

**Caractérisation des effets de
l'uranium chez le poisson zèbre
Danio rerio
*Mécanismes de stress, neurotoxicité et
métabolisme mitochondrial***

Adélaïde LERBOURS
Décembre 2009
ISRN/IRSN-2010/127

Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie

THESE

UNIVERSITE DE PROVENCE - AIX-MARSEILLE I

Ecole doctorale
SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT ED 251

Pour l'obtention du diplôme de
Docteur de l'Université de Provence Mention Sciences

Spécialité
Environnement et Santé

Adélaïde LEREBOURS

Caractérisation des effets de l'uranium chez le poisson zèbre *Danio rerio*
Mécanismes de stress, neurotoxicité et métabolisme mitochondrial

Thèse dirigée par Jacqueline GARNIER-LAPLACE et Jean-Paul BOURDINEAUD

Devant le jury d'examen composé de :

Dr. Patrice CATTY	Chercheur CEA	Rapporteur
Dr. Jean-Marc PORCHER	Chercheur INERIS	Rapporteur
Pr. Rémi CHAPPAZ	Professeur Université Aix Marseille I	Examineur
Dr. Daniel BRETHERS	CR1 CNRS Université Bordeaux II	Examineur
Pr. Jean-Paul BOURDINEAUD	Professeur Université Bordeaux I	Co-directeur de thèse
Dr. Christelle ADAM-GUILLERMIN	Chercheur IRSN	Tuteur de thèse

«Un plan, quand il apparaît à l'esprit, le séduit et le captive. Il est tout lumière, ordre et nouveauté, puis, lorsque vient l'heure d'exécution et de travail, lorsqu'il faut ranger dans le cadre et dans les lignes régulières qu'il présente, la masse brute et informe des matériaux amassés, alors commence l'épreuve décisive [...] le passage d'une conception abstraite à une œuvre effective.»

Emile Littré

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury. Je remercie Mr Jean-Marc Porcher et Mr Patrice Catty d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je souhaite aussi remercier Mr Rémi Chappaz et Mr Daniel Brèthes d'avoir accepté d'être examinateurs.

J'adresse une grande reconnaissance à ma directrice de thèse Mme Jacqueline Garnier-Laplace qui m'a soutenue dans les choix importants qui ont jalonné ma thèse.

Je remercie mon co-directeur de thèse Mr Jean-Paul Bourdineaud pour les discussions scientifiques constructives me conduisant à la réflexion nécessaire pour mener à bien mes travaux de recherche.

Je remercie Mme Christelle Adam-Guillermin pour la qualité de son encadrement et sa gentillesse.

J'adresse mes remerciements à Mr Jean-Charles Massabuau pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe GEMA dans le cadre de la collaboration. Je remercie notamment Mr Patrice Gonzalez pour m'avoir appris avec une grande rigueur des expériences de biologie moléculaire depuis mon stage de master et pour son implication dans le comité de pilotage de thèse.

Je remercie également Daniel Brèthes pour son accueil à l'Institut de Biochimie et Génétiques Cellulaires et le temps précieux consacré à la découverte de la biochimie des mitochondries de zèbres uranifères.

Je remercie Wim DeCoen pour m'avoir accueillie au laboratoire d'Anvers. Je remercie Tine et Karlijn pour leur attention lors des expériences, le travail dans une ambiance étudiante agréable et efficace ainsi que pour leur confiance.

J'adresse mes remerciements à Virginie Camilleri, Isabelle Cavallié et Magali Floriani pour leur aide conséquente lors des dissections, dosages et observations microscopiques.

Merci à Daniel Orjollet, Sylvie Pierrisnard, Frédéric Coppin, Rodolphe Gilbin, Laureline Février et Sandrine Frelon pour leur contribution.

Je remercie Tom Hinton pour les corrections en anglais et ses suggestions scientifiques.

Merci à Catherine pour sa sympathie lors du séjour en Belgique.

Je remercie Claudine pour les nombreux dossiers traités.

Je remercie chaleureusement Starrlight Augustine pour les bons moments d'évasion passés et ses conseils, et Sandrine Pereira pour son aide précieuse et efficace ainsi que pour ses encouragements. Je remercie également Béatrice et Olivier Herlory pour leurs conseils. Merci aussi à Sandrine, Nicolas et Jérôme pour leur sympathie.

Un grand merci également à l'équipe GEMA à Arcachon pour son accueil sympathique. Merci aux étudiants pour les bons moments passés et à Sébastien pour ses explications et discussions intéressantes.

Enfin j'adresse un grand remerciement à ma famille, mes amis et mes proches pour leur soutien inestimable et leur grande confiance, ainsi que pour la relecture du manuscrit.

Résumé

Ces travaux de thèse s'insèrent dans le cadre général de l'étude des effets biologiques de l'uranium chez le poisson zèbre *Danio rerio* exposé par voie directe à de faibles concentrations d'uranium (20 et 100 µg/L).

Lors d'une première expérience de contamination de 28 jours suivie d'une phase de dépuración de 8 jours, l'étude des profils d'expression de 20 gènes impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires a permis d'identifier la nature des effets potentiels d'une exposition à l'uranium dans quatre organes, le cerveau, le foie, les muscles et les branchies, en relation avec la bioaccumulation de l'uranium. Le foie et les branchies accumulent de fortes concentrations d'uranium et sont le siège d'une dépuración efficace alors que l'inverse est observé pour les muscles et le cerveau. L'exposition à l'uranium induit une réponse tardive dans le foie (inflammation, apoptose et détoxification) et les branchies (balance oxydative) et à l'opposé, une réponse précoce est observée dans le cerveau (réponse neuronale) et les muscles (métabolisme mitochondrial). Le cerveau et les muscles apparaissent donc comme des organes sensibles pour lesquels les capacités de défense sont dépassées au-delà de concentrations tissulaires faibles.

Une étude plus approfondie a porté sur ces deux organes, en termes d'altération fonctionnelle et protéique du métabolisme mitochondrial. Une altération du couplage énergétique de la chaîne respiratoire pour les faibles doses, une variation du contenu protéique (induction des sous-unités I et IV de la cytochrome *c* oxydase) ainsi que des dommages histologiques (dilatation et vacuolisation du tissu musculaire) sont observés. Une autre étude s'est focalisée sur le cerveau et les effets précoces d'une exposition à l'uranium à travers l'analyse des perturbations transcriptionnelles et de l'ultrastructure du bulbe olfactif. Une répression de gènes codant pour les récepteurs de l'olfaction *or111-7* et *or102-5* est observée dès 3 jours d'exposition à la plus faible concentration. Ces réponses et les lésions histologiques observées suggèrent que le système olfactif serait sensible à une exposition à l'uranium.

Mots clés: Poisson zèbre *Danio rerio*, uranium, bioaccumulation, mécanismes de stress, système nerveux central, voie olfactive, bioénergétique mitochondriale, histopathologies.

Abstract

This research explored several biological effects of uranium (U) in zebrafish exposed to low waterborne uranium concentrations (20 and 100 $\mu\text{g/L}$).

In tissue specific study (brain, liver, skeletal muscles and gills) of transcriptional responses in 20 genes identified the nature of the potential U effects during 28 days of exposure followed by an 8-day depuration phase in connection with U bioaccumulation. Liver and gills accumulate high concentrations of U and the depuration is efficient contrary to the brain and muscles. U exposure induced a later response in liver (inflammatory process, apoptosis and detoxification) and gills (oxidative balance) and an early one in brain (neuronal response) and muscles (mitochondrial metabolism). Brain and muscles appear sensitive since defence mechanisms are inefficient above low concentrations.

A further study on these two organs examined the function and protein content of the respiratory mitochondrial chain following U exposure. An inhibition of the respiratory control ratio for the lowest concentration, variation in the protein synthesis of the complex IV (induction of cytochrome *c* oxydase sub-unit I and IV) and histological damage (dilatation in brain and vacuolization in muscles) were observed. Another study focused on the early effects on the brain and was accomplished through a large transcriptional analysis coupled with examinations of the olfactory bulb ultrastructure. A depression of genes encoding olfactory receptor *or111-7* and *or102-5* was observed as rapidly as 3 days post-exposure to the lowest concentration of U. These responses and histological injuries suggest that the olfactory system could be sensitive to U exposure.

Key words: Zebrafish *Danio rerio*, uranium, bioaccumulation, stress mechanisms, central nervous system, olfactory pathway, mitochondrial energy metabolism, histopathology.

Publications

Lerebours A., Gonzalez P., Adam C., Camilleri V., Bourdineaud J.-P., and Garnier-Laplace J. Comparative Analysis Of Gene Expression in Brain, Liver, Skeletal Muscles, and Gills Of Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to Environmentally Relevant Waterborne Uranium Concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2009, 28, 1271-1278.

Lerebours A., Bourdineaud J.-P., Van der Ven K., Vandembrouck T., Gonzalez P., Camilleri V., Floriani M., Garnier-Laplace J. and Adam-Guillermin C. Sub-lethal effects of waterborne uranium exposures on the zebrafish brain : transcriptionnal responses and alterations of the olfactory bulb ultrastructure. *Environmental Science and Technology*. 2010, 44, 1438-1443.

Lerebours A., Adam-Guillermin C., Brèthes D., Frelon S., Camilleri V., Floriani M., Garnier-Laplace J. and Bourdineaud J.-P. Assessment of mitochondrial energy metabolism impairments in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low waterborne uranium concentrations. En préparation.

Communications orales

Lerebours A., Adam C., Camilleri V. and Garnier-Laplace J.
Toxicity mechanisms of uranium: from gene to tissular response of the zebrafish *Danio rerio*. Annual Main Meeting of the Society for Experimental Biology, 6-10 July 2008, Marseille, France.

Lerebours A., Gonzalez P., Adam C., Camilleri V., Bourdineaud J.-P., and Garnier-Laplace J. Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles and gills of the zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant uranium water concentrations. 5th SETAC World Congress, 3-7 August 2008, Sydney, Australia.

Lerebours., A. Mécanismes de toxicité de l'uranium chez le poisson zèbre *Danio rerio*. 16ème congrès de l'Ecole Doctorale des Sciences de l'Environnement. 30-31 Mars 2009, Marseille, France. Prix de la meilleure présentation.

Communication par affiche

Lerebours A., Gonzalez P., Adam C., Camilleri V., Bourdineaud J.-P., and Garnier-Laplace J. Gene response of the zebrafish exposed to waterborne uranium. SETAC Europe 18th Annual Meeting, 25-29 May 2008, Warsaw, Poland.

Sommaire

Liste des tableaux	1
Liste des figures	2
Liste des abréviations.....	3
Introduction	6
Chapitre I : Etat de l'art sur l'uranium et l'environnement.....	10
A. Uranium	12
A. 1 Propriétés.....	12
A. 1. a) Propriétés chimiques	12
A. 1. b) Propriétés physiques	13
A. 2 Distribution environnementale	17
A. 1. a) Origine et distribution naturelle	17
A. 1. b) Impact anthropique.....	19
B. Interactions uranium-organismes.....	21
B. 1 Biodisponibilité	21
B. 2 Bioaccumulation	22
B. 3 Dépuration	24
C. Effets biologiques de l'uranium	25
C. 1 Au niveau de l'organisme et des tissus.....	25
C. 1. a) Critères létaux.....	25
C. 1. b) Reproduction et jeunes stades de vie.....	27
C. 1. c) Lésions observées	28
C. 2 Toxicité de l'uranium	29
C. 2. a) Génotoxicité	29
C. 2. b) Neurotoxicité.....	31
C. 2. c) Néphrotoxicité	32
C. 3 Altération des grandes fonctions cellulaires	34
C. 3. a) Balance oxydative.....	34
C. 3. b) Mécanismes de détoxification	37
C. 3. c) Mort cellulaire	39

Chapitre II : Objectifs et stratégies expérimentales du programme de recherche	42
A. Concentrations en uranium.....	44
B. Paramètres biologiques.....	44
C. Choix du modèle biologique : le poisson zèbre <i>Danio rerio</i>	46
C. 1 Biologie et écologie	46
C. 2 Intérêt du modèle	47
D. Choix des organes et tissus	48
D. 1 Les branchies	48
D. 2 Le cerveau	49
D. 3 Les muscles	53
D. 4 Le foie.....	56
E. Voies moléculaires de stress étudiées.....	57
E. 1 L'expression de gènes-cibles	57
E. 2 La réponse transcriptionnelle globale	60
E. 3 Le métabolisme mitochondrial	60
E. 4 L'ultrastructure cellulaire	62
F. Objectifs	63
Chapitre III : Matériels et Méthodes.....	66
A. Conditions expérimentales	68
A. 1 Maintenance des organismes.....	68
A. 1. a) Description générale.....	68
A. 1. b) Eau artificielle	69
A. 1. c) Dispositif expérimental	71
A. 1. d) Contrôle des paramètres.....	71
A. 2 Conditions d'exposition.....	72
A. 2. a) Concentrations.....	72
A. 2. b) Procédure de contamination.....	72
A. 2. c) Prélèvement et dissections	73
B. Bioaccumulation	73
C. Expression de gènes.....	74
C. 1 PCR quantitative en temps réel	74
C. 1. a) Extraction des ARNs	74
C. 1. b) Obtention des ADNc	74

C. 1. c) Amplification.....	74
C. 2 Puce à ADN.....	77
C. 2. a) Extraction des ARNs	78
C. 2. b) Marquage.....	79
C. 2. c) Hybridation.....	79
C. 2. d) Analyse bioinformatique	81
D. Bioénergétique mitochondriale	82
D. 1 Oxygraphie	82
D. 1. a) Préparation des fibres musculaires	82
D. 1. b) Préparation des cerveaux.....	82
D. 1. c) Mesures de respiration mitochondriale	83
D. 1. d) Activité de la cytochrome <i>c</i> oxydase	85
D. 2 Analyse du contenu protéique	85
D. 2. a) Traitement des protéines	85
D. 2. b) Transferts Western	86
E. Observations microscopiques.....	87
F. Statistiques	87

Chapitre IV : Effets de l'uranium sur l'expression de gènes impliqués dans différentes voies moléculaires de stress cellulaire au niveau de 4 organes-clés chez *Danio rerio* 90

Introduction 92

Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles and gills of the zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant waterborne uranium concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2009, 28, 1271-1278. 96

Principales avancées et conclusion..... 122

Chapitre V : Etude des effets précoces de l'uranium sur le cerveau : voies moléculaires affectées et dommages au niveau de l'ultrastructure du bulbe olfactif.....	126
Introduction	128
Sublethal effects of waterborne uranium exposures on the zebrafish brain: transcriptional responses and alterations of the olfactory bulb ultrastructure. <i>Environmental Science and Technology</i> . 2010, 44, 1438-1443.	132
Principales avancées et conclusion.....	158
Chapitre VI : Evaluation des effets de l'uranium sur le métabolisme énergétique mitochondrial dans le cerveau et les muscles du poisson zèbre	162
Introduction	164
Assessment of mitochondrial energy metabolism impairments in skeletal muscles and brain of zebrafish (<i>Danio rerio</i>) exposed to low concentrations of waterborne uranium. <i>In preparation</i>	166
Principales avancées et conclusion.....	191
Chapitre VII : Discussion générale et perspectives.....	196
Références	216

Liste des tableaux

Tableau 1 : Activité des différents isotopes de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri calculée à partir de la composition isotopique détaillée ci-dessus.	14
Tableau 2 : Composition isotopique en masse de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri à 0,2% en ²³⁵ U (Weigel, 1986, WHO, 2001).	16
Tableau 3 : Concentrations mesurées dans l'eau de consommation humaine issue de puits..	18
Tableau 4 : Valeurs des doses létales d'uranium à 96 h d'exposition pour lesquelles 50% de la mortalité est constatée (LC ₅₀ 96 h) chez différentes espèces de poissons. La dureté, l'alcalinité, et le pH de l'eau sont rapportés selon les références associées.....	26
Tableau 5 : Classification du poisson zèbre <i>Danio rerio</i>	46
Tableau 6 : Récapitulatif des paramètres étudiés selon les objectifs du programme de recherche.	64
Tableau 7 : Composition de l'eau synthétique utilisée dans les expériences (pH = 6,4 pCO ₂ atm).....	69
Tableau 8 : Symboles des gènes, numéros d'accension et séquences des amorces correspondantes utilisées dans l'expérience 1.....	75
Tableau 9 : Composition du « tampon A ».	82
Tableau 10 : Composition du « tampon de respiration cerveau ».	82
Tableau 11 : Composition du « tampon de respiration muscles ».	84
Tableau 12 : Description des réplicats analysés au cours des trois expériences.....	88

Liste des figures

Figure 1 : Chaînes de désintégration de l' $^{238}\text{U}/^{234}\text{U}$ et de l' ^{235}U (Morello <i>et al.</i> , 2001).	15
Figure 2 : a) Production mondiale d'uranium en 2008 en tonnes par pays b) Résidus miniers d'uranium recensés dans le monde en millions de tonnes d'uranium par pays (d'après la banque de données de World Nuclear Association).....	21
Figure 3 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire (d'après Favier, 2003).....	29
Figure 4 : Schéma de la balance anti-oxydants/pro-oxydants représentant un stress oxydant.	34
Figure 5 : Cycle de vie du poisson zèbre.	47
Figure 6 : Description anatomique du cerveau du poisson zèbre en vue dorsale (d'après Neuroanatomy of the Zebrafish Brain, 1996).	49
Figure 7 : Représentation schématique de l'anatomie cellulaire du système olfactif périphérique et de l'organisation neuronale dans le bulbe olfactif d'un téléostéen (d'après The Laboratory Fish, 2000).	51
Figure 8 : Images de cellules olfactives réceptrices ciliées (A et B) et à microvillosités (C et D) de la truite arc-en-ciel <i>Oncorhynchus mykiss</i> (d'après The Laboratory Fish, 2000).	51
Figure 9 : Image d'une rosette olfactive du poisson rouge <i>Carassius auratus</i> montrant les arrangements en lamelle de l'épithélium olfactif (d'après The Laboratory Fish, 2000).....	52
Figure 10 : Identification des muscles blancs et rouges chez la carpe selon les vues : latérale (a) dorsale (b) et transversale (c) (d'après The Laboratory Fish, 2000).	54
Figure 11 : Schéma d'une cellule musculaire (Histologie fonctionnelle, 2001).	55
Figure 12 : Description d'un sarcomère, unité des myofibrilles (Histologie fonctionnelle, 2001).....	56
Figure 13 : Schéma du fonctionnement du système cholinergique (d'après Soreq et Seidman, 2001).....	1
Figure 14 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale.	62
Figure 15 : Spéciation théorique de l'uranium dans l'eau artificielle utilisée (20 $\mu\text{g U/L}$, pCO_2 atm) réalisée à partir de la banque de données de Denison et Garnier-Laplace (2003) avec le logiciel JCHESS.....	70
Figure 16 : Dispositif expérimental.....	71
Figure 17 : Programme des cycles avec les appareils a) LightCycler et b) Mx3005P.	77
Figure 18 : Système de dépôt des spots sur les lames.....	78
Figure 19 : Chambre d'hybridation.....	80
Figure 20 : Lavage des lames.....	80
Figure 21 : Chambre de respiration.....	83
Figure 22 : Profil oxygraphique.	84
Figure 23 : Synthèse des principaux résultats obtenus.....	199

Liste des abréviations

A

aa aminoallyl
ABC ATP Binding Cassette
abcb1 ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 3 like 1
ache acetylcholinesterase
ADN Acide Désoxyribonucléique
ADNc Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ADP Adénosine 5'-diphosphate
ARN Acide Ribonucléique
ARNm Acide Ribonucléique messenger
Asc Ascorbate
atp1a1a.4 ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, alpha 1a.4 polypeptide
atp5a1 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1
atp5f1 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1
ATP Adénosine 5'-triphosphate
ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease Registry

B

bax bcl2-associated X protein
BSA Bovine Serum Albumin

C

cat catalase
CCCP carbonyl cyanide m-chloro-phenyl hydrazone
cd11b integrin alpha-M precursor
chat choline acetyltransferase
cox1 cytochrome *c* oxydase subunit I
cox4i1 cytochrome *c* oxydase subunit IV
cyp3c1l2 cytochrome P450, family 3, subfamily c, polypeptide 1 like 2
cytP450 cytochrome P450
Cy Cyanine

D

DCE Directive Cadre européenne sur l'Eau
 $\Delta\Delta C_t$ delta-delta threshold cycle
dATP désoxyadénosine triphosphate
dCTP désoxycytidine triphosphate
dGTP désoxyguanosine triphosphate
dNTP désoxynucléotide triphosphate
DMT1 Divalent Metal Transporter 1
dTTP désoxyribosylthymine 5'-triphosphate
dUTP désoxyuracil triphosphate
DU Depleted Uranium

E

EDTA éthylène-diamine-tétraacétate
EDX Energy Dispersive X-ray

Euratom European Atomic Energy Community
EGTA éthylèneglycol-bis(2-aminoéthyl)-tétraacétate
EI Espace Intermembranaire
ERICA Environmental Risk for Ionising Contaminants: Assessment and Management
ERO Espèces Réactives de l'Oxygène

G

gadd45b growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
gfap glial fibrillary acidic protein
gls1 glutaminase like
GO Gene Ontology
gpx1a glutathione peroxidase 1a
gstp1 glutathione-S-transferase pi

H

hspb1 heat shock protein, alpha-crystallin-related 1

I

ICP-MS Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
ICP-AES Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy
il1b interleukine 1 beta
ISO International Organization for Standardization

L

LC₅₀ 96h Lethal Concentration yielding to 50% of mortality after 96h of exposure

M

MDR MultiDrug Resistance
MET Microscope Electronique à Transmission
mt-cyb cytochrome b, mitochondrial
MXR MultiXenobiotic Resistance

N

NAD Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH forme réduite du NAD⁺
ncam3 neural cell adhesion molecule 3
ndfus3 NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, (NADH-coenzyme Q reductase)
NHS-ester N-hydroxysuccinimide-ester

O

OCDE Organisation for Economic Cooperation and Development
OMP Olfactory Marker Protein
or111-7 odorant receptor, family D, subfamily 111, member 7
or102-5 odorant receptor, family C, subfamily 102, member 5
or107-1 odorant receptor, family D, subfamily 107, member 1

P

PCR Polymerase Chain Reaction
PCRD Programme Cadre de Recherche et Développement

R

rad51 RAD51 homolog

REACH Registration, Evaluation, Authorisations and Restriction of Chemicals

S

SAGE Serial Analyses Gene Expression

sdhb succinate dehydrogenase complex, subunit B

SNC Système Nerveux Central

sod1 superoxydedismutase soluble

sod2 superoxydedismutase mitochondriale

SSC Saline Sodium Citrate

SDS Sodium DodecylSulfate

SDS-PAGE Sodium DodecylSulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

T

TAP Transporter in Antigene Processing

TMPD tetramethylphenylenediamine

U

U Uranium

UA Uranium Appauvri

UN Uranyle Nitrate

V

vchat vesicular acetylcholine transporter

W

WHO World Health Organization

Introduction

Les écosystèmes sont depuis longtemps menacés par les activités humaines. La contamination des différents compartiments de l'environnement est une préoccupation majeure pour la société et en particulier pour la communauté scientifique. L'augmentation des pressions anthropogéniques constitue un risque potentiel pour la biocénose. Une des principales problématiques posées en écotoxicologie est le devenir des polluants dans l'environnement et leurs effets sur les organismes.

La préoccupation européenne pour la préservation de l'environnement aquatique et l'entrée de nouvelles substances chimiques potentiellement toxiques sur le marché a fait l'objet de plusieurs projets. En 2000, l'Europe a adopté la Directive Cadre sur l'Eau (DCE). L'objectif général vise à atteindre un bon état écologique des eaux en 2015. Cette directive vise notamment à « renforcer la protection de l'environnement aquatique ainsi qu'à l'améliorer » (Article 1). Le règlement européen REACH (Registration, Evaluation, Authorisations and Restriction of Chemicals) adopté en 2006 et rentré en vigueur en juin 2007 vise à améliorer la connaissance des usages et propriétés des substances chimiques fabriquées ou importées dans l'union européenne, assurer la maîtrise des risques liés à leurs usages, et restreindre ou interdire leur emploi en cas de besoin. Le développement de méthodes d'évaluation du risque environnemental lié à la présence de radionucléides dans l'environnement a également fait l'objet de programmes européens comme le projet ERICA (Environmental Risk for Ionising Contaminants : Assessment and Management) en 2004 (6^{ème} PCRD, Euratom, 2004-2007).

Les polluants introduits de façon accidentelle ou chronique dans l'environnement, se dispersent dans l'air, le sol et l'eau. En outre, les processus de transport, lixiviation ou érosion d'un bassin versant contribuent à l'augmentation des concentrations de polluants dans l'eau.

Ces concentrations dans les écosystèmes aquatiques constituent un risque potentiel pour les organismes.

Les substances radioactives font partie des contaminants de l'environnement. Parmi elles, l'uranium est essentiellement caractérisé par son pouvoir chimiotoxique plutôt que par son pouvoir radiotoxique qui est plus faible. Les rejets d'uranium dans l'environnement ont principalement pour origine l'industrie nucléaire (extraction minière, stockage de résidus miniers, accidents de centrale et déchets issus des différentes étapes du cycle du combustible), l'activité militaire et l'agriculture. Dans ce contexte, le programme ENVIRHOM lancé en 2001 par l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (Garnier-Laplace et Paquet, 2001), vise à caractériser les effets biologiques des substances radioactives (dont l'uranium) chez l'homme et dans l'environnement lors d'expositions chroniques à faibles doses.

Le poisson peut représenter un intérêt halieutique ou patrimonial (poissons migrateurs). C'est un organisme intégrateur situé en fin de chaîne trophique. Le poisson fait l'objet de nombreuses études en écotoxicologie aquatique. Certains sont étudiés en tant qu'espèces sentinelles car ils sont le reflet de la qualité de leur environnement.

Jusqu'à présent les études menées sur les effets de l'uranium sur le poisson ont porté sur la bioaccumulation et/ou la distribution de l'élément dans l'organisme (Poston, 1982, Swanson, 1985, Cooley et Claverkamp, 2000) ou des tests de toxicité aiguë (Parkhurst *et al.*, 1984, Bywater *et al.*, 1991, Holdway, 1992). Les effets de l'uranium sur la survie, la croissance et la reproduction du poisson ont été récemment étudiés (Bourrachot, 2009). Une exposition à l'uranium peut induire des dommages au niveau de l'ultrastructure gonadique (Bourrachot, 2009), branchiale ou musculaire (Barillet, 2007). Le pouvoir génotoxique de l'uranium a également été décrit (Buet *et al.*, 2005, Barillet *et al.*, 2007, Bourrachot, 2009). Enfin, l'uranium est susceptible de perturber la balance oxydative et la transmission cholinergique (Barillet, 2007). Les derniers travaux ont contribué à l'apport de nouvelles

connaissances concernant les effets de l'uranium chez le poisson, cependant, les modes d'action toxiques de l'uranium sont relativement peu explorés.

Dans ce contexte, notre travail de recherche a consisté à approfondir les réponses moléculaires étudiées précédemment et à acquérir de nouvelles connaissances sur les mécanismes susceptibles d'être affectés par une contamination à l'uranium chez le poisson zèbre *Danio rerio*.

Nos premiers travaux ont visé à déterminer la spécificité des réponses moléculaires dans différents tissus-cibles chez le poisson zèbre. Ensuite, la deuxième étude a consisté à approfondir ces réponses dans le cerveau, identifié comme l'un des organes les plus sensibles lors de la première expérimentation et à caractériser les atteintes sur l'ultrastructure. La dernière partie de notre programme de recherche a consisté à évaluer de façon plus précise les effets de l'uranium sur la chaîne respiratoire mitochondriale et l'ultrastructure cellulaire dans le cerveau et les muscles du poisson.

Le document présente en premier lieu un état de l'art sur l'uranium et l'environnement, les choix et stratégies adoptés ainsi que les matériels et méthodes employés. Les résultats sont ensuite présentés et discutés dans les chapitres IV, V et VI. Enfin, la partie finale du document présente une discussion générale et les perspectives de recherche issues du travail de thèse.

Chapitre I : Etat de l'art sur l'uranium et l'environnement

A. Uranium

L'uranium a été découvert en 1789 par le chimiste M. H. Klaproth dans un minéral appelé pechblende. Il le baptisa uranium à la suite de la découverte 8 ans plus tôt de la planète Uranus. L'élément fut utilisé à cette époque dans la coloration du verre et de la porcelaine. En 1896, Henri Becquerel découvrit la radioactivité en laissant les sels d'uranium sur une plaque photographique.

A. 1 Propriétés

A. 1. a) Propriétés chimiques

Généralités

L'uranium est l'élément le plus lourd existant à l'état naturel. De numéro atomique $Z = 92$, l'uranium est un élément chimique radioactif appartenant à la famille des actinides (famille comprenant quinze éléments, de l'actinium $Z = 89$ au lawrencium $Z = 103$) (Ribera *et al.*, 1996, Madic et Genet, 2001). Sa densité est élevée, i.e. 19 g/cm^3 , un peu plus faible que le tungstène mais beaucoup plus forte que le plomb ($11,3 \text{ g/cm}^3$) (ATSDR, 1999). L'uranium peut adopter quatre états de valence associés aux formes ioniques suivantes : U^{3+} (+III), U^{4+} (+IV), UO_2^+ (+V) et UO_2^{2+} (+VI) (Ribera *et al.*, 1996).

En milieu aquatique

Dans l'eau, l'uranium est retrouvé en conditions oxydantes sous la forme soluble de valence +VI (Colle *et al.*, 2001, Sheppard *et al.*, 2005). L'ion uranyle UO_2^{2+} est l'espèce dominante dans les eaux de surfaces en milieu oxydant jusqu'à $\text{pH} = 6$. Des complexes stables de l'ion uranyle avec des carbonates, des phosphates et des sulfates peuvent facilement se former. Au-delà apparaissent les formes hydroxylées ($\text{UO}_2(\text{OH})_2$) puis, pour des pH supérieur à 8, les formes carbonatées ($\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$) (Colle *et al.*, 2001). La spéciation de l'uranium en eau douce est influencée par le pH et le potentiel d'oxydoréduction, mais aussi par la concentration en ligands organiques (Colle *et al.*, 2001). La dureté et l'alcalinité sont également des paramètres influant sur la spéciation de l'uranium. En conditions réductrices l'uranium est présent sous la forme très peu soluble de valence +IV (Sheppard *et al.*, 2005).

A. 1. b) Propriétés physiques

L'uranium naturel

L'uranium naturel se compose de trois isotopes ^{234}U , ^{235}U , et ^{238}U représentant respectivement 0.0054%, 0.72%, et 99.27% de la masse de l'élément (WHO, 2001). Ces isotopes se désintègrent principalement par émission d'un rayonnement α (noyau d'He) pour aboutir aux isotopes stables de plomb ^{206}Pb et ^{207}Pb (**Figure 1**). L' ^{235}U , et l' ^{238}U existent depuis l'origine de la terre et l' ^{234}U est un produit de la chaîne de décroissance de l' ^{238}U (**Figure 1**). Ces trois isotopes ont les mêmes propriétés chimiques, cependant leurs propriétés radioactives diffèrent (ATSDR, 1999). Les demi-vies des radio-isotopes d'uranium sont de $2,44 \times 10^5$ années pour l' ^{234}U , $7,1 \times 10^8$ années pour l' ^{235}U , et de $4,5 \times 10^9$ années pour l' ^{238}U . Plus la demi-vie est longue, moins la radioactivité est importante (Soit n la demi-vie et A l'activité, $A = A_0/2^n$). L' ^{234}U est donc l'élément le plus radioactif et l' ^{238}U le moins radioactif. En considérant l'uranium naturel, 48,9%, 2,2%, et 48,9% de la radioactivité est associée à l' ^{234}U , l' ^{235}U , et l' ^{238}U respectivement (**Tableau 1**). L'activité spécifique de l'uranium naturel

est de 25300 Bq/g. De ce fait, l'uranium naturel peut être considéré comme un élément faiblement radioactif. L' ^{235}U est le seul isotope naturel fissile susceptible de fournir une grande quantité d'énergie (plus d'un million de fois supérieure à celle des combustibles fossiles). Sa fission libère une énergie de 200 MeV. Dans le domaine industriel, l'uranium enrichi en ^{235}U est le combustible des réacteurs nucléaires. Les propriétés de fission de l' ^{235}U ont également été exploitées à des fins militaires (bombe A).

Tableau 1 : Activité des différents isotopes de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri calculée à partir de la composition isotopique détaillée ci-dessus.

	^{238}U	^{235}U	^{234}U
Activité spécifique (Bq/g)	$1,24 \cdot 10^4$	$8,00 \cdot 10^4$	$2,30 \cdot 10^8$
Activité uranium naturel (%)	48,6	2,3	49,1
Activité uranium appauvri (%)	88,9	1,1	9,9

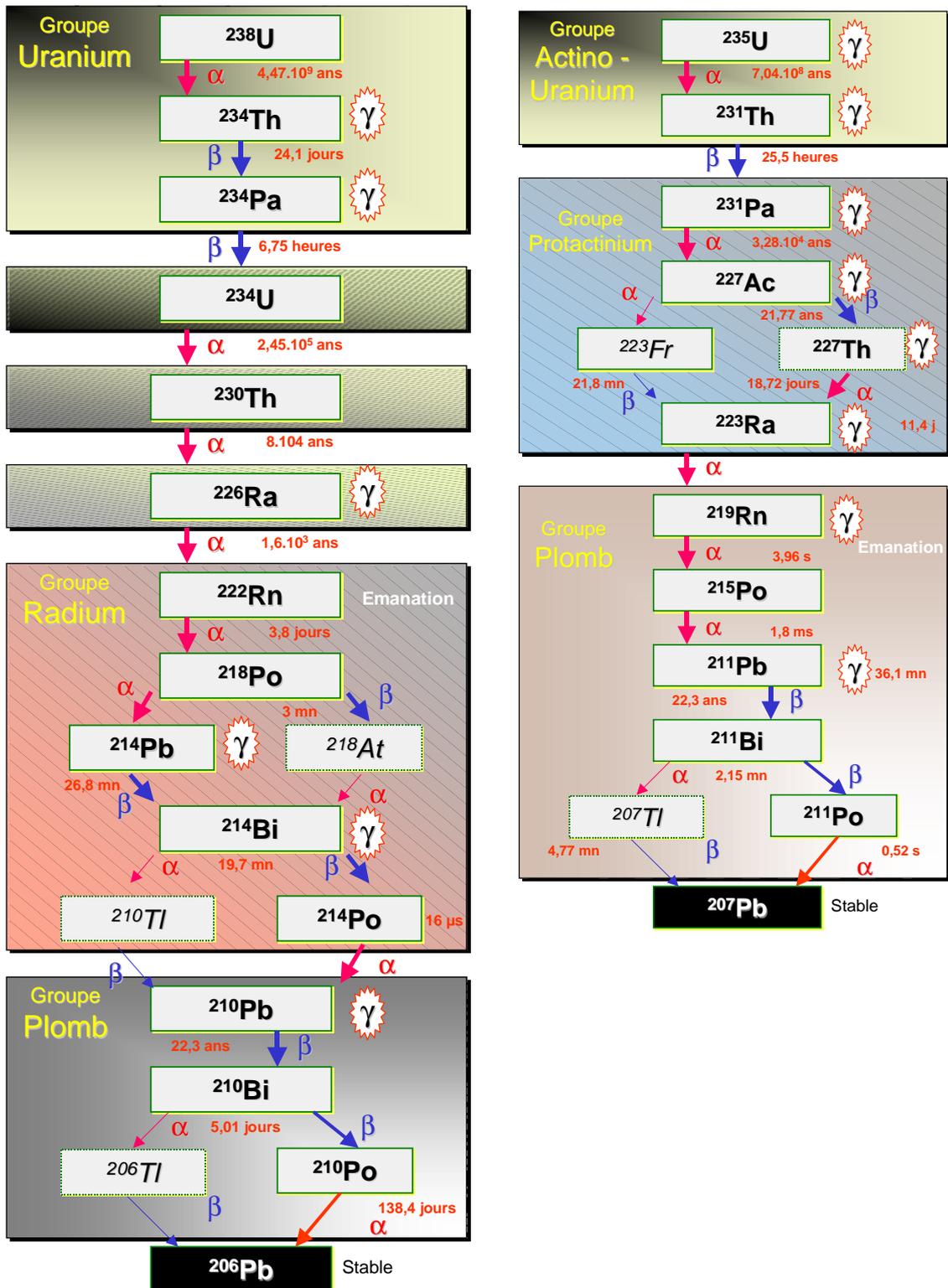


Figure 1 : Chaînes de désintégration de l' $^{238}\text{U}/^{234}\text{U}$ et de l' ^{235}U (Morello *et al.*, 2001).

L'uranium appauvri

L'uranium appauvri est un sous-produit du processus d'enrichissement de l'uranium naturel (WHO, 2001). Pour 1 kg d'uranium enrichi, 5 kg d'uranium appauvri sont produits (Bem et Bou-Rabee, 2004). L'uranium appauvri se caractérise par une teneur plus faible en ^{235}U (0,2 à 0,3%) et en ^{234}U . Sa composition usuelle est de 0,0006% pour l' ^{234}U , 0,2% à 0,3% pour l' ^{235}U , et de 99,8% pour l' ^{238}U (**Tableau 2**). L'uranium appauvri (à 0,2% en ^{235}U) a une activité spécifique de 14000 Bq/g représentant approximativement 60% de celle de l'uranium naturel (25300 Bq/g) (WHO, 2001, Bleise *et al.*, 2003). L'uranium appauvri présente des propriétés intéressantes. Dense, résistant et pyrophorique au-delà de 600°C, il est utilisé à des fins militaires dans la fabrication des armes. Il confère une grande efficacité de perforation aux munitions et une meilleure résistance des chars aux attaques (Bleise *et al.*, 2003, Bem et Bou-Rabee, 2004). Disponible et peu coûteux, l'uranium appauvri est également employé dans le domaine industriel. Il est utilisé dans la fabrication des écrans de protection contre les rayonnements, des volets et gouvernes de direction d'avions et des quilles de voiliers (Bleise *et al.*, 2003).

Tableau 2 : Composition isotopique en masse de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri à 0,2% en ^{235}U (Weigel, 1986, WHO, 2001).

	^{238}U	^{235}U	^{234}U
Uranium naturel	99,270	0,7200	0,0054
Uranium appauvri	99,800	0,2000	0,0006

A. 2 Distribution environnementale

A. 1. a) Origine et distribution naturelle

Les roches

L'uranium est un élément naturel présent dans les roches, le sol et l'eau. La croûte terrestre renferme l'essentiel du stock d'uranium de la terre (46 à 77%) (Bonin et Blanc, 2001), à une abondance moyenne d'environ 2 à 4 mg/kg (Ribera *et al.*, 1996, Bonin et Blanc, 2001, WHO, 2001). Au cours des processus géologiques naturels, notamment lors de la formation du manteau terrestre, l'uranium s'est concentré préférentiellement dans la phase liquide et s'est incorporé avec les produits riches en silice. Les roches ignées comme les granites contiennent ainsi plus d'uranium. L'érosion des roches ignées a contribué à la dispersion de l'élément dans l'environnement terrestre à l'échelle des temps géologiques, et, plus particulièrement, dans les roches sédimentaires où il est principalement associé à la matière organique et aux phosphates (WHO, 2001). L'uranium entre dans la composition d'au moins 200 minéraux. Il peut être le composant essentiel de certains minéraux rares, ou un élément de substitution dans des minéraux communs. Il peut être adsorbé sur la surface des minéraux (oxy-hydroxydes de fer ou argiles), associé à la matière organique ou dissous dans les eaux interstitielles (Bonin et Blanc, 2001).

Le sol

La concentration moyenne en uranium dans les sols est d'environ 1,8 mg/kg, avec des valeurs comprises entre 0,5 et 5 mg/kg. Des mécanismes vont contribuer à la répartition de l'uranium dans les sols. Certains sont intrinsèques aux propriétés du sol (granulométrie, composition et concentration en matière organique), d'autres dépendent des propriétés du radioélément (forme chimique) ou encore des conditions environnementales. Ainsi, quatre mécanismes sont principalement responsables de la répartition de l'uranium dans les sols : le

transport par l'eau (lixiviation), la diffusion, le transport biologique (plantes, microorganismes, insectes), et la dispersion par le vent et la pluie (Ribera *et al.*, 1996).

Les sédiments

La capacité des sédiments à fixer l'uranium est considérable. Cette fixation dépend de la granulométrie ; les plus grandes quantités d'uranium sont retrouvées dans les fractions granulométriques les plus fines, de diamètre inférieur à 50 µm. Dans l'environnement, les sédiments ont un rôle de stockage de l'élément (Ribera *et al.*, 1996).

L'eau

Les sources hydrothermales représentent une des principales sources d'uranium (Ribera *et al.*, 1996). Dans les eaux douces, les concentrations sont très variables, de 0,01 µg/L à plus de 1,5 mg/L et sont le reflet des abondances naturelles en uranium dans les roches et les sols environnants. Plusieurs études ont rapporté des concentrations en uranium élevées dans l'eau de consommation humaine au niveau de puits (**Tableau 3**). Les eaux souterraines se chargent en minéraux et notamment en uranium au contact des dépôts géologiques. Les concentrations mesurées peuvent être nettement supérieures à la valeur recommandée par l'organisation mondiale de la santé dans l'eau de consommation humaine, qui est de 15 µg/L (WHO, 2004). Dans l'eau de mer, les concentrations retrouvées sont de l'ordre de quelques microgrammes par litre (WHO, 2001).

Tableau 3 : Concentrations mesurées dans l'eau de consommation humaine issue de puits.

Localisation	Concentration (µg U/L)	Références
Canada	2 - 781	Limson Zamora <i>et al.</i> , 1998
Canada	0,7 - 19,6	Mao <i>et al.</i> , 1995
Etats-Unis	1,8 - 7780	Orloff <i>et al.</i> , 2003
Finlande	0,03 - 1500	Kurttio <i>et al.</i> , 2006
Norvège	0 - 750	Frengstad <i>et al.</i> , 2000

A. 1. b) Impact anthropique

Les activités anthropiques contribuent à l'augmentation des concentrations en uranium dans les différents compartiments de l'environnement. Elles sont principalement liées aux activités militaires, à l'utilisation d'engrais et à l'exploitation de l'uranium au cours du cycle du combustible nucléaire.

Contamination des sols

Les armes à l'uranium appauvri ont été utilisées lors de quatre récents conflits : en Irak et au Koweït lors de la « guerre du golfe » en 1991, en Bosnie-Herzégovine en 1995, au Kosovo en 1999 (WHO, 2001, Bleise *et al.*, 2003) et en Afghanistan (Helmer *et al.*, 2007). L'équivalent de 300 tonnes d'uranium appauvri a été utilisé lors de la guerre du Golfe, 10 tonnes au Kosovo et 2 tonnes en Bosnie-Herzégovine. Lors des tirs, l'uranium se disperse sous forme de fines particules d'oxydes d'uranium peu solubles qui se déposent rapidement sur le sol (Bem et Bou-Rabee, 2004).

Les engrais phosphatés sont utilisés dans l'agriculture à grande échelle pour la production des cultures. Produits à partir des roches riches en phosphates, ces engrais contiennent des concentrations en uranium pouvant atteindre une moyenne de 129 µg/g. Ces concentrations sont variables : elles dépendent du type de roche utilisée pour la production des fertilisants (Kratz et Schung, 2006). La dispersion des engrais au niveau des terres agricoles constitue une source potentielle de contamination des sols.

Contamination des hydrosystèmes fluviaux

L'exploitation des mines d'uranium contribue largement à l'augmentation des concentrations en uranium dans l'hydrosphère. Les concentrations retrouvées en mer d'Aral (pouvant atteindre 141 µg/L d'uranium) proviennent essentiellement de la rivière Syrdanya (Kazakhstan) contaminée par l'activité minière (Friedrich, 2009). Dans l'article 64 de la loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999), il a été conclu que « les rejets

d'uranium [...] contenus dans les effluents des mines et des usines d'uranium pénètrent dans l'environnement en quantités ou concentrations ou dans des conditions de nature à avoir, immédiatement ou à long terme, un effet nocif sur l'environnement ou sa diversité biologique » (Environnement Canada, 2003). En 2008, le Canada produit 20,5% de la production mondiale, suivi par le Kazakhstan (19,4%) et l'Australie (19,2%). Viennent ensuite la Namibie, la Russie, le Niger, l'Ouzbékistan, les Etats-Unis... (**Figure 2.a**). Dans le contexte d'un apport anthropique d'uranium dans l'hydrosphère par l'extraction minière, la caractérisation des résidus miniers dans le monde permet d'avoir un aperçu des risques potentiels de contamination. Les résidus miniers les plus abondants se trouvent en Afrique du Sud, en Namibie, aux Etats-Unis, au Canada, en Allemagne et au Kazakhstan (**Figure 2.b**)

2. a

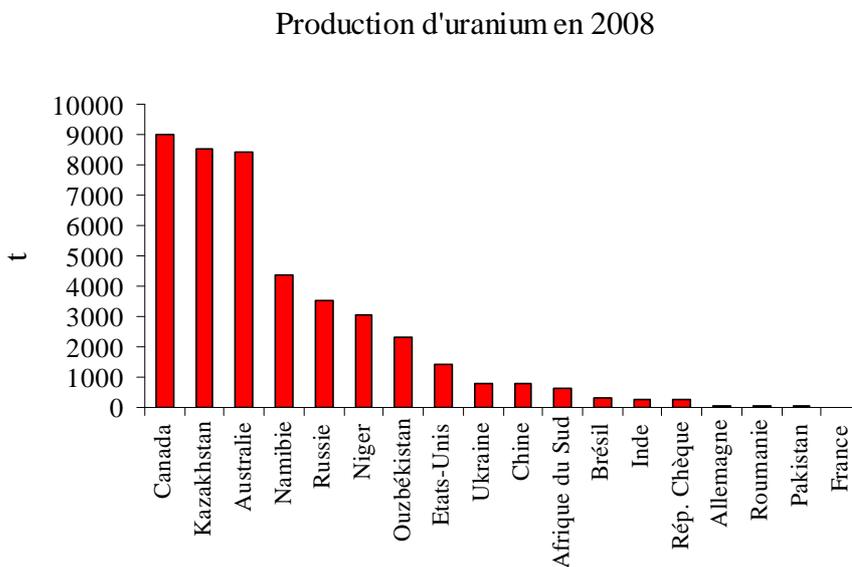


Figure 2 : a) Production mondiale d'uranium en 2008 en tonnes par pays

2. b

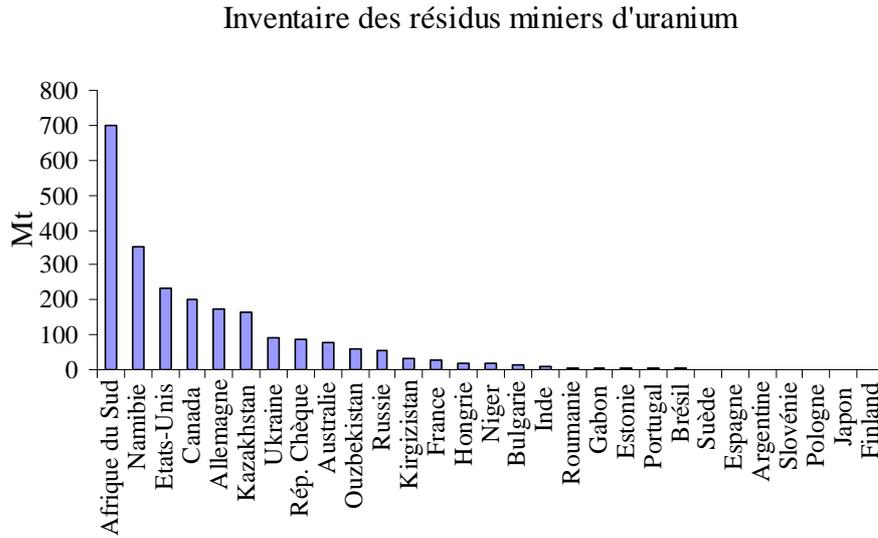


Figure 2 : b) Résidus miniers d'uranium recensés dans le monde en millions de tonnes d'uranium par pays (d'après la banque de données de World Nuclear Association).

B. Interactions uranium-organismes

B. 1 Biodisponibilité

Les interactions entre un contaminant et les membranes biologiques dépendent de l'état physiologique de l'organisme et des facteurs abiotiques influençant la spéciation chimique de l'élément. La fraction biodisponible d'un composé est celle qui peut être absorbée par l'organisme : plus précisément, c'est celle qui est capable de franchir les barrières biologiques. En effet, la concentration totale d'un contaminant n'est en général pas un bon indicateur de sa biodisponibilité et c'est en particulier le cas pour l'uranium, dont la chimie en solution est vaste et complexe (Denison, 2003).

Des études récentes portant sur la biodisponibilité de l'uranium proposent plusieurs modèles concernant les espèces susceptibles d'être accumulées. Des modèles considèrent un effet non compétitif de la concentration en protons et la co-accumulation de l'ion uranyle

UO_2^{2+} avec l'espèce neutre UO_2CO_3 , ou bien, avec l'une des espèces UO_2OH^+ ou $\text{UO}_2(\text{OH})_2$ pour d'autres modèles (Denison, 2003).

La dureté et l'alcalinité influencent la toxicité de l'uranium, ces deux paramètres affectant la spéciation chimique en phase aqueuse et l'absorption métallique à travers les membranes biologiques (Sheppard *et al.*, 2005).

B. 2 Bioaccumulation

Chez les poissons, les voies de contamination sont multiples. La contamination peut s'effectuer par voie branchiale, trophique, maternelle ou cutanée. Dans le cas de l'uranium, les contaminations par l'eau ou par la voie alimentaire ont fait l'objet de plusieurs travaux. Une étude récente menée chez le poisson zèbre *Danio rerio* a montré un transfert de l'uranium de la femelle aux œufs, mettant en évidence une contamination par voie maternelle (Bourrachot, 2009). La contamination par voie cutanée n'est pas documentée.

A l'échelle de l'organisme

Une voie importante d'absorption d'uranium chez les poissons d'eau douce est l'ingestion de sédiments et d'aliments contaminés. Les poissons benthiques accumulent de plus grandes concentrations d'uranium que les prédateurs et les espèces pélagiques. Le coefficient de transfert entre le meunier noir *Catostomus commersoni*, espèce fourragère benthique, et le grand corégone *Coregonus clupeaformis*, espèce omnivore pélagique est faible (Swanson, 1985). Les espèces de niveau trophique supérieur comme la truite, accumulent très faiblement l'uranium par rapport aux espèces de niveau trophique inférieur (Mahon, 1982). Les taux de transfert d'uranium dans les muscles de la truite sont inférieurs à ceux mesurés chez le grand corégone (Clulow *et al.*, 1998). Rien n'indique qu'il y ait bioamplification de l'uranium dans le réseau trophique, sans doute à cause de son très faible taux d'assimilation (<5%) par le tube digestif de la plupart des organismes. Dans ces études,

la principale source de contamination étant le sédiment, les espèces benthiques sont les plus exposées à l'uranium.

Plusieurs études portant sur la bioaccumulation de l'uranium au niveau de l'organisme ont été menées chez le poisson zèbre *Danio rerio* exposé à de faibles concentrations dans une eau de composition artificielle de faible alcalinité maintenue à un pH de 6,5. Pour une concentration de 100 µg/L d'uranium appauvri (nitrate d'uranyle), l'organisme accumule significativement cet élément dès 3 jours d'exposition. Les concentrations mesurées à 3, 10 et 20 jours d'exposition étaient respectivement de 6, 8 et 12 µg U/g de tissu, poids frais (Barillet *et al.*, 2007). Après 20 jours d'exposition à 250 µg/L dans des conditions physicochimiques comparables, la concentration retrouvée dans l'organisme dépourvu de ses gonades est d'environ 125 µg U/g de tissu, poids sec (Bourrachot, 2009). Des expériences antérieures ont montré que les poissons zèbres exposés à 150 µg/L d'uranium (acétate d'uranyle) dans l'eau (dureté : 178 mg/L CaCO₃, pH = 7,9) accumulaient significativement l'uranium dès le premier jour d'exposition. Les valeurs mesurées étaient de 500 ngU/g de tissu, poids frais (Labrot *et al.*, 1999). Des expériences menées au laboratoire réalisées sur les larves de *Danio rerio* exposées à 20 et 250 µg/L d'uranium appauvri et à 20 et 100 µg/L d'uranium 233 (activité spécifique de 3,57.10⁸ Bq/g) ont mis en évidence une accumulation significative de l'uranium après 9 et 15 jours d'exposition à 250 et 20 µg/L d'uranium appauvri respectivement et après 15 jours d'exposition à 100 µg/L d'uranium 233. A ce temps d'analyse les larves exposées à 250 µg/L d'uranium appauvri sont décimées (Bourrachot, 2009).

Au niveau des tissus et organes

Des études menées sur des poissons sauvages, comme le grand corégone *Coregonus clupeaformis*, issus de lacs Canadiens dont les sédiments contiennent de fortes concentrations en radionucléides, indiquent que les principaux sites d'accumulation sont les os, le tube

digestif, les reins et le foie (Swanson, 1985, Waite *et al.*, 1988). Des expérimentations en laboratoire menées sur cette espèce contaminée par voie trophique à l'uranium, ont également montré que ces organes accumulaient l'uranium de façon prépondérante et que l'accumulation de l'uranium dépendait de la dose et de la durée de contamination (Cooley *et al.*, 2000a).

Les travaux menés chez le poisson zèbre exposé à 100 µg/L d'uranium appauvri dans l'eau pendant 20 jours montrent une accumulation préférentielle dans le foie et les branchies, et, dans une moindre mesure, les muscles, le cerveau, les gonades, la peau et le squelette (Barillet *et al.*, 2007). Les niveaux d'accumulation dans les différents organes sont similaires pour l'exposition à 100 µg/L d'un mélange U appauvri - ^{233}U présentant une activité radiologique élevée (2375 Bq/L) excepté dans les gonades où l'accumulation est plus importante (Barillet *et al.*, 2007). L'uranium s'accumule dans les gonades mâles et femelles des organismes après 20 jours d'exposition à 20 et 250 µg/L d'uranium appauvri (Bourrachot, 2009).

B. 3 Dépurat

Les données concernant la dépurat de l'uranium sont rares. L'étude de la dépurat d'un contaminant à l'échelle d'un organisme ou des organes/tissus permet d'estimer la durée d'internalisation du composé après une exposition. Elle permet d'appréhender, en complément d'autres études, la réversibilité ou non des effets ainsi que la sensibilité d'une espèce étudiée ou bien des différents organes/tissus lors d'une exposition. D'un point de vue environnemental, l'étude de la dépurat est pertinente chez les poissons qui peuvent fuir, par exemple, une zone contaminée.

Des expériences de dépurat chez le poisson zèbre sur une durée de 30 jours ont montré que la concentration de l'uranium dans l'organisme restait élevée (20 fois plus que chez les organismes témoins) (Labrot *et al.*, 1999). Plus récemment, des études ont révélé une tendance à la diminution de la concentration en uranium au niveau de l'organisme et des

gonades, après 15 jours d'une phase de dépuración chez les individus préalablement exposés à 20 et 250 µg/L d'uranium. De plus, l'uranium est transféré dans les œufs issus des pontes effectuées pendant la période en eau non contaminée, suggérant une dépuración par la voie maternelle (Bourrachot, 2009).

C. Effets biologiques de l'uranium

C. 1 Au niveau de l'organisme et des tissus

La toxicité des espèces métalliques présentes à l'état de traces dans l'environnement chez les organismes aquatiques est liée à certaines formes physicochimiques de l'élément. La matière organique dissoute, sous forme d'acides humiques et fulviques, est connue pour former des complexes stables d'uranyle. Elle contribue à la migration de l'uranyle dans le milieu aquatique. UO_2^{2+} et UO_2OH^+ seraient les espèces uraniques responsables à 96% d'un impact au niveau de la réponse biologique, et l'ion uranyle serait deux fois plus toxique (Markich *et al.*, 1996). Toutefois, une étude plus récente suggère une co-accumulation de l'ion libre et des espèces carbonatées ou bien, avec une des espèces UO_2OH^+ ou $\text{UO}_2(\text{OH})_2^0$ ce qui nuance l'hypothèse précédente (Denison, 2003).

C. 1. a) Critères létaux

Les données de toxicité aiguë de l'uranium chez les poissons sont bien documentées dans la littérature. Plusieurs références font état des doses létales d'uranium correspondant à une mortalité observée de 50% du nombre d'individus (LC_{50}) après une exposition de 96 h chez différentes espèces de poisson (**Tableau 4**). Les valeurs des LC_{50} à 96 h s'échelonnent de 0,73 à 135 mg/L d'uranium. Ces valeurs varient faiblement de 1 à 2 mg/L selon l'espèce considérée et le stade de vie, mais elles sont de 10 à 100 fois plus importantes selon la dureté de l'eau (**Tableau 4**). En considérant l'ensemble des résultats, la toxicité de l'uranium est inversement corrélée à la dureté et l'alcalinité de l'eau. Un bon nombre de facteurs comme la

qualité de l'eau nécessitent d'être approfondis en vue de caractériser l'impact écotoxicologique d'une manière plus pertinente (Pyle *et al.*, 2002). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer la toxicité moindre de l'uranium dans des eaux dures et très alcalines. Dans les eaux de dureté élevée les ions calcium pourraient être en compétition avec les métaux lourds au niveau des sites d'absorption dans les branchies contribuant à une biodisponibilité plus faible du contaminant. Dans les eaux plus alcalines le métal libre pourrait interagir avec des ions hydroxydes et des ions carbonates pour former des complexes moins solubles et moins biodisponibles (Parkhurst *et al.*, 1984).

Tableau 4 : Valeurs des doses létales d'uranium à 96 h d'exposition pour lesquelles 50% de la mortalité est constatée (LC₅₀ 96 h) chez différentes espèces de poissons. La dureté, l'alcalinité, et le pH de l'eau sont rapportés selon les références associées.

Espèces (âge)	LC ₅₀ 96h (mgU/L)	Dureté (mgCaCO ₃ /L)	Alcalinité (mgCaCO ₃ /L)	pH	Références
<i>Melanotaenia nigrans</i> (7j)	1,7				
<i>Melanotaenia nigrans</i> (10j)	1,9				
<i>Melanotaenia splendida inornata</i> (7j)	2,66				
<i>Melanotaenia splendida inornata</i> (10j)	3,46				
<i>Craterocephalus marianae</i> (juvénile)	1,22		3,26	6,6	Bywater <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomugil tenellus</i> (juvénile)	0,73				
<i>Ambassis macleayi</i> (juvénile)	0,8				
<i>Mogurnda mogurnda</i> (7j)	1,1				
<i>Mogurnda mogurnda</i> (10j)	1,46				
<i>Danio rerio</i>	3,05	178		7,9	Labrot <i>et al.</i> , 1999
<i>Melanotaenia splendida inornata</i> (14j)	1,39		3,2	6,7	Holdway, 1992
<i>Mogurnda mogurnda</i> (6j)	1,57				
<i>Pimephales promelas</i>	2,8	20	18	7,4	Tarzwell et Henderson, 1960
	135	400	360	8,2	
<i>Salvelinus fontinalis</i>	5,5	32	12	6,7	Parkhurst <i>et al.</i> , 1984
	23	210	54	7,5	

Les poissons adultes seraient moins sensibles à la toxicité de l'uranium que les juvéniles ou les larves (Holdway, 1992). Dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique, cette observation est valable pour de nombreux polluants.

C. 1. b) Reproduction et jeunes stades de vie

La viabilité des œufs ou encore la fréquence de ponte des poissons sont des paramètres plus sensibles que les évaluations standards toxicologiques s'attardant sur des critères de croissance et de mortalité (Pyle *et al.*, 2002).

Reproduction et stade œuf

Le succès reproducteur des poissons zèbres diminue lors d'une exposition à l'uranium appauvri de 20 et 250 µg/L dans une eau de composition artificielle de faible alcalinité maintenue à un pH de 6,5. En effet, une réduction du nombre d'évènements de ponte est observée et la plus forte concentration entraîne une diminution du nombre d'œufs pondus par femelle après 14 jours d'exposition. Pour des conditions d'exposition similaires, un retard d'éclosion est également observé (Bourrachot, 2009).

Stade pro-larve/larve

Des expériences réalisées en laboratoire ont mis en évidence des effets significatifs de l'uranium sur les stades de vie précoces. Une réduction significative de la croissance des larves de *Danio rerio* est constatée dès 9 jours d'exposition à 20 et 250 µg/L d'uranium appauvri. Après 15 jours d'exposition, la mortalité des larves est quasi-totale (de 93 à 95%) (Bourrachot, 2009).

Chez le poisson *Mogurnda mogurnda*, un retard de développement de la vessie natatoire de la larve exposée à 810 µg/L d'uranium est observé. Ce développement cesse à 1560 µg/L d'uranium (Holdway, 1992). Dans cette étude, les expériences menées sur les juvéniles ont montré que les stades avancés étaient moins sensibles que les stades précoces.

Une expérience menée *in situ* au niveau de lacs avoisinant une ancienne mine d'uranium « Key Lake » dans la province de Saskatchewan au Canada a mis en évidence une mortalité des larves de *Pimephales promelas* (Pyle *et al.*, 2002).

C. 1. c) Lésions observées

Chez le grand corégone *Coregonus clupeaformis* contaminé à l'uranium par voie trophique, des dommages histologiques ont été observés au niveau du foie et des reins de l'organisme. Des nécroses hépatocytaires et des altérations de l'épithélium biliaire ont été rapportées. De nombreuses histopathologies rénales comme des nécroses tubulaires, des lésions glomérulaires et des phénomènes inflammatoires sont aussi décrits. Dans cette étude, une corrélation positive entre les dommages histologiques, la concentration en uranium dans l'alimentation et le temps d'exposition a été mise en évidence (Cooley *et al.*, 2000). Waite *et al.*, (1990) ont observé des lésions au niveau des muscles blancs et rouges du grand corégone prélevé à proximité de sites contaminés par les effluents de mines d'uranium au Canada.

L'exposition à l'uranium par voie directe peut également endommager le tissu branchial. La formation d'œdèmes caractérisés par un décollement de l'épithélium et de la membrane basale est constatée au niveau des lamelles branchiales du poisson zèbre exposé à 100 µg/L d'uranium appauvri. Les effets observés sur les branchies des individus exposés à une activité radiologique plus élevée (mélange U appauvri - ^{233}U) sont plus prononcés. Dans cette expérience, des dommages sont également observés au niveau des muscles squelettiques. Les structures tissulaires sont désorganisées et les myofibrilles apparaissent déstructurées (Barillet, 2007).

Les gonades sont également touchées par l'exposition à l'uranium. Une dégénérescence des ovocytes est observée chez les poissons zèbres exposés à 20 et 250 µg/L d'uranium appauvri. Les cellules constituant l'enveloppe des gonades femelles sont désordonnées. Une désorganisation des tubes séminifères est constatée dans les gamètes mâles des individus exposés à 250 µgU/L. Dans certains cas, les membranes des têtes spermatozoaires sont irrégulières et des petites vacuoles apparaissent (Bourrachot, 2009).

C. 2 Toxicité de l'uranium

C. 2. a) Génotoxicité

Une substance ou un rayonnement dit génotoxique compromet l'intégrité du génome. L'ADN subit en permanence l'agression d'agents génotoxiques qui proviennent de l'activité de la cellule (espèces réactives de l'oxygène) ou de l'environnement (polluants, rayonnements ionisants). La molécule d'ADN est particulièrement sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Les dommages oxydatifs principaux générés par le radical hydroxyle OH^\cdot sont les bases oxydées, les sites abasiques, les adduits, les cassures simples brins et les pontages ADN-protéines. Les bases qui composent l'ADN et particulièrement la guanine sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases engendrant un grand nombre de bases modifiées comme les 8-oxo-guanines. Les espèces réactives de l'oxygène peuvent attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique ou attaquer le sucre créant une coupure de chaîne simple brin. Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN (de type malonaldehyde-dG par exemple) (**Figure 3**).

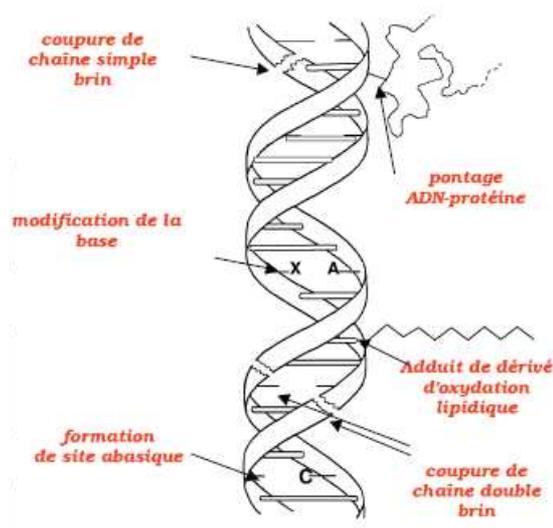


Figure 3 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire (d'après Favier, 2003).

L'attaque de l'ADN est permanente et le nombre de lésions est important. Cependant, la réparation des dommages est assurée par des systèmes spécialisés, participant ainsi au maintien de l'intégrité du génome. Si les systèmes de réparation ne peuvent subvenir à une surcharge de lésions provoquées par un stress, les mécanismes de réplication de l'ADN seront perturbés et des erreurs de lecture et de synthèse surviendront. De plus, des cassures mal réparées peuvent entraîner une instabilité génomique. Des altérations importantes peuvent mener à une mort cellulaire par apoptose afin d'éviter la nuisance potentielle de cellules présentant des anomalies fonctionnelles.

L'uranium peut induire des effets au niveau des acides nucléiques en modifiant les bases et en provoquant des ruptures de chaînes. De nombreux travaux réalisés sur différents types cellulaires de mammifères ont mis en évidence le pouvoir génotoxique de l'uranium (Monleau et al., 2006, Coryell and Stearns, 2006, Stearns *et al.*, 2005, Miller *et al.*, 2002a, 2002b).

Des essais comètes réalisés sur les cellules d'embryons de poissons zèbres exposées à 20, 100 et 250 µg/L d'uranium appauvri, et sur les cellules germinales mâles et femelles après 20 jours d'exposition à 250 µg/L d'uranium appauvri ont révélé une augmentation significative des dommages à l'ADN (Bourrachot, 2009). La radiotoxicité de l'uranium a également été évaluée à travers une exposition à l'uranium 233 de cellules d'embryons. Des dommages à l'ADN ont également été relevés mais dans une moindre mesure que pour l'exposition à l'uranium appauvri. Un effet génotoxique est également observé au niveau des érythrocytes d'individus exposés à 500 µg/L après 20 jours d'exposition (Barillet *et al.*, 2007). Lors de ces expériences les poissons ont été exposés à des mélanges en U appauvri et ²³³U. Les dommages à l'ADN apparaissent de façon plus précoce (dès 10 jours) chez les organismes exposés aux plus fortes activités radiologiques (2375 Bq/L et 7150 Bq/L).

C. 2. b) Neurotoxicité

Les travaux menés sur les effets neurotoxiques de l'uranium jusqu'à présent concernent principalement des expérimentations réalisées sur le modèle murin. La connaissance des effets de l'uranium sur le système nerveux central présentant un intérêt dans notre étude, de nombreuses références concernant les mammifères seront évoquées.

L'uranium peut s'accumuler dans le cerveau en passant la barrière hémato-encéphalique (Pellmar *et al.*, 1999, Barber *et al.*, 2005) ou l'épithélium olfactif (Monleau *et al.*, 2005, Houpert *et al.*, 2007, Tournier *et al.*, 2009) et se distribuer de manière hétérogène selon le mode d'administration (Pellmar *et al.*, 1999, Barber *et al.*, 2005, Houpert *et al.*, 2007). Lors d'expositions par inhalations répétées chez le rat, l'uranium s'accumule de façon plus importante dans le bulbe olfactif (Monleau *et al.*, 2005). L'uranium inhalé pourrait atteindre le système nerveux central, depuis le contact avec l'épithélium olfactif situé dans la cavité nasale, *via* les axones des neurones récepteurs de l'olfaction, jusqu'au bulbe olfactif (Tournier *et al.*, 2009).

L'exposition à l'uranium peut provoquer des troubles comportementaux chez le rat comme des perturbations de la mémoire spatiale, une hyperactivité (augmentation de l'activité locomotrice) (Monleau *et al.*, 2005, Briner et Murray, 2005), des troubles du sommeil (Lestaevel *et al.*, 2005) ainsi que des perturbations sensorimotrices (Abou-Donia *et al.*, 2002).

Le système cholinergique pourrait être une cible de l'exposition à l'uranium. Une diminution de la quantité d'acétylcholine, du récepteur muscarinique mAChR et de l'activité de l'acétylcholinestérase AChE est observée chez les rats exposés à l'uranium par l'eau de boisson. Les auteurs suggèrent que ces altérations cholinergiques pourraient contribuer aux désordres comportementaux (Bensoussan *et al.*, 2009).

Les travaux menés jusqu'à présent sur la neurotoxicité de l'uranium chez le poisson rapportent une diminution de l'activité de l'AChE chez le poisson zèbre exposé à 100 µgU/L

quelle que soit l'activité radiologique de l'uranium (0 Bq/L ou 2375 Bq/L) (Barillet *et al.*, 2007) et à 750 µgU/L dans une eau de composition physico-chimique différente (Labrot *et al.*, 1996).

Des changements au niveau du comportement des *Danio rerio* ont été observés pour les plus fortes concentrations (de 0,89 à 7,10 mgU/L) lors d'expérimentations de toxicité aiguë dans une eau caractérisée par une concentration en CaCO₃ de 178 mg/mL et un pH de 7,9. Les poissons nageaient d'une manière désorientée, ce comportement de nage est un indicateur de toxicité des métaux toxiques chez les poissons (Labrot *et al.*, 1999).

Le stress oxydant est l'une des causes de neurotoxicité de l'uranium (Lestaevel *et al.*, 2009). En effet, l'exposition à l'uranium enrichi entraîne une augmentation de la concentration en lipides peroxydés au niveau du cerveau du rat. En parallèle, l'activité des enzymes anti-oxydantes est diminuée. Les mécanismes semblent différer dans le cadre de l'exposition à l'uranium appauvri puisque celui-ci stimule l'activité de ces enzymes mais n'influe pas sur la peroxydation lipidique. Ces résultats suggèrent que la stimulation de l'activité anti-oxydante, dans le cadre d'une exposition à l'uranium appauvri, permet la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène en excès, ce qui n'est pas le cas pour l'exposition à l'uranium enrichi (Lestaevel *et al.*, 2009).

La perturbation de la balance oxydative et une augmentation de la peroxydation lipidique pourraient être des mécanismes expliquant la neurotoxicité de l'uranium, et, notamment, certains troubles comportementaux comme l'hyperactivité (Briner et Murray, 2005).

C. 2. c) Néphrotoxicité

Les reins seraient un site majeur d'accumulation de l'uranium (Pellmar *et al.*, 1999) et le siège de sa toxicité chez les mammifères. Quel que soit le mode d'exposition, l'uranium induit de nombreuses histopathologies rénales (Leggett, 1989, ATSDR, 1999, Kurttio *et al.*,

2002, Martinez *et al.*, 2003). Dans les cas les plus graves, une intoxication à l'uranium peut entraîner un dysfonctionnement important des reins pouvant être létal (Martinez *et al.*, 2003).

Les évènements moléculaires impliqués dans la néphrotoxicité de l'uranium ont été examinés par des analyses SAGE (Serial Analyses Gene Expression) chez la souris. Dans l'étude relative à l'exposition aiguë par injection intra-péritonéale, la réponse anti-oxydante, l'apoptose, le cycle cellulaire et l'inflammation apparaissent comme étant des indicateurs de dysfonctionnement rénal (Taulan *et al.*, 2006). A la suite d'une exposition chronique par l'eau de boisson contaminée à l'uranium, la réponse transcriptionnelle des gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante, le transport d'ions, et la synthèse de protéines est modifiée (Taulan *et al.*, 2004). Dans cette étude, les résultats indiquent la surexpression de 10 gènes codant pour des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale (*atp5g1*, *atp5g2*, *atp5j2*, *atp5a1*, *cox4a*, *cox8a*, *cox17*, *ndufa1*, *ndufa2*, *ndufa7*). Le nombre de gènes exprimés de manière différentielle dans ce mécanisme est considérable comparé aux autres processus biologiques. L'altération de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial pourrait être une indication moléculaire de la toxicité de l'uranium.

Les similitudes entre les pathologies rénales observées chez les mammifères et chez le grand corégone indiquent que les reins pourraient également être un organe-cible de la toxicité de l'uranium chez le poisson (Cooley *et al.*, 2000b). Les lésions du tubule et du glomérule rénal ainsi que des nécroses sont compatibles avec les effets observés chez les mammifères (Cooley *et al.*, 2000b).

Une évaluation toxicologique réalisée *in situ* dans la province de Saskatchewan au Canada impactée par les effluents d'une mine d'uranium, a mis en évidence une accumulation plus importante en uranium dans les os, les reins et le tractus digestif du grand corégone que dans le foie, les gonades et les muscles (Waite *et al.*, 1990).

C. 3 Altération des grandes fonctions cellulaires

C. 3. a) Balance oxydative

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{OH}\cdot$...) sont produites par plusieurs mécanismes physiologiques car elles sont utiles pour l'organisme à des doses raisonnables. Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes et notamment à la phagocytose. Par exemple, l'activation de la NADPH oxydase au niveau des macrophages, génère des anions superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$. L'origine de leur production peut être endogène (mitochondrie, peroxyosome, cytP450, NADPH-oxydase) ou bien exogène (rayons γ , X, UV, électrons, métaux, xénobiotiques). La source principale de génération d'ERO dans la cellule est la respiration mitochondriale. Lorsque cette production est maîtrisée par des systèmes de défenses (enzymes neutralisantes, vitamines et métallothionéines), la balance anti-oxydants/pro-oxydants est dite en équilibre. Lorsque ces espèces sont produites en trop grande quantité et que les défenses anti-oxydantes sont insuffisantes, il y a génération d'un stress oxydant (**Figure 4**).

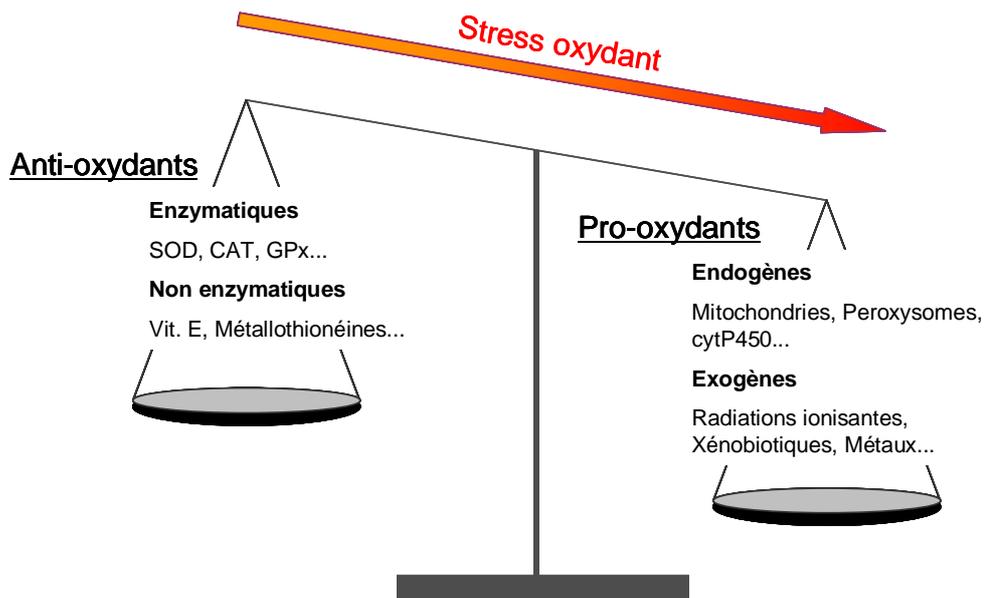


Figure 4 : Schéma de la balance anti-oxydants/pro-oxydants représentant un stress oxydant.

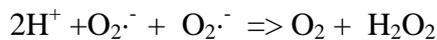
La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : l'ADN, les protéines, les lipides ou encore les glucides.

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes. Certains composés non enzymatiques comme les vitamines E et C ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux. Ce sont les piègeurs ou éboueurs (« scavenger »). D'autres sont synthétisés par les cellules et les protègent contre les radicaux libres comme les métallothionéines ou le glutathion réduit. Des enzymes interviennent également dans la régulation du stress oxydatif comme la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT).

La superoxyde dismutase SOD

La superoxyde dismutase est une enzyme ubiquitaire chez les organismes aérobies. C'est une métalloprotéine à Cu et à Zn dans le cytosol des eucaryotes, et à Mn dans les mitochondries.

Elle catalyse la dismutation du radical superoxyde selon la réaction :



Les cellules se protègent ainsi des effets toxiques du radical superoxyde, très réactif avec les molécules biologiques, en le convertissant en un composé moins toxique : le peroxyde d'hydrogène.

Ce dernier composé demeurant toutefois toxique pour la cellule, d'autres enzymes vont intervenir dans la neutralisation de cette espèce : la catalase et la glutathion peroxydase.

La catalase CAT

L'enzyme est présente chez presque tous les organismes aérobies. Sa fonction principale est la protection contre les effets toxiques du peroxyde d'hydrogène en catalysant sa décomposition en eau et oxygène : $2\text{H}_2\text{O}_2 \Rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

La glutathion peroxydase GPx

La glutathion peroxydase intervient, avec la catalase, dans la destruction de l' H_2O_2 , et aussi dans neutralisation des hydroperoxydes issus de la peroxydation des acides gras polyinsaturés.

Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène par le glutathion :

$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{G-SH} \Rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{G-S-S-G}$, ainsi que celle des hydroperoxydes:

$\text{R-O-O-H} + 2\text{G-SH} \Rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSH}$

L'uranium comme de nombreux métaux est capable de perturber la balance oxydative.

Des analyses SAGE réalisées au niveau des reins de souris exposées à l'uranium dans l'eau de boisson ont mis en évidence une modulation de l'expression de gènes impliqués dans la défense anti-oxydante (*gpx3*, *sod1* et *gstt2*) (Taulan *et al.*, 2004, 2006).

Chez le poisson zèbre *Danio rerio* et la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, l'exposition à l'uranium entraîne une diminution de la concentration des enzymes neutralisantes des espèces réactives de l'oxygène telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (Labrot *et al.*, 1996, Buet *et al.*, 2005, Barillet *et al.*, 2007). Une diminution de la quantité de la superoxyde dismutase est observée dès 3 jours d'exposition chez les individus exposés au mélange U appauvri - ^{233}U (activité de 2375 Bq/L). La concentration enzymatique retourne au niveau des témoins après 10 jours puis diminue de nouveau après 20 jours de manière comparable pour les deux conditions d'exposition (U appauvri et mélange U appauvri - ^{233}U) (Barillet *et al.*, 2007). Pour une exposition au mélange d'activité radiologique élevée, une diminution de la concentration de la catalase est également observée de façon plus précoce (à 10 jours) que pour l'exposition à l'uranium appauvri seul (à 20 jours) (Barillet *et al.*, 2007). Une diminution significative de la concentration en glutathion peroxydase et de la quantité hépatique de glutathion apparaît à 3 jours d'exposition chez les individus exposés au mélange U appauvri - ^{233}U . Pour des temps d'exposition plus longs,

aucun effet de l'exposition à l'uranium quelle que soit son activité radiologique n'est observé (Barillet *et al.*, 2007).

Le mécanisme de peroxydation lipidique membranaire est un des mécanismes d'action toxique des métaux chez les poissons. Les lipides peroxydés sont issus de l'attaque des membranes phospholipidiques par les radicaux libres et l'oxygène générés lors d'un stress oxydant. Chez les poissons, l'exposition à l'uranium par voie trophique peut induire une peroxydation lipidique (Cooley *et al.*, 2000b). Chez le grand corégone, les auteurs ont montré que l'uranium induisait une augmentation de la concentration en lipides peroxydés dépendant de la dose administrée. Ce paramètre serait un indicateur sensible d'exposition à l'uranium (Cooley *et al.*, 2000b).

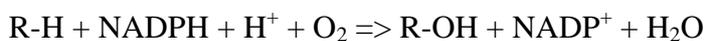
C. 3. b) Mécanismes de détoxification

Dans l'environnement, les organismes sont fréquemment exposés à des substances étrangères, les xénobiotiques (hydrocarbures, pesticides...). Ces composés généralement hydrophobes, rentrent dans l'organisme en traversant les membranes par diffusion. Ces substances sont éliminées hors de la cellule par des processus de détoxification impliquant des enzymes de biotransformation (phases I et II) et des transporteurs (phase III). En phase I, les enzymes permettent l'ajout d'une nouvelle fonction chimique rendant la molécule plus polaire. En phase II, la conjugaison de la substance avec un groupement rend la molécule plus hydrosoluble, facilitant son transport et son expulsion en phase III par une pompe ATPase.

Le cytochrome cytP_{450}

Les cytochromes P_{450} catalysent diverses réactions d'oxydation utilisant l' O_2 moléculaire et le NADPH. Ils interviennent en phase I du processus de détoxification cellulaire.

La réaction typique est une hydroxylation :



La plupart des isoenzymes de cytochromes P₄₅₀ sont associées au réticulum endoplasmique, aux peroxyosomes, et quelques-unes, à la membrane interne des mitochondries. Beaucoup d'entre elles sont inductibles et participent au catabolisme des xénobiotiques.

Chez les petits mammifères, l'exposition à l'uranium (voie cutanée, voie intrapéritonéale, eau de boisson) module la synthèse d'ARNm de plusieurs cytP450 (Taulan *et al.*, 2004, 2006 ; Souidi *et al.*, 2005 ; Guéguen *et al.*, 2006) ainsi que l'activité de l'enzyme CYP3A au niveau du foie (Guéguen *et al.*, 2006).

La glutathion-S-transférase GST

Les glutathion-S-transférases catalysent la conjugaison entre un peptide, le glutathion réduit, et les composés électrophiles. Elles interviennent au niveau de la phase II du processus de détoxification cellulaire. Cette conjugaison du glutathion avec certains substrats permet la formation de composés moins toxiques. Les GST jouent également un rôle dans la destruction des peroxydes et des époxydes provenant de l'oxydation non enzymatique des acides gras.

Les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) forment une superfamille et sont caractérisés par une fonction de transport consommant de l'ATP. Parmi ces transporteurs, les protéines MDR (multidrug resistance) sont des glycoprotéines membranaires qui pompent les xénobiotiques (notamment les médicaments) hors de la cellule par couplage à l'hydrolyse de l'ATP. Elles peuvent être responsables de l'échec des thérapies anticancéreuses (Gottesman et Pastan, 1993).

Par analogie avec le système de résistance MDR identifié chez les mammifères, le transporteur a été appelé MXR (multixenobiotic resistance) chez les mollusques. Les protéines MXR sont induites par le cadmium, le mercure et le zinc. Chez les poissons, un homologue de la protéine MDR est la protéine TAP2. Le gène *abcb311* codant pour cette protéine est fortement induit dans les branchies du poisson zèbre exposé au cadmium. En

parallèle, une diminution de la concentration tissulaire en cadmium est observée (Gonzalez *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent un lien possible entre l'induction de la protéine et la détoxification métallique.

Chez le bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea*, une exposition à 80 µg/L d'uranium induit la synthèse de la protéine MXR au niveau des branchies (Tran *et al.*, 2005).

C. 3. c) Mort cellulaire

La mort cellulaire implique une modification irréversible du métabolisme de la cellule provoquant la destruction de ses structures. Elle peut être engendrée par 3 types de mécanismes : la nécrose, l'apoptose et la sénescence.

La nécrose

La nécrose est habituellement consécutive à une insuffisance en ATP ou à une lésion de la membrane (plasmique ou intracellulaire) provoquant une élévation anormale de la concentration en Ca^{2+} du cytosol. Cette élévation entraîne l'activation de protéases, phospholipases et autres hydrolases, menant à la destruction des constituants cellulaires à un rythme dépassant les capacités des mécanismes réparateurs.

En histologie, le phénomène se traduit par une dilatation du réticulum endoplasmique et une rétractation de la membrane interne des mitochondries. Si la cellule ne peut pas réparer les lésions, la chromatine du noyau se condense, le noyau se fragmente et se dissout, le cytoplasme se vacuolise, la cellule gonfle, les organites cytoplasmiques disparaissent et les membranes se rompent. Contrairement à l'apoptose, la nécrose est un processus qui entraîne une réaction inflammatoire.

Chez le grand corégone contaminé à l'uranium par voie trophique, des nécroses hépatiques et rénales ainsi que des phénomènes inflammatoires ont été observés (Cooley *et al.*, 2000b).

L'apoptose

L'apoptose possède de multiples rôles physiologiques, elle intervient dans la morphogénèse et le système immunitaire. Elle se déclenche également à la suite de dommages à l'ADN ou d'anomalies fonctionnelles.

L'apoptose est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. Ce suicide cellulaire se déclenche en réponse à des signaux intracellulaires ou extracellulaires conduisant *in fine* à la phagocytose des débris cellulaires par les macrophages, sans dommages pour les cellules adjacentes.

L'apoptose est considérée comme une mort cellulaire programmée ou ordonnée dans le sens où le mécanisme se déroule en différentes phases.

Lorsqu'un signal de mort est lancé, l'action des protéines Bcl-2 et Bax au niveau des mitochondries contribue au largage du cytochrome *c* dans le cytoplasme, activant ainsi les caspases.

L'apoptose se traduit morphologiquement par une condensation précoce de la chromatine sur l'enveloppe nucléaire et par la rétractation de la cellule qui se fragmente en vésicules. Les fragments sont ensuite phagocytés par les macrophages sans déclencher de réaction inflammatoire.

**Chapitre II : Objectifs et stratégies expérimentales du programme
de recherche**

Cette partie vise à présenter les principaux choix ayant guidé l'élaboration du programme de recherche mis en place dans cette thèse. Un bilan des paramètres étudiés est présenté en fin de chapitre dans le **Tableau 6**.

A. Concentrations en uranium

Le programme de recherche mis en œuvre dans cette thèse s'insère dans le contexte du programme ENVIRHOM dédié à la caractérisation des effets biologiques des substances radioactives (dont l'uranium) lors d'expositions chroniques à faibles doses. Par conséquent, les gammes de concentrations doivent être représentatives de situations environnementales. Les concentrations peuvent se rapprocher du bruit de fond géochimique ou refléter les rejets accidentels ou chroniques liés au cycle du combustible nucléaire.

Les concentrations choisies dans notre étude sont de 20 et 100 µg/L d'uranium. La plus faible est proche de la valeur conseillée par l'organisation mondiale pour la santé de 15 µg/L (WHO, 2001). La concentration la plus élevée est représentative de concentrations retrouvées au niveau de puits (Kurttio *et al*, 2006) ou en aval immédiat de sites miniers (Antunes *et al.*, 2007).

Ces concentrations étant très inférieures aux doses létales, l'utilisation de marqueurs sensibles s'est avérée judicieuse. L'échelle moléculaire considérée comme étant la plus fine dans le cadre d'exposition à faibles doses permet l'analyse de réponses précoces. Les modifications moléculaires sont les premiers signes de perturbations dues à un stress.

B. Paramètres biologiques

De faibles concentrations en métaux peuvent provoquer de nombreux désordres sub-cellulaires (comme une perturbation de la balance oxydative, des dommages à l'ADN ...). Les cellules ont mis en place au cours de l'évolution de nombreux mécanismes de défense contre

les stress endogènes et exogènes. Lorsque le stress est trop important, ces systèmes de défense peuvent être dépassés, laissant apparaître les premiers symptômes à l'échelle moléculaire.

Les marqueurs moléculaires ont été choisis dans notre étude non seulement en raison de leur temps de réponse rapide et de leur sensibilité mais aussi parce qu'ils permettent de caractériser et de mieux comprendre les modes d'actions toxiques et les cibles cellulaires d'un contaminant.

La régulation des fonctions cellulaires peut être étudiée au niveau de la transcription (expression de gènes), au niveau protéique (quantification, activité enzymatique) et au niveau du métabolisme.

L'analyse des profils d'expression de gènes (étude de gènes cibles ou analyse transcriptomique) constitue une approche puissante pour caractériser les différentes atteintes moléculaires potentiellement impliquées dans les mécanismes de toxicité de l'uranium selon les différents organes/tissus. L'analyse fonctionnelle et quantitative des protéines d'un mécanisme d'intérêt permet d'approfondir le mode d'action du toxique et d'acquérir une signification biologique plus importante. L'analyse des dommages au niveau de l'ultrastructure cellulaire ou tissulaire permet de confronter les observations aux résultats moléculaires.

Les dysfonctionnements cellulaires perceptibles au niveau moléculaire peuvent avoir des conséquences à long terme et/ou à des niveaux d'organisation biologiques supérieurs (organes/tissus, organismes).

Les concentrations tissulaires en uranium permettent de confronter les résultats obtenus sur les effets observés avec les niveaux accumulés. Les mesures réalisées sur une période relativement longue avec plusieurs temps de mesure au niveau de différents organes contribuent à l'évaluation du comportement de l'uranium dans les tissus et à la prise en compte du rôle physiologique des différents organes. Le choix des temps d'analyse a

notamment reposé sur les résultats antérieurs issus d'expériences réalisées au laboratoire (Barillet, 2007). De plus, une période de dépuraction participe à la compréhension de la rémanence du contaminant et peut mettre en évidence des organes susceptibles d'être plus affectés que d'autres. Dans notre étude, une durée intermédiaire de 8 jours a été retenue afin de prendre en compte les cinétiques de dépuraction de chaque organe.

C. Choix du modèle biologique : le poisson zèbre *Danio rerio*

C. 1 Biologie et écologie

Le poisson zèbre *Danio rerio* appartient à la famille des Cyprinidés (**Tableau 5**), la plus grande famille de poissons d'eau douce. L'habitat naturel du poisson zèbre se situe au niveau des bassins hydrofluviaux du Gange et du Brahmapoutre situés au nord-est de l'Inde, au Bangladesh et au Népal. Le poisson zèbre vit dans des eaux de visibilité réduite, à faible courant ou stagnantes souvent proches des rizières. Les poissons occuperaient toute la colonne d'eau. Ce poisson omnivore se nourrit principalement de zooplancton, d'insectes et d'algues.

Classification

Le poisson zèbre *Danio rerio*



Tableau 5 : Classification du poisson zèbre *Danio rerio*.

Super-classe	Ostéichtyens	Classe	Actinoptérygiens
Sous-classe	Néoptérygiens	Infra-classe	Téléostéens
Superordre	Ostariophysiens	Ordre	Cypriniformes
Superfamille	Cyprinoidés	Famille	Cyprinidés
Genre	<i>Danio</i>	Espèce	<i>rerio</i>

Cycle de vie

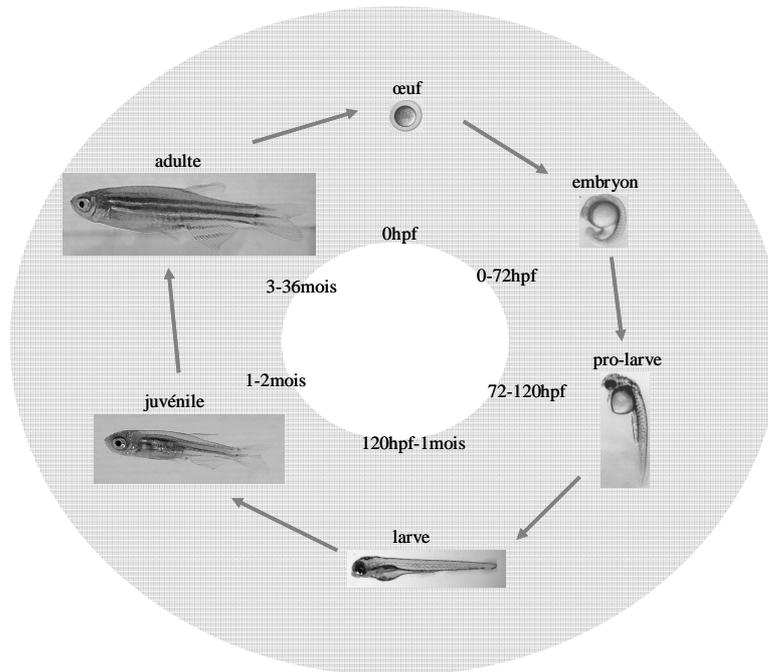


Figure 5 : Cycle de vie du poisson zèbre.

C. 2 Intérêt du modèle

Le poisson zèbre *Danio rerio* est l'un des organismes vertébrés le plus important en génétique, biologie développementale, neurophysiologie et dans le domaine médical. Il possède de nombreux atouts le rendant attractif pour les manipulations expérimentales. C'est un petit poisson qui s'élève et se reproduit facilement en laboratoire et sa maintenance est peu coûteuse. Son cycle de vie est relativement court : environ 2 à 3 mois (**Figure 5**). Les œufs sont relativement gros et transparents. Les différents stades du développement embryonnaire peuvent être facilement étudiés avec un microscope à dissection. Le développement est rapide, et dès 5 jours, les larves se mettent en chasse de nourriture et évitent la prédation. De nombreux travaux réalisés en génétique moléculaire depuis une dizaine d'années ont contribué à des avancées importantes menant, en 2001, au projet de séquençage du génome du poisson zèbre. Enfin, ces organismes sont recommandés pour les bioessais (ISO 7346-1,2,3, 1996, OCDE, 2004a,b,c).

D. Choix des organes et tissus

D. 1 Les branchies

Les branchies représentent un organe multifonctionnel interagissant avec le milieu aquatique. Elles assurent la respiration, mais aussi l'osmorégulation, la régulation de la balance acide-base et le métabolisme de circulation des hormones et xénobiotiques. En plus de ces fonctions vitales, les branchies sont d'un intérêt tout particulier dans notre étude car elles constituent la première barrière biologique à l'uranium dans le cadre d'une exposition par voie directe.

Anatomie

Les téléostéens possèdent 8 arcs branchiaux organisés en 4 paires de rangées de filaments fortement vascularisés. Les filaments sont constitués de fines lamelles branchiales.

Système respiratoire

L'eau pénètre par la bouche, entre dans le pharynx puis ressort par les ouïes. Au niveau des branchies, une membrane mince sépare le sang du milieu extérieur. Des échanges gazeux s'effectuent à travers cette paroi, le sang absorbant de l'oxygène et rejetant une partie de son gaz carbonique. L'oxygène est absorbé par simple diffusion à travers l'épithélium lamellaire. Le dioxyde de carbone est excrété sous forme de gaz dissous ou de carbonates par des transporteurs d'ions spécialisés.

Osmorégulation

Afin d'assurer l'osmorégulation, des transporteurs prennent en charge les ions (comme par exemple les ions Na^+ , Ca^{2+} , H^+ et Cl^-) et, par conséquent, jouent également un rôle vital dans la balance acide-base ainsi que dans le métabolisme du calcium.

D'autres cellules épithéliales sécrètent du mucus ou constituent une barrière physiologique pour l'environnement.

D. 2 Le cerveau

Comme pour tous les vertébrés, le système nerveux du poisson peut se diviser en une partie centrale et une partie périphérique. Le système nerveux central (SNC) comprend le cerveau, la moelle épinière et deux des nerfs crâniens (**Figure 6**) alors que le système nerveux périphérique comprend le reste des nerfs crâniens et les nerfs spinaux.

Le cerveau se décompose en trois parties : antérieure (proscéphale), intermédiaire (mésencéphale) et postérieure (rhombencéphale). La partie antérieure est formée par le télencéphale et le diencéphale. Chez les poissons, les bulbes olfactifs font partie du télencéphale.

Environ 22 nerfs crâniens peuvent être identifiés chez les poissons. Certains sont uniquement sensoriels, d'autres sont uniquement moteurs et le reste constitue les nerfs mixtes. Les 4 premiers nerfs sont situés dans la partie antérieure et sont purement sensoriels. Parmi eux, le nerf olfactif (nerf I) se caractérise par un processus afférent des cellules olfactives bipolaires.

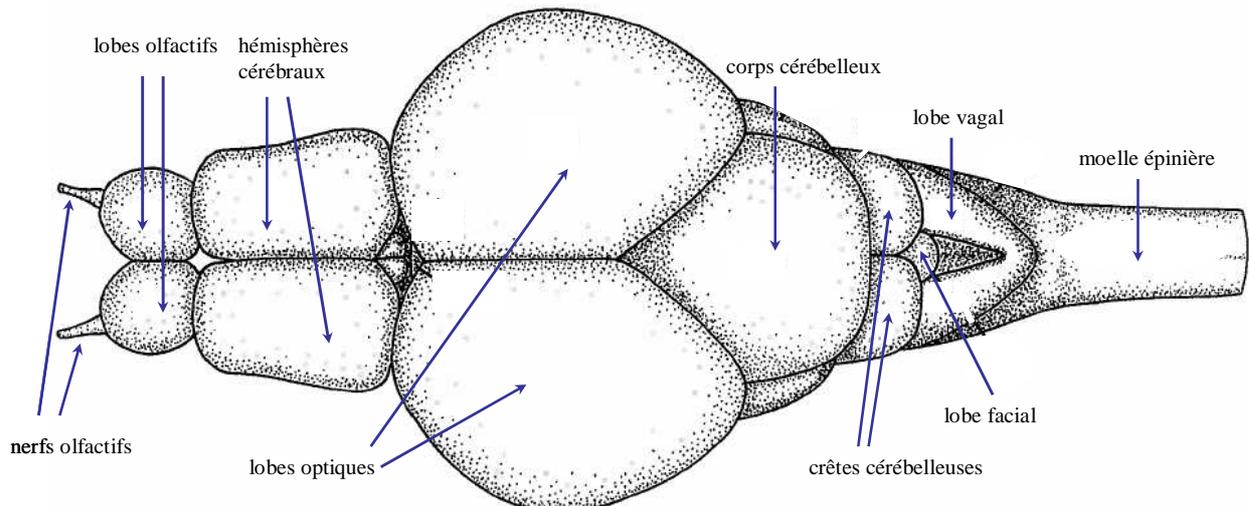


Figure 6 : Description anatomique du cerveau du poisson zèbre en vue dorsale (d'après Neuroanatomy of the Zebrafish Brain, 1996).

Le système nerveux des vertébrés est composé d'ensembles variés de neurones bipolaires ou multipolaires dotés d'un corps cellulaire, d'un axone et de dendrites. En général, les axones sont appelés « extensions » dans le système nerveux central et « nerfs » dans le système nerveux périphérique. Les synapses sont les sites de communication entre les neurones *via* la libération de neurotransmetteurs ou par des signaux électriques. Les liaisons formant les synapses sont de type axones-axones, dendrites-dendrites ou bien axones-dendrites.

Les cellules olfactives réceptrices bipolaires sont liées à l'épithélium et leur axone converge vers des glomérules localisés dans des régions spécifiques du bulbe olfactif. Les informations sont ensuite transmises par les cellules mitrales (**Figure 7**).

Les dendrites des cellules olfactives réceptrices se situent à la surface de l'épithélium, et sont directement exposées à l'environnement extérieur. Leur corps cellulaire se situe dans la couche moyenne de l'épithélium. Au niveau de la surface épithéliale, la vésicule olfactive donne naissance aux cils (**Figure 8**). A son extrémité basale, chaque cellule réceptrice se prolonge par un axone qui rejoint le bulbe olfactif pour former des synapses avec les neurones sensitifs de second ordre. Les cellules réceptrices olfactives sont continuellement régénérées chez les poissons adultes.

L'évènement initial de l'olfaction est la liaison d'une molécule odorante à un récepteur spécifique membranaire. Les neurones olfactifs peuvent exprimer environ 100 récepteurs olfactifs différents. Les récepteurs de l'olfaction appartiennent à la grande superfamille des récepteurs couplés aux protéines G qui sont formés de 7 domaines hydrophobes.

La liaison des molécules odorantes aux récepteurs induit une cascade de transduction menant à la dépolarisation du neurone et à la génération d'un potentiel d'action au niveau de l'axone.

Afin de décoder une ségrégation olfactive, les neurones projettent leur axone dans des régions localisées au niveau du bulbe olfactif (**Figure 7**).

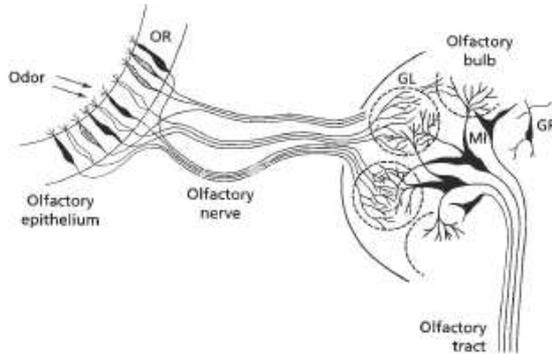


Figure 7 : Représentation schématique de l'anatomie cellulaire du système olfactif périphérique et de l'organisation neuronale dans le bulbe olfactif d'un téléostéen (d'après The Laboratory Fish, 2000).

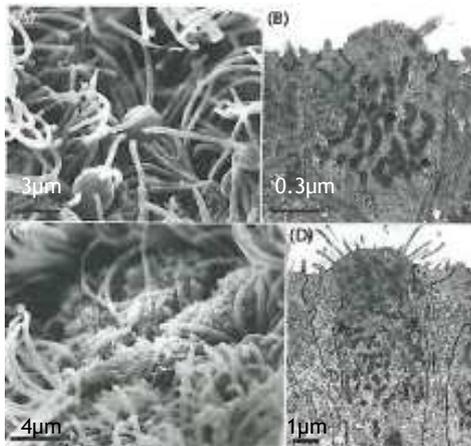


Figure 8 : Images de cellules olfactives réceptrices ciliées (A et B) et à microvillosités (C et D) de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* (d'après The Laboratory Fish, 2000).

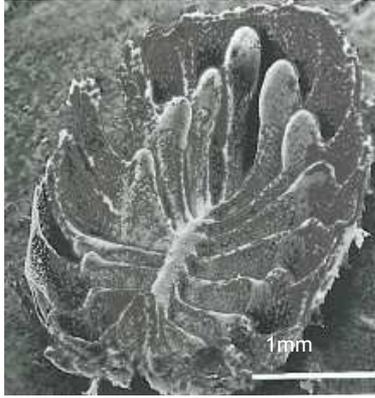


Figure 9 : Image d'une rosette olfactive du poisson rouge *Carassius auratus* montrant les arrangements en lamelle de l'épithélium olfactif (d'après The Laboratory Fish, 2000).

Chez les vertébrés, les systèmes olfactifs et gustatifs représentent les voies principales de détection et d'identification de stimuli chimiques dans l'environnement. Les informations sont détectées et transmises directement au SNC par les neurones des nerfs crâniens I de l'olfaction.

L'épithélium olfactif se situe dans la cavité nasale des téléostéens. Celui-ci est arrangé en lamelles formant une rosette ovale chez la plupart des poissons (**Figure 9**). Chez les cyprinidés, l'organe olfactif est proche du bulbe olfactif et l'extension est relativement courte.

Notre étude a porté sur les voies moléculaires affectées au niveau du cerveau du poisson. L'élargissement de l'étude à des courts temps d'exposition a mis en évidence l'importance de la voie olfactive. C'est une barrière biologique exposée à l'uranium lors d'une contamination par voie directe. L'ultrastructure du cerveau et en particulier du lobe olfactif, partie sensible du cerveau des poissons exposés aux métaux, a été examinée. Enfin, les effets potentiels sur le métabolisme mitochondrial dans cet organe ont été évalués.

D. 3 Les muscles

On distingue les muscles striés et les muscles lisses. Parmi les muscles striés, les muscles squelettiques unissent les os entre eux et permettent la motricité. Ces types de fibres musculaires sont définis à la fois par leurs propriétés mécaniques et métaboliques.

Propriétés mécaniques

Les muscles utilisés pour les activités motrices réduites, comme le maintien de la posture ou la réalisation de mouvements lents, se contractent et se relâchent lentement et utilisent l'énergie lentement. Ce sont les fibres musculaires à contraction lente. Les muscles sollicités pour les mouvements rapides et puissants se contractent et se relâchent rapidement en utilisant l'énergie rapidement. Ce sont les fibres musculaires à contraction rapide.

Propriétés métaboliques

Les besoins métaboliques de chaque type de fibres sont très différents, les fibres rouges à contraction lente possèdent un métabolisme aérobie alors que les fibres blanches à contraction rapide utilisent les voies anaérobies. La plupart des muscles contiennent en fait un mélange de ces deux types de fibres musculaires et constituent un type intermédiaire.

Les fibres à contraction lente sont sollicitées pour les activités peu intenses et fonctionnent une grande partie du temps. Leur potentiel de fonctionnement aérobie important permet d'éviter l'excès de sous-produits responsables de la fatigue. La couleur rouge de ces fibres est due aux fortes densités de myoglobines, mitochondries et capillaires nécessaires à une consommation importante d'oxygène (**Figure 10**).

Le volume des mitochondries réduit l'espace disponible pour les myofibrilles ce qui peut expliquer que ces fibres génèrent moins de force que les fibres blanches.

Les fibres à contraction rapide sont sollicitées pour les activités intenses (accélérations rapides) et fonctionnent occasionnellement. Elles utilisent l'énergie très rapidement à un taux qui ne peut être maintenu sous aérobose. Le métabolisme glycolytique se met en place

provoquant une fatigue rapide. C'est le muscle blanc contenant peu de mitochondries et de myoglobine, et faiblement vascularisé (**Figure 10**). Il est en revanche riche en glycogène et enzymes glycolytiques.

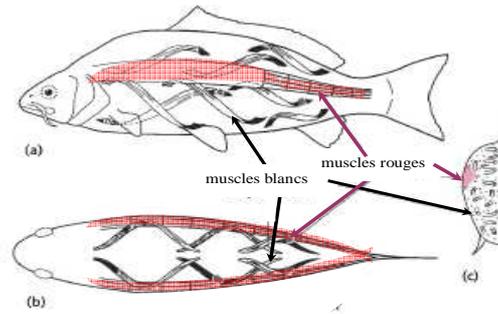


Figure 10 : Identification des muscles blancs et rouges chez la carpe selon les vues : latérale (a) dorsale (b) et transversale (c) (d'après The Laboratory Fish, 2000).

Le muscle squelettique est responsable des mouvements du squelette et d'organes. Il est aussi appelé muscle strié car la disposition des protéines contractiles prend l'aspect de stries transversales bien visibles. Les fonctions très développées des organites cytoplasmiques des cellules musculaires ont conduit à l'utilisation d'une terminologie spécifique pour certains composants cellulaires : membrane plasmique = *sarcolemme*, cytoplasme = *sarcoplasme*, réticulum endoplasmique = *réticulum sarcoplasmique* (**Figure 11**).

Cellule musculaire

Les fibres musculaires sont constituées de myofibrilles, structures cylindriques parallèles entre elles occupant le sarcoplasme. Chaque myofibrille présente un motif répété de stries transversales correspondant à l'ordonnement des protéines contractiles qu'elle contient. L'alignement des myofibrilles parallèles avec leurs stries transversales est responsable de la striation régulière observée en microscopie électronique sur les coupes

longitudinales de muscle squelettique (**Figure 12**). Au niveau des myofibrilles, la contraction est générée par le travail des myofilaments qui sont des filaments très fins de myosine et d'actine (**Figure 12**). Les filaments contiennent les protéines de régulation qui contrôlent la contraction et la relaxation musculaire. La dépolarisation du sarcolemme entraîne la libération d'ions Ca^{2+} contenu dans le réticulum sarcoplasmique. Sous l'influence de l'énergie libérée à partir de l'ATP et l'intervention de protéines de régulation, les filaments de myosine et d'actine glissent les uns sur les autres, entraînant un raccourcissement du sarcomère.

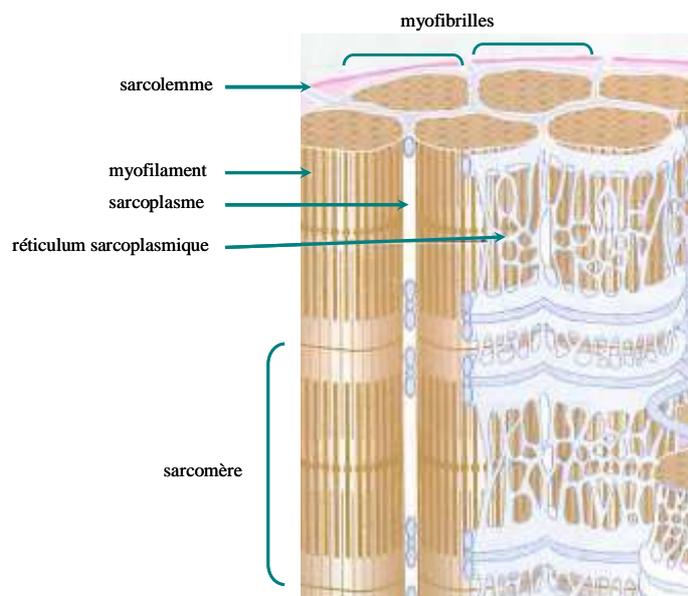


Figure 11 : Schéma d'une cellule musculaire (Histologie fonctionnelle, 2001).

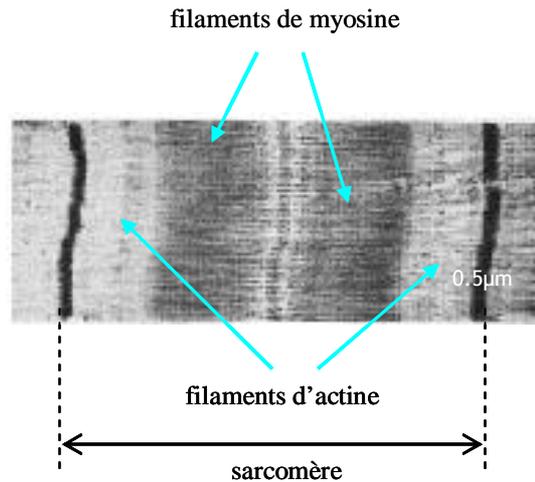


Figure 12: Description d'un sarcomère, unité des myofibrilles (Histologie fonctionnelle, 2001).

Dans le cadre d'une exposition à l'uranium, des atteintes musculaires pourraient compromettre l'activité motrice de l'organisme et le coût métabolique alloué. Les muscles ont été retenus dans notre étude.

D. 4 Le foie

Le foie assure trois fonctions vitales : la dépuración, la synthèse et le stockage. C'est l'organe qui effectue le plus grand nombre de transformations chimiques : c'est « l'usine métabolique » de l'organisme.

Le foie a un rôle dans le métabolisme des glucides et des lipides. Il stocke les vitamines liposolubles et le glycogène. Il possède également un rôle dans le métabolisme des protéines et dans la destruction des globules rouges vieillissants. Il intervient également dans la détoxification des toxines et xénobiotiques.

En raison des fonctions vitales assurées par le foie, les effets de l'uranium sur cet organe ont suscité notre intérêt.

E. Voies moléculaires de stress étudiées

E. 1 L'expression de gènes-cibles

L'étude de l'expression de gènes « cibles » impliqués dans plusieurs processus cellulaires a permis d'identifier la nature des effets potentiels d'une contamination à l'uranium dans le cerveau, le foie, les muscles et les branchies du poisson. Ainsi, les organismes ont été exposés par l'eau aux concentrations C0 : 0 µgU/L, C1 : 20 µgU/L et C2 : 100 µgU/L.

Les différentes fonctions cellulaires étudiées à travers l'expression différentielle de gènes sont la détoxification, la régulation de la balance oxydative, la respiration mitochondriale, l'apoptose, la réparation, la réponse inflammatoire et la réponse neuronale (**Tableau 6**).

Dans cette étude, la mesure des niveaux d'ARNm a été réalisée par PCR quantitative en temps réel.

Plusieurs fonctions sont détaillées dans la partie « altération des grandes fonctions cellulaires ». Nous nous attarderons donc sur la réponse inflammatoire et neuronale. Le métabolisme mitochondrial sera détaillé dans la troisième partie de ce chapitre.

Réponse inflammatoire

Des études antérieures ont mis en évidence l'induction de facteurs d'inflammations dans les reins du rat (Taulan *et al.*, 2006) et des lésions histologiques des lamelles branchiales chez le poisson zèbre lors d'expositions à l'uranium (Barillet, 2007).

Le gène choisi intervenant dans la réponse inflammatoire a été étudié au niveau des 4 organes.

L'interleukine-1 (IL-1) est une cytokine sécrétée par les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. Elle joue un rôle prééminent dans la réponse inflammatoire du corps aux infections. Elle augmente l'expression de facteurs d'adhésion sur les cellules endothéliales, afin de faciliter la transmigration des leucocytes (globules blancs) sur le ou les sites de l'infection.

Réponse neuronale

Des études menées au laboratoire ont mis en évidence une perturbation de l'acétylcholinestérase chez le poisson zèbre exposé à l'uranium (Barillet *et al.*, 2007). Chez le rat, le système cholinergique est une cible de l'exposition à l'uranium (Bensoussan *et al.*, 2009). Ces résultats ont donc contribué aux choix de gènes impliqués dans le système cholinergique.

Le système cholinergique

La découverte du premier neurotransmetteur, l'acétylcholine (ACh), fut suivie de la découverte de l'enzyme l'hydrolysant : l'acétylcholinestérase (AChE). L'ACh est impliquée dans l'apprentissage et la mémoire au niveau du système nerveux central et dans la contraction musculaire au niveau du système nerveux périphérique.

La neurotransmission régie par l'acétylcholine est fondamentale dans le fonctionnement du système nerveux. L'AChE hydrolyse et désactive l'ACh régulant ainsi la concentration du neurotransmetteur dans la synapse (**Figure 13**).

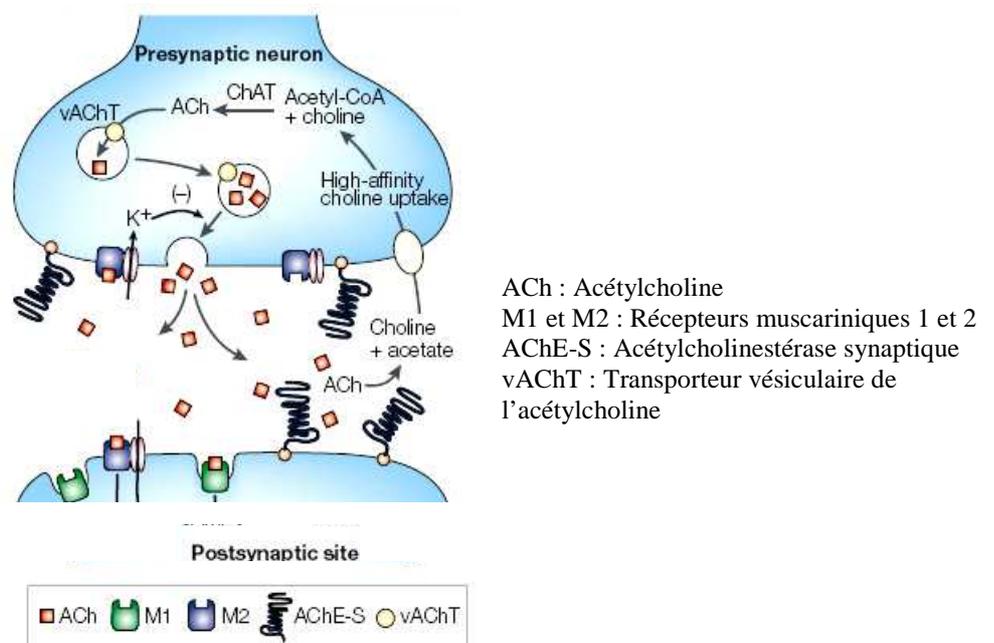


Figure 13 : Schéma du fonctionnement du système cholinergique (d'après Soreq et Seidman, 2001).

Au niveau du neurone présynaptique, la choline-acétyltransférase (ChAT) catalyse la synthèse de l'acétylcholine (ACh) à partir de la choline et de l'acétyl-CoA. L'ACh est prise en charge dans des vésicules synaptiques *via* le transporteur vésiculaire de l'ACh (vAChT). Les potentiels d'action induisent la libération de l'ACh dans la fente synaptique où elle peut se lier aux récepteurs muscariniques de la membrane pré et postsynaptique. Les récepteurs de la membrane postsynaptique assurent la transduction du signal. Les récepteurs situés au niveau de la membrane présynaptique contrôlent la libération de l'ACh *via* une rétroaction négative (**Figure 13**).

La glutaminase de type 1

La glutaminase de type 1 (GLS1) est impliquée dans la synthèse de glutamate qui est un neurotransmetteur excitateur très répandu dans le système nerveux central. Il est à l'origine de la synthèse de l'acide γ aminobutyrique, un neurotransmetteur important dans le SNC.

L'intégrine α M

L'intégrine α alpha M (CD11B) peut être impliquée dans des processus de neuroinflammation.

La glial fibrillary acidic protein (GFAP)

La GFAP est un filament intermédiaire présent dans certaines cellules gliales du système nerveux central, et en particulier les astrocytes. Si le système nerveux central est blessé, les astrocytes réagissent en produisant rapidement plus de GFAP. Elle serait impliquée dans la forme et le mouvement des astrocytes et jouerait un rôle dans le maintien de la barrière hémato-céphalique. Elle est impliquée dans le phénomène de gliose.

E. 2 La réponse transcriptionnelle globale

Une étude à grande échelle de fluctuation des niveaux d'ARNm permet de déceler de nouveaux marqueurs d'exposition à l'uranium et voies moléculaires associées. La prise en compte de milliers de transcrits permet de développer les recherches sur les modes d'action de l'uranium. Notre étude a consisté à développer (au vu des résultats de la première étude) les effets potentiels de l'exposition à l'uranium sur le système nerveux central du poisson par la technique des puces à ADN. La librairie utilisée se compose de 3479 séquences nucléotidiques (de 70 bases) de poisson zèbre.

Des modifications transcriptionnelles de gènes impliqués dans plusieurs processus biologiques ont été identifiées. Les voies moléculaires les plus pertinentes et explicites ont été étudiées de manière approfondie. Ces voies concernent la réponse de gènes impliqués dans la réception de surface cellulaire, l'adhésion cellulaire, et le transport d'ions.

E. 3 Le métabolisme mitochondrial

Dans la première étude, les niveaux d'expression des gènes *coxI* et *atpb* impliqués dans le métabolisme mitochondrial sont modifiés dès 3 jours d'exposition aux deux concentrations en uranium dans les muscles du poisson. La respiration mitochondriale est une des principales sources endogènes de génération des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule. Elle intervient également dans le déclenchement de l'apoptose. La respiration mitochondriale fournit de l'ATP, principale source d'énergie pour la cellule. Le dysfonctionnement mitochondrial, le stress oxydant et l'apoptose ont été reliées aux pathophysiologies de maladies neurodégénératives. La chaîne respiratoire mitochondriale est apparue comme un mécanisme d'intérêt dans le cadre d'une contamination à l'uranium suscitant des expérimentations supplémentaires. Ainsi, le fonctionnement de la chaîne respiratoire par oxygraphie, l'activité de la cytochrome-*c*-oxydase ainsi que l'analyse du contenu protéique des différents complexes (la NADH-déshydrogénase, la succinate-

déshydrogénase, les sous-unités I et IV de la cytochrome-*c*-oxydase et la sous-unité α de l'ATP-synthase) ont été étudiés par transferts de type western blot dans le cerveau et les muscles des poissons exposés à l'uranium.

La chaîne respiratoire des eucaryotes est localisée dans la membrane interne des mitochondries. Elle comprend quatre étapes d'oxydation catalysées par quatre complexes enzymatiques membranaires (I, II, III et IV) ; les vecteurs d'électrons entre les complexes sont deux molécules mobiles : l'ubiquinone dans la bicouche phospholipidique et le cytochrome *c* dans l'espace intermembranaire (EI). Lors du fonctionnement de la chaîne, un potentiel électrochimique de protons est généré au travers de la membrane par les complexes I, III, et IV. Le gradient de protons participe à la phosphorylation de l'ADP en ATP (**Figure 14**).

Le complexe I ou NADH-déshydrogénase, oxyde le NADH en NAD^+ et réduit le coenzyme Q en coenzyme QH₂. La réaction s'accompagne d'un pompage de protons de la matrice vers l'EI. Le complexe II ou succinate-déshydrogénase, oxyde le succinate en fumarate et réduit le coenzyme Q en coenzyme QH₂. Le complexe III ou cytochrome-*c*-réductase oxyde le coenzyme QH₂ en coenzyme Q et réduit le $\text{cytc}(\text{Fe}^{3+})$ en $\text{cytc}(\text{Fe}^{2+})$. La réaction s'accompagne d'un pompage de protons de la matrice vers l'EI. Le complexe IV ou cytochrome *c* oxydase, oxyde le $\text{cytc}(\text{Fe}^{2+})$ en $\text{cytc}(\text{Fe}^{3+})$ et réduit l'O₂ en H₂O. La réaction s'accompagne d'un pompage de protons de la matrice vers l'EI.

Le complexe F₀-F₁ forme l'ATP-synthase, enzyme couplée énergétiquement avec la chaîne respiratoire mitochondriale. Elle est constituée du complexe extramembranaire F₁ associé au complexe membranaire F₀. Ce dernier est un canal ionique à l'intérieur duquel passent les protons grâce à l'énergie fournie par le gradient de potentiel électrochimique des protons $\Delta\mu_{\text{H}^+}$. La synthèse d'ATP est alors réalisée au niveau du complexe F₁. Lorsque le

gradient de protons est favorable, l'enzyme couple la synthèse de l'ATP (à partir de l'ADP et du Pi) au flux spontané de protons du complexe Fo vers l'E1 (**Figure 14**).

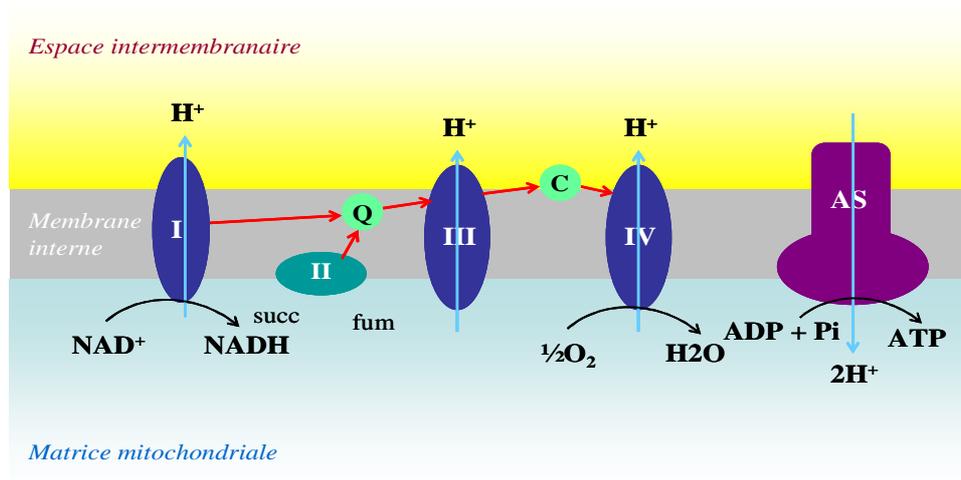


Figure 14 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale.

E. 4 L'ultrastructure cellulaire

Les réponses biologiques d'une contamination à l'uranium peuvent être reliées à des altérations cellulaires ou sub-cellulaires dans certains tissus ou organes spécifiques. La mesure de ces altérations constitue un bon indicateur de l'exposition à l'uranium. Nous nous sommes intéressés aux effets de l'uranium sur l'ultrastructure du tissu musculaire et du bulbe olfactif.

F. Objectifs

Ces travaux de thèse s'insèrent dans le cadre général de la caractérisation des effets de l'uranium chez le poisson zèbre *Danio rerio* exposé à de faibles concentrations en uranium dans l'eau.

Dans un premier temps, l'objectif a résidé dans la détermination des mécanismes moléculaires affectés à travers l'expression de gènes-cibles au niveau de quatre organes-clés. La spécificité tissulaire de la réponse transcriptionnelle et de l'accumulation en uranium dans le cerveau et les muscles a suscité une attention particulière dans la suite de notre programme de recherche, avec la réalisation de deux autres expériences.

Un second travail s'est focalisé sur les effets précoces d'une exposition à l'uranium dans le cerveau à travers une approche transcriptionnelle globale et la caractérisation des atteintes éventuelles sur l'ultrastructure du système olfactif.

Le dernier axe de recherche a visé à approfondir les effets de l'uranium sur le métabolisme mitochondrial dans le cerveau et les muscles à travers le fonctionnement de la chaîne respiratoire et l'état des structures cellulaires.

Tableau 6 : Récapitulatif des paramètres étudiés selon les objectifs du programme de recherche.

OBJECTIFS <i>CHOIX</i>	Expérience 1 Spécificité des mécanismes moléculaires selon les tissus	Expérience 2 Approfondissement des réponses dans les tissus cibles	Expérience 3 Fonctionnement de la chaîne respiratoire dans les tissus cibles
Conditions d'exposition	C0, C1, C2	C0, C1, C2	C0, C1, C2
Cinétique d'exposition	3, 10, 21, 28 j	3, 10 j	10, 28 j
Dépuration	8 j		
Organes	CERVEAU MUSCLES FOIE BRANCHIES	CERVEAU	CERVEAU MUSCLES
Paramètres biologiques	Détoxification Balance oxydative Métabolisme mitochondrial Apoptose Réparation Inflammation Réponse neuronale	Recherche parmi 3479 gènes	Couplage énergétique Synthèse protéique
Bioaccumulation	conditions & tissus décrits	conditions & tissus décrits	conditions & tissus décrits
Observation de l'ultrastructure	cerveau - 10, 28 j muscles - 10, 28 j & dépuration	lobe olfactif - 10 j	muscles - 10, 28 j lobe olfactif - 10 j

Chapitre III : Matériels et Méthodes

A. Conditions expérimentales

Les études en laboratoire permettent d'avoir une bonne maîtrise des conditions du milieu. Ce type d'étude permet une discrimination et un contrôle optimal des paramètres (concentrations, voies et durée d'exposition, physicochimie du milieu, nature et forme du contaminant). Le transfert de l'uranium étant très faible par voie trophique, nous nous sommes intéressés au transfert par une contamination de l'eau.

A. 1 Maintenance des organismes

A. 1. a) Description générale

Les poissons utilisés pour les expériences provenaient du fournisseur Exomarc (Lormont, France) et de l'élevage de la grande rivière (St Forgeux, France). Pour chaque expérience, des lots homogènes d'adultes matures (âge minimum : 3 mois) ont été obtenus. Les mâles pesaient environ 500 mg et mesuraient 3 cm. Les femelles n'ont pas été prises pour les expériences afin d'éviter des interférences dues aux processus de reproduction.

La maintenance des organismes en laboratoire a été réalisée en respectant les exigences expérimentales ainsi que les conditions les plus favorables (les moins stressantes possibles) pour les organismes. Les poissons ont été maintenus à une densité maximale de 5 individus par litre dans une eau à 24-25°C. L'oxygénation de l'eau a été assurée par des pompes à air. Les quantités de nourritures (GranoMix, JBL) administrées étaient de 2% de leur poids frais. Les fèces et surplus de nourriture dans les fonds des bacs ont été aspirés tous les jours.

A. 1. b) Eau artificielle

L'eau utilisée pour les expériences est une eau synthétique, dont la composition est détaillée dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Composition de l'eau synthétique utilisée dans les expériences (pH = 6,4 pCO₂ atm).

Espèces	Concentration (mg/L)
Ca ²⁺	8,7
Mg ²⁺	1,4
Na ⁺	5,1
K ⁺	1
Cl ⁻	13,4
SO ₄ ²⁻	12,5
NO ₃ ⁻	9,2
CO ₃ ²⁻	0,45

L'eau artificielle choisie représente un bon compromis entre le maintien des conditions physiologiques normales de l'animal et l'optimisation de la biodisponibilité de l'uranium. La composition de l'eau a été réalisée à l'aide de simulations effectuées avec le logiciel JCHESS qui permet de modéliser la spéciation de l'uranium en se basant sur des équilibres thermodynamiques. Ce logiciel utilise la base de données thermodynamiques vérifiée par F. Denison (2003).

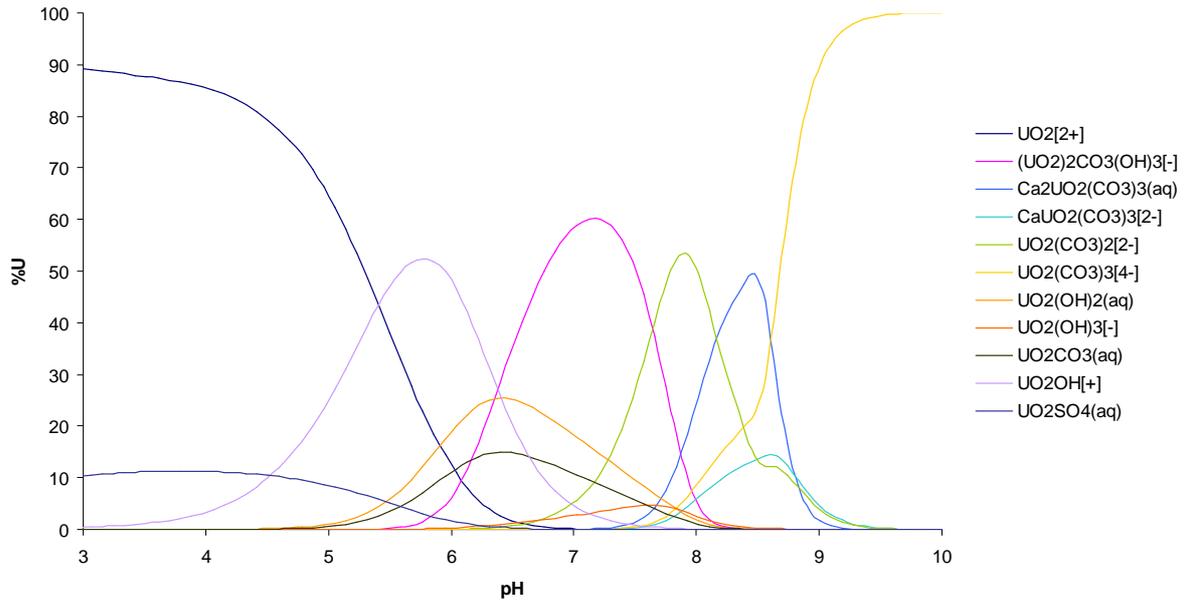


Figure 15 : Spéciation théorique de l'uranium dans l'eau artificielle utilisée (20 µg U/L, pCO₂ atm) réalisée à partir de la banque de données de Denison et Garnier-Laplace (2003) avec le logiciel JCHESS.

Pour une faible concentration en uranium, et dans une eau de composition simple à pCO₂ atm, les espèces majoritaires sont UO₂²⁺, UO₂OH⁺, UO₂(OH)₂ (aq), dans la gamme 5,5 < pH < 6, UO₂OH⁺, UO₂OH₂(aq), (UO₂)₂CO₃(OH)₃⁻, UO₂CO₃ (aq) dans la gamme 6 < pH < 6,5, (UO₂)₂CO₃(OH)₃⁻, UO₂(CO₃)₂²⁻ Ca₂UO₂(CO₃)₃ (aq) dans la gamme 6,5 < pH < 8,5, et pour les pH > 8,5, l'espèce majoritaire est (UO₂)₂(CO₃)₃⁴⁻ (**Figure 15**).

Dans le cas de l'eau utilisée dont le pH d'équilibre est 6,4, les espèces majoritaires sont : UO₂CO₃ (aq), UO₂(OH)₂ (aq), (UO₂)₂CO₃(OH)₃⁻ et UO₂OH⁺, trois d'entre-elles étant des espèces considérées comme biodisponibles (cf § biodisponibilité).

A. 1. c) Dispositif expérimental

Dans le système ouvert choisi pour les expériences, l'arrivée d'eau est assurée par un pompage dans des nourrices contenant une centaine de litres. Le rejet est effectué par pompage de l'eau du bac jusqu'en cuve suspecte (**Figure 16**).

Pour deux expériences dont les temps de prélèvements étaient rapprochés, des cages ont été utilisées afin de réduire le stress des poissons pendant leur collecte (**Figure 16**). Ainsi, pour un temps donné, tous les poissons d'une même cage ont été prélevés sans perturber les autres organismes.

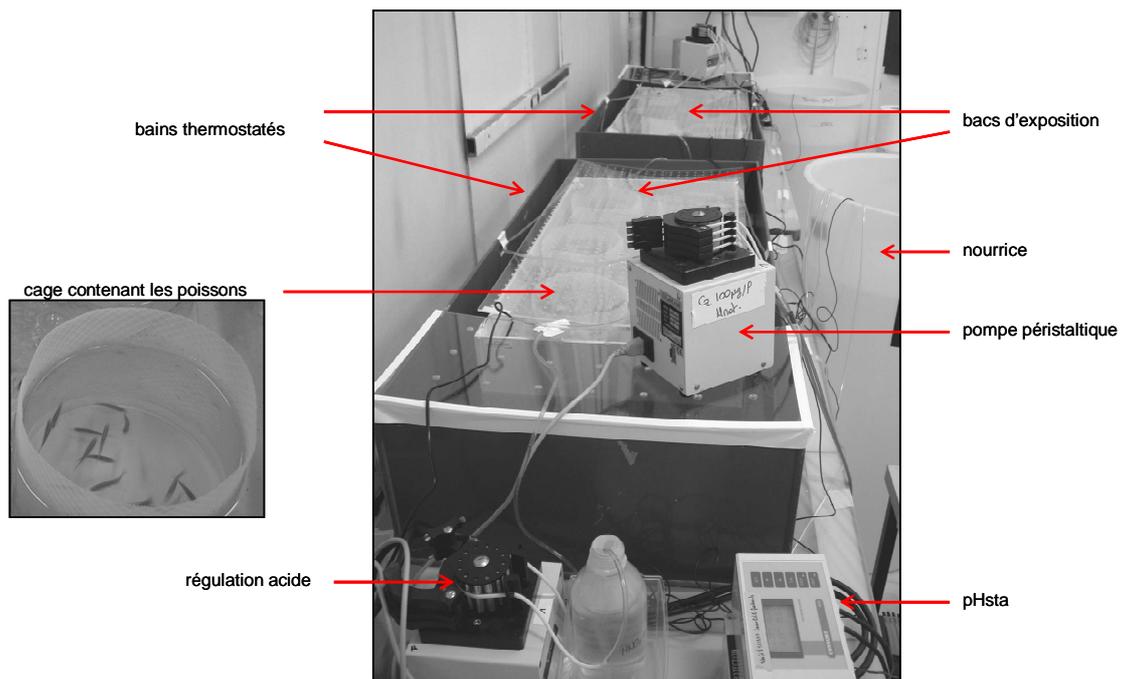


Figure 16 : Dispositif expérimental.

A. 1. d) Contrôle des paramètres

Les paramètres physicochimiques ont été contrôlés de façon journalière. Les concentrations en anions majeurs ont été analysées dans des échantillons d'eau par

chromatographie ionique (Dionex DX-120, Sunnyvale, CA, USA). Les concentrations en cations majeurs et en uranium ont été mesurées par spectrométrie d'absorption atomique (ICP-AES, Optima 4300DV, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA, limite de quantification de 10 µg/L) après acidification des échantillons à une concentration finale de 0,3M d'acide nitrique (2% HNO₃ 14,4M, v/v). Le pH a été maintenu à 6,3-6,5 par des pHstats (Consort R301, Illkirch, Belgium), contrôlant l'ajout d'acide nitrique (0,01M HNO₃).

B. 2 Conditions d'exposition

A. 2. a) Concentrations

La solution mère utilisée pour les expériences a été préparée à partir de nitrate d'uranyle UO₂(NO₃)₂ 6H₂O (Sigma, France) acidifié avec de l'acide nitrique à une concentration finale de 0,3M (2% HNO₃ 14,4M, v/v). L'uranium utilisé est de l'uranium appauvri à 0,2% en ²³⁵U. La solution a été stockée à 4°C pendant les expériences.

Pour chacune de nos expériences, la condition C0 a été associée à la condition témoin, la condition C1 à l'exposition faible concentration correspondant à une concentration nominale de 20 µg/L, et la condition C2 à l'exposition plus élevée correspondant à une concentration nominale de 100 µg/L.

A. 2. b) Procédure de contamination

Avant la contamination, les organismes ont été acclimatés pendant 2 à 3 semaines dans les unités expérimentales.

Au temps initial de la contamination, l'eau des nourrices et des bacs des conditions d'exposition C1 et C2 a été contaminée avec une solution contenant la concentration correspondante en solution mère d'uranium et de la soude (NaOH, 1M) afin de neutraliser l'acidité. Le système ouvert a permis d'assurer une contamination en continu. La décroissance de l'uranium pendant les premiers jours d'exposition, en partie due à l'absorption sur les

plastiques (bacs, pompes de circulation, sucres et cages), a été compensée manuellement une à deux fois par jour.

A. 2. c) Prélèvement et dissections

A chaque temps d'analyse, les poissons ont été prélevés et sacrifiés dans un mélange de glace et d'eau à 0°C. Un maximum de 4 organes : le cerveau, les muscles, le foie et les branchies ont été disséqués selon les expériences. Les poissons utilisés pour les extractions de protéines et les mesures de respiration mitochondriale ont été disséqués dans une coupelle en verre sur de la glace. Les organes dédiés aux analyses d'expression de gènes ont été congelés à -80°C dans du « RNA later » (Qiagen) afin d'optimiser la conservation des ARNs, notamment pendant les transports.

B. Bioaccumulation

La bioaccumulation de l'uranium, c'est-à-dire la capacité de l'organisme à absorber et concentrer l'uranium, a été évaluée dans les différents organes/tissus du poisson. Elle permet de déterminer les sites préférentiels d'accumulation de l'uranium et sa durée de stockage dans les organes. De plus, un effet ou une réponse biologique peut être lié à une concentration tissulaire.

Afin de mesurer les concentrations tissulaires en uranium rapportées en masse de poids sec, les organes ont été introduits dans des microcoupelles préalablement pesées, séchés à l'étuve à 50°C pendant 48 h puis pesés à l'aide d'une microbalance (Sartorius SE2, Germany).

Une digestion acide des échantillons a été effectuée avec de l'acide nitrique (1 mL d'HNO₃ 14,4M) dans des tubes en polypropylène à 100°C pendant 3h. Après une dilution dans l'acide des minéralisats, les concentrations en uranium ont été mesurées par

spectrométrie de masse à couplage plasma inductif (ICP-MS, Varian 810, Australia, limite de quantification 1 ng/L).

C. Expression de gènes

C. 1 PCR quantitative en temps réel

C. 1. a) Extraction des ARNs

Les ARNs ont été extraits de 40 mg de tissu en utilisant le kit « Absolutely RNA RT-PCR Miniprep kit » (Stratagene, Amsterdam, Netherlands) et selon les instructions du fournisseur. La qualité des ARNs obtenus a été évaluée par électrophorèse en gel d'agarose-formaldéhyde à 1%. Pour chaque condition, 5 réplicats ont été analysés.

C. 1. b) Obtention des ADNc

Les ADNc ont été synthétisés à partir de 5 µg des ARN totaux en utilisant le kit « AffinityScript™ Multiple Temperature cDNA Synthesis kit » (Stratagene) selon les instructions du fournisseur. Les ADNc ont été conservés à -20°C avant l'analyse en PCR quantitative en temps réel.

C. 1. c) Amplification

Pour chaque gène d'intérêt, des couples d'amorces spécifiques ont été déterminées à l'aide du logiciel LightCycler de design des amorces (version 1.0, Roche, Meylan, France). Les numéros d'accession ainsi que les amorces de chaque gène sont détaillés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Symboles des gènes, numéros d'accèsion et séquences des amorces correspondantes utilisées dans l'expérience 1.

Nom du gène	Symbole	Numéro d'accèsion	Amorces (5'-3')
acetylcholinesterase	<i>ache</i>	NM_131846.1	GTGGCAACTCGCATGGT ^a AGTGCGGGCGAAATTAGC ^b
choline acetyltransferase	<i>chat</i>	NM_001130719.1	GGAAGTCCATAAAAGCCCAA ^a TTGGGACGACTGGACCAT ^b
vesicular acetylcholine transporter	<i>vchat</i>	NM_201107.1	TCCGTTTGGCGGAATCCT ^a ACGGCGATGTACGGGTC ^b
glial fibrillary acidic protein	<i>gfap</i>	NM_131373.2	AGTACCAGGACCTGCTCAA ^a ACAGTTCGCACAACCTATGCT ^b
integrin alpha-M precursor	<i>cd11b</i>	XM_687072.3	ACGTGACGCTGTTTGTGCG ^a GCCAGCAGCACAAGTCC ^b
glutaminase, like	<i>gls1</i>	NM_001045044.1	AGGCCATGCTGAGGTTG ^a CTGCCGTCTCTTTTTTCGCT ^b
beta actin 1	<i>bactin</i>	NM_131031	AAGTGCACGCTGGACA ^a GTTTAGGTTGGTCGTTTCGTTGA ^b
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 3 like 1	<i>abcb311</i>	NM_001006594.1	GCAAGATAGCGATGGTGGG ^a CGTTGGCTTTGCTTGCAG ^b
cytochrome P450, family 3, subfamily c, polypeptide 1 like 2	<i>cyp3c112</i>	NM_001007400.1	GGGTCTGTAAGAAGACTGTAGAGC ^a CGAGGCCCGAGTCCAA ^b
heat shock protein, alpha-crystallin-related 1	<i>hspb1</i>	NM_001008615.1	CAGCACACACTGGCCG ^a GTGATTGACATCTAGGCTGATCTT ^b
glutathione peroxidase 1a	<i>gpx1a</i>	NM_001007281.2	CACCCTCTGTTTGGCTTCC ^a CTCTTTAATATCAGCATCAATGTCGATGG ^b
glutathione-S-transferase pi	<i>gstp1</i>	NM_131734.3	CGGATTCCTGGTTGGCG ^a TGCCATTGATGGGCAGTTT ^b
catalase	<i>cat</i>	NM_130912.1	CCTGTGGGGCGTTTTG ^a CGGTACGGGCAGTTGAC ^b
superoxide dismutase 1, soluble	<i>sod1</i>	BC055516.1	TGAGACACGTCGGAGACC ^a TGCCGATCACTCCACAGG ^b
superoxide dismutase 2, mitochondrial	<i>sod2</i>	CB923500.1	TTCAGGGCTCAGGCTGG ^a ATGGCTTTAACATAGTCCGGT ^b
bcl2-associated X protein	<i>bax</i>	AF231015.1	GGCTATTTCAACCAGGGTTCC ^a TGCGAATCACCAATGCTGT ^b
growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	<i>gadd45b</i>	BC059472.1	GCTTGTTCGTGTCTTCTGTGG ^a

RAD51 homolog	<i>rad51</i>	BC062849.1	CTTCCCGCATTTCAGCGAT ^b TGCTGCGTCTCGCTGA ^a GCCTCGGCCTCTGGTAA ^b
cytochrome C oxydase subunit I	<i>coxI</i>	NC_002333.2	GGAATACCACGACGGTACTCT ^a AGGGCAGCCGTGTAAT ^b
ATP synthase, H ⁺ transporting mitochondrial, F0 complex, subunit b, isoform 1	<i>atp5f1</i>	BC083308.1	GTGTGACAGGGCCTTATATGC ^a CTGAGCCTTTGCTATTTTATCCGC ^b
interleukine 1 beta	<i>il1b</i>	NM_212844.1	GGTTGCGCAGCGGCGGATCTC ^a GACCCGCTGATCTCCTTGAGT ^b

^a Amorce sens. ^b Amorce anti-sens.

L'amplification des ADNc est suivie par l'agent intercalant de l'ADN le « SyberGreen I » (Roche). Les réactions de PCR en temps réel ont été réalisées dans le LightCycler (Roche) et le Mx3005P QPCR System (Stratagene) selon les instructions du fournisseur (**Figure 17**). Chaque mélange réactionnel de 20 µL contenait 2 µL d'ADNc (0,5 µg d'ARN rétro-transcrit), 1 µL de mélange contenant le marqueur fluorescent, le couple d'amorces spécifique du gène étudié à une concentration finale de 300 nM pour chaque amorce.

a)



Programme	T°C	Temps
dénaturation	95	10min
1 cycle		
amplification	95	5s
50 cycles	60	5s
	72	20s

b)

Programme	T°C	Temps
dénaturation	95	10min
1 cycle		
amplification	95	1min
50 cycles	60	1min
	72	1min

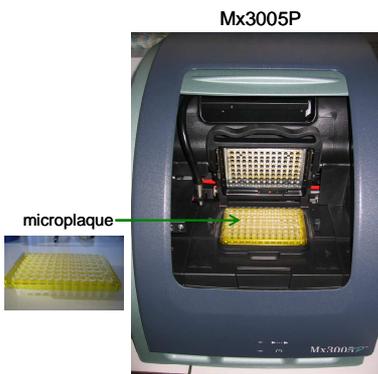


Figure 17 : Programme des cycles avec les appareils a) LightCycler et b) Mx3005P.

La spécificité des réactions a été déterminée par la courbe de dissociation des produits de PCR. Ces courbes sont obtenues en suivant le niveau de fluorescence pendant l'élévation de température progressive des produits de PCR de 60°C à 95°C.

Le gène de référence choisi pour les expériences est le gène de l'actine pour des raisons de stabilité dans le temps et selon les traitements dans les expériences.

Ainsi, l'expression de chaque gène a été normalisée à l'expression du gène de l'actine et calculée par la méthode des $\Delta\Delta C_t$. Pour chaque niveau d'expression génique, la valeur moyenne ainsi que l'écart-type ont été déterminés ($n = 5$). Les facteurs d'induction de chaque gène ont été obtenus en effectuant le rapport entre le niveau d'expression moyen du gène d'intérêt d'une condition d'exposition et le niveau d'expression moyen de ce gène pour la condition contrôle.

C. 2 Puce à ADN

Une librairie d'oligonucléotides de poisson zèbre (Qiagen Operon[®] Array-ready oligo set[™]) a été obtenue chez Qiagen (Venlo, The Netherlands). Cette librairie se compose de 3479 séquences oligonucléotidiques de 70 bases spécifiques de différents tissus représentant des

gènes de fonctions connues ou prédites chez le poisson zèbre. Les séquences ont été déposées sur les lames (**Figure 18**).

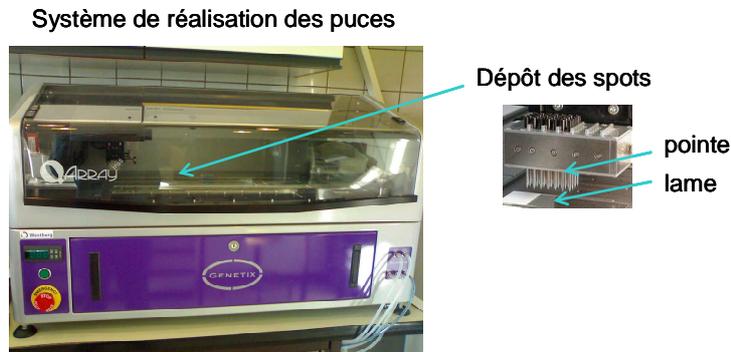


Figure 18 : Système de dépôt des spots sur les lames.

Les analyses transcriptomiques ont été réalisées sur le cerveau et sur les muscles. Cependant, des difficultés ont été rencontrées pour les tissus musculaires. Le matériel biologique obtenu après les différentes étapes était de moins bonne qualité et les scans des puces ont révélés des anomalies (traces de marqueur, intensités des spots anormales). Nous n'avons donc pas donné suite à cette étude.

C. 2. a) Extraction des ARNs

Pour chaque condition, 3 répliquats de pool de 10 cerveaux ont été préparés. Les ARNs totaux ont été extraits à partir de 50 mg de tissu selon le protocole d'extraction au Trizol « Trizol-RNA-Extraction » (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) suivant les instructions du fournisseur. La qualité des ARNs (intégrité des bandes ribosomiques 16S et 28S) a été évaluée par électrophorèse en gel d'agarose-formaldehyde à 1%.

C. 2. b) Marquage

Les ARNs ont été rétro-transcrits en utilisant l'enzyme « Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase » (Invitrogen), des amorces aléatoires (Invitrogen) et un mélange de dNTP marqués (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 15 mM dTTP, 10 mM aminoallyl(aa)-dUTP, Fermentas, Germany). Une référence (Lucidea) et des ARNm « tests » (GE Healthcare, UK) ont été ajoutés aux échantillons d'ARNs des organismes contrôles et exposés, afin de valider la performance de la puce (paramètres et analyse quantitative).

Les aa-dUTP non incorporés ont été retirés avant le couplage avec le marqueur Cy : N-hydroxysuccinimide-ester (NHS-ester) en utilisant le kit « Qiaquick PCR purification kit » (Qiagen, Crawley, UK).

Après la purification, 40 000 pmol de NHS-ester Cy3 et Cy5 (Amersham Biosciences, Roosendaal, the Netherlands) ont été couplés aux aa-dUTP des aa-cDNA. Une deuxième étape de purification sur colonnes « Qiaquick PCR purification columns » (Qiagen, Crawley, UK) a permis d'enlever les marqueurs Cy non incorporés. La quantité de marqueur incorporé dans chaque échantillon de cDNA a été déterminée par spectrophotométrie à 550 nm (Cy3) et 650 nm (Cy5). Pour chaque échantillon, une aliquote de 50 pmoles d'ADNc marqué a été séchée.

C. 2. c) Hybridation

Lors de l'étape de pré-hybridation, les lames ont été incubées dans une solution composée de SSC 5x, de SDS 0,1% et de BSA 1 mg/mL pendant 1h à 42°C. Ensuite, les lames ont été rincées dans un bain d'eau déminéralisée puis dans un bain d'isopropanol suivi d'un séchage à l'azote.

Les pelotes d'ADNc précipitées ont été reprises dans une solution d'hybridation contenant 30% de formamide, SSC 5x, 0,1% SDS et 0,1 mg/mL de sperme de saumon. Chaque échantillon Cy3 ou Cy5 a été mélangé avec la référence correspondante. Le mélange

a été dénaturé à 95°C pendant 5 minutes et déposé sur la lame. Les lames ont ensuite été recouvertes par des lamelles. Les lames ont été disposées dans une chambre d'hybridation (Genetix, Ltd, Hampshire, UK) et laissées à 42°C pendant 16-18h (**Figure 19**).

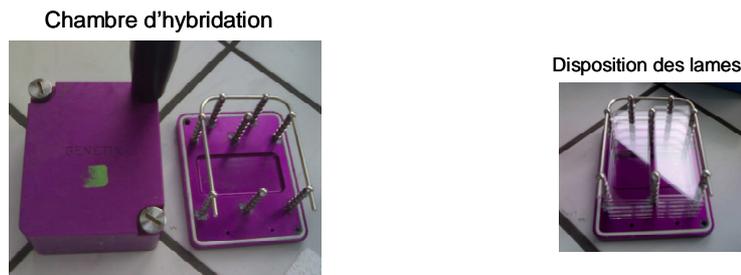


Figure 19 : Chambre d'hybridation.

Après l'hybridation, plusieurs lavages ont été effectués. Les lames ont été immergées dans un bain à 42°C de 2x SSC et de 0,1 % de SDS pour enlever les lamelles puis dans deux autres bains identiques pendant 5 min, puis dans deux bains de 0,1x SSC et de 0,1 % de SDS à température ambiante pendant 10 minutes, et enfin quatre bains de 0,1x SSC à température ambiante pendant 1 minute (**Figure 20**). Après le dernier lavage, les lames ont été rincées dans un bain d'eau déminéralisée puis dans un bain d'isopropanol d'1 minute chacun puis séchées à l'azote.

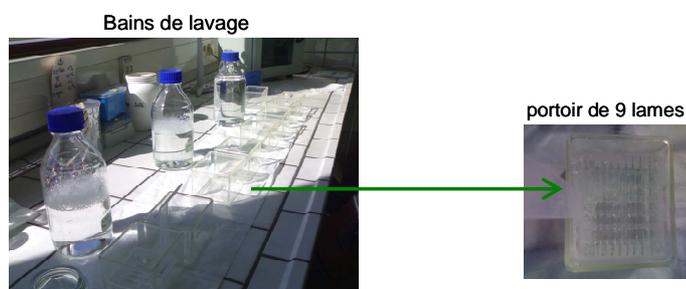


Figure 20 : Lavage des lames.

C. 2. d) Analyse bioinformatique

Les puces ont été analysées en utilisant un scanner confocal excitant les fluorophores à 532 et 635 nm (Genetix Personal 4100A, Axon Instruments, Union city, CA, USA). Le réglage du tube photomultiplicateur a été ajusté pour chaque puce de façon à avoir un rapport proche de 1. L'identification des spots et leur quantification ont été réalisées avec le logiciel Genepix Pro 4.1. Les résultats ont ensuite été traités à l'aide d'un serveur « Bioarray Software Environment Database » (BASE 1.2.12, <http://www.islab.ua.ac.be/base/>). L'intensité du rapport entre une condition exposée et la condition témoin correspondante a été calculée. Une transformation logarithmique en \log_2 a été effectuée ainsi que des analyses statistiques et une normalisation des données. De plus, un cut-off a été effectué pour ne considérer que les facteurs d'induction supérieurs à 2 (soit $\log_2(\text{cy5}/\text{cy3}) > 1$) et les facteurs de répression inférieurs à 0,5 (soit $\log_2(\text{cy5}/\text{cy3}) < -1$). Un logiciel d'ontologie génétique a contribué à classer et à annoter les gènes différentiellement exprimés à partir de leur identification GO (Gene Ontology) Blast2GO (www.blast2go.de). Néanmoins, cet outil bioinformatique, pourtant couramment utilisé dans le traitement des données de puces, présentait de nombreuses erreurs dans la classification des gènes. Il a donc été nécessaire de mener une recherche approfondie sur la fonction de chacun des gènes pour un classement en processus biologiques rigoureux.

D. Bioénergétique mitochondriale

D. 1 Oxygraphie

D. 1. a) Préparation des fibres musculaires

20 mg de fibres ont été incubées 5 minutes dans le « tampon A » (pH = 7,1 composition détaillée **Tableau 9**) afin de préserver les fibres, 1 minute dans le tampon de perméabilisation (tampon A contenant de l'ATP à 5 mM, de la Phosphocréatine à 20 mM et de la saponine à 50 µg/mL perméabilisant les membranes) et rincées dans 5 mL de tampon B (tampon A contenant du KH_2PO_4 à 3 mM et 25 mg BSA) afin d'enlever la saponine.

Tableau 9 : Composition du « tampon A ».

Ingrédient	Concentration (mM)
MES	100
Imidazole	20
EGTA	10
MgCl_2	5
Taurine	20
Dithiothreitol	0,5

D. 1. b) Préparation des cerveaux

Chaque cerveau a été introduit dans 70 µL du « tampon de respiration cerveau » (pH = 7,4 composition détaillée **Tableau 10**), pesé et broyé au potter dans un tube de 1,5 mL (12 passages d'un piston conique).

Tableau 10 : Composition du « tampon de respiration cerveau ».

Ingrédient	Concentration (mM)
Mannitol	225
Saccharose	75
EDTA	0,1
KCl	5
H_3PO_4	5
Tris	15

D. 1. c) Mesures de respiration mitochondriale

La consommation en oxygène mitochondriale a été mesurée polarographiquement à 28°C dans une chambre de 1 mL thermostatée réalisée sur mesure et équipée d'une électrode de Clark (Heito) (**Figure 21**). L'oxygraphe (Heito) est connecté à un système d'acquisition (logiciel réalisé au laboratoire). La chambre est quasiment étanche, elle est bouchée par un bouchon d'un trou de 1 mm de diamètre permettant l'ajout des substrats et inhibiteurs en limitant au maximum la surface de contact avec l'air ambiant (**Figure 21**). La réoxygénation est nulle ou négligeable pour des concentrations en O₂ supérieures ou égales à 20% de la saturation.

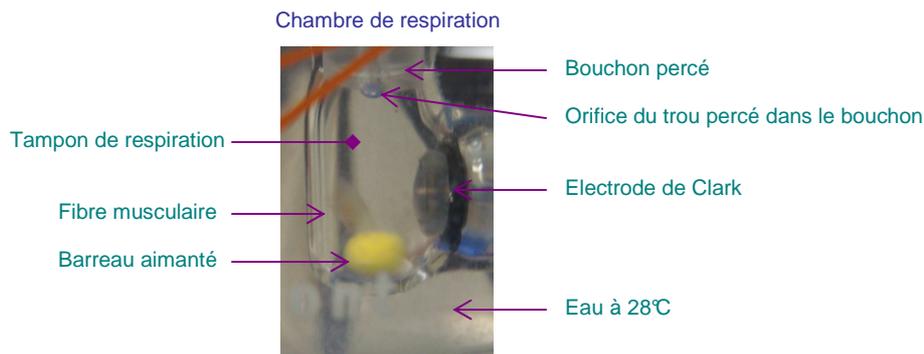


Figure 21 : Chambre de respiration.

Deux systèmes à oxygraphie ont permis l'analyse en parallèle des fibres musculaires et du cerveau des organismes. Une cuve à oxygraphie contenait le morceau de fibre musculaire perméabilisée dans 1 mL du « tampon de respiration muscles » (pH = 7,4 composition détaillée **Tableau 11**). L'autre cuve contenait l'homogénat de cerveau dans le « tampon de respiration cerveau » (**Tableau 10**).

Tableau 11 : Composition du « tampon de respiration muscles ».

Ingrédient	Concentration (mM)
Mannitol	75
Saccharose	25
EDTA	0,5
KCl	100
H ₃ PO ₄	10
Tris-HCl	20

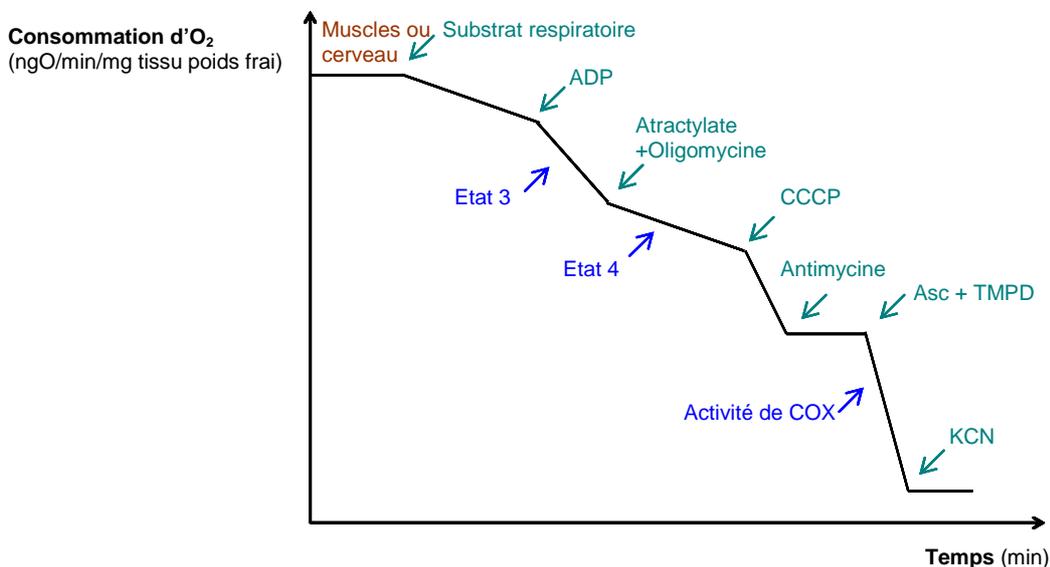


Figure 22 : Profil oxygraphique.

Le broyat de cerveau ou la fibre musculaire sont introduits dans la cuve d'oxygraphie. Les substrats respiratoires (pyruvate 10 mM et malate 10 mM) sont ajoutés, la chaîne

respiratoire fonctionne au repos. Lors de l'ajout d'ADP 2 mM, il y a phosphorylation de l'ADP en ATP par l'ATP-synthase, provoquant une diminution du gradient électrochimique de protons, la respiration est alors stimulée, le fonctionnement de la chaîne respiratoire est phosphorylant, c'est l'état 3. L'addition d'atractylate 1 mM et d'oligomycine 12,5 µg/mL inhibent l'activité de l'ATP-synthase et de l'ATP-translocase, la différence de potentiel électrochimique en protons est maintenue, le fonctionnement de la chaîne respiratoire est non phosphorylant, c'est l'état 4. Le CCCP est un découplant qui perméabilise la membrane aux protons. Il stimule ainsi la respiration et permet l'obtention de la vitesse maximale (le flux d'électrons est maximum sur l'ensemble de la chaîne respiratoire). L'ajout d'antimycine inhibe le complexe III, la respiration est totalement inhibée ce qui va permettre ensuite la mesure de la consommation du complexe IV par addition d'ascorbate et de tetraméthylphénylènediamine (TMPD) permettant l'apport direct d'électrons au complexe IV. Le cyanure provoque un arrêt total de l'activité respiratoire.

Après chaque mesure de respiration, le morceau de fibre est enlevé, égoutté puis pesé. Le contrôle respiratoire est défini par le rapport entre la consommation d'oxygène à l'état 3 et l'état 4 (**Figure 22**).

D. 1. d) Activité de la cytochrome *c* oxydase

L'activité de la cytochrome *c* oxydase (complexe IV) a été évaluée en inhibant le complexe III avec de l'antimycine (3 µg/mL) et en utilisant de l'ascorbate (12,5 mM) et du TMPD (1,5 mM) système donneur d'électrons (**Figure 22**). Le niveau respiratoire a été mesuré selon la méthode polarographique décrite précédemment.

D. 2 Analyse du contenu protéique

D. 2. a) Traitement des protéines

5 poissons par condition ont été dédiés aux analyses protéiques. Le cerveau et les fibres musculaires de chaque poisson ont été introduits dans des tubes de 1,5 mL contenant

120 μL et 500 μL de produit d'extraction des protéines respectivement (T-PER Tissue Protein Extraction Reagent, Pierce) et un inhibiteur de protéases (Roche). Chaque cerveau a été traité au sonicateur (demi puissance, 1 à 2 s). Les fibres musculaires ont été écrasées dans un tube Eppendorf à l'aide d'un potter conique puis broyées pendant quelques secondes à l'ultraturax. La fraction protéique a été recueillie après deux étapes de centrifugation afin d'éliminer les gros débris cellulaires et tissulaires.

La concentration en protéines a été déterminée par une méthode colorimétrique en microplaques à l'aide du kit « BCA Protein Assay Reagent » (Pierce). Les préparations ont été ramenées à 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protéines dans un tampon de charge et de l' H_2O QSP. Elles ont été congelées à -80°C en attendant l'étape suivante. Pour chaque échantillon, 20 μg de protéines ont été déposés par piste et séparés par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE 15%.

D. 2. b) Transferts Western

La migration de 1h30 à 60 mA et 60 V a été réalisée dans le tampon de migration de Laemmli. Les produits de migration ont été transférés sur des membranes en nitrocellulose par transfert semi-sec pendant 7 minutes (iBlot™ Dry Blotting System, Invitrogen).

Chaque membrane a été incubée avec un cocktail d'anticorps monoclonaux de souris (MitoSciences) dirigés contre la sous-unité NDUF3 (MS110) du complexe I (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la sous-unité de la protéine Fe/S du complexe II (MS203) (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), les sous-unités COXI (MS404) (1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et COXIV (MS407) (1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) du complexe IV, une sous-unité alpha de l'ATPsynthase (MS502) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et la porine (MSA03) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ensuite, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-igG de souris (Jackson Immuno Research laboratories, Inc.) couplé à la peroxydase. Les bandes correspondant aux protéines ciblées ont été détectées par chimioluminescence (Amersham, Biosciences) à l'aide d'une caméra CCD (Genegnome, Syngene, Bio-Imaging).

Les quantifications ont été réalisées avec le logiciel ImageJ.

E. Observations microscopiques

L'analyse des effets de l'uranium au niveau cellulaire et tissulaire est complémentaire aux analyses moléculaires et fonctionnelles présentées précédemment. L'examen ultrastructural rend compte des effets à un niveau d'organisation biologique supérieur.

L'examen des structures a été réalisé avec le microscope électronique à transmission (MET) Tecnai 12 G2 Biotwin (FEI, Eindhoven, Pays-Bas), avec une tension d'accélération maximale de 120 kV, une résolution de 0,2 nm et un grossissement possible de 300 000 x. Des analyses chimiques ont été réalisées par couplage du microscope avec une sonde EDX (Energy Dispersive X-ray) équipée d'une fenêtre ultrafine (SUTW, SAPPHIR).

Après fixation chimique et déshydratation, les tissus d'intérêts ont été inclus dans des supports de résine (Epon 812). Des coupes ultra-fines ont été réalisées à l'aide d'un ultramicrotome (Leica Microsystems, Ruel-Malmaison, France). L'épaisseur des coupes dédiées à l'analyse optique, l'observation au MET et à l'analyse chimique était respectivement de 500 nm, 80 nm et 140 nm.

F. Statistiques

Les variations des concentrations tissulaires en uranium, des expressions de gènes ainsi que les différences de consommation en oxygène entre les individus exposés à C1 ou C2 et les contrôles C0 ont été analysées avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis (les hypothèses de normalité et d'indépendance des variables n'étaient pas vérifiées). Le nombre de réplicats utilisé pour chaque expérience est détaillé dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 : Description des réplicats analysés au cours des trois expériences.

Paramètres	Réplicats
Expérience 1	
Organe	cerveau, foie, muscles, branchies
Expression gènes	$n^* = 5$
Bioaccumulation	
Analyse MET	$n = 3$
Expérience 2	
Organe	cerveau
Expression gènes	$n^{**} = 3$
Bioaccumulation	$n = 5$
Analyse MET	$n = 3$
Expérience 3	
Organe	cerveau, muscles
Respiration mitochondriale	$n = 9$
Bioaccumulation	$n = 5$
Synthèse de protéines	$n = 4$
Analyse MET	$n = 3$
* n : pool de 4 organes	
** n : pool de 10 organes	

**Chapitre IV : Effets de l'uranium sur l'expression de gènes
impliqués dans différentes voies moléculaires de stress cellulaire
au niveau de 4 organes-clés chez *Danio rerio***

Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles, and gills of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant waterborne uranium concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2009, 28, 1271-1278.

Introduction

Les modes d'action toxique de l'uranium chez le poisson sont relativement peu connus. Parmi les réponses étudiées, une perturbation de la balance oxydative a été mise en évidence, pouvant être à l'origine d'atteintes à l'ADN ainsi qu'une perturbation de l'activité de l'AChE (Barillet, 2007). Toutefois, de nombreuses autres réponses cellulaires potentiellement perturbées par une exposition à l'uranium restent inexplorées (i.e. détoxification, apoptose, réparation des dommages à l'ADN, métabolisme énergétique, neuroinflammation).

L'objectif de l'étude présentée ci-après a reposé sur l'évaluation de la spécificité des réponses moléculaires dans différents tissus-cibles du poisson zèbre exposé à de faibles concentrations en uranium dans l'eau. Le suivi de l'expression de 15 à 20 gènes a été réalisé au cours d'une phase d'exposition de 28 jours suivie d'une phase de dépuración de 8 jours donnant un premier aperçu des processus mis en œuvre lors de l'élimination de l'uranium. Les différents axes de recherche étaient les suivants :

Comparaison multiple des réponses selon différents organes.

Les organes-cibles ont été choisis en fonction de leur rôle physiologique d'une importance majeure chez le poisson. Dans le cerveau, des dysfonctionnements de voies de neurotransmission ou des lésions peuvent porter une atteinte au bon fonctionnement du système nerveux central. Outre leur rôle dans la respiration, les branchies interviennent également dans l'osmorégulation. Le foie peut être considéré comme la principale usine métabolique de l'organisme mais accomplir également de nombreuses autres tâches (détoxification, synthèse de protéines plasmatiques, stockage des réserves...). Enfin, les muscles génèrent les mouvements adaptés à la situation environnementale et requièrent un coût énergétique important permettant la contraction dans l'effort de nage. Ces organes ont été

choisis dans notre étude parce qu'ils possèdent un rôle physiologique qui leur est propre ce qui suggère une diversité des mécanismes impliqués vis-à-vis de la pression de contamination. De plus, les résultats antérieurs suggèrent que leur étude est pertinente dans le cadre de la toxicité de l'uranium (Cooley et Klaverkamp, 2000a, Cooley *et al.*, 2000b, Barillet, 2007, Barillet *et al.*, 2007).

Des expériences antérieures menées au laboratoire ont mis en évidence une perturbation de l'activité de l'acétylcholinestérase dès 3 jours d'exposition dans le cerveau des poissons zèbres exposés à 20 et 100 µg/L d'uranium (Barillet, 2007). Dans les mêmes conditions expérimentales, une diminution des concentrations des enzymes antioxydantes a été remarquée dans le foie des organismes. Les branchies et les muscles ont fait l'objet d'analyses histologiques chez poisson zèbre exposé à l'uranium et des dommages ont été observés (Barillet, 2007).

Afin de recouper et de comparer rigoureusement les résultats avec ceux précédemment obtenus, les concentrations, les temps et les conditions physicochimiques (T°C, pH, composition de l'eau artificielle et concentrations en uranium) ont été choisis par rapport aux expériences de chimiotoxicité de Barillet (2007).

L'étude des mécanismes moléculaires mis en jeu dans le cadre d'une dépuraison de l'uranium est une partie originale encore non explorée lors de travaux antérieurs. La phase de dépuraison permet d'estimer les capacités de détoxification des différents organes à travers le suivi des concentrations tissulaires et des mécanismes potentiels mis en jeu.

Perturbation des mécanismes impliqués dans la réponse des cellules au stress.

Les précédents travaux portant sur les effets de l'uranium chez le poisson zèbre ont mis en évidence une modification de la balance oxydative (extraits hépatiques), des atteintes génotoxiques (érythrocytes, hépatocytes et cellules germinales), une perturbation du système

cholinergique (AChE cérébrale) ainsi que des inflammations branchiales (Barillet, 2007). Ces travaux ont contribué au choix de gènes impliqués dans le système cholinergique, la balance oxydative, la réparation des dommages à l'ADN et la réponse inflammatoire.

D'après les travaux relatant les effets d'expositions aux métaux chez le poisson et, en particulier, les études menées chez le poisson zèbre exposé au MeHg ou au Cd (Gonzalez *et al.*, 2004, 2006, Cambier *et al.*, 2009) nous avons trouvé judicieux dans une optique de comparaison des effets de l'uranium avec d'autres métaux, d'étudier également la réponse de gènes impliqués dans la détoxification, le métabolisme mitochondrial et la réponse neuronale avec en particulier la synthèse du glutamate, et les processus de neuroinflammation.

Nous avons donc cherché à comparer ces mécanismes moléculaires affectés chez le poisson exposé à de faibles concentrations en uranium à travers l'expression de gènes cibles dans les autres organes-clés choisis par rapport à la physiologie de l'organisme et à la toxicité de l'uranium (Cooley et Klaverkamp, 2000a, Cooley *et al.*, 2000b, Barillet *et al.*, 2007).

Relation entre les profils d'expression de gènes et la concentration en uranium dans le milieu et les tissus.

Les modifications d'expression géniques ont été étudiées pour deux concentrations d'exposition : 20 et 100 µg/L qui se situent dans la gamme des concentrations pouvant être retrouvées à proximité des anciens sites miniers d'uranium en France. Une modulation de l'expression de gènes en fonction de la concentration administrée a été recherchée. De surcroît, la bioaccumulation de l'uranium a été quantifiée dans les tissus, afin d'estimer les capacités de stockage et d'élimination de l'uranium dans ces organes, étape indispensable à l'interprétation des réponses moléculaires.

**Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles
and gills of the zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant
waterborne uranium concentrations**

*Adélaïde LEREBOURS†, Patrice GONZALEZ‡, Christelle ADAM†, Virginie CAMILLERI†,
Jean-Paul BOURDINEAUD‡, Jacqueline GARNIER-LAPLACE†*

†Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sûreté
Nucléaire (IRSN), Bât 183, BP 3, 13115 Saint-Paul-Lez-Durance Cedex, France

‡Géochimie et Ecotoxicologie des Métaux dans les systèmes Aquatiques (GEMA), UMR
5805 CNRS - Université Bordeaux 1, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

Abstract – The effects of waterborne uranium (U) exposure on gene expression were examined in four organs (brain, liver, skeletal muscles and gills) of the zebrafish (*Danio rerio*). Adult male fish were exposed to three exposure treatments: no added U, $23 \pm 6 \mu\text{g U/L}$ and $130 \pm 34 \mu\text{g U/L}$. After 3, 10, 21, and 28 d of exposure and an 8-d depuration period, gene expression and U bioaccumulation were analyzed. Bioaccumulation decreased significantly in liver during the depuration phase, and genes involved in detoxification, apoptotic mechanism and immune response were strongly induced. Among these genes, *abcb311*, which belongs to the ABC transporter family, was 4-times and 24-times induced in organisms previously exposed to 23 ± 6 and $130 \pm 34 \mu\text{g/L}$ of U, respectively. These results highlight the role of liver in detoxification mechanisms. In gills, at the highest U concentration, *gpx1a*, *cat*, *sod1*, and *sod2* genes were up-regulated at day 21, indicating the onset of an oxidative stress. Mitochondrial metabolism and DNA integrity were also affected since *cox1*, *atp5f1*, and *rad51* genes were up-regulated at day 21 and during the depuration phase. In skeletal muscles, *cox1*, *atp5f1*, and *cat* were induced at day 3 suggesting an impact on the mitochondrial metabolism and production of reactive oxygen species. In brain, *gls1* was also induced at day 3 suggesting a need in glutamate synthesis involved in neuron transmission. No changes in gene expression were observed in brain and skeletal muscles at days 21 and 28 of exposure although bioaccumulation increased. During the depuration phase, U excretion was inefficient in brain and skeletal muscles, and expression of most of the tissue-specific genes was repressed or unchanged.

Keywords: Uranium, *Danio rerio*, Gene expression, Bioaccumulation

Introduction

Uranium (U) is a naturally occurring heavy metal, member of the actinide series. Its concentration in ecosystems can increase according to various anthropogenic contributions, originating from the nuclear fuel cycle, farming, research laboratories, and military use of depleted uranium. It is found in aquatic systems with concentrations varying from 0.01 µg/L up to 2 mg/L depending on the geological background [1]. The major forms of U are, U(VI) in oxic, and U(IV) in anoxic water [2].

Uranium toxicity mechanisms have not been extensively studied in non-human species, and most of the studies relate to acute lethality data [3]. Acute toxicity assays conducted on zebrafish *Danio rerio* exposed to waterborne uranium, showed that the 96h median lethal concentration value (LC50) was 3.05 mg/L of U [4]. Several studies have focused on uranium effects on the central nervous system. In rats, uranium crosses the blood-brain barrier and accumulates in brain [5, 6] which is a target organ after acute depleted uranium exposure [7]. Electrophysiological changes were reported in vitro in rat hippocampal slices embedded with depleted uranium fragments [8]. A recent study demonstrated that in mammal brain, after inhalation exposure, the highest uranium concentration was found in the olfactory bulb [9]. In fish, where an intact nervous system is required to mediate relevant behaviors such as food search, predator recognition, communication and orientation [10, 11], such high metal accumulation in the olfactory system might have dramatic consequences. In a recent study in the zebrafish exposed to 100 µgU/L, uranium induced a significant increase in acetylcholinesterase activity, an enzyme playing a key role in neurotransmission [12].

Additionally, uranium like any heavy metal is able to enhance the production of free radical species [13, 14]. It has been demonstrated that, in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and in the zebrafish *Danio rerio* [12], uranium decreases activities of enzymes involved in antioxidant defenses, such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase for

fish exposed to 20 and 100 µgU/L. Genotoxicity assays revealed a significant effect of waterborne uranium on DNA integrity of erythrocytes in zebrafish exposed to the same concentration range [15]. Uranyl ion (UO_2^{2+}) is able to inhibit adenosine triphosphate (ATP) and the activity of enzymes involved in energetic metabolism [16, 17]. In mammals, uranium exposure might affect xenobiotic detoxification by altering some cytochrome P450 enzyme activities [18]. Furthermore, it has been demonstrated that the multidrug resistance protein was induced in gills of the freshwater clam *Corbicula fluminea* exposed to 80 µg/L of uranium [19].

Gene expression measurements present a relevant endpoint to reveal the initial effects of uranium on organisms at low concentrations, well below those causing adverse effects. Changes in gene response are among the most sensitive indicators of exposure to a toxicant in organisms. To our knowledge, no study of adult fish transcriptional responses to uranium contamination has been reported to date. The zebrafish *Danio rerio*, whose genome is entirely sequenced, is a model for gene function, developmental biology, and toxicology. The main objective of this study is to address the question whether uranium at low doses set around environmental concentrations found close to uranium mining sites is likely to modify and disturb gene expression. To achieve such a goal, twenty genes involved in several cellular toxicity mechanisms and adaptive responses were selected. The effects of U on neuronal mechanisms were explored through monitoring variations in the expression of genes involved in neuroinflammation (*gfap*, *cd11b*) or in cholinergic (*ache*, *vchat*, *chat*), or glutamatergic system (*gls1*). Genes encoding antioxidant defenses (*cat*, *sod1*, *sod2*, *gpx1a*, *gstp1*, *hspb1*) were selected. Genotoxicity was investigated through the expression of two genes that are known to be expressed in DNA repair: *gadd45b* and *rad51*. The mitochondrial metabolism was also investigated using *cox1* and *atp5f1*. Other selected genes are involved in detoxification mechanisms (*cyp3c1l2*, *abcb3l1*) and apoptotic mechanisms: *bax*. Inflammation

was considered with *ill*. The expression levels of these 20 genes were investigated in four organs after 3, 10, 21, and 28 d of exposure followed by an 8-d depuration period. The possible effects of three exposure treatments were tested: no added U, 23 µg/L of U (97 nM) and 130 µg/L of U (546 nM) (referred to C1 and C2 respectively). These two exposure conditions are within the range of environmental concentrations found close to mining sites [20] or in drilled wells [21]. Furthermore, the first concentration chosen is close to the provisional drinking water guideline value of the World Health Organization (Geneva, Switzerland), 15 µg/L of U [22].

Materials and Methods

Exposure conditions

Adult zebrafish were obtained from a French supplier (Exomarc) and acclimated to laboratory conditions for two weeks before the experiment. Male fish (body wt: 0.70 ± 0.08 g wet weight (wet wt); standard length: 3.33 ± 0.14 cm) were randomly placed in 18 cages distributed in three continuous flow-through tanks at a density of 20 fish per cage. One cage was sampled at each time point to reduce fish stress during collecting times (including the time 0 at the onset of the experiment). Female fish were excluded to avoid any interference due to reproduction processes. The system was alimented by artificial water (Ca^{2+} : 8.7 mg/L, Mg^{2+} : 1.4 mg/L, Na^+ : 5.1 mg/L, K^+ : 1 mg/L, Cl^- : 13.4 mg/L, SO_4^{2-} : 12.5 mg/L, NO_3^- : 9.2 mg/L, CO_3^{2-} : 0.45 mg/L). Major anion concentrations were analysed in water samples by ionic chromatography (Dionex DX-120, Sunnyvale, CA, USA), cation and uranium concentrations were measured after 2% [v/v] HNO_3 acidification by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (Optima 4300DV, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Throughout the experiment, water temperature was maintained at 24.5 ± 0.5 °C, while pH was adjusted continuously to 6.4 ± 0.2 (pH regulators, Consort R301, Illkirch, Belgium) to optimize U bioavailable form concentration. Tank bottoms were cleaned every day to

eliminate fish faeces and food remains. Fish in each cage were fed once a day with a quantity of standard fish pellets corresponding to 2% of the fish body weight. Control fish were maintained in a non-contaminated tank. In exposure tanks, fish were contaminated by the direct route at C1: $23 \pm 6 \mu\text{g}$ of U/L ($97 \pm 25 \text{ nM}$) and C2: $130 \pm 34 \mu\text{g}$ of U/L ($546 \pm 143 \text{ nM}$). Water contamination was realized by daily addition of uranyl nitrate solution, $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, France). The quantity of added U was adapted to compensate the decrease in metal water concentrations over the 24 h cycle. Twenty fish per condition were removed after 3, 10, 21, 28 d of exposure and after 8 d of a depuration phase. They were killed by immersion in melting ice. For each organism, brain, liver, skeletal muscles and gills were dissected and frozen at -80°C in RNAlater (Qiagen, France). For each organ, five replicates were prepared by pooling four fish. A homogenization of each pool was performed using sterilized scalpels. Each replicate was split into two parts for genetic analysis and U concentration determinations.

U analysis

For each replicate the sub-pool dedicated to U analyses was dried at 50°C during 48 h and weighed (dry wt) using a microbalance (Sartorius SE2, Goettingen, Germany). Samples were digested by nitric acid (1 ml of HNO_3 65%) in polypropylene tubes at 100°C during 3 h. After acidic dilution of the digests, U concentrations were determined by an Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (Varian 810, Mulgrave, Australia, quantification limit: 1 ng/L) according to French standards.

Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction

Total RNAs were extracted from 40 mg of fresh tissue using the Absolutely RNA RT-PCR Miniprep kit (Stratagene, Amsterdam, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. The quality of RNAs produced was evaluated by electrophoresis on a 1%

agarose-formaldehyde gel. For each exposure condition and each organ, samples were analyzed in five replicates.

Table 1: Gene names, abbreviations, accession numbers, and specific primer pairs for the 20 genes from *Danio rerio* used in the study.

Gene name	Abbreviation	Accession number	Primer (5'-3')
acetylcholinesterase	<i>ache</i>	NM_131846.1	GTGGCAACTCGCATGGT ^a AGTGCGGGCGAAATTAGC ^b
choline acetyltransferase	<i>chat</i>	NM_001130719.1	GGACTGCCATAAAAGCCCAA ^a TTGGGACGACTGGACCAT ^b
vesicular acetylcholine transporter	<i>vchat</i>	NM_201107.1	TCCGTTTGGCGGAATCCT ^a ACGGCGATGTACGGGTC ^b
glial fibrillary acidic protein	<i>gfap</i>	NM_131373.2	AGTACCAGGACCTGCTCAA ^a ACAGTTCGCACAACATATGCT ^b
integrin alpha-M precursor	<i>cd11b</i>	XM_687072.3	ACGTGACGCTGTTTGTGCG ^a GCCAGCAGCACAAGTCC ^b
glutaminase, like	<i>gls1</i>	NM_001045044.1	AGGCCATGCTGAGGTTG ^a CTGCCGTCTCTTTTCGCT ^b
beta actin 1	<i>bactin</i>	NM_131031	AAGTGCACGCTGGACA ^a GTTTAGGTTGGTCGTTTCGTTTGA ^b
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 3 like 1	<i>abcb311</i>	NM_001006594.1	GCAAGATAGCGATGGTGGG ^a CGTTGGCTTTGCTTGCAG ^b
cytochrome P450, family 3, subfamily c, polypeptide 1 like 2	<i>cyp3c112</i>	NM_001007400.1	GGGTCTGTAAGAAGACTGTAGAGC ^a CGAGGCCCGAGTCCAA ^b
heat shock protein, alpha-crystallin-related 1	<i>hspb1</i>	NM_001008615.1	CAGCACACACTGGCCG ^a GTGATTGACATCTAGGCTGATCTT ^b
glutathione peroxidase 1a	<i>gpx1a</i>	NM_001007281.2	CACCCTCTGTTTGC GTTCC ^a CTCTTTAATATCAGCATCAATGTCGATGG ^b
glutathione-S-transferase pi	<i>gstp1</i>	NM_131734.3	CGGATTCCTGGTTGGCG ^a TGCCATTGATGGGCAGTTT ^b
catalase	<i>cat</i>	NM_130912.1	CCTGTGGGGCGTTTGT ^a CGGTACGGGCAGTTGAC ^b
superoxide dismutase 1, soluble	<i>sod1</i>	BC055516.1	TGAGACACGTCGGAGACC ^a TGCCGATCACTCCACAGG ^b
superoxide dismutase 2, mitochondrial	<i>sod2</i>	CB923500.1	TTCAGGGCTCAGGCTGG ^a ATGGCTTTAACATAGTCCGGT ^b
bcl2-associated X protein	<i>bax</i>	AF231015.1	GGCTATTTCAACCAGGGTTCC ^a TGCGAATCACCAATGCTGT ^b
growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	<i>gadd45b</i>	BC059472.1	GCTTGTTCTGTGCTTCTGTGG ^a CTTCCCGCATTTCAGCGAT ^b
RAD51 homolog	<i>rad51</i>	BC062849.1	TGCTGCGTCTCGTGA ^a GCCTCGGCCTCTGGTAA ^b
cytochrome C oxidase subunit I	<i>cox1</i>	NC_002333.2	GGAATACCACGACGGTACTCT ^a AGGGCAGCCGTGTAAT ^b
ATP synthase, H ⁺ transporting mitochondrial, F0 complex, subunit b, isoform 1	<i>atp5f1</i>	BC083308.1	GTGTGACAGGGCCTTATATGC ^a CTGAGCCTTTGCTATTTTATCCGC ^b
interleukine 1 beta	<i>il1b</i>	NM_212844.1	GGTTGCGCAGCGCGGATCTC ^a GACCCGCTGATCTCCTTGAGT ^b

^aForward primer. ^bReverse primer.

First strand cDNA was synthesized from 5 µg of total RNA using the AffinityScript™ Multiple Temperature cDNA Synthesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The cDNA mixture was conserved at -20°C until being used in real-time PCR reactions.

The accession numbers of the 20 genes used in this study are reported in **Table 1**. For each gene, specific primer pairs were determined using the LightCycler probe design software (version 1.0, Roche, Meylan, France).

The amplification of cDNA was monitored using the DNA intercalating dye SyberGreen I (Roche). Real-time PCR reactions were performed in a LightCycler (Roche) and Mx3000P QPCR System (Stratagene) following the manufacturer's instructions (one cycle at 95°C for 10 min and 50 amplification cycles at 95°C for 5 s, 60°C for 5 s, and 72°C for 20 s for the LightCycler, one cycle at 95°C for 10 min and 50 amplification cycles at 95°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72 °C for 1 min for the Mx3000P QPCR System). Each 20 µL reaction contained 2 µL of reverse transcribed product template (0.5 µg of the retrotranscribed RNA), 1 µL of master mix including the SyberGreen I fluorescent dye (Roche), and the gene specific primer pair at a final concentration of 300 nM for each primer.

The reaction specificity was determined for each reaction from the dissociation curve of the PCR product. This dissociation curve was obtained by following the SyberGreen fluorescence level during a gradual heating of the PCR products from 60 to 95°C. The beta actin gene was chosen as the reference gene because of its stability over time and treatment in the experiment. Relative quantification of each gene expression level was normalized to the beta actin gene expression and calculated by the delta-delta threshold cycle (C_t) method [23]. For each gene expression level the mean value and the associated standard deviation ($n=5$) were determined (Supplemental Data, **Table S1, S2, S3, and S4**). Induction factors of each

gene were obtained by comparing each mean value observed in the exposed condition with that of the control condition.

Statistical analysis

Because normality (Shapiro-Wilk test) and independence assumptions for valid parametric analyses were not satisfied significant variations in gene expression levels in the four organs were determined using the non-parametric Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). The statistically significant expression level changes as compared to control are presented in **Table 2**. The same test was used to assess any significant effects of time and water concentration on tissue uranium data ($p < 0.05$).

Table 2. Significant variations in gene expression as compared to control (\times induction or \div repression factors, $p < 0.05$, $n = 5$) in brain, skeletal muscles, liver and gills from *Danio rerio* after 3, 10, 21, and 28 days of exposure at 23 ± 6 (C1) and 130 ± 34 (C2) μg of U/L and after an 8-d depuration phase. Empty cells: not statistically significant.

functions	genes	C1					C2				
		3	10	21	28	8d	3	10	21	28	8d
BRAIN											
detoxification	<i>abcb311</i>										$\div 4$
	<i>cyp3c112</i>	$\times 6$	$\times 4$				$\times 5$				
oxidative stress	<i>hspb1</i>			$\div 3$							
	<i>gpx1a</i>		$\div 4$					$\div 3$			
	<i>gstp1</i>		$\div 3$								$\div 20$
	<i>cat</i>		$\times 10$					$\times 5$			
	<i>sod1</i>										
	<i>sod2</i>	$\div 3$									
apoptosis	<i>bax</i>										
DNA repair	<i>gadd</i>		$\times 2$			$\div 4$					$\div 3$
	<i>rad51</i>										
mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>										
	<i>atp5f1</i>										
inflammatory process	<i>il1b</i>		$\div 8$	$\div 7$	$\div 4$		$\div 10$				
neuronal response	<i>ache</i>							$\times 2$			
	<i>chat</i>										
	<i>vchat</i>	$\times 7$									
	<i>gfap</i>										
	<i>cd11b</i>										$\div 100$
	<i>gsl</i>	$\times 19$						$\times 11$			
SKELETAL MUSCLES											
detoxification	<i>abcb311</i>	$\div 8$			$\div 20$		$\div 33$				
	<i>cyp3c112</i>		$\div 4$				$\div 6$				
oxidative stress	<i>hspb1</i>		$\times 3$								
	<i>gpx1a</i>										
	<i>gstp1</i>										
	<i>cat</i>	$\times 4$				$\div 2$	$\times 4$				
	<i>sod1</i>										
	<i>sod2</i>					$\div 4$					
apoptosis	<i>bax</i>	$\div 16$	$\div 20$	$\div 25$	$\div 9$		$\div 16$	$\div 5$	$\div 9$		
DNA repair	<i>gadd</i>										
	<i>rad51</i>						$\div 8$				
mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	$\times 13$	$\times 4$			$\div 3$	$\times 22$				
	<i>atp5f1</i>	$\times 3$					$\times 4$				
inflammatory process	<i>il1b</i>	$\div 7$	$\div 12$			$\div 14$	$\div 30$	$\div 6$	$\div 9$		
LIVER											
detoxification	<i>abcb311</i>					$\times 4$		$\times 2$			$\times 24$
	<i>cyp3c112</i>	$\div 3$									$\times 2$
oxidative stress	<i>hspb1</i>										$\times 35$
	<i>gpx1a</i>	$\div 8$	$\div 8$		$\times 17$						
	<i>gstp1</i>		$\div 100$		$\times 8$		$\div 3$				
	<i>cat</i>	$\div 4$	$\div 12$		$\times 7$				$\div 14$		
	<i>sod1</i>				$\times 5$						
	<i>sod2</i>				$\times 11$						
apoptosis	<i>bax</i>					$\times 4$				$\times 10$	
DNA repair	<i>gadd</i>	$\div 8$	$\times 6$		$\times 4$						
	<i>rad51</i>										
mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>		$\times 4$		$\times 5$		$\div 3$				
	<i>atp5f1</i>	$\div 7$			$\times 4$						
inflammatory process	<i>il1b</i>					$\times 4$				$\times 45$	
GILLS											
detoxification	<i>abcb311</i>										
	<i>cyp3c112</i>							$\times 5$			
oxidative stress	<i>hspb1</i>										
	<i>gpx1a</i>			$\times 3$				$\times 5$	$\times 3$		
	<i>gstp1</i>										
	<i>cat</i>										
	<i>sod1</i>							$\times 3$			
	<i>sod2</i>			$\times 2$				$\times 7$			
apoptosis	<i>bax</i>						$\div 4$				
DNA repair	<i>gadd</i>										
	<i>rad51</i>							$\times 3$	$\times 2$	$\times 5$	
mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>							$\times 4$		$\times 4$	
	<i>atp5f1</i>								$\times 2$		
inflammatory process	<i>il1b</i>								$\times 3$		

Results

Experimental conditions

No mortality was observed during the acclimation and metal exposure periods. Furthermore, biological (fish body wet wt) and physicochemical parameters such as water composition, U water concentration, temperature and pH remained stable (data not shown).

U Bioaccumulation

Total U concentrations were determined in brain, liver, skeletal muscle and gills after each sampling time for the three exposure treatments (**Fig. 1**). For the control fish, they were below the detection limit in brain and skeletal muscles, while they reached 10 and 100 ng/g for gills and liver respectively. Those values were found at the beginning of the experiment and remained constant until its end.

U accumulation levels were ten-times higher in liver and gills than in brain and skeletal muscles (for fish exposed to the C1 and C2 condition respectively).

A three-fold significant increase in U accumulation was observed in brain between days 10 and 21 for the C1 condition, i.e., 18 to 49 ng U/g, dry weight, and between days 21 and 28, i.e., 160 to 476 ng U/g, dry weight, for the C2 condition ($p < 0.05$). A seven-fold significant increase was observed, i.e., 105 to 707 ng U/g, dry weight, between day 21 and 28 in skeletal muscles of fish exposed to the C2 concentration ($p < 0.05$). Depuration did not lead to any significant uranium concentration decrease in these organs ($p > 0.05$).

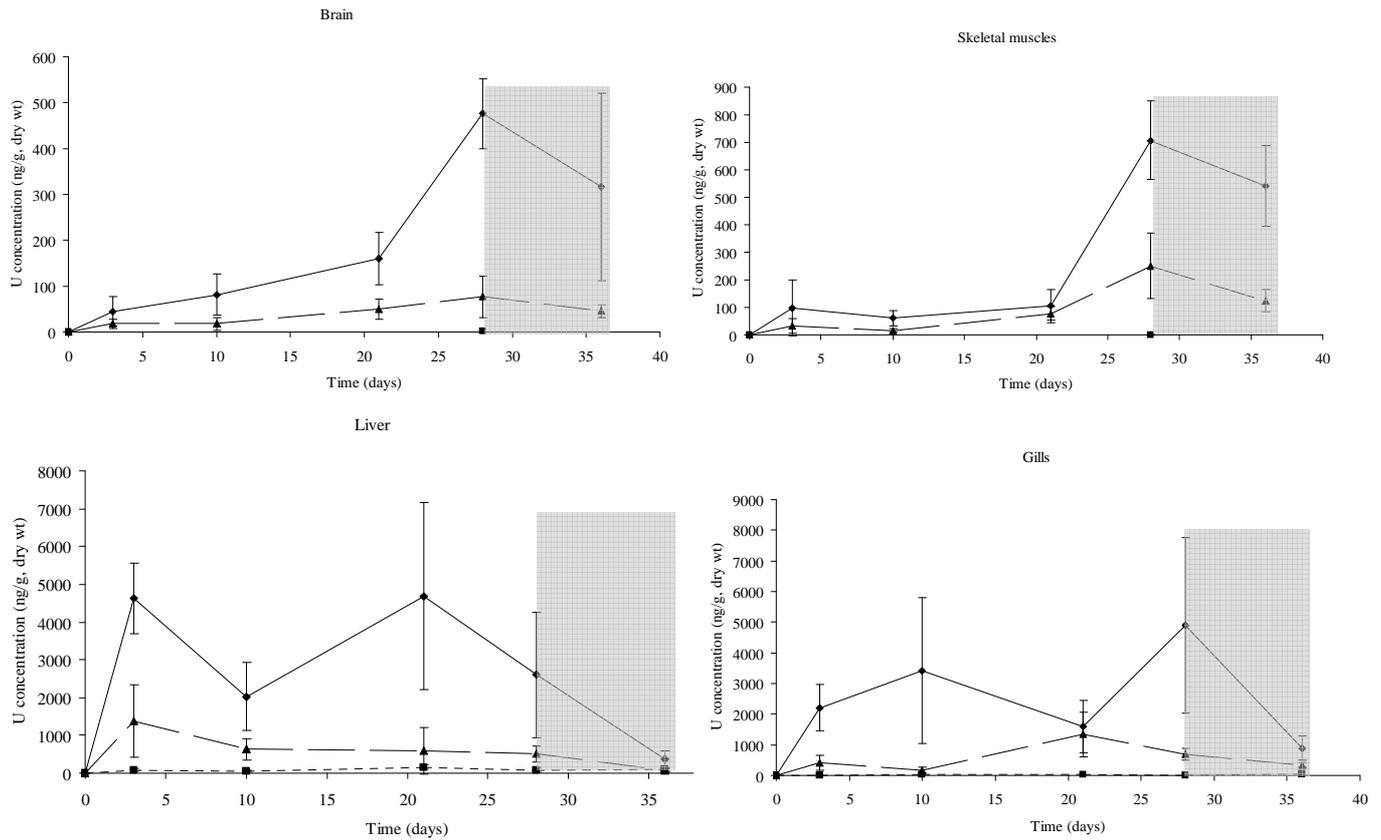


Figure 1. Average uranium concentration (ng/g, dry wt, mean \pm standard deviation, $n=5$) determined in brain, skeletal muscles, liver and gills of *Danio rerio* after 3, 10, 21, and 28 d of three exposure treatments: no added U (C0=■), 23 ± 6 (C1=▲) and 130 ± 34 (C2 =◆) μg of U/L and after an 8-d depuration phase (in grey).

In gills, between days 3 and 10 under C1 exposure, no significant increase of bioaccumulation was measured ($p>0.05$) whereas a significant one was observed between days 10 and 21 ($p<0.05$) with an eight-fold increase, i.e., 173 to 1,345 ng U/g, dry weight. During the C2 exposure no significant trend of bioaccumulation was observed ($p>0.05$). At the depuration time U internal concentrations significantly decreased by a factor 2 and 5.5 in organisms preliminary exposed to C1 and C2 U concentrations, respectively ($p<0.05$).

In the liver, a two-fold early significant decrease appeared at day 10 for fish exposed to C2 concentration ($p<0.05$), followed by a stagnation until day 28. Between days 3 and 28

under C1 exposure, no significant change of U bioaccumulation was measured ($p>0.05$). Depuration had an impact on this organ where U tissular concentrations decreased significantly by a factor of 6, i.e., 512 to 81 ng U/g, dry weight, and 7, i.e. 2,599 to 371 ng U/g, dry weight, for fish preliminary exposed to C1 and C2 conditions, respectively ($p<0.05$).

Gene expression levels

The genetic analysis evidenced a tissue-specific basal expression rate. For instance, the *abcb3/1* gene showed a higher basal expression rate in liver (Supplemental Data, Table S3) and skeletal muscles (Supplemental Data, Table S2) than in gills (Supplemental Data, Table S4) or brain (Supplemental Data, Table S1). Higher basal expression levels were found in liver as compared to the other organs particularly for genes involved in antioxidant defenses *sod1*. In the four tissues, *cox1* showed the highest basal expression rate. Besides these basal gene expressions, marked differences in the transcriptional response onset and intensity in response to U exposures appeared between organs (Table 2).

In gills, the effects of an increase in U concentrations were obvious since at day 21 only *gpx1a* and *sod2* genes were up-regulated in C1, whereas *cyp3c112*, *gpx1a*, *cat*, *sod1*, *sod2*, *rad51*, and *cox1* genes were up-regulated in C2 ($p<0.05$). However, this differential gene regulation is promoted by equivalent U concentrations within gills, i.e., 1345 and 1587 ng U/g at day 21 for fish exposed to C1 and C2 conditions, respectively ($p>0.05$).

In liver, an inverse situation occurred in which many genes, i.e., *gpx1a*, *gstp1*, *cat*, *sod1*, *sod2*, *gadd45b*, *cox1*, *atp5f1*, were up-regulated at day 28 at the lowest U concentration ($p<0.05$) whereas none of them displayed differential expression at the highest U concentration ($p>0.05$). This pattern was observed although at day 28 the liver contained five-times more U under C2 exposure than under C1, i.e., 2,600 ng U/g versus 512 ng U/g, respectively. Under the highest U exposure, a strong transcriptional response could be observed only during the depuration phase. At this stage, *abcb311*, *cyp3c112*, *hspb1*, *bax*, and

ill genes were up-regulated meanwhile U accumulation in the liver was similar to that observed at the lowest U exposure at day 28 (371 ng U/g vs 512 ng U/g). At the lowest U concentration, *abcb311*, *bax*, and *ill* were also up-regulated during the depuration phase but to a lower extent than under C2 exposure, i.e., x4 against x24 for *abcb311*, x4 against x10 for *bax*, and x4 against x45 for *ill* ($p < 0.05$) presumably because the U concentration in this tissue after 8 d of depuration had declined to reach 81 ng U/g under C1 versus 371 ng U/g under C2 ($p < 0.05$). At early times of exposure in liver, many genes were down-regulated in C1 whereas their expression remained equal to that in the control tissue in C2 condition.

In skeletal muscles, a 3-d waterborne U exposure triggered an up-regulation of *cat*, *coxI*, and *atpb* genes, and a down-regulation of *abcb311*, *bax*, and *ill* genes, whatever the contamination pressure ($p < 0.05$). At day 10, *hspb1* and *coxI* genes were up-regulated in C1 muscles but not in C2 muscles, although C2 muscles accumulated five-times more U than C1 muscles, i.e., 10 ng U/g against 50 ng U/g. At this date the levels of down-regulation were higher for *cyp3c112*, *bax*, and *ill* genes in C1 muscles than in C2 muscles.

In the brain, effects of uranium on gene expression were observed as early as 3 and 10 days after exposure. Brain specific genes such as *glsI* and *vacht* were strongly up-regulated after 3 d, indicating an impact of U on the cholinergic pathway and glutamate synthesis. At day 3, *vacht* and *glsI* gene responses were higher under C1 exposure than under C2 exposure, i.e., seven-fold up-regulation in C1 against basal level expression in C2 for *vacht*, and nineteen-fold up-regulation in C1 against eleven-fold up-regulation in C2 for *glsI*. However, at that time C2 brains accumulated twice as much U than C1 brains, i.e., 45 ng U/g against 18 ng U/g. At day 10, the same trend was verified with *cyp3c112*, *cat*, and *gadd45b* up-regulated four-, ten-, and two-times in C1, respectively, versus basal level expression, five-times, and basal level expression in C2, respectively. *Gstp1* and *ill* genes were down-regulated three- and eight-times, respectively, in C1, against basal level expressions for both genes in C2. Yet,

at that time, C2 brains accumulated five-times more U than C1 brains, i.e., 82 ng U/g against 18 ng U/g ($p < 0.05$).

Discussion

During the experiment, no mortality was evidenced and swimming velocity seemed unchanged. This observation could be correlated to the middle range water U concentrations. Indeed, behavioral changes were observed in acute toxicity experiments where fish exposed to 3.05 mg/L swam in a disorientated way [4].

The fact that the highest U accumulations were found in liver and gills, had already been evidenced by others studies [12]. This heterogeneous distribution throughout the body revealed the physiological role of organs in uptake and transport of uranium in zebrafish.

Gills represent the main uptake route for waterborne exposures and they could be an effective barrier to uranium uptake by trapping within the protective mucus layer, as previously shown for other divalent metals in fish [24]. Furthermore, UO_2^{2+} is able to exchange with Ca^{2+} at the surface of bone mineral crystals [25] and can concentrate in gill arches, which are rich in calcium. This could explain the higher uranium accumulation in this tissue as compared to brain or skeletal muscle during the exposure period. After a depuration phase a significant decrease of U in gills highlights the efficiency of uranium excretion in this tissue.

In liver, no gene expression response could be observed above a tissue concentration of 2,031 ng U/g, as if high U concentrations inhibited liver transcriptional response, whereas a gene response was observed with only 81 ng U/g, at day 8 of depuration under C1 condition. It has been suggested that the occurrence of hepatic and biliary histopathologies in lake whitefish exposed to dietary uranium could be linked to a possible biliary excretion of uranium [26]. This is consistent with the prominent role of the bile in the excretion of other metals orally administrated to fish [27, 28]. Indeed, in the present study, depuration resulted

in a decreased U concentration in liver of fish previously exposed to both C1 and C2 conditions. The pattern of gene expression observed during the depuration phase indicates that in this organ several molecular pathways such as oxidative stress, apoptosis, immune response and detoxification, are impacted. Among genes involved in detoxification, *abcb311* is four- and twenty-four-times up-regulated in liver of fish previously exposed to C1 and C2 conditions, respectively. The ATP-binding cassette (ABC), sub-family B, member 3 like 1, is the closest zebrafish counterpart of the mammalian multi-drug resistance member, a protein using ATP as an energy source to extrude xenobiotic and metals [29]. Other members of the ABC transporter superfamily such as the multidrug resistance-associated protein [30], the *Leishmania* LtpgpA transporter [31], and the yeast cadmium resistance factor 1 [32], are xenobiotic pumps and are also involved in metal detoxification. A recent study on the effects of waterborne cadmium (Cd) exposure on gene expression in zebrafish drew a parallel between the one hundred-fold increase in *abcb311* expression and the decrease in Cd burden in gills, and a three-fold increase in *abcb311* expression and a stagnation of Cd loading in muscles [33]. A gene involved in inflammatory response, *ill*, was also found to overexpress four- and forty-five-times in liver of fish previously exposed to C1 and C2 conditions, respectively. Interleukin-1 β is an important inflammatory cytokine and a good marker of inflammatory response [34]. It plays an important role in the host response to tissue injury and immunological reactions and is mainly produced by blood monocytes and tissue macrophages [35]. Its strong induction for fish previously exposed to C2 condition highlights the effects of U on the immune response. In literature, data concerning U immunotoxicity are scarce. Nevertheless, a serial analysis of gene expression of the mice kidney revealed that uranyl nitrate exposure leads to an up-regulation of immunity gene expression levels [36] and single inhalation exposure to uranium significantly increased the mRNA levels of Interleukin-8 (IL-8) and IL-10 in the rat lung tissues [37]. Interleukin-17 may activate pro-apoptotic members

and hence initiate the apoptotic process associated with an increased translocation of *Bax* to the mitochondria and a decrease of the mitochondrial transmembrane potential [38]. The costimulation of Il-4 and Il-10 also induced mast cell apoptosis [39]. In the present study, *bax* gene was 4- and 10-times up-regulated in fish previously exposed to C1 and C2 concentrations, respectively. After 28 d of C1 exposure many genes involved in oxidative stress, DNA repair and mitochondrial metabolism were induced. The disruption of the mitochondrial chain transport may lead to the formation of free radicals and DNA damage. This is in keeping with recent studies led on hepatic cells and erythrocytes of zebrafish exposed to 100 µg U/L during a 20-d exposure period, showing the effects of U on antioxidant enzyme activities and DNA integrity [12, 15].

In brain, early transcriptional responses were observed with gene inductions involved in detoxification, oxidative stress, DNA repair and neuronal response concerning cholinergic system and glutamate synthesis, in agreement with the increase of acetylcholinesterase activity measured in zebrafish brain after 20 d of exposure at 100 µg U/L [12].

In brain and skeletal muscles, there also were early inductions of the *cat* gene involved in oxidative balance suggesting a production of reactive oxygen species. Early genetic inductions may indicate that cells are still able to establish defense mechanisms. At later exposure times, repression or lack of variation in gene expression were observed for fish exposed to the highest U concentration. This may be interpreted as an incapacity to mount an efficient transcriptional response considering our gene selection. For instance, in the brain, after the depuration period in fish previously exposed to C2 concentration, some genes were strongly repressed (*cd11b* gene was one hundred-times repressed).

The early inductions or late repressions that we observe in brain or skeletal muscles relative to liver and gills occur despite the fact that brain and skeletal muscles accumulate ten-times less uranium than these other tissues. Consequently brain and muscles appeared to

display a higher sensitivity than liver and gills. Indeed, a gene expression response was observed in brain and muscles as soon as after 3 d of exposure when U concentrations within these tissues had reached 18 and 32 ng U/g, respectively. Thus, U concentrations as low as 0.08 and 0.13 nmol U/g (dry wt) are able to trigger a gene response within brain and muscles, respectively. As a mean of comparison, after waterborne cadmium exposure of zebrafish, the observed minimal tissue cadmium concentrations necessary to trigger transcriptional responses in brain and muscles were equal to 3.9 and 0.4 nmol Cd/g wet weight, giving 16 and 2 nmol Cd/g on a dry weight basis, respectively [33]. Therefore, zebrafish brain and muscles are supposed to be much more sensitive to U than Cd contamination.

The present study showed that uranium at low doses set around the environmental concentrations close to uranium mining sites is likely to modify and disturb gene expression. The study of the selected genes and the link with uranium internal concentrations demonstrated that effects of uranium exposure on the molecular pathways considered are time-, concentration- and tissue-dependant. However we can not exclude that other molecular pathways may be affected by uranium. These results will be completed by a set of new data obtained by DNA microarray.

Acknowledgement – We specially thank Isabelle Cavalie and Veronique Marie for *D. rerio* dissecting and Daniel Orjollet for ionic chromatography measurements. This study is a part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.

Supplemental material

Table S1. Gene expression as compared to actin (mean \pm standard deviation, $n=5$) in brain of the zebrafish exposed to three exposure treatments: no added U (C0), 23 ± 6 (C1) and 130 ± 34 (C2) μg of U/L and after an 8-d depuration phase.

Table S2. Gene expression as compared to actin (mean \pm standard deviation, $n=5$) in skeletal muscles of the zebrafish exposed to three exposure treatments: no added U (C0), 23 ± 6 (C1) and 130 ± 34 (C2) μg of U/L and after an 8-d depuration phase.

Table S3. Gene expression as compared to actin (mean \pm standard deviation, $n=5$) in liver of the zebrafish exposed to three exposure treatments: no added U (C0), 23 ± 6 (C1) and 130 ± 34 (C2) μg of U/L and after an 8-d depuration phase.

Table S4. Gene expression as compared to actin (mean \pm standard deviation, $n=5$) in gills of the zebrafish exposed to three exposure treatments: no added U (C0), 23 ± 6 (C1) and 130 ± 34 (C2) μg of U/L and after an 8-day depuration phase

Table S2. Gene expression as compared to actin (mean ± standard deviation, n=5) in skeletal muscles of the zebrafish exposed to three exposure treatments: no added U (C0), 23 ± 6 (C1) and 130 ± 34 (C2) µg of U/L and after an 8-d depuration phase

SKELETAL MUSCLES		C0				
functions	genes	3	10	21	28	8d
detoxification	<i>abcb311</i>	1.3 ± 0.6	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.4	0.6 ± 0.3	0.03 ± 0.04
	<i>cyp3c112</i>	0.04 ± 0.03	0.020 ± 0.008	0.04 ± 0.04	0.009 ± 0.015	0.008 ± 0.005
oxidative stress	<i>hspb1</i>	0.2 ± 0.1	0.15 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1
	<i>gpx1a</i>	0.7 ± 0.4	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.1
	<i>gstp1</i>	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.12 ± 0.09
	<i>cat</i>	0.08 ± 0.04	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.19 ± 0.08
	<i>sod1</i>	0.6 ± 0.4	0.8 ± 0.3	1.0 ± 0.4	3 ± 3	1.00 ± 0.40
	<i>sod2</i>	7 ± 8	2.0 ± 0.8	3 ± 2	6 ± 4	2.9 ± 0.5
apoptosis	<i>bax</i>	1.1 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.4 ± 0.3	0.04 ± 0.06
DNA repair	<i>gadd45b</i>	0.6 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.4	0.4 ± 0.2	0.38 ± 0.31
	<i>rad51</i>	0.06 ± 0.04	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.013 ± 0.007
mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	25 ± 17	208 ± 117	436 ± 376	334 ± 230	360 ± 90
	<i>atp5f1</i>	1.9 ± 0.4	5 ± 2	7 ± 4	7 ± 4	7 ± 4
inflammatory process	<i>il1b</i>	0.04 ± 0.02	0.017 ± 0.008	0.012 ± 0.008	0.01 ± 0.01	0.007 ± 0.005
		C1				
detoxification	<i>abcb311</i>	0.16 ± 0.08	0.02 ± 0.01	0.006 ± 0.005	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.04
	<i>cyp3c112</i>	0.06 ± 0.10	0.006 ± 0.005	0.009 ± 0.005	0.013 ± 0.006	0.009 ± 0.005
oxidative stress	<i>hspb1</i>	0.2 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.06 ± 0.03
	<i>gpx1a</i>	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.2	1.1 ± 0.8	0.3 ± 0.1
	<i>gstp1</i>	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.16 ± 0.07
	<i>cat</i>	0.29 ± 0.10	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.09 ± 0.05
	<i>sod1</i>	1.0 ± 0.5	0.5 ± 0.4	1.0 ± 0.6	1.7 ± 1.0	0.4 ± 0.3
	<i>sod2</i>	2.6 ± 1.3	1.4 ± 0.8	1.7 ± 1.0	3.2 ± 0.9	0.7 ± 0.4
apoptosis	<i>bax</i>	0.09 ± 0.05	0.03 ± 0.02	0.08 ± 0.13	0.04 ± 0.05	0.03 ± 0.02
DNA repair	<i>gadd45b</i>	0.6 ± 0.3	0.3 ± 0.1	1.3 ± 1.1	1.5 ± 0.8	0.20 ± 0.07
	<i>rad51</i>	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.012 ± 0.008
mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	261 ± 103	778 ± 473	247 ± 67	736 ± 494	146 ± 97
	<i>atp5f1</i>	6 ± 3	5 ± 2	10 ± 3	11 ± 5	4 ± 2
inflammatory process	<i>il1b</i>	0.006 ± 0.004	0.001 ± 0.001	0.004 ± 0.004	0.0012 ± 0.0006	0.0007 ± 0.0009
		C2				
detoxification	<i>abcb311</i>	0.04 ± 0.03	0.2 ± 0.4	0.09 ± 0.06	0.3 ± 0.2	0.05 ± 0.06
	<i>cyp3c112</i>	0.006 ± 0.002	0.009 ± 0.004	0.008 ± 0.003	0.02 ± 0.02	0.007 ± 0.002
oxidative stress	<i>hspb1</i>	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.03 ± 0.02
	<i>gpx1a</i>	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.4	0.4 ± 0.3
	<i>gstp1</i>	0.15 ± 0.04	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.4	0.4 ± 0.2
	<i>cat</i>	0.30 ± 0.09	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.13 ± 0.04
	<i>sod1</i>	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.3	1.4 ± 0.4	1.5 ± 0.8	1.2 ± 0.9
	<i>sod2</i>	1.7 ± 0.4	1.7 ± 0.9	3.1 ± 0.9	4 ± 3	3 ± 3
apoptosis	<i>bax</i>	0.08 ± 0.05	0.11 ± 0.06	0.09 ± 0.07	0.2 ± 0.1	0.006 ± 0.004
DNA repair	<i>gadd45b</i>	0.3 ± 0.2	0.17 ± 0.08	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.6
	<i>rad51</i>	0.006 ± 0.002	0.012 ± 0.005	0.012 ± 0.004	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.02
mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	468 ± 257	306 ± 76	458 ± 200	637 ± 305	296 ± 227
	<i>atp5f1</i>	8 ± 1	8 ± 4	14 ± 4	16 ± 14	10 ± 5
inflammatory process	<i>il1b</i>	0.001 ± 0.001	0.003 ± 0.003	0.002 ± 0.001	0.007 ± 0.005	0.0005 ± 0.0003

Table S3. Gene expression as compared to actin (mean ± standard deviation, n=5) in liver of the zebrafish exposed to three exposure treatments: no added U (C0), 23 ± 6 (C1) and 130 ± 34 (C2) µg of U/L and after an 8-d depuration phase.

LIVER		C0				
functions	genes	3	10	21	28	8d
detoxification	<i>abcb311</i>	0.16 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.04	0.03 ± 0.02	0.006 ± 0.003
	<i>cyp3c112</i>	0.36 ± 0.05	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.13 ± 0.05	0.13 ± 0.07
oxidative stress	<i>hspb1</i>	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.04	0.02 ± 0.02	0.005 ± 0.003	0.005 ± 0.004
	<i>gpx1a</i>	7 ± 2	12 ± 10	33 ± 28	0.9 ± 0.5	4 ± 3
	<i>gstp1</i>	1.9 ± 0.6	4 ± 2	7 ± 5	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.7
	<i>cat</i>	18 ± 5	15 ± 10	20 ± 12	3 ± 1	4 ± 3
	<i>sod1</i>	14 ± 6	10 ± 7	9 ± 5	1.7 ± 0.8	4 ± 4
	<i>sod2</i>	3 ± 2	2 ± 1	0.4 ± 0.3	0.18 ± 0.07	0.26 ± 0.07
	<i>bax</i>	0.06 ± 0.03	0.2 ± 0.2	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.013 ± 0.009
DNA repair	<i>gadd45b</i>	0.2 ± 0.1	0.20 ± 0.10	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.06 ± 0.02
	<i>rad51</i>	0.009 ± 0.008	0.012 ± 0.006	0.02 ± 0.01	0.005 ± 0.003	0.004 ± 0.002
mitochondrial metabolism	<i>coxI</i>	139 ± 69	132 ± 83	62 ± 47	27 ± 18	66 ± 65
	<i>atp5f1</i>	5 ± 2	6 ± 2	2 ± 2	0.8 ± 0.4	2 ± 2
inflammatory process	<i>il1b</i>	0.008 ± 0.007	0.01 ± 0.02	0.003 ± 0.003	0.0007 ± 0.0004	0.0002 ± 0.0001
		C1				
detoxification	<i>abcb311</i>	0.07 ± 0.05	0.9 ± 0.9	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.04	0.03 ± 0.02
	<i>cyp3c112</i>	0.15 ± 0.09	0.6 ± 0.7	0.17 ± 0.07	0.3 ± 0.2	0.19 ± 0.09
oxidative stress	<i>hspb1</i>	0.004 ± 0.003	0.09 ± 0.06	0.018 ± 0.003	0.02 ± 0.02	0.006 ± 0.007
	<i>gpx1a</i>	1.2 ± 0.9	2 ± 1	6 ± 3	21 ± 21	2.0 ± 1.4
	<i>gstp1</i>	2 ± 2	0.02 ± 0.01	1.3 ± 0.8	4 ± 5	0.7 ± 0.3
	<i>cat</i>	5 ± 4	1.0 ± 0.1	14 ± 11	23 ± 17	4 ± 3
	<i>sod1</i>	32 ± 28	6 ± 4	35 ± 44	9 ± 5	3 ± 3
	<i>sod2</i>	2 ± 3	0.6 ± 0.5	1.3 ± 0.4	3.7 ± 4.8	0.5 ± 0.3
	<i>bax</i>	0.07 ± 0.09	0.08 ± 0.07	0.11 ± 0.04	0.04 ± 0.04	0.05 ± 0.02
DNA repair	<i>gadd45b</i>	0.02 ± 0.01	1.3 ± 0.9	0.5 ± 0.5	0.12 ± 0.07	0.02 ± 0.01
	<i>rad51</i>	0.03 ± 0.02	0.008 ± 0.007	0.05 ± 0.07	0.007 ± 0.004	0.007 ± 0.005
mitochondrial metabolism	<i>coxI</i>	551 ± 473	404 ± 144	160 ± 16	127 ± 75	39 ± 15
	<i>atp5f1</i>	1.0 ± 0.7	4 ± 5	15 ± 19	3 ± 1	2 ± 1
inflammatory process	<i>il1b</i>	0.002 ± 0.001	0.06 ± 0.07	0.004 ± 0.004	0.002 ± 0.003	0.0006 ± 0.0001
		C2				
detoxification	<i>abcb311</i>	0.09 ± 0.05	0.14 ± 0.07	0.03 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.13 ± 0.06
	<i>cyp3c112</i>	0.2 ± 0.2	0.7 ± 0.8	0.13 ± 0.08	0.15 ± 0.07	0.25 ± 0.04
oxidative stress	<i>hspb1</i>	0.010 ± 0.007	0.08 ± 0.07	0.006 ± 0.007	0.005 ± 0.004	0.13 ± 0.10
	<i>gpx1a</i>	14 ± 11	42 ± 41	0.4 ± 0.2	2 ± 2	2.3 ± 0.8
	<i>gstp1</i>	0.5 ± 0.3	15 ± 14	0.16 ± 0.09	0.6 ± 0.4	1.4 ± 0.6
	<i>cat</i>	14 ± 10	29 ± 14	1.2 ± 0.8	5 ± 5	3 ± 1
	<i>sod1</i>	13 ± 10	21 ± 17	1 ± 1	3 ± 2	2.90 ± 0.09
	<i>sod2</i>	2.5 ± 1.5	4.6 ± 5.4	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.6
	<i>bax</i>	0.02 ± 0.01	0.005 ± 0.004	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.12 ± 0.03
DNA repair	<i>gadd45b</i>	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.08	0.008 ± 0.005	0.023 ± 0.007	0.1 ± 0.2
	<i>rad51</i>	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.04	0.004 ± 0.002	0.0022 ± 0.0007	0.02 ± 0.01
mitochondrial metabolism	<i>coxI</i>	40 ± 8	921 ± 715	29 ± 15	39 ± 33	40 ± 8
	<i>atp5f1</i>	4 ± 4	7 ± 5	0.7 ± 0.3	1.2 ± 0.8	1.7 ± 0.7
inflammatory process	<i>il1b</i>	0.002 ± 0.001	0.006 ± 0.006	0.0011 ± 0.0006	0.002 ± 0.002	0.02 ± 0.03

Table S4. Gene expression as compared to actin (mean ± standard deviation, n=5) in gills of the zebrafish exposed to three exposure treatments: no added U (C0), 23 ± 6 (C1) and 130 ± 34 (C2) µg of U/L and after an 8-d depuration phase.

GILLS		C0				
functions	genes	3	10	21	28	8d
detoxification	<i>abcb311</i>	0.04 ± 0.03	0.0108 ± 0.0006	0.015 ± 0.007	0.02 ± 0.02	0.004 ± 0.001
	<i>cyp3c112</i>	0.010 ± 0.007	0.009 ± 0.005	0.006 ± 0.003	0.008 ± 0.004	0.006 ± 0.003
oxidative stress	<i>hspb1</i>	0.005 ± 0.004	0.010 ± 0.011	0.004 ± 0.006	0.0017 ± 0.0009	0.004 ± 0.003
	<i>gpx1a</i>	0.07 ± 0.04	0.10 ± 0.06	0.05 ± 0.02	0.054 ± 0.009	0.10 ± 0.04
	<i>gstp1</i>	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.2	0.07 ± 0.05	0.05 ± 0.03	0.09 ± 0.06
	<i>cat</i>	0.011 ± 0.004	0.012 ± 0.005	0.011 ± 0.007	0.013 ± 0.005	0.0102 ± 0.0009
	<i>sod1</i>	0.20 ± 0.09	0.2 ± 0.1	0.18 ± 0.08	0.15 ± 0.04	0.2 ± 0.1
	<i>sod2</i>	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.03
apoptosis	<i>bax</i>	0.02 ± 0.01	0.007 ± 0.006	0.008 ± 0.006	0.011 ± 0.006	0.02 ± 0.01
DNA repair	<i>gadd45b</i>	0.030 ± 0.008	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.06 ± 0.04	0.023 ± 0.007
	<i>rad51</i>	0.004 ± 0.002	0.003 ± 0.002	0.0016 ± 0.0004	0.0020 ± 0.0008	0.005 ± 0.002
mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	4 ± 2	6 ± 1	6 ± 5	7 ± 4	6 ± 2
	<i>atp5f1</i>	0.11 ± 0.05	0.12 ± 0.06	0.08 ± 0.04	0.10 ± 0.05	0.14 ± 0.04
inflammatory process	<i>il1b</i>	0.003 ± 0.002	0.002 ± 0.001	0.0010 ± 0.0007	0.0007 ± 0.0003	0.001 ± 0.001
C1						
detoxification	<i>abcb311</i>	0.03 ± 0.02	0.015 ± 0.007	0.02 ± 0.01	0.021 ± 0.007	0.014 ± 0.005
	<i>cyp3c112</i>	0.0068 ± 0.0006	0.01 ± 0.01	0.008 ± 0.003	0.008 ± 0.002	0.012 ± 0.008
oxidative stress	<i>hspb1</i>	0.006 ± 0.009	0.010 ± 0.009	0.004 ± 0.003	0.002 ± 0.002	0.004 ± 0.005
	<i>gpx1a</i>	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.14 ± 0.09	0.09 ± 0.03	0.2 ± 0.2
	<i>gstp1</i>	0.06 ± 0.04	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.04	0.08 ± 0.04
	<i>cat</i>	0.015 ± 0.004	0.02 ± 0.02	0.014 ± 0.006	0.016 ± 0.008	0.016 ± 0.008
	<i>sod1</i>	0.25 ± 0.04	0.28 ± 0.10	0.28 ± 0.09	0.24 ± 0.05	0.4 ± 0.2
	<i>sod2</i>	0.08 ± 0.03	0.2 ± 0.2	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.1 ± 0.1
apoptosis	<i>bax</i>	0.010 ± 0.003	0.005 ± 0.002	0.008 ± 0.007	0.009 ± 0.004	0.009 ± 0.005
DNA repair	<i>gadd45b</i>	0.021 ± 0.009	0.017 ± 0.004	0.09 ± 0.08	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.10
	<i>rad51</i>	0.0037 ± 0.0009	0.008 ± 0.009	0.004 ± 0.003	0.0015 ± 0.0005	0.01 ± 0.01
mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	4 ± 2	6 ± 1	9 ± 6	9 ± 5	16 ± 14
	<i>atp5f1</i>	0.18 ± 0.07	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.08	0.10 ± 0.02	0.2 ± 0.2
inflammatory process	<i>il1b</i>	0.0013 ± 0.0003	0.0012 ± 0.0003	0.0011 ± 0.0007	0.0006 ± 0.0003	0.0008 ± 0.0001
C2						
detoxification	<i>abcb311</i>	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.05 ± 0.05	0.04 ± 0.02	0.008 ± 0.002
	<i>cyp3c112</i>	0.009 ± 0.006	0.008 ± 0.004	0.05 ± 0.07	0.015 ± 0.005	0.02 ± 0.01
oxidative stress	<i>hspb1</i>	0.007 ± 0.004	0.003 ± 0.003	0.009 ± 0.009	0.003 ± 0.002	0.005 ± 0.004
	<i>gpx1a</i>	0.2 ± 0.1	0.13 ± 0.09	0.2 ± 0.1	0.18 ± 0.04	0.3 ± 0.2
	<i>gstp1</i>	0.1 ± 0.2	0.09 ± 0.03	0.07 ± 0.04	0.10 ± 0.05	0.2 ± 0.2
	<i>cat</i>	0.012 ± 0.005	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
	<i>sod1</i>	0.21 ± 0.05	0.3 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.30 ± 0.07	0.5 ± 0.3
	<i>sod2</i>	0.05 ± 0.01	0.10 ± 0.08	0.21 ± 0.09	0.07 ± 0.03	0.2 ± 0.2
apoptosis	<i>bax</i>	0.003 ± 0.002	0.008 ± 0.005	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.008 ± 0.002
DNA repair	<i>gadd45b</i>	0.009 ± 0.006	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.05
	<i>rad51</i>	0.010 ± 0.011	0.004 ± 0.004	0.006 ± 0.003	0.0036 ± 0.0007	0.03 ± 0.02
mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	7 ± 6	8 ± 7	31 ± 31	13 ± 7	39 ± 40
	<i>atp5f1</i>	0.14 ± 0.03	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.20 ± 0.06	0.5 ± 0.2
inflammatory process	<i>il1b</i>	0.0020 ± 0.0003	0.0020 ± 0.0009	0.0009 ± 0.0008	0.0020 ± 0.0009	0.0010 ± 0.0001

References

1. World Health Organization. 2001. Depleted uranium: Sources, exposure and health effects. WHO/SDE/PHE/01.1. Geneve, Switzerland.
2. Markich SJ. 2002. Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *TheScientificWorldJournal* 2:707-729.
3. Sheppard SC, Sheppard MI, Gallerand MO, Sanipelli B. 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *J Environ Radioact* 79:55-83.
4. Labrot F, Narbonne JF, Ville P, Saint Denis M, Ribera D. 1999. Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36:167-178.
5. Barber DS, Ehrich MF, Jortner BS. 2005. The effect of stress on the temporal and regional distribution of uranium in rat brain after acute uranyl acetate exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 68:99-111.
6. Pellmar T, Fuciarelli A, Ejniak J, Hamilton M, Hogan J, Strocko S, Emond C, Mottaz H, Landauer M. 1999. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci* 49:29-39.
7. Lestaevel P, Houpert P, Bussy C, Dhieux B, Gourmelon P, Paquet F. 2005. The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 212:219-226.
8. Pellmar TC, Keyser DO, Emery C, Hogan JB. 1999. Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments. *Neurotoxicology* 20:785-792.
9. Monleau M, Bussy C, Lestaevel P, Houpert P, Paquet F, Chazel V. 2005. Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations. *Neurosci Lett* 390:31-36.
10. Baatrup E. 1991. Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs, of fish. *Comp Biochem Physiol - C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 100:253-257.
11. Rouleau C, Borg-Neczak K, Gottofrey J, Tjälve H. 1999. Accumulation of Waterborne Mercury(II) in Specific Areas of Fish Brain. *Environ Sci Technol* 33:3384 - 3389.
12. Barillet S, Adam C, Palluel O, Devaux A. 2007. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environ Toxicol Chem* 26:497-505.
13. Miller AC, Xu J, Stewart M, Borooks K, Hodge S, Shi L, Page N, McClain D. 2002. Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: dicentric frequency of neoplastic transformation as endpoints. *Radiation Protection Dosimetry* 99:275-278.

14. Yazzie M, Gamble SL, Civitello ER, Stearns DM. 2003. Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chem Res Toxicol* 16:524-530.
15. Barillet S, Buet A, Adam C, Devaux A. 2005. Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection Suppl* 40:S175-S180.
16. Nechay BR, Thompson JD, Saunders JP. 1980. Inhibition by uranyl nitrate of adenosine triphosphatases derived from animal and human tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 53:410-419.
17. McQueney MS, Markham GD. 1995. Investigation of monovalent cation activation of S-adenosylmethionine synthetase using mutagenesis and uranyl inhibition. *J Biol Chem* 270:18277-18284.
18. Pasanen M, Lang S, Kojo A, Kosma VM. 1995. Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environ Res* 70:126-133.
19. Tran D, Bourdineaud JP, Massabuau JC, Garnier-Laplace J. 2005. Modulation of uranium bioaccumulation by hypoxia in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: Induction of multixenobiotic resistance protein and heat shock protein 60 in gill tissues. *Environ Toxicol Chem* 24:2278-2284.
20. Antunes SC, Pereira R, Gonçalves F. 2007. Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Arch Environ Contam Toxicol* 53:207-213.
21. Kurttio P, Harmoinen A, Saha H, Salonen L, Karpas Z, Komulainen H, Auvinen A. 2006. Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *American Journal of Kidney Diseases* 47:972-982.
22. World Health Organization. 2004. Guidelines for drinking-water quality, third edition. Geneva, Switzerland, pp 197-209.
23. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402-408.
24. Coello WF, Khan MA. 1996. Protection against heavy metal toxicity by mucus and scales in fish. *Arch Environ Contam Toxicol* 30:319-326.
25. Leggett RW, Pellmar TC. 2003. The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J Environ Radioact* 64:205-225.
26. Cooley HM, Evans RE, Klaverkamp JF. 2000. Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat Toxicol* 48:495-515.
27. Weisbart M. 1973. The distribution and tissue retention of mercury-203 in the goldfish (*Carassius auratus*). *Can J Zool* 51:143-150.

28. Lanno RP, Hicks B, Hilton JW. 1987. Histological observations on intrahepatocytic copper-containing granules in rainbow trout reared on diets containing elevated levels of copper. *Aquat Toxicol* 10:251-263.
29. Achard M, Baudrimont M, Boudou A, Bourdineaud JP. 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat Toxicol* 67:347-357.
30. Tommasini R, Vogt E, Fromenteau M, Hortensteiner S, Matile P, Amrhein N, Martinoia E. 1998. An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J* 13:773-780.
31. Dey S, Papadopoulou B, Haimour A, Roy G, Grondin K, Dou D, Rosen BP, Ouellette M. 1994. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. *Mol Biochem Parasitol* 67:49-57.
32. Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczycka M, Thiele DJ, Rea PA. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Nat Acad Sci USA* 94:42-47.
33. Gonzalez P, Baudrimont M, Boudou A, Bourdineaud JP. 2006. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *BioMetals* 19:225-235.
34. Corripio-Miyar Y, Bird S, Tsamopoulos K, Secombes CJ. 2007. Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1 and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Mol Immunol* 44:1361-1373.
35. Dinarello CA. 1997. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 8:253-265.
36. Taulan M, Paquet F, Maubert C, Delissen O, Demaille J, Romey MC. 2004. Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environ Health Perspect* 112:1628-1635.
37. Monleau M, De Méo M, Paquet F, Chazel V, Duménil G, Donnadiou-Claraz M. 2006. Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicol Sci* 89:287-295.
38. Dragon S, Saffar AS, Shan L, Gounni AS. 2008. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol Immunol* 45:160-168.
39. Bouton LA, Ramirez CD, Bailey DP, Yeatman CF, Yue J, Wright HV, Domen J, Rosato RR, Grant S, Fischer-Stenger K, Ryan JJ. 2004. Costimulation with interleukin-4 and interleukin-10 induces mast cell apoptosis and cell-cycle arrest: The role of p53 and the mitochondrion. *Expl Hematol* 32:1137-1145.

Principales avancées et conclusion

Les travaux visaient à caractériser les effets de l'uranium et plus particulièrement, la spécificité des réponses moléculaires dans différents tissus du poisson zèbre exposé à de faibles concentrations d'uranium dans l'eau. Les résultats ont donné le jour à plusieurs avancées :

Dépendance de la distribution de l'uranium selon les organes.

La distribution hétérogène de l'uranium dans l'organisme met en évidence le rôle physiologique des organes considérés, dans l'absorption et le transport de l'uranium chez le poisson. Les concentrations tissulaires mesurées dans le foie et les branchies du poisson sont environ dix fois plus élevées que dans le cerveau et les muscles. De plus, l'accumulation dans le foie et les branchies est plus variable que dans le cerveau et les muscles pendant la phase d'exposition. Par ailleurs, une chute des concentrations tissulaires est observée dans le foie et les branchies après une phase de dépuración de 8 jours alors que dans les muscles et le cerveau seule une tendance à la diminution est observée. Ainsi, l'accumulation de l'uranium a été quantifiée à travers la phase d'exposition et la phase de dépuración dans les quatre organes. Les profils d'accumulation et de dépuración de l'uranium diffèrent selon l'organe considéré.

Spécificité de la réponse moléculaire selon les organes, les temps et les concentrations.

Les expressions géniques sont différemment modifiées selon les organes avec une variation pour les temps courts d'exposition et la faible concentration dans le cerveau et les muscles.

L'exposition à l'uranium induit une réponse dès 3 jours d'exposition dans le cerveau avec la réponse de gènes impliqués dans la synthèse du glutamate (*gls1*) ou le transport vésiculaire de l'acétylcholine (*vchat*) et dans les muscles avec la réponse de gènes impliqués dans le

métabolisme mitochondrial (*coxI*, *atp5f1*). A 3 jours d'exposition, les concentrations tissulaires en uranium sont très faibles : de 18 et 45 ngU/g dans le cerveau et de 32 et 98 ngU/g dans les muscles pour les individus exposés à 20 et 100 µgU/L respectivement. Une réponse plus tardive à 28 jours d'exposition à 20 µgU/L est observée dans le foie avec l'induction de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial, la réparation des dommages à l'ADN et la balance oxydative. La concentration tissulaire en uranium mesurée à ce temps d'analyse est de 512 ngU/g. Une réponse plus tardive est également observée dans les branchies à 21 jours d'exposition à 100 µgU/L avec l'induction de gènes impliqués dans la détoxification, la balance oxydative, le métabolisme mitochondrial et la réparation des dommages à l'ADN. La concentration tissulaire mesurée est alors de 1587 ngU/g. Ainsi, pendant la phase d'exposition, les réponses moléculaires sont observées de façon précoce (dès 3 jours d'exposition pour C1 et C2) dans le cerveau et les muscles du poisson et de façon plus tardive dans le foie (à 28 jours pour C1) et les branchies (à 21 jours pour C2). Les réponses sont particulièrement sensibles dans le cerveau et les muscles car elles sont observées pour concentrations tissulaires beaucoup plus faibles que celles mesurées dans le foie et les branchies.

La phase de dépuración de 8 jours souligne la distinction entre les réponses obtenues dans le cerveau et les muscles et celles obtenues dans le foie et les branchies.

En effet, après 8 jours de dépuración, les concentrations tissulaires en uranium chutent dans le foie et les branchies des organismes préalablement exposés à C1 et C2 et des réponses transcriptionnelles sont particulièrement importantes dans le foie avec l'induction de gènes impliqués dans l'apoptose, l'inflammation ou la détoxification. A ce temps d'analyse la diminution n'est pas significative dans le cerveau et les muscles et les niveaux d'expression géniques sont comparables à ceux des témoins ou inférieurs. Ainsi, le foie et les branchies

sont le siège d'une dépurative efficace. Dans les muscles et le cerveau, la dépurative apparaît plus lente sur la période considérée de 8 jours.

Les réponses de gènes impliqués dans la balance oxydative et le système cholinergique corroborent les travaux antérieurs réalisés chez le poisson zèbre exposé à l'uranium montrant une perturbation de l'activité anti-oxydante dans les hépatocytes et une perturbation de l'activité de l'acétylcholinestérase dans le cerveau (Barillet, 2007, Barillet *et al.*, 2007).

Les réponses obtenues sont spécifiques du tissu considéré et de la durée de l'exposition. D'autres auteurs ont constaté une spécificité de la réponse transcriptionnelle chez le poisson zèbre exposé au cadmium par voie directe et au méthylmercure par voie trophique (Gonzalez *et al.*, 2005, 2006). Dans notre étude, des réponses transcriptionnelles sont observées dès 3 jours pour des concentrations tissulaires de 0,08 et 0,13 nmol/g (poids sec) d'uranium dans le cerveau et les muscles respectivement. A titre de comparaison, la concentration tissulaire minimale pour laquelle une réponse transcriptionnelle est observée est de 16 et 2 nmol/g (poids sec) de cadmium dans le cerveau et les muscles (Gonzalez *et al.*, 2006). Par conséquent, le cerveau et les muscles des poissons zèbres semblent plus sensibles à une contamination à l'uranium qu'au cadmium.

Les réponses précoces (dès 3 jours d'exposition) et sensibles (également observées à la faible concentration) impliquées dans les mécanismes d'intérêts (neurotoxicité et métabolisme mitochondrial), et l'inefficacité de la dépurative dans les muscles et le cerveau du poisson ont fait l'objet d'une attention particulière dans la suite de notre programme de recherche, avec la réalisation de deux autres expériences. L'importance des réponses transcriptionnelles pour les faibles concentrations tissulaires et leur retour au niveau basal pour les concentrations plus fortes suggèrent qu'à partir d'un certain seuil de concentration les cellules ne sont plus capables de mettre en place un mécanisme compensatoire. Cependant cette hypothèse se limite à notre sélection de gènes et ne prend pas en considération d'autres processus

susceptibles de se mettre en place. Il s'est avéré intéressant d'élargir la recherche en considérant d'autres processus biologiques dans l'évaluation des effets de l'uranium sur la réponse neuronale.

**Chapitre V : Etude des effets précoces de l'uranium sur le
cerveau : voies moléculaires affectées et dommages au niveau de
l'ultrastructure du bulbe olfactif**

Sublethal effects of waterborne uranium exposures on the zebrafish brain: transcriptional responses and alterations of the olfactory bulb ultrastructure.

Environmental Science and Technology. 2010, 44: 1438-1443.

Introduction

Comme l'a montré la première expérience, les mécanismes moléculaires affectés par une exposition à l'uranium sont spécifiques du tissu considéré et de la durée de l'exposition. Les résultats de la première étude ont mis en évidence des perturbations neuronales précoces et sensibles à travers l'expression différentielle de gènes impliqués dans le système cholinergique (*vchat*) et la synthèse de glutamate (*gls1*) ainsi que des capacités de dépuraison faibles. Le cerveau apparaît donc comme un organe particulièrement sensible chez les poissons exposés à l'uranium.

L'objectif de cette deuxième partie du programme de recherche a résidé dans une meilleure compréhension des effets précoces d'une exposition à l'uranium dans le cerveau. Plusieurs études ayant mis en évidence la fragilité du système olfactif des poissons lors d'expositions métalliques dans l'eau comme pour le Cd ou le Cu (Moran *et al.*, 1992, Hansen *et al.*, 1999, Blechinger *et al.*, 2007), les atteintes éventuelles sur l'ultrastructure du système olfactif ont été recherchées. Les axes développés pour répondre à cet objectif sont les suivants :

Recherche de processus biologiques affectés.

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans la neurotoxicité de l'uranium. Les expériences menées chez le rat illustrent la diversité des mécanismes potentiellement responsables de désordres neurologiques. Des perturbations du système cholinergique (Bensoussan *et al.*, 2009), dopaminergique (Bussy *et al.*, 2006), ou encore la génération d'un stress oxydatif (Briner et Muray, Lestaevel *et al.*, 2009) dans le cerveau du rat pourraient contribuer à la neurotoxicité de l'uranium.

Lors de nos premières expériences, le suivi de 20 gènes a été effectué dans le cerveau des poissons représentant sept processus biologiques différents (la détoxification, la balance oxydative, la réparation des dommages à l'ADN, l'apoptose, la réponse inflammatoire, le métabolisme mitochondrial et la réponse neuronale).

Afin de prendre en compte d'autres processus pouvant être potentiellement impliqués dans les effets neurotoxiques de l'uranium, une recherche plus étendue s'est imposée. En effet, une vision d'ensemble permet une meilleure appréhension des processus affectés.

Analyse approfondie des réponses précoces à faibles concentrations

Les réponses transcriptionnelles de gènes impliqués dans la réponse neuronale à 3 et 10 jours d'exposition ont été discutées précédemment. Lors d'expériences antérieures menées au laboratoire dans des conditions semblables des perturbations de l'activité de l'acétylcholinestérase avaient été décelées dès 3 jours d'exposition. Au vu des résultats initiaux nous avons suggéré la mise en place d'une réponse compensatoire pour les concentrations tissulaires modérées et une estompe des mécanismes pour les concentrations plus élevées mais dans quelle mesure pouvons-nous émettre cette hypothèse sachant que nous n'avons étudié que l'expression différentielle de 20 gènes ? Les travaux de cette deuxième partie ont visé à approfondir les réponses afin de pouvoir étayer ce type d'hypothèse.

Recherche d'atteintes éventuelles sur l'ultrastructure du bulbe olfactif.

D'après les informations issues de la littérature, le système olfactif des poissons est particulièrement vulnérable aux expositions métalliques par voie directe. De plus, l'intégrité de ce système est requise dans la gestion de nombreux comportements nécessaires à la survie du poisson comme la recherche de nourriture, la fuite des prédateurs ou encore la reproduction.

La perturbation d'un processus à travers l'expression transcriptionnelle a ses limites dans le sens où l'on peut discuter de la mise en place d'une réponse compensatoire pour faire

face à la pression de contamination mais lorsque les mécanismes sont dépassés et tendent à des effets délétères ce type d'étude ne suffit plus. Afin d'approfondir l'interprétation des résultats, l'analyse de l'ultrastructure permet de discuter de la répercussion des effets qui sont le reflet de mécanismes moléculaires dépassés. L'examen a reposé sur l'ultrastructure de la neuropile du bulbe olfactif partie du cerveau assurant un rôle clé dans le fonctionnement du système olfactif.

**Sublethal effects of waterborne uranium exposures on the zebrafish brain:
transcriptional responses and alterations of the olfactory bulb
ultrastructure**

¹*Adélaïde Lerebours*, ²*Jean-Paul Bourdineaud*, ³*Karlijn van der Ven*, ³*Tine Vandenbrouck*,
²*Patrice Gonzalez*, ¹*Virginie Camilleri*, ¹*Magali Floriani*, ¹*Jacqueline Garnier-Laplace and*
¹*Christelle Adam-Guillermin*

¹Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sûreté
Nucléaire, Bât 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-Lez-Durance Cedex, France ;

²Equipe de Géochimie et Ecotoxicologie des Métaux dans les systèmes Aquatiques (GEMA),
UMR 5805 CNRS - Université Bordeaux 1, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France ;

³Department of Biology, Laboratory of Ecophysiology, Biochemistry and Toxicology,
University of Antwerp, Groeneborgerlaan 171, 2020 Antwerp, Belgium

Abstract

The toxic action modes of uranium (U) in fish are still scarcely known. U is known to modify the acetylcholinesterase activity in the fish brain. To get further insight in U neurotoxicity in fish, we examined the transcriptional responses in brain of the zebrafish, *Danio rerio*, exposed to 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ of waterborne U for three and 10 days. In parallel, an ultrastructure analysis of the neuropil of the olfactory bulb, an area of the brain of fish sensitive to metal contamination, was performed after 10 days of U exposure. This combined transcriptomic and histological study is the first report performed in the brain and specifically the olfactory bulb of fish exposed to U. We found that 56 transcripts responded to the metal exposure, and the anatomical structure of the olfactory bulb was damaged. The greatest gene response occurred at the lower U concentration and the numbers of responding genes common to any two U exposures were much smaller than those unique to each exposure. These data showed that the intensity of gene response may not correlate positively with toxicant concentrations according to our experimental design. Instead, different patterns of gene expression are expected for each exposure. Gene responses were categorized into eight functional classes and the transcriptional responses of genes involved in the olfactory system were significantly affected. Collectively, the data suggest that genes in the olfactory region may be ecologically relevant and sensitive transcriptional biomarkers of U waterborne exposure.

Introduction

Uranium (U), a naturally occurring element and a member of the actinide series, is widely distributed throughout the environment. The natural concentrations found in freshwater systems are highly variable and range from 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$ to over 2 mg L^{-1} , depending on the geological background (1). Various anthropogenic contributions originating from the nuclear fuel cycle, farming, research laboratories and military activities may considerably enhance U levels in terrestrial and aquatic ecosystems (1).

The effects of U on freshwater organisms have not been extensively studied and most of the data are related to bioaccumulation and acute-exposure toxicity tests (2-4). At the individual level, a delay in hatching and a decrease of hatching rate were observed for eggs of zebrafish exposed to 20 and 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ of depleted uranium (5). In the lake whitefish *Coregonus clupeaformis* exposed to dietary U, an increase of lipid peroxidation and histopathological lesions were observed in the liver and kidneys (6).

The toxic modes of action of U at environmentally relevant concentrations are still scarcely known. Recent studies showed that in the zebrafish liver, U affects gene expression and activities of antioxidant enzymes, i.e. *gpx1a*, *cat*, *sod1*, *sod2* (7) and catalase, superoxide dismutase (8) after waterborne exposure to 20 and 100 $\mu\text{g U L}^{-1}$. In erythrocytes, genotoxicity assays revealed a significant effect of waterborne U on DNA integrity for the same concentration range (9).

Experiments led on small mammals suggest that U may either be transported to the brain through the blood-brain barrier (10, 11) or via the olfactory pathway (12). Data relating to the sub-lethal effects of U in the brain of fish are scarce. In zebrafish, U induced an increase of acetylcholinesterase activity (8) and affected the expression of genes involved in detoxification, oxidative stress, DNA repair, cholinergic system and glutamate synthesis after 3 and 10 days of waterborne exposure (7).

We were particularly interested in the olfactory system of fish because it is a sensitive target of metal exposure (13), and such exposures might have dramatic consequences on fish survival since olfaction mediates a wide variety of behaviors (14). For example, in the endangered and threatened Pacific salmon studies have shown that olfactory injury induced by copper exposures may contribute to population decline (15).

The present work aims at expanding the understanding of the effects of U on the central nervous system of fish, with an emphasis on the olfactory system. The approach used was based on the study of brain transcriptional responses to U using DNA microarray. Transcriptomic analyses were performed after 3 (T3) and 10 (T10) days of exposure in fish exposed to environmentally relevant concentrations: C0: control, C1: 15 and C2: 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ of U. Those concentrations are found close to mining sites (16) or in drill wells (17). The lowest one corresponds also to the provisional drinking water guideline value of the World Health Organization (15 $\mu\text{g U L}^{-1}$) (18). Sampling times were chosen according to previous work showing that most of the changes at the gene expression level occur at these times in the brain of zebrafish (7). Additionally, the effects of U on the neuroanatomical organization of the zebrafish olfactory bulb were studied using transmission electronic microscope (TEM). At the tissue level, uranium accumulation was measured. The research revealed a depression of odorant receptors (*or111-7* and *or102-5*) after 3 days of U exposure and showed neuropil alterations in the olfactory bulb. This combined transcriptomic and histological study is the first report performed in the brain and specifically the olfactory bulb of fish exposed to U.

Experimental section

Exposure Conditions. Adult zebrafish were obtained from a French supplier (St Forgeux) and acclimated to laboratory conditions for three weeks before the experiment. Male fish (body weight: 0.40 ± 0.11 g wet weight (w. w.); standard length: 2.82 ± 0.31 cm) were randomly placed in 18 cages distributed in three continuous flow-through tanks at a density of 5 fish per liter. Two cages were sampled at each time point to reduce fish stress during collecting times (including time 0 at the onset of the experiment). Female fish were excluded to avoid any interference due to reproduction processes. The system was alimented by a synthetic moderately soft water (Ca^{2+} : 8.7 mg L^{-1} , Mg^{2+} : 1.4 mg L^{-1} , Na^{+} : 5.1 mg L^{-1} , K^{+} : 1 mg L^{-1} , Cl^{-} : 13.4 mg L^{-1} , SO_4^{2-} : 12.5 mg L^{-1} , NO_3^{-} : 9.2 mg L^{-1} , CO_3^{2-} : 0.45 mg L^{-1} , $\text{pH} = 6.3$) whose composition was chosen to optimize U bioavailability. Major anion concentrations were analysed in water samples by ionic chromatography (Dionex DX-120, Sunnyvale, CA, USA), major cation and uranium concentrations were measured by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES, Optima 4300DV, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA, quantification limit of $10 \mu\text{g L}^{-1}$) after acidification at a final concentration of nitric acid of 0.3M (2% HNO_3 14.4M, v/v). Throughout the experiment, water temperature was maintained at 24.0 ± 0.3 °C and the pH was maintained at 6.3 by pH regulators (Consort R301, Illkirch, Belgium). Tank bottoms were cleaned every day to eliminate fish faeces and food remains. Fish in each cage were fed once a day with a quantity of standard fish pellets corresponding to 2% of the fish body weight (wet weight).

In exposure tanks, fish were contaminated with waterborne U at nominal concentration of $15 \mu\text{g U L}^{-1}$ (C1) and $100 \mu\text{g U L}^{-1}$ (C2) (concentrations measured are shown Table S1) by a continuous flow-through system. The decrease of U concentration in water was manually compensated. The stock solution of U used was prepared from uranyl nitrate $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, France) and acidified with nitric acid (final concentration of 0.3 M, 2% HNO_3

14.4M, v/v). This solution was maintained at 4°C during the experiment. Thirty five fish per condition were removed after 0, 3, and 10 days of exposure. Zebrafish were sacrificed within minutes by immersion in melting ice ($T = 0^{\circ}\text{C}$). This is in agreement with the ethical guidelines displayed and used by the NIH intramural research program (<http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Zebrafish.pdf>).

U analysis. For each condition five fish dedicated to U measurements were collected and frozen at -80°C . Each organism was carefully defrosted at room temperature and the brain (olfactory bulb, forebrain, midbrain and hindbrain) was dissected and dried at 50°C during 48 hours and weighed (dry weight, d. w.) using a microbalance (Sartorius SE2, Germany). Samples were digested by nitric acid (1 ml of HNO_3 14.4M) in polypropylene tubes at 100°C during 3 hours. After acidic dilution of the digests, U concentrations were determined by an Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP-MS, Varian 810, Australia, quantification limit of 1 ng L^{-1}).

Preparation of tissues for Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis. In the framework of this study, TEM analyses were focused on the olfactory bulb since metals are often observed to be accumulated in this brain area in fish.

Three fish were removed from each tank after 10 days of exposure. After dissection, the olfactory bulb was fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for two days at 4°C . The samples were washed for 5 min three times with the same buffer. Samples were postosmicated with 1% osmium tetroxyde in cacodylate buffer for 1 h, dehydrated in ethanol, and embedded in Epon 812. Sections for optical and electron microscope of 500 nm and 80 nm respectively, were obtained by an ultramicrotome (UCT, Leica). For TEM analysis, ultrathin sections were mounted on copper grids and examined in a Tecnai G2 Biotwin (FEI) electron microscope using an accelerating voltage of 100 KeV. At least 200 photographs were taken, analyzed and compared. A previous exploratory experiment

conducted under the same experimental conditions helped us to identify the ultrastructure damage in the olfactory bulb of fish exposed to uranium during 10 days.

Microarray analyses

Zebrafish oligo microarray. A zebrafish oligonucleotide library (Qiagen Operon[®] Array-ready oligo set[™]) was bought from Qiagen (Venlo, The Netherlands). This library consists of 3479 single-stranded oligonucleotides (70 bases long), representing tissue a-specific zebrafish genes with predicted or known functions. Amilosane coated slides (Asper Biotech, Tartu, Estonia) were spotted robotically in duplicate through contact printing using a Qarray mini (Genetix Ltd., Hampshire, United Kingdom) and cross-linked by UV radiation ($6 \times 10^5 \mu\text{J}$) (Stratalinker, Stratagene, La Jolla, CA, USA). Controls (Lucidea Universal ScoreCard, GE healthcare, Roosendaal, The Netherlands) were spotted complementary on the arrays to give an indication about the specific character and the efficiency of the hybridization.

RNA extraction. For each condition, 3 replicates were prepared by pooling 10 brains. The organs were frozen at -80°C in RNAlater (Qiagen, France). Total RNAs were extracted from 50 mg of fresh tissue by Trizol-RNA-Extraction (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) according to the manufacturer's instructions. The quality of RNAs produced (the integrity of the 18 and 28S ribosomal bands) was evaluated by electrophoresis on a 1% agarose-formaldehyde gel.

Labeling and hybridization. Most of the technical details relative to labeling and hybridization are described in supplemental material (Text S1).

Precipitated cDNA samples were dissolved in hybridization solution (30% formamide, 5x SSC, 0.1% SDS and 0.1 mg mL^{-1} salmon sperm). Three replicates were analysed per treatment. To include a correction for dye-related biases, two samples were labeled with cy3 and one with Cy5 (or vice versa) per replicate.

Each sample Cy3 or Cy5 was mixed with the corresponding reference which was a mix of RNA from controls and U-exposed brain samples. The mixture was heat denaturated for 5

minutes at 95°C and added to the microarray under a glass coverslip. The array was then incubated at 42°C in a hybridization chamber (Genetix Ltd, Hampshire, UK) for 16-18h.

After hybridization, the arrays were submerged in 2x SSC and 0.1% SDS at 42°C to remove the coverslip, two washes of 2x SSC and 0.1% SDS for 5 minutes at 42°C, two washes of 0.1x SSC and 0.1% SDS at room temperature of 10 minutes each and four washes of 0.1x SSC at room temperature of 1 minute. After the last wash of 0.1x SSC, the arrays were rinsed in demineralized water and isopropanol for 1 minute each and dried using compressed N₂.

Bioinformatic analysis. Arrays were scanned with a Genepix Personal 4100A confocal scanner (Axon instruments, Union city, CA, USA) which excited the fluorophores at 532 and 635 nm. To balance the overall intensities between the two channels, the PMT voltage was adjusted for each slide to obtain a ratio closed to one. Spot recognition, identification and quantification of raw foreground and background intensities were automated using Genepix Pro 4.1 software. This raw data was subsequently processed in the Bioarray Software Environment Database (BASE 1.2.12, <http://www.islab.ua.ac.be/base/>). After local background subtraction, intensity ratios could be calculated and were log₂ transformed. Limma analyses and normalization of the data were performed. Additionally, spots with an $-1 > M > 1$ (i.e. fold change (FC) > 2 or < 0.5) were considered differentially expressed (with $M = \log_2(\text{FC})$). All differentially expressed genes were classified using Blast2GO (www.blast2go.de), a comprehensive bioinformatics tool which enables annotating and classifying of differential genes according to the Gene Ontology (GO) designation.

Quantitative real-time RT-PCR. Real time PCR was used on the same samples to test the performance of the microarray. The protocol is described in supplemental data (Text S2). The specific primer pairs used are reported in Table S2. The differential expression levels of *or111-7*, *thoc1*, *atp1a1a.4* and *ncam3* genes were evaluated (Table S3).

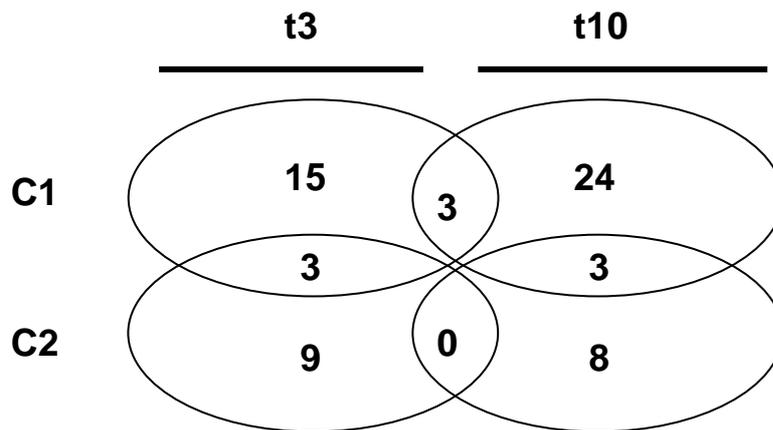
Results

Effect of exposure concentrations on U accumulation in zebrafish brain. Nominal and measured U concentrations were similar (Table S1). U concentrations were determined in the brain at 0, 3 and 10 days of exposure for the three exposure conditions (Figure S1). At day 3 the median concentrations were 31, 40 and 442 ng U g⁻¹ (d.w.) for control, C1 and C2 fish respectively. The accumulation of U in fish exposed to the lowest concentration was close to the basal level. A high variability was observed on values measured in brains of fish exposed to both conditions at day 3. At day 10, the median concentrations were 26, 166 and 683 ng U g⁻¹ (d. w.) for control, C1 and C2 fish respectively. Variability was lower than that observed after 3 days of exposure. As expected, U accumulation tended to increase with the exposure concentration.

Differential gene expression in response to uranium exposure. Gene expression changes in zebrafish brain were evaluated for fish exposed to U concentrations of 15 and 100 µg L⁻¹ after 3 and 10 days in comparison with controls. Interestingly, a larger number of genes were found to be differentially expressed for fish exposed to the lower U concentration, rather than the higher concentration. After 3 days of exposure, the expression of 15 genes was modified for fish exposed to the C1 concentration versus 9 genes for fish exposed to the C2 concentration (Figure 1). The trend of a larger number of genes being differentially expressed following exposure to the lower U concentration was magnified after 10 days of exposure; with the expression of 24 genes modified for fish exposed to the lower concentration versus 8 genes for fish exposed to the higher concentration. A total of 67 genes were found to be differentially regulated in response to uranium. Among them, 56 transcripts were unique to either one of the four U treatments; more precisely, 15, 24, 9, and 8 genes were unique to C1-T3, C1-T10, C2-T3, and C2-T10 treatments, respectively (Figure 1). When looking at a Venn

diagram comparing the transcripts distribution among the four treatments, only 3 transcripts or less were shared between any two U treatments (these shared genes are presented in Table S4).

Figure 1. Venn diagram of the transcriptional changes occurring with uranium exposure. The total numbers of transcripts meeting the cutoff criteria for each uranium treatment are contained within each labeled circle. The numbers where circles overlap show the number of transcripts which are shared between those treatments (see **Table S4**). C1: 15 $\mu\text{g U L}^{-1}$ and C2: 100 15 $\mu\text{g U L}^{-1}$; t3 and t10 indicate 3 days and 10 days of uranium exposure, respectively



All the genes that responded to the U treatments were categorized into eight functional classes (Table S5), encompassing: 1) general cell metabolism, 2) cell surface receptors, 3) developmental processes, 4) cytoskeletal organization, 5) signal transduction, 6) regulation of gene expression, 7) transcriptional processes, and 8) protein synthesis and trafficking (Table S5). Genes within the “general cell metabolism” class demonstrated the widest variance in response to the U treatments. After 10 days exposure to a U concentration of 15 $\mu\text{g L}^{-1}$, the microarray documented a change in the expression of 15 genes; whereas, no general cell

metabolism genes responded when fish were exposed to the higher U concentration for the same time period (Table S5).

An interesting observation is that among the cell surface receptor class of genes those encoding for odorant receptors were most strongly represented. Of the five differential transcripts found, three belong to the odorant receptor family [(*or111-7*; odorant receptor, family D, subfamily 111, member 7), (*or102-5*; odorant receptor, family C, subfamily 102, member 5) and (*or107-1*; odorant receptor, family D, subfamily 107, member 1)]. In the brain of fish exposed to C1 concentrations, *or111-7* and *or102-5* were repressed after 3 days and *or107-1* was repressed after 10 days (Table S5). The odorant receptor repertoire of zebrafish is composed of 143 genes. These genes belong to eight families (A, B, C, D, E, F, G and H) (19). Fourteen genes encoding for odorant receptor belonging to 3 families (C, D and F) were represented on the microarray. 21% of these genes respond to the treatment and encode for odorant receptors belonging to 2 families (C and D).

U exposure leads to histological damage. The olfactory system of fish extends from the olfactory rosettes which are directly in contact with the external medium, to the olfactory bulb and other areas of the brain (20).

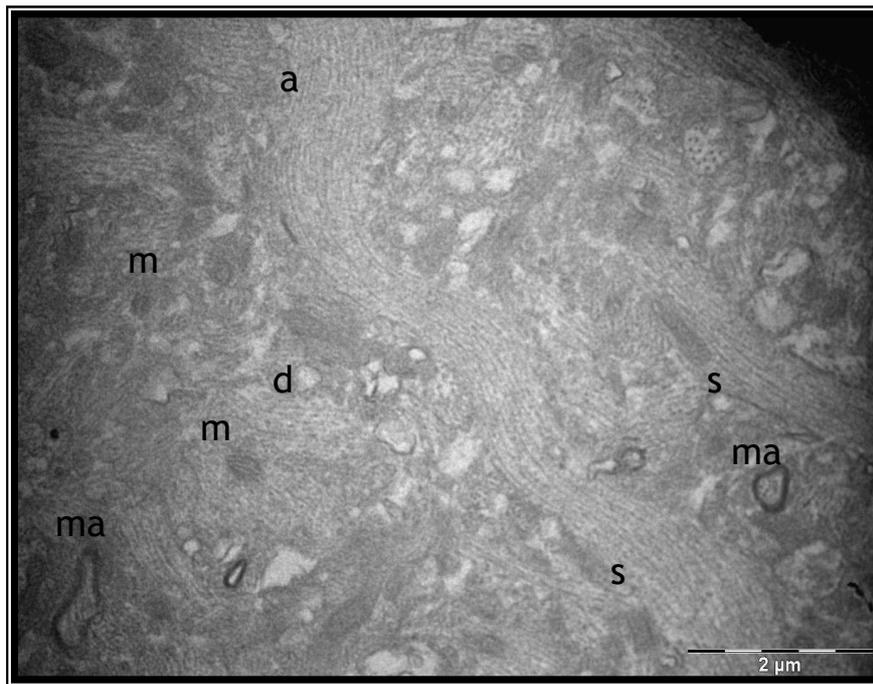
The axons of sensory neurons converge to a specific region of the olfactory bulb where they make synapses with the relay neurons (21). In control fish (Figure 2.A) the structure of the neuropil of the olfactory bulb, was characterized by synaptic connections formed between branches of axons and dendrites, and was composed of myelinated extensions. After 10 days of exposure to C1 and C2 concentrations of U, the results showed an effect of U in the internal structure of the olfactory bulb. An increase in extracellular space was observed, moreover, some myelinated sheaths were deprived of axons, suggesting a neural degeneration (Figures 2.B, 2.C). The cytoskeleton of neurons comprises distinct structural complexes.

Axons are composed of microtubules, and some polymers of tubulin subunits that form filaments. In the present study, the filaments were easily observed via microscopic analyses of the brains from control fish (Figure 2.A). In contrast, brains from C1 and C2 groups had axon filaments that were less represented (Figures 2.B, 2.C).

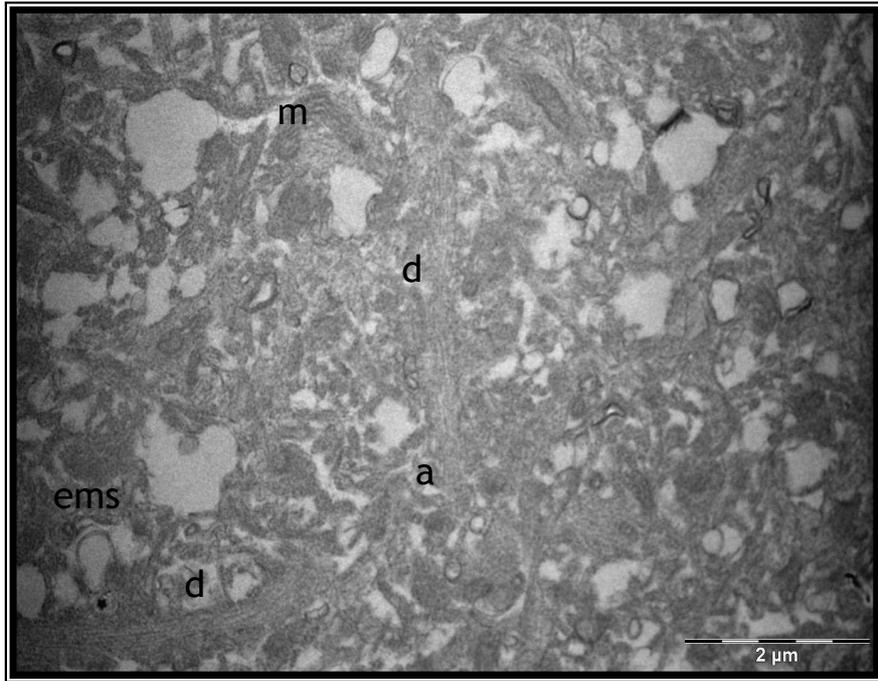
Figure 2. Ultrathin sections through the olfactory bulb observed with a TEM showing the neuropil after 10 days of exposure. (A) control (B) exposed to C1 condition (C) exposed to C2 condition.

d: dendrite, m: mitochondria, a: axon, ma: myelinated axon, s: synapse, ems: empty myelinated sheath

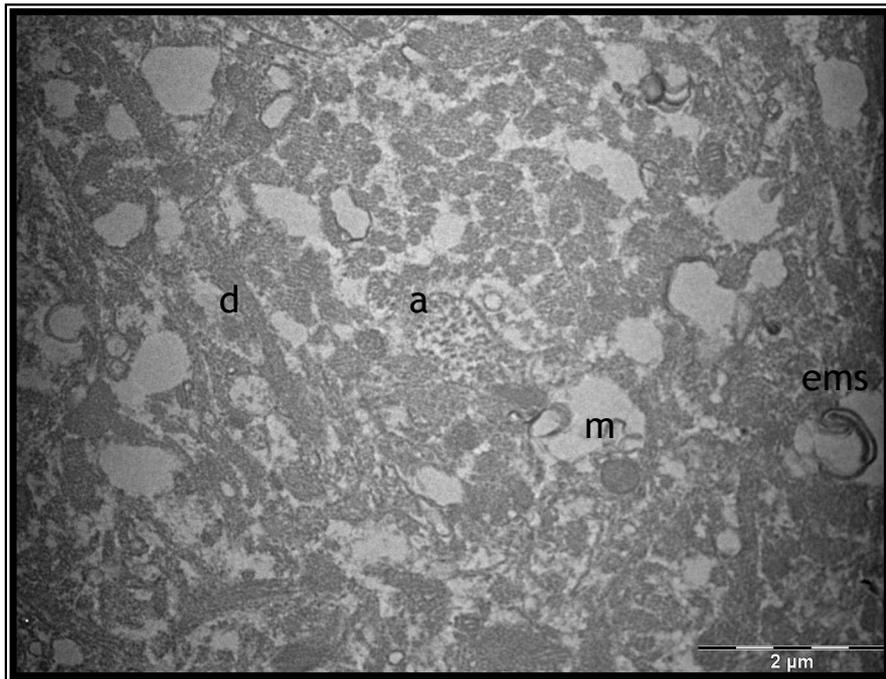
A



B



C



Discussion

Previous studies on the brain of zebrafish exposed to U were related to the monitoring of target gene expression, acetyl cholinesterase activity and U bioaccumulation (7, 8). The microarray methodology used herein is complementary to gene expression analyses using targeted genes. Moreover, our use of toxicogenomics and histological analyses performed in zebrafish brain and olfactory bulb is a novel approach. The olfactory bulb plays a central role in signal discrimination and transmission. In the current study, histological damages were observed in the olfactory bulb after U exposure, and effects on molecular targets related to the olfactory system were highlighted.

Three main findings emerge from the present work: 1) at a U concentration close to the WHO drinking water guideline value, 56 transcripts responded to the metal exposure, and the anatomical structure of the olfactory bulb was damaged; 2) gene expression responses were inversely related to U exposure concentration. The greatest gene response occurred at the lower U concentration; especially after 10 days of exposure, even though the U accumulated in the brain was greater at the higher U concentration (C2). This is in keeping with our previous observations according which in zebrafish liver and brain, the differential expression of stress responsive genes was greater at the lowest U concentration (7). This inverse response has already been observed on human lung cells exposed to arsenic at either 5 or 50 μM . The number of genes responding to the lowest arsenic concentration was higher than the numbers responding to the highest (110 versus 65, respectively) (22); Similarly, in *Daphnia magna* exposed to cadmium at either 18 or 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, more genes responded at the lowest than at the highest concentrations (39 versus 34 genes, respectively) (23); 3) the numbers of responding genes common to any two U treatments were much smaller than those unique to each exposure (Figure 1). Similarly, in the arsenic study referenced above, 94 and 49 genes were unique to 5 and 50 μM arsenic exposures, respectively, but only 16 genes were shared by the

two treatments (22). In another study, gene expressions within kidney tissues were examined from mice exposed to chronic or acute uranyl nitrate contamination (24, 25). Only 16 genes were common to the two exposures and expressed the same way; 147 genes were differentially regulated in either one of the two conditions; 10 genes were common to the two conditions, but expressed the opposite way (up-regulated under chronic exposure but down-regulated under acute exposure). In the fathead minnow liver, the acute or chronic dietary methylmercury contamination resulted in the differential expression of 650 or 267 genes, respectively, but only 18 genes were common to both conditions (26). Similarly, recent studies on gene expression in *Daphnia magna* following exposure to several metals over a range of concentrations highlighted that the stress response is less specific at higher concentrations (23). Collectively, these studies demonstrate the dynamic nature of the genetic response at low doses, and that the intensity of gene response may not correlate positively with toxicant concentrations according to the selected conditions. Instead, different patterns of gene expression are expected for each exposure. Thus, when shifting from chronic to acute exposure the intensity of the differential response of each peculiar gene does not necessarily increase as might have been expected but rather the qualitative nature of the gene response is changed which may result in a modified tissue metabolism. In keeping with this, it has been shown that U is an endocrine disrupter in mice at low but not at high doses (27).

U accumulation in the brain. In the present work, concentrations measured in brain were within the same range of those found in a previous study performed using the same experimental conditions (7). Studies of accumulation in rats showed that uranium was heterogeneously distributed in different areas of the brain as follows: olfactory bulb (567 ng g^{-1}) > hippocampus (156 ng g^{-1}) > frontal cortex (122 ng g^{-1}) > cerebellum (42 ng g^{-1}) (12). Moreover authors observed behavioural changes (locomotion activity and spatial memory

working). In a recent study on zebrafish, concentrations in the brain did not significantly decrease after 8 days of a depuration phase following 28 days of waterborne exposure to the same concentrations (7). Thus, the slow biological half-time of U in brain of zebrafish means that it could be a sensitive organ following depleted uranium exposures; as was observed for rodents (28). The findings on these two vertebrate models (rat and zebrafish) suggest that in order to gain additional insights on the mechanistic responses from uranium exposure, it would be useful to include both the measurement of U concentrations in different areas of the brain and additional behavioral tests.

Histological injuries. An essential prerequisite for studies of circuit connectivity and behavior is a clear understanding of the neuroanatomy of the brain. However, there is a lack of detailed neuroanatomical information for the zebrafish model. To date, histological effects in the brain of fish induced by metal exposure have focused on the olfactory epithelium structure in chinook salmon and rainbow trout (29), brown trout (14) and zebrafish (30) exposed to waterborne metals.

Our results expand on the earlier data by revealing global effects of U on the neuropil situated in the olfactory bulb, the primary central relay (31) where the sensory neurones make synapses with the secondary neurones. The axons of these relay neurones project, via the olfactory tract, to higher centres in the brain, mediating information related to the essential life processes (21). In the current study, ultrastructure dilatations in the neuropil of the olfactory bulb were observed (Figures 2.B, 2.C).

The histological analysis presented herein represents the first report on the observation and identification of the fish olfactory bulb internal ultrastructure. Further investigations are needed to get a better understanding of the neuroanatomical organization and to expand analyses on the effects of U in other areas of the brain.

The research reported herein brings additional information concerning molecular events affected by U exposure to the brain, as compared to previous work targeting selected genes. When applying toxicogenomics in ecotoxicology it is important not to lose sight of the ecological relevance of observed effects (32). In this regard, the olfactory pathway seems to be particularly interesting and some genes are valuable candidates as transcriptional biomarkers.

Toward ecologically relevant biomarkers. Teleost possess a well developed sense of smell that is used for the localization of food, detection of predators, mating and other type of inter-individual communication (33). The fish olfactory system is particularly sensitive to waterborne pollutants, since the olfactory epithelium is directly exposed to the aqueous environment. In this way, exposure to metals may lead to cell death processes and olfactory epithelium alterations (13, 14, 29, 30). Divalent metal ions are taken up specifically by olfactory sensory neurons of fish and then transported axonally toward the olfactory bulb in the central nervous system (13). In zebrafish exposed to low waterborne concentrations, U accumulated in the brain as quickly as 3 and 10 days. In small mammals, U may be transported to the brain through the blood-brain barrier (10, 11) or via the olfactory pathway, thus explaining the highest concentration found in the olfactory bulb (12). The OR cells are rich in endocytic vesicles indicating that they are actively engaged in the uptake of exogenous materials from the environment (34). Upon odorant binding, olfactory receptors translate this event into a relatively conserved pathway involving G-protein-coupled signaling cascade, membrane depolarization, and ensuring action potential (35).

The fish olfactory epithelium contains two major types of olfactory sensory neurons which project their axons to different regions of the olfactory bulb and probably mediate

different types of behaviors. Ciliated olfactory sensory neurons mediate avoidance behaviors and microvillous feeding behaviors (20).

In the current study, U exposures induced changes in gene expression encoded for members of the odorant receptor family (*or111-7*, *or102-5*, and *or107-1*). OR111-7 is expressed exclusively in ciliated olfactory sensory neurons mediating avoidance behaviors (20). *or111-7*, *or102-5* were depressed after 3 days of C1 exposure when U tissular concentrations were close to those of controls. These findings highlight the sensitivity and the ecological relevance of the transcriptional response of the odorant receptor genes in the case of U waterborne exposures. A previous study on zebrafish, showed that odorant receptor genes represent relevant transcriptional biomarkers of metal olfactory impairment (35).

Considering the modifications of some gene transcriptional responses at low doses of U and histological effects in the olfactory bulb, the present study highlights the environmental relevance of the odorant receptor gene responses, however, because of the dynamic nature of the genetic response, their use as transcriptional biomarkers would require further investigations.

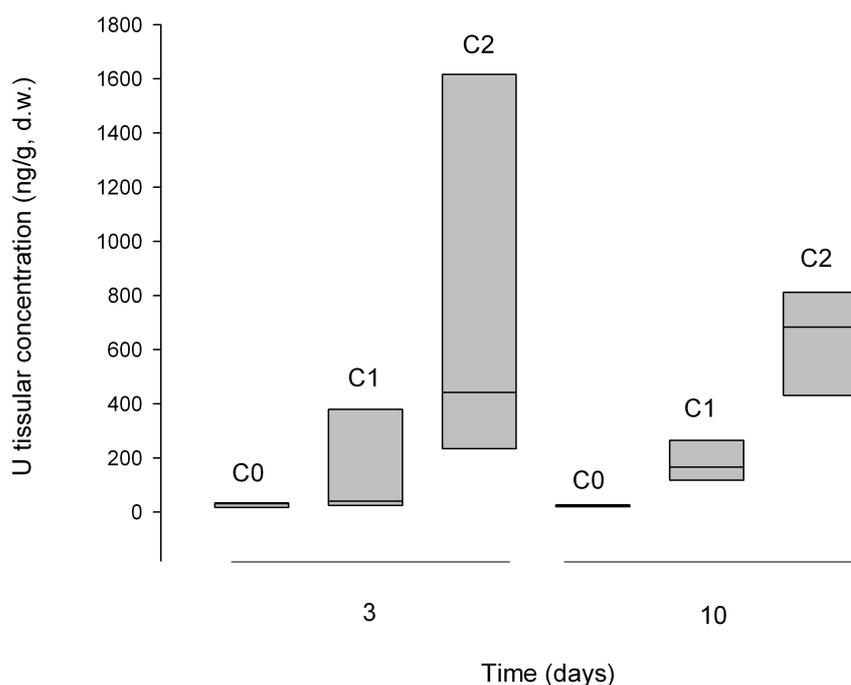
Acknowledgments

The authors wish to thank Tom Hinton and Starrlight Augustine for English corrections and Sylvie Pierrisnard, Frédéric Coppin, Sandrine Peirra and Sébastien Cambier for their scientific support. This study is a part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.

Supplemental material

Tables S1, S2, S3, S4, S5, Figure S1, Text S1 and S2 are presented in SI pages. This information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Figure S1: Distribution of U concentrations (ng g⁻¹, d. w.) determined in brain of the zebrafish after 3, and 10 days of three exposure treatments: C0: no added U, C1: 15 and C2: 100 µg U L⁻¹. Interquartile ranges are represented by the box. The boxes are delimited by the first (25% of samples) and the third (75% of samples) quartile. The line in each box is the median of the distribution (n=5).



Exposure	C0		C1		C2	
Time	3	10	3	10	3	10
Median	31	26	40	166	442	683

Table S1: Nominal and measured concentrations of uranium in water samples (mean \pm standard deviation, n=20)

U concentrations	C1	C2
nominal ($\mu\text{g U L}^{-1}$)	15	100
measured ($\mu\text{g U L}^{-1}$)	13 \pm 3	91 \pm 11

Table S2: Gene and primers used to evaluate microarray results

Gene symbol	Forward Primer	Reverse Primer
<i>or111-7</i>	AATAAGATTATGGGATTTCTCTACACAAC	TTGGAGGTGCTAAAAAGCAATAATGA
<i>atp1a1a.4</i>	TCCCTTTCAACTCCACCAAC	GAAGGCAGAAGTGGCAGAAA
<i>ncam3</i>	GCGATCAGGATGCAGAAGC	GGTTGTTACTCAAAGTCTTGAAACG
<i>thoc1</i>	GCCAAATGGACGAAATCGCA	TCAGGGCCGTGACCAG
<i>bactin</i>	AAGTGCGACGTGGACA	GTTTAGGTTGGTCGTTTCGTTTGA

Table S3: Results of the quantitative real-time PCR

Accession number	Gene name	Gene symbol	Real-time PCR	Microarray
NM_131582	odorant receptor, familyD, subfamily111, member7	<i>or111-7</i>	-3.3	-2.2
NM_131689	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 1a.4 polypeptide	<i>atp1a1a.4</i>	-0.3	-1.1
NM_131831	neural cell adhesion molecule 3	<i>ncam3</i>	-0.6	-1.3
NM_201324	THO complex1	<i>thoc1</i>	-1.1	-3.8

Table S4: A listing of those genes that responded similarly to two U treatments (see Venn Diagram, **Figure 1**).

Treatments	Genes
- Same exposure time, but different U concentrations C1-t3 and C2-t3 C1-t10 and C2-t10	<i>or102-5</i> ; <i>ziro3/irx3a</i> ; <i>ddx46</i> <i>prkci</i> ; <i>tp63</i> ; <i>phf5a</i>
- Same U concentration, but different exposure times C1-t3 and C1-t10	<i>ptpn11</i> ; <i>pvalb2</i> ; <i>ckma</i>

Table S4: Differential gene expression as compared to control in brain of zebrafish exposed to 15 (C1) and 100 (C2) $\mu\text{g U L}^{-1}$ during 3 and 10 days (1-fold cut-off). Gene expression level is median \log_2 (exposed/control).

gene	encoded protein function	exposure condition			
		C1		C2	
		T3	T10	T3	T10
CELL SURFACE RECEPTOR					
<i>kdr1</i>	VEGF receptor/kinase insert domain receptor like		3.38		
<i>opn1sw1</i>	opsin 1, short-wave-sensitive		1.24		
<i>or111-7</i>	odorant receptor, family D, subfamily 111, member 7	-2.22			
<i>or102-5</i>	odorant receptor, family C, subfamily 102, member 5	-1.84		-2.22	
<i>or107-1</i>	odorant receptor, family D, subfamily 107, member 1		1.94		
SIGNAL TRANSDUCTION					
<i>bre</i>	brain and reproductive organ-expressed (tnfrsf1a modulator)				-1.02
<i>fyna</i>	FYN oncogene related to SRC, FGR, YESa		1.54		
<i>gsk3a</i>	glycogen synthase kinase 3		1.08		
<i>nck2</i>	nck SH2/SH3 adaptor protein			-1.18	
<i>notch2</i>	notch homolog2		1.06		
<i>ppp6c</i>	protein phosphatase catalytic subunit			1.83	
<i>prkci</i>	protein kinase C, iota		-1.01		-3.29
<i>ptpn11</i>	protein tyrosine non-receptor type 11	-2.10	1.27		
REGULATION OF GENE EXPRESSION					
<i>caskb</i>	calcium calmodulin-dependant serine protein kinase		-1.07		
<i>esrrgb</i>	estrogen-related receptor gammab		-1.49		
<i>ff1a/nr5a2</i>	nuclear receptor subfamily5, groupA, member2				-1.21
<i>foxb1.1</i>	forkhead box B1.1			-1.03	
<i>gbx1</i>	gastrulation brain homeobox1		-1.03		
<i>hoxa9a</i>	homeo box A9a				-1.03
<i>hoxa11b</i>	homeo box A11b			-1.83	
<i>med29</i>	mediator complex subunit 29	1.10			
<i>mll3a</i>	mixed-lineage leukemia 3, histone methyltransferase				1.29
<i>tp63</i>	tumor protein p63		-1.54		-1.58
<i>sox17</i>	SRY-box containing gene 17	1.13			
<i>ziro3/irx3a</i>	iroquois homeobox protein 3a	1.27		-1.21	
TRANSCRIPTION PROCESS					
<i>ddx46</i>	RNA helicase/dead (asp-glu-ala-asp) box polypeptide 46	-2.71		-1.96	
<i>histh4</i>	histone h4				1.02
<i>phf5a</i>	phd-finger 5a		-1.36		-1.21
<i>syf2</i>	syf2rna splicing factor		1.42		
<i>thoc1</i>	tho complex 1	-3.83			
<i>thoc7</i>	tho complex 7 homolog	-1.73			
PROTEIN SYNTHESIS AND TRAFFICKING					
<i>rpl5b</i>	ribosomal protein 15	-3.05			
<i>srp72</i>	signal recognition particle 72	-2.93			
<i>stx6</i>	syntaxin 6				-2.01
<i>tars</i>	threonyl-trna synthetase	-2.30			
<i>vps18</i>	vacuolar protein sorting protein 18				-2.56
CYTOSQUELETAL ORGANIZATION					
<i>katnb1</i>	katanin p80 subunit B1	-2.03			
<i>mospd1</i>	motile sperm domain containing1		1.44		
<i>myhz2</i>	myosin, heavy polypeptide 2, fast muscle specific		1.49	2.39	
<i>mylz3</i>	myosin, light polypeptide 3, skeletal muscle	1.16			
<i>tnnc</i>	troponin C, fast skeletal	1.01			
<i>tubb2</i>	similar to tubulin beta-2 chain	-1.12			

		C1		C2	
		T3	T10	T3	T10
DEVELOPMENTAL PROCESS					
<i>mab211l</i>	mab-21-like1		1.17		
<i>ndr1</i>	nodal related 1				-1.48
<i>ntla</i>	no tail				-1.02
CELL METABOLISM					
general metabolism					
<i>asnsd1</i>	asparagine synthetase domain containing 1	-3.97			
<i>ndpkz1/nme2</i>	nucleoside diphospho kinase/non-metastatic cells protein expresse	1.46			
<i>pvalb2</i>	parvalbumin 2	1.24	1.53		
protein turnover					
<i>npepps</i>	aminopeptidase puromycin sensitive		1.05		
<i>psmb3</i>	proteasomebeta type 3	-1.72			
<i>psmb10</i>	proteasome subunit, beta type, 10		1.05		
<i>smfn</i>	RNA exonuclease 2 homolog	-2.22			
detoxification					
<i>glo1</i>	glyoxalase i		1.00		
<i>msra</i>	methionine sulfoxide reductase a	1.05			
energetic metabolism					
<i>ckma</i>	creatine kinase, muscle a	1.27	1.26		
<i>hbaa1</i>	hemoglobin alpha adult-1				-1.28
<i>idh3g</i>	isocitrate dehydrogenase 3 (nad+) gamma				1.47
<i>oxct1a</i>	3-oxoacidtransferase 1		1.34		
<i>pgm1</i>	phosphoglucomutase 1		-1.36		
lipid metabolism					
<i>agps</i>	alkylglycerone phosphate synthase				4.45
<i>zgc:101621</i>	sterol carrier protein 2		1.02		
ion transport					
<i>atp1a1a.4</i>	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 1a.4 polypeptide	-1.11			
<i>slc30a9</i>	solute carrier family 30 member9		1.53		
cell adhesion					
<i>adrm1b</i>	adhesion regulating molecule 1		1.01		
<i>cldnh</i>	claudin h				1.16
<i>cldn12</i>	claudin 12		2.30		2.74
<i>ncam3</i>	neural cell adhesion molecule 3		-1.29		

Text S1. Labeling and hybridization of cDNA

RNAs were reverse transcribed using the Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen), random hexamer primers (Invitrogen) and a dNTP labeling mix (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 15 mM dTTP, 10 mM aa-dUTP, Fermentas, Germany). Lucidea reference and test mRNA spikes (GE Healthcare, UK) were added to the RNA samples from control and exposed organisms to enable validation of array performance parameters and quantitative analysis. The unincorporated aminoallyl-dUTP (aa-dUTP) were removed before covalent coupling with N-hydroxysuccinimide-ester (NHS-ester) Cy using the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Crawley, UK). After purification, 40,000 pmol NHS-ester Cy3 et

Cy5 (Amersham Biosciences, Roosendaal, the Netherlands) were covalently coupled to the aa-dUTP of the first strand aa-cDNA. A second purification step with the Qiaquick PCR purification columns (Qiagen, Crawley, UK) ensured the removal of unincorporated Cy-dyes. The amount of dye incorporated into each cDNA sample was determined by spectrophotometry at 550 nm (Cy3) and 650 nm (Cy5). 50 pmoles of each dye (labeled cDNA), was aliquoted and dried for each sample.

Prior to hybridization, the arrays were prehybridized in a solution containing 5x SSC, 0.1% SDS and 1mg mL⁻¹ BSA for 1h at 42°C after which the array was washed in demineralized water and isopropanol. Slides were dried using N₂.

Text S2. Quantitative real-time RT-PCR

First strand cDNA was synthesized from 5 µg of total RNA using the AffinityScript™ Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. For each gene, specific primer pairs were determined using the LightCycler probe design software (version 1.0, Roche). The amplification of cDNA was monitored using the DNA intercalating dye SyberGreen I. Real-time PCR reactions were performed in a LightCycler (Roche) and following the manufacturer's instructions (one cycle at 95°C for 10 min and 50 amplification cycles at 95°C for 5 s, 60°C for 5 s, and 72°C for 20 s). Each 20 µL reaction contained 2 µL of reverse transcribed product template, 1 µL of master mix including the SyberGreen I fluorescent dye (Roche), and the gene specific primer pair at a final concentration of 300 nM for each primer. The reaction specificity was determined for each reaction from the dissociation curve of the PCR product. This dissociation curve was obtained by following the SyberGreen fluorescence level during a gradual heating of the PCR products from 60 to 95°C. Relative quantification of each gene expression level was normalized to the β-actin gene expression because it remains stable over time and with uranium treatments, as previously shown by other experiments (7).

References

- (1) WHO (World Health Organization) *Depleted uranium: Sources, exposure and health effects*; WHO/SDE/PHE/01.1; 2001.
- (2) Bywater, J. F.; Banaczowski, R.; Bailey, M. Sensitivity to uranium of six species of tropical freshwater fishes and four species of cladocerans from Northern Australia. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1991**, *10*, 1449-1458.
- (3) Labrot, F.; Narbonne, J. F.; Ville, P.; Saint Denis, M.; Ribera, D. Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **1999**, *36*, 167-78.
- (4) Poston, T. M. Observations on the bioaccumulation potential of thorium and uranium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **1982**, *28*, 682-690.
- (5) Bourrachot, S.; Simon, O.; Gilbin, R. The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* **2008**, *90*, 29-36.
- (6) Cooley, H. M.; Evans, R. E.; Klaverkamp, J. F. Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* **2000**, *48*, 495-515.
- (7) Lerebours, A.; Gonzalez, P.; Adam, C.; Camilleri, V.; Bourdineaud, J.-P.; Garnier-Laplace, J. Comparative Analysis Of Gene Expression in Brain, Liver, Skeletal Muscles, and Gills Of Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to Environmentally Relevant Waterborne Uranium Concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2009**, *28*, 1271-1278.
- (8) Barillet, S.; Adam, C.; Palluel, O.; Devaux, A. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2007**, *26*, 497-505.
- (9) Barillet, S.; Buet, A.; Adam, C.; Devaux, A. Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection Suppl.1* **2005**, *40*, S175-S180.
- (10) Barber, D. S.; Ehrich, M. F.; Jortner, B. S. The effect of stress on the temporal and regional distribution of uranium in rat brain after acute uranyl acetate exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* **2005**, *68*, 99-111.
- (11) Pellmar, T.; Fuciarelli, A.; Ejniak, J.; Hamilton, M.; Hogan, J.; Strocko, S.; Emond, C.; Mottaz, H.; Landauer, M. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicological Sciences* **1999**, *49*, 29-39.
- (12) Monleau, M.; Bussy, C.; Lestaevel, P.; Houpert, P.; Paquet, F.; Chazel, V. Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations. *Neuroscience Letters* **2005**, *390*, 31-36.
- (13) Blechinger, S. R.; Kusch, R. C.; Haugo, K.; Matz, C.; Chivers, D. P.; Krone, P. H. Brief embryonic cadmium exposure induces a stress response and cell death in the developing

olfactory system followed by long-term olfactory deficits in juvenile zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2007**, *224*, 72-80.

(14) Moran, D. T.; Rowley Iii, J. C.; Aiken, G. R.; Jafek, B. W. Ultrastructural neurobiology of the olfactory mucosa of the brown trout, *Salmo trutta*. *Microscopy Research and Technique* **1992**, *23*, 28-48.

(15) Sandahl, J. F.; Baldwin, D. H.; Jenkins, J. J.; Scholz, N. L. A sensory system at the interface between urban stormwater runoff and salmon survival. *Environmental Science and Technology* **2007**, *41*, 2998-3004.

(16) Antunes, S. C.; Pereira, R.; Gonçalves, F. Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **2007**, *53*, 207-213.

(17) Kurttio, P.; Harmoinen, A.; Saha, H.; Salonen, L.; Karpas, Z.; Komulainen, H.; Auvinen, A. Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *American Journal of Kidney Diseases* **2006**, *47*, 972-982.

(18) WHO (World Health Organization). Guidelines for drinking-water quality, third edition. In World Health Organization: Geneva, 2004; pp 197-209.

(19) Alioto, T. S.; Ngai, J. The odorant receptor repertoire of teleost fish. *BMC Genomics*. **2005**, *6*, 173.

(20) Sato, Y.; Miyasaka, N.; Yoshihara, Y. Hierarchical regulation of odorant receptor gene choice and subsequent axonal projection of olfactory sensory neurons in zebrafish. *Journal of Neuroscience* **2007**, *27*, 1606-1615.

(21) Hamdani, E. H.; Doving, K. B. The functional organization of the fish olfactory system. *Progress in Neurobiology* **2007**, *82*, 80-86.

(22) Andrew, A. S.; Warren, A. J.; Barchowsky, A.; Temple, K. A.; Klei, L.; Soucy, N. V.; O'Hara, K. A.; Hamilton, J. W. Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in human lung cells. *Environmental Health Perspectives* **2003**, *111*, 825-838.

(23) Poynton, H. C.; Loguinov, A. V.; Varshavsky, J. R.; Chan, S.; Perkins, E. J.; Vulpe, C. D. Gene expression profiling in *Daphnia magna* part I: Concentration-dependent profiles provide support for the no observed transcriptional effect level. *Environmental Science and Technology* **2008**, *42*, 6250-6256.

(24) Taulan, M.; Paquet, F.; Maubert, C.; Delissen, O.; Demaille, J.; Romey, M. C. Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environmental Health Perspectives* **2004**, *112*, 1628-1635.

(25) Taulan, M.; Paquet, F.; Argiles, A.; Demaille, J.; Romey, M. C. Comprehensive analysis of the renal transcriptional response to acute uranyl nitrate exposure. *BMC Genomics*. **2006**, *7*, 2.

(26) Klaper, R.; Carter, B. J.; Richter, C. A.; Drevnick, P. E.; Sandheinrich, M. B.; Tillitt, D. E. Use of a 15 k gene microarray to determine gene expression changes in response to acute and chronic methylmercury exposure in the fathead minnow *Pimephales promelas* Rafinesque. *J. Fish Biol.* **2008**, *72*, 2207-2280.

- (27) 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.; Dyer, C. A. Drinking water with uranium below the U.S. EPA water standard causes estrogen receptor-dependent responses in female mice. *Environ. Health Perspect.* **2007**, *115*, 1711-1716.
- (28) Lestaevel, P.; Houpert, P.; Bussy, C.; Dhieux, B.; Gourmelon, P.; Paquet, F. The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* **2005**, *212*, 219-226.
- (29) Hansen, J. A.; Rose, J. D.; Jenkins, R. A.; Gerow, K. G.; Bergman, H. L. Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to copper: Neurophysiological and histological effects on the olfactory system. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1999**, *18*, 1979-1991.
- (30) Matz, C. J.; Krone, P. H. Cell death, stress-responsive transgene activation, and deficits in the olfactory system of larval zebrafish following cadmium exposure. *Environmental Science and Technology* **2007**, *41*, 5143-5148.
- (31) Byrd, C. A.; Brunjes, P. C. Organization of the olfactory system in the adult zebrafish: Histological, immunohistochemical, and quantitative analysis. *Journal of Comparative Neurology* **1995**, *358*, 247-259.
- (32) Van Der Ven, K.; Keil, D.; Moens, L. N.; Van Leemput, K.; Van Remortel, P.; De Coen, W. M. Neuropharmaceuticals in the environment: Mianserin-induced neuroendocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) using cDNA microarrays. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2006**, *25*, 2645-2652.
- (33) Korsching, S. I.; Argo, S.; Campenhausen, H.; Friedrich, R. W.; Rummrich, A.; Weth, F. Olfaction in zebrafish: What does a tiny teleost tell us? *Seminars in Cell and Developmental Biology* **1997**, *8*, 181-187.
- (34) Tjalve, H.; Henriksson, J. Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *NeuroToxicology* **1999**, *20*, 181-196.
- (35) Tilton, F.; Tilton, S. C.; Bammler, T. K.; Beyer, R.; Farin, F.; Stapleton, P. L.; Gallagher, E. P. Transcriptional biomarkers and mechanisms of copper-induced olfactory injury in zebrafish. *Environmental Science and Technology* **2008**, *42*, 9404-9411.

Principales avancées et conclusion

Dans cette étude nous avons cherché à acquérir une meilleure connaissance des effets précoces d'une exposition à l'uranium dans le cerveau et à évaluer d'éventuelles atteintes sur l'ultrastructure du bulbe olfactif. Plusieurs avancées découlent de ces travaux de recherche :

Principaux processus biologiques affectés.

Les expressions différentielles de gènes ont été classées dans 8 processus biologiques dont le métabolisme cellulaire général, les récepteurs de surface cellulaire et l'organisation du cytosquelette. Des gènes impliqués dans l'équilibre ionique ainsi que l'homéostasie du calcium (parvalbumin, calcium/calmodulin-dependant protein kinase) sont également représentés. Une étude récente met également en évidence une perturbation de la réponse transcriptionnelle de gènes impliqués dans l'homéostasie ionique des cellules neuronales du bulbe olfactif des poissons zèbres exposés par voie directe au Cu. Les auteurs suggèrent que ces réponses comptent parmi les marqueurs de toxicité du Cu sur le système olfactif (Tilton *et al.*, 2008). En raison de la faible signification biologique de la réponse transcriptionnelle nous n'avons pas parlé de toxicité de l'U dans notre étude mais d'indicateurs de perturbations. Par rapport aux travaux précédents, ces résultats montrent que d'autres processus sont affectés dans le cerveau des poissons à 3 et 10 jours d'exposition aux deux concentrations en uranium.

Sensibilité de la réponse pour les faibles concentrations.

56 gènes ont été répertoriés dans 8 processus biologiques après 3 et 10 jours d'exposition aux deux concentrations en uranium. La réponse d'expression génique la plus importante apparaît pour l'exposition à la faible concentration C1 et en particulier à 10 jours. Pourtant, les concentrations tissulaires mesurées dans le cerveau des individus exposés à la condition C2 sont supérieures. Cette étude présente une dynamique de la nature de la réponse

transcriptionnelle à de faibles concentrations. L'importance de la réponse n'est pas dose-dépendante. Des profils de gènes différents sont attendus pour chaque condition d'exposition. Des expériences transcriptomiques réalisées chez la daphnie *Daphnia magna* exposée à plusieurs concentrations en métaux mettent en valeur une réponse moins spécifique (vis-à-vis du mécanisme de toxicité du métal) pour les concentrations d'exposition plus élevées (Poynton *et al.*, 2008). Ces travaux nous laissent penser que nos résultats obtenus pour la faible concentration sont d'un intérêt particulier du point de vue de la spécificité de la réponse.

Pertinence de la réponse transcriptionnelle de gènes codant pour des récepteurs de l'olfaction.

Une modulation de la réponse transcriptionnelle de gènes codant pour les récepteurs de l'olfaction *or111-7*, *or102-5*, et *or107-1* est observée. *Or111-7* et *or102-5* sont réprimés dès 3 jours d'exposition à la plus faible concentration et la bioaccumulation de l'uranium dans le cerveau n'est pas significativement plus élevée que le bruit de fond mesuré chez les témoins. L'expression de ces gènes est donc sensible à une exposition à l'uranium. Ces gènes codent pour des récepteurs de l'olfaction. Le poisson zèbre possède environ 100 récepteurs olfactifs (Barth *et al.*, 1996). La puce utilisée comprenait 14 récepteurs appartenant à 3 familles C, D et F. *Or111-7* et *or107-1* appartiennent à la famille D, *or102-5* appartient à la famille C. La réponse de 3 gènes sur 14 appartenant à deux familles est à prendre en considération. Les récepteurs de l'olfaction ont un rôle fondamental dans la réception et la transmission du signal *via* les neurones de l'olfaction jusqu'aux neurones secondaires dans le bulbe olfactif. Une altération de ces récepteurs pourrait menacer la survie des organismes car le système olfactif régit un grand nombre de comportements décrits précédemment dans l'introduction. En outre, le récepteur OR111-7 est exprimé dans les neurones ciliés intervenant dans l'évitement de la prédation (Sato *et al.*, 2007). L'utilisation de ces gènes en

tant que biomarqueurs de transcriptions sensibles serait risquée dans le sens où la réponse retourne à l'état basal pour des concentrations supérieures. Toutefois, il serait intéressant de prendre en compte un plus grand nombre de récepteurs sur la centaine existant car ces réponses demeurent pertinentes d'un point de vue écologique dans le cadre d'exposition métallique à de faibles concentrations dans l'eau.

Des études récentes ont montré une diminution du succès reproducteur chez les poissons zèbres exposés à l'uranium par voie directe (Bourrachot, 2009). De plus, plusieurs réponses endocriniennes impliquées dans la reproduction sont régulées et initiées par les neurones de l'olfaction chez les poissons (Tierney *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent un lien éventuel entre une perturbation de l'olfaction et les problèmes de reproduction des poissons zèbres exposés par voie directe à l'uranium.

Altérations de l'ultrastructure du bulbe olfactif.

Au niveau du lobe olfactif, les examens histologiques ont montré une dilatation de la neuropile et une altération des structures axonales. Les réponses moléculaires et les lésions histologiques observées suggèrent que le système olfactif serait sensible à de faibles concentrations d'uranium.

**Chapitre VI : Evaluation des effets de l'uranium sur le
métabolisme énergétique mitochondrial dans le cerveau et les
muscles du poisson zèbre**

Assessment of mitochondrial energy metabolism impairments in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low waterborne uranium concentrations. En préparation.

Introduction

La respiration mitochondriale est une des principales sources endogènes de génération des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule. Elle intervient également dans le déclenchement de l'apoptose. La respiration mitochondriale fournit de l'ATP, principale source d'énergie pour la cellule. Le dysfonctionnement mitochondrial, le stress oxydant et l'apoptose ont été reliées aux pathophysiologies de maladies neurodégénératives.

Les résultats précédemment obtenus montrent une induction importante de gènes codant pour des enzymes de la chaîne respiratoire (*coxI* et *atp5f1*) et régulant la balance oxydative (*cat*) dans les muscles dès 3 jours d'exposition aux deux concentrations. Dans le cerveau, des perturbations de gènes impliqués dans le système cholinergique (*vchat*), la synthèse de glutamate (*gls1*), la balance oxydative (*cat*) la réception olfactive (i.e. *or111-7*, *or102-5*) l'adhésion cellulaire (*ncam3*) ou encore le transport ionique (i.e. *atp1a1a.4*) sont observées chez les poissons exposés à la faible concentration (20 µgU/L).

L'objectif de cette 3^{ème} expérience est d'évaluer les effets de l'uranium sur la chaîne respiratoire mitochondriale et sur l'ultrastructure cellulaire. Plusieurs axes de recherche ont été développés :

Fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les effets de l'uranium sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale sont peu connus. Brady *et al.*, (1989) ont étudié l'action de l'uranium *in vitro* sur l'activité mitochondriale de tubules proximaux de lapins. Les auteurs ont remarqué une inhibition de la consommation en oxygène et une déficience du couplage énergétique à partir d'une exposition à 1 mM d'uranium. Cette concentration d'exposition est extrêmement élevée.

Notre travail a consisté à analyser dans le cerveau et les muscles des poissons exposés aux concentrations C1 et C2 pendant 10 et 28 jours le fonctionnement de la chaîne respiratoire en inhibant ou activant les complexes par addition d'effecteurs de ce mécanisme. Cette analyse par oxygraphie a également permis d'estimer l'activité maximale de la cytochrome *c* oxydase.

Analyse du contenu protéique de certains complexes.

Les modifications du contenu protéique de la chaîne respiratoire ne sont pas documentées en ce qui concerne les effets de l'uranium dans la littérature. Elles peuvent contribuer à une meilleure compréhension des altérations fonctionnelles observées.

Les gènes *coxI* et *atp5f1* étaient induits dans les muscles de manière précoce. Ces résultats ont suscité notre attention dans l'analyse de la synthèse protéique des sous-unités I et IV de la cytochrome *c* oxydase et d'une sous-unité de l'ATPsynthase.

Atteintes éventuelles de l'ultrastructure cellulaire.

L'examen de l'ultrastructure cellulaire au microscope électronique à transmission informe sur l'importance des perturbations observées à la suite d'une contamination. Elle complète l'analyse fonctionnelle et protéique réalisée dans le cerveau et les muscles et permet d'appréhender les effets à un niveau d'organisation biologique supérieur.

Assessment of mitochondrial energy metabolism impairments in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium

*Adélaïde Lerebours¹, Christelle Adam-Guillermin¹, Daniel Brèthes², Sandrine Frelon¹,
Magali Floriani¹, Virginie Camilleri¹, Jacqueline Garnier-Laplace¹ and Jean-Paul
Bourdineaud³*

¹Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Bât 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-Lez-Durance Cedex, France ;

²CNRS, UMR 5095, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, Université Victor Segalen-Bordeaux 2, France

³CNRS, UMR 5805, Equipe de Géochimie et Ecotoxicologie des Métaux dans les systèmes Aquatiques - Université Bordeaux 1, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France ;

Abstract

Uranium (U) is widely distributed throughout the environment but anthropogenic contributions originating from the nuclear fuel cycle or military activities may considerably enhance U levels in terrestrial and aquatic ecosystems. Then, it would be valuable to get clues about the possible effects of this metal on the aquatic fauna at concentrations commensurate with the provisional drinking water guideline value of the World Health Organization ($15 \mu\text{g U.L}^{-1}$). In the present work, we examined the mitochondrial function in brain and skeletal muscles of the zebrafish *Danio rerio* exposed to $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ and $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ of waterborne U for 10 and 28 days. At the lowest exposure concentration, the basal mitochondrial respiration rate was increased in brain at day 10 and in muscles at day 28. This is due to an increase of the inner membrane permeability, resulting in a decrease of the respiratory control ratio. In addition, the levels of cytochrome *c* oxidase subunit IV (COX-IV) increased in brain at day 10 and those of COX-I increased in muscles at day 28. Histological analyses performed by transmission electron microscopy revealed a dilatation of the ultrastructure of the neuropil in the olfactory bulb after 10 days of exposure to the highest concentration and myofibrils were altered and endomysium inflated in muscular cells, these effects being the highest at the lowest concentration after 28 days of exposure.

Introduction

Uranium (U), a naturally occurring element and a member of the actinide series, is widely distributed throughout the environment. The natural concentrations found in freshwater systems are highly variable and range from 0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ to over 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, depending on the geological background (1). Various anthropogenic contributions originating from the nuclear fuel cycle, farming, research laboratories and military activities may considerably enhance U levels in terrestrial and aquatic ecosystems (1).

The effects of U on freshwater organisms have not been extensively studied. Several data are related to bioaccumulation and acute-exposure toxicity tests (2-4). In the lake whitefish *Coregonus clupeaformis* exposed to dietary U, an increase of lipid peroxidation and histopathological lesions were observed in the liver and kidneys (5). At the individual level, a delay in hatching and a decrease of hatching rate were observed for eggs of zebrafish exposed to 20 and 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ of depleted uranium (6). In zebrafish liver, U affected the expression of genes involved in the neutralization of the oxidative stress such as *gpx1a*, *cat*, *sod1*, *sod2* (7), and modified the activities of the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase (8), after waterborne exposure to 20 and 100 $\mu\text{g U}\cdot\text{L}^{-1}$. In zebrafish brain, U triggered an increase of acetylcholinesterase activity (8) and affected the expression of genes involved in detoxification, oxidative stress, DNA repair, cholinergic system and glutamate synthesis after 3 and 10 days of waterborne exposure (7). A recent study performed in the same conditions demonstrated that exposure to U lead to histological damage in the olfactory bulb and variations in transcriptional response of genes encoding for odorant receptors in zebrafish brain (9). In zebrafish erythrocytes, genotoxicity assays revealed a significant effect of waterborne U on DNA integrity for the same concentration range (10).

A link between U exposure and mitochondrial metabolism has been established at the transcriptional level both in mammals and in fish.

A long time ago, in 1916, some researchers examined the effects of uranium in the kidneys of the guinea pig and observed histological injuries and some abnormalities related to mitochondria (11). In mice chronically exposed to uranium in drinking water, a serial analysis of gene expression (SAGE) performed in kidney revealed an induction of ten genes encoding for enzymes of the mitochondrial respiratory chain (*atp5g1*, *atp5g2*, *atp5j2*, *atp5a1*, *cox4a*, *cox8a*, *cox17*, *ndufa1*, *ndufa2*, *ndufa7*) (12). The number of differentially expressed genes involved in mitochondrial metabolism was more important than those involved in other biological process. Another SAGE performed in kidney of mice exposed to acute uranium intraperitoneally, revealed that two genes encoding for enzymes of the mitochondrial respiratory chain were induced (*atp5k*, *ndufa1*) and two repressed (*atp5b*, *ndufb9*) (13). These findings show that different gene expression profiles are expected for each exposure concentration and that a great number of genes involved in mitochondrial metabolism are modulated for the lowest exposure.

In skeletal muscles of zebrafish, the expression of the *cox1* and *atp5f1* genes, involved in mitochondrial metabolism, was up-regulated after 3 days of exposure to 20 or 100 $\mu\text{g U.L}^{-1}$ (7).

Since U impinges on the transcriptional regulation of many respiratory genes, the aim of the present work was to evaluate the effects of U on the mitochondrial function in brain and skeletal muscles and on these tissues ultrastructure. Analyses were performed on zebrafish exposed for 10 (T10) and 28 days (T28) to environmentally relevant U concentrations: C0: control, C1: 30 and C2: 100 $\mu\text{g U.L}^{-1}$. Those concentrations are found close to mining sites (14) or in drill wells (15). The lowest one is close to the provisional drinking water guideline value of the World Health Organization (15 $\mu\text{g U.L}^{-1}$) (16). Besides the quantification of U accumulated within tissues, the approach used was based on the study of the mitochondrial respiration, the analysis of the protein content of the complexes of the electron transport chain

(ETC), the study of the expression of genes encoding sub-units of the ETC and a transmission electron microscopy analysis.

Experimental procedure

Exposure Conditions

Adult zebrafish were obtained from a French supplier (Exomarc) and acclimated to laboratory conditions for three weeks before the experiment. Male fish (body weight: 0.70 ± 0.08 g wet weight (w. w.); standard length: 3.33 ± 0.14 cm) were randomly placed in three continuous flow-through tanks. Female fish were excluded to avoid any interference due to reproduction processes. The system was alimented by a synthetic moderately soft water (Ca^{2+} : 8.7 mg.L^{-1} , Mg^{2+} : 1.4 mg.L^{-1} , Na^{+} : 5.1 mg.L^{-1} , K^{+} : 1 mg.L^{-1} , Cl^{-} : 13.4 mg.L^{-1} , SO_4^{2-} : 12.5 mg.L^{-1} , NO_3^{-} : 9.2 mg.L^{-1} , CO_3^{2-} : 0.45 mg.L^{-1}) whose composition was chosen to optimize U bioavailability. Major anion concentrations were analysed in water samples by ionic chromatography (Dionex DX-120, Sunnyvale, CA, USA), major cation and uranium concentrations were measured by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES, Optima 4300DV, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA, quantification limit of $10 \mu\text{g.L}^{-1}$) after acidification at a final concentration of nitric acid of 0.29 M (2% of 14.4 M HNO_3 , v/v). Throughout the experiment, water temperature was maintained at $24.5 \pm 0.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and the pH was maintained at 6.4 by pH regulators (Consort R301, Illkirch, Belgium). Tank bottoms were cleaned every day to eliminate fish feces and food remains. Fish were fed once a day with a quantity of fish pellets (GranoMix, JBL) corresponding to 2% of the fish body weight (wet weight).

In exposure tanks, fish were contaminated with waterborne U at nominal concentration of $30 \mu\text{g U.L}^{-1}$ (C1) and $100 \mu\text{g U.L}^{-1}$ (C2) by a continuous flow-through system. The decrease of U concentration in water was manually compensated. The stock solution of U used was prepared

from uranyl nitrate $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, France) and acidified with nitric acid (final concentration of 0.29 M, 2 % of 14.4 M HNO_3 , v/v). This solution was maintained at 4°C during the experiment.

Twenty two fish per condition were removed after 10 and twenty seven after 28 days of exposure and were killed within seconds by immersion in melting ice ($T = 0^\circ\text{C}$). This is in agreement with the ethical guidelines displayed and used by the NIH intramural research program (<http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Zebrafish.pdf>).

For each condition, 9 fish were dedicated to respiration measurements, 5 fish for protein analyses, 5 fish for U accumulation analyses, 5 fish for gene expression analyses at day 28 and 3 fish for muscular and brain ultrastructure examinations.

U quantification

For each condition five fish dedicated to U measurements were collected and the brain and skeletal muscles were dissected and dried at 50°C during 48 hours and weighed (dry weight, d. w.) using a microbalance (Sartorius SE2, Germany). Samples were digested by nitric acid (1 ml of 14.4 M HNO_3) in polypropylene tubes at 100°C during 3 hours. After acidic dilution of the digests, U concentrations were determined by an inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICP-MS, PQ EXCELL, ThermoElectron with S-Option, the limit of quantification is 2-2.5 ng U.L^{-1}) according to French Standards.

Quantitative Real-Time PCR

Total RNAs were extracted from 40 mg of fresh tissue using the Absolutely RNA RT-PCR Miniprep kit (Stratagene, Amsterdam, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. The quality of RNAs produced was evaluated by electrophoresis on a 1% agarose-formaldehyde gel. Samples were analyzed in five replicates for both exposure conditions and each organ at day 28.

First strand cDNA was synthesized from 5 µg of total RNA using the AffinityScript™ Multiple Temperature cDNA Synthesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The amplification of cDNA was monitored using the DNA intercalating dye SyberGreen I. Real-time PCR reactions were performed in a LightCycler (Roche) following the manufacturer's instructions. Primer pairs used are listed in **Table S1**. Relative quantification of each gene expression level was normalized according to the actin gene expression.

Mitochondrial respiration

Fish were dissected on ice for skeletal muscles and brain harvesting.

Muscle fibers preparation

20 mg of fibres were incubated for 5 min in 5 mL of buffer A (0.1 M sodium 2-(N-morpholino)ethanesulfonate, 20 mM imidazole, 10 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 20 mM taurine, 0.5 mM dithiothreitol, pH 7.1) to preserve fibres, 1 min in 5 mL of permeabilisation buffer (buffer A containing 5 mM ATP, 20 mM phosphocreatine, and 50 µg/mL saponine) and washed in 5 mL of buffer B (buffer A containing 3 mM KH₂PO₄ and 5 mg/ml BSA) to remove saponine according to the method already described (17).

Brain preparation

Each brain was weighed and introduced in a 1.5 mL tube containing 70µL of the brain respiratory buffer (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, 5 mM KCl, 5mM H₃PO₄, 15 mM Tris pH 7.4) weighed and ground with a plastic potter applying 12 strokes.

Measurements

Mitochondrial oxygen consumption was monitored polarographically at 28°C using a Clark oxygen electrode in a 1 mL thermostatically controlled chamber (Heito oxymeter). Two identical systems were available and analysis on brains and muscles coming from the same animal were performed in parallel. One oxygraph cuvette was containing one bundle of

permeabilized muscle in 1 mL of the muscle respiratory buffer (75 mM mannitol, 25 mM sucrose, 0.5 mM EDTA, 100 mM KCl, 10mM H₃PO₄, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) (18). The second cuvette contained the brain homogenate in the brain respiratory buffer described above.

Pyruvate 10 mM and malate 10 mM were used as respiratory substrates. State 3 of respiration was obtained by addition of 2 mM of ADP and state 4 was reached by using a combination of atractylate (0.1 mM) and oligomycin (12.5 µg/mL). After each respiration measurement, the bundle of fibres was removed from the cuvette, dried and weighed. The respiratory control ratio is defined as the ratio of state 3 to state 4 respiratory rates.

Cytochrome c oxidase activity

Cytochrome *c* oxidase activity (complex IV) was monitored by specifically inhibiting the third complex of the respiratory chain with antimycin (3 µg/mL) and by using ascorbate (12.5 mM) and tetramethylphenylenediamine (TMPD) (1.5 mM) as an electron donor system directly delivering electrons to cytochrome *c*. The respiratory rate was monitored by the polarographic method described above.

Protein content analysis

Protein extraction and migration

5 fish per condition were used for protein analyses. For each fish, the brain and muscular fibers were introduced into 1.5 mL tubes containing 120 and 150 µL of tissue protein extraction reagent (T-PER, Pierce) with a protease inhibitor cocktail (Roche). Brains were disrupted by sonication (2 seconds at 4°C with a 2 mm diameter tip). Muscular fibers were mechanically crushed and minced with an Ultraturax homogenizer. After 5 min incubation at 4°C, insoluble material was removed by centrifugation (10,000 g, 5 min, 4°C).

The protein concentration was determined using the « BCA Protein Assay Reagent » (Pierce) and for each sample 20 µg of proteins were loaded and separated on a 15% SDS-PAGE gel.

Western blotting

Proteins were electro-transferred onto nitrocellulose membranes using the « iBlot™ Dry Blotting System » (Invitrogen). Membranes were incubated with mouse monoclonal antibodies (MitoSciences) directed against the complex I subunit NDUFS3 (MS110), the complex II Fe/S protein subunit (MS203), the complex IV COX-I (MS404) and COX-IV (MS407) subunits, the ATP synthase alpha subunit (MS502) and porin (MSA03). Each antibody was used at the indicated dilution. No antibody is available for zebrafish complex III subunits. Secondary antibodies were peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibodies (Jackson Immuno Research laboratories, Inc.). Western blots were revealed following the Enhanced Chemio Luminescence method (Amersham Biosciences) on CCD camera (Genegnome, Syngene, Bio-Imaging). Quantifications were done using ImageJ software.

Preparation of tissues for Transmission Electron Microscopy analysis

Three fish were removed from each tank after 10 and 28 days of exposure. After dissection, a thin section of muscle fillet and the olfactory bulb were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for two days at 4°C. The samples were washed for 5 min three times with the same buffer. Samples were postosmicated with 1% osmium tetroxyde in cacodylate buffer for 1 h, dehydrated in ethanol, and embedded in Epon 812. Sections for optical and electron microscope of 500 nm and 80 nm respectively, were obtained by an ultramicrotome (UCT, Leica). For ultrastructure's analysis, ultrathin sections were mounted on copper grids and examined in a Tecnai G2 Biotwin (FEI) electron microscope using an accelerating voltage of 100 KeV. At least 500 photographs were taken, analyzed and compared for skeletal muscles and at least 200 for brains. Chemical analyses were enhanced

on ultra-thin 140-nm sections with an Energy Dispersive X-ray microanalyser equipped with a Super Ultra Thin Window model SAPHIR (EDX) with a counting time of 2 min. The electron probe was focused on several points. These punctual analyses are highly sensitive but did not allow the visualization of U microlocalization.

Statistical analyses

The differences between oxygen consumption, U tissue accumulation, gene expression level and protein content in exposed and control fish were assed using the Kruskal-Wallis statistical test (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Results

U accumulation in zebrafish brain and muscles

Nominal and measured waterborne U concentrations were similar. It was measured $32 \pm 10 \mu\text{g U.L}^{-1}$ ($n = 28$) and $105 \pm 16 \mu\text{g U.L}^{-1}$ ($n = 28$) for nominal U concentrations corresponding to 30 and 100 $\mu\text{g U.L}^{-1}$, respectively. U concentrations were determined in the brain and muscles at 10 and 28 days of exposure for the three exposure conditions (**Table 1**).

After 10 days brain accumulated 2.8 $\mu\text{g U/g}$ at C2 exposure and 0.16 $\mu\text{g U/g}$ at C1 exposure. The accumulated U concentration even exhibited a 3.5 fold decrease between 10 and 28 days at C2 exposure to reach 0.8 $\mu\text{g U/g}$ only. In skeletal muscles, U concentrations featured a saturation-like pattern with 1.5 $\mu\text{g U/g}$ after both 10 and 28 days at C2 exposure. Brain and muscles are weak U accumulators. Indeed, the bioaccumulation factors, the ratio of the accumulated U concentration over the waterborne U concentration, were low reaching a value of 7 and 4 after 10 days at C2 exposure in the brain and the muscles, respectively.

Table 1: U tissular concentrations (mean \pm standard deviation, $n = 5$, ng/g, dry wt) determined in brain and skeletal muscles of fish exposed at C0 (no added U), C1 (30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of U) and C2 (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of U) concentrations during 10 and 28 days.

	10 days			28 days		
	C0	C1	C2	C0	C1	C2
Brain	32 \pm 28	156 \pm 149	2793 \pm 1401	20 \pm 10	393 \pm 407	816 \pm 597
Skeletal muscles	12 \pm 6.3	142 \pm 99.4	1540 \pm 192	16 \pm 10	373 \pm 142	1546 \pm 1022

Mitochondrial respiration disturbances after U exposure

After 10 and 28 days of U exposure, mitochondrial respiration was measured directly on saponin-skinned muscle fibers and on brain homogenate, using pyruvate-malate as substrates. The state 3 respiration (phosphorylation) obtained after ADP addition was not affected in either condition by U exposure ($p > 0.05$) (**Fig. 1a**).

The state 4 respiration (no ATP synthesis, basal respiration) was significantly increased in skeletal muscles after 28 days of exposure to C1 condition ($p < 0.05$) (**Fig. 1b**). In brain homogenate, an increase trend is observed at 10 days for fish exposed to the lowest concentration. These higher state 4 respirations displayed by the contaminated mitochondria indicate an increase in protons leakage through the inner mitochondrial membrane from the periplasmic space towards the matrix.

The respiratory control ratio (RCR), the ratio of the respiratory rate at state 3 over that at state 4, decreased significantly from 3.5 ± 0.4 for controls down to 2.0 ± 0.1 for contaminated muscles after 28 days of exposure at the C1 condition ($p < 0.01$) (**Fig. 1c**). In brains of fish exposed to C1 condition the RCR decreased significantly from 3.7 ± 0.4 for controls down to 2.6 ± 0.2 for contaminated individuals after 10 days of exposure ($p < 0.05$).

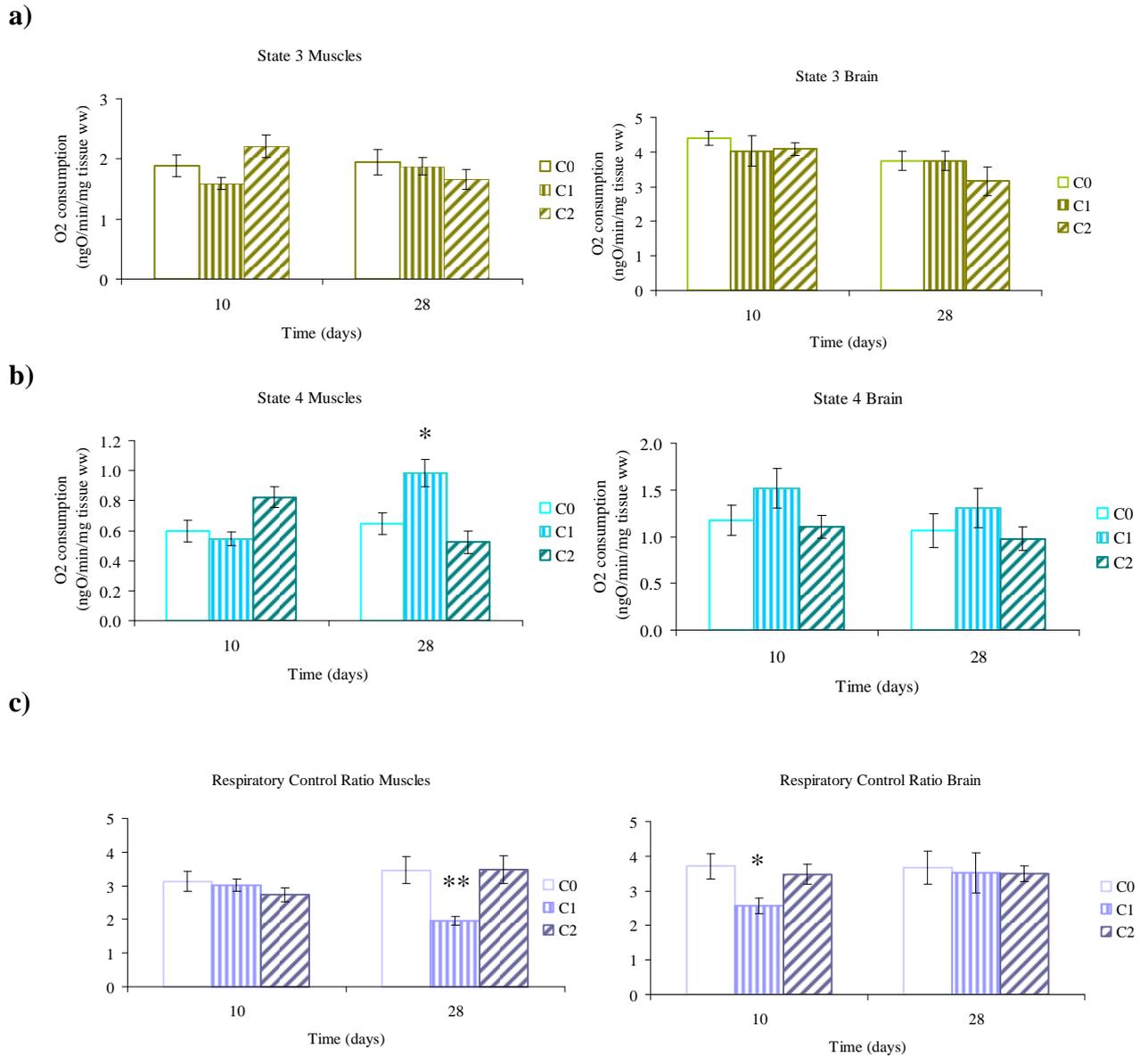


Figure 1: Oxygen consumption rates (ngO/min/mg of tissue wet weight, mean \pm standard error, $n = 9$) measured on permeabilized muscle fibers and brain homogenate after 10 and 28 days for controls and fish exposed to C1 ($30 \mu\text{g.L}^{-1}$ of U) and C2 ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$ of U) conditions. The state 3 is the respiration under ADP stimulation (Figure 1.a), the state 4 is the basal respiration (Figure 1.b). The respiratory control ratio is the ratio of oxygen consumption rates as observed at state 3 over that at state 4 (Figure 1.c). (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Activity of COX did not significantly evolve in brain and muscles of fish exposed to both concentrations after 10 and 28 days ($p > 0.05$) (**Fig. 2**).

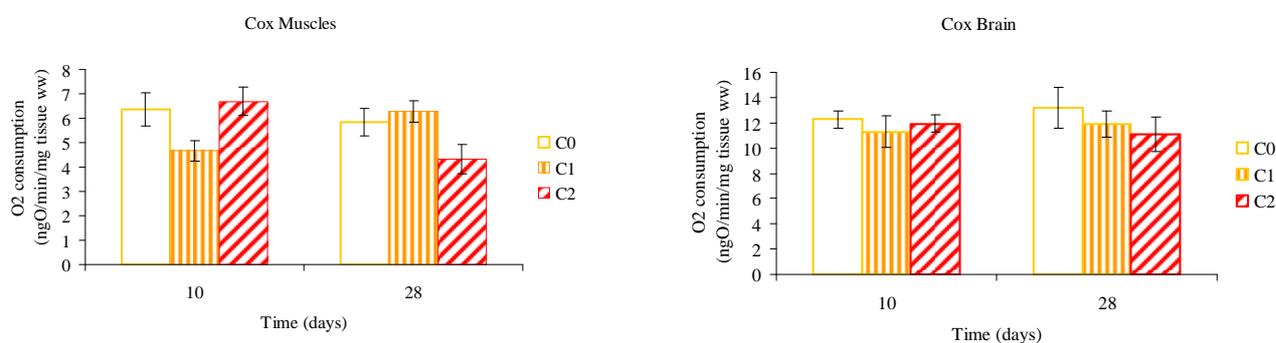


Figure 2: Cytochrome *c* oxydase activity in permeabilized muscle fibers and brain homogenate was measured as described in material and method section (ngO/min/mg of tissue wet weight, mean \pm standard error, $n = 9$). Electrons were directly supplied to complex IV by addition of ascorbate and TMPD in the presence of antimycin the complex III inhibitor.

Effects of U on mitochondrial respiratory chain protein content

Western blotting analysis was performed on protein fractions of brain and skeletal muscles using monoclonal antibodies directed against subunits of complex I, II, IV and V. Porin was used as a standard, monitoring the quantity of mitochondrial proteins loaded onto each lane. The analyzed subunits of complexes I, II and V displayed the same quantities in control and contaminated protein fractions of brain and skeletal muscles for both conditions of time and exposure. Cytochrome *c* oxydase subunit IV (complex IV) was more abundant in protein fractions of brain after 10 days of exposure with a mean 2.6-fold increase for fish exposed to the lowest concentration ($p < 0.05$) and a mean 2-fold increase for fish exposed to C2 condition ($p < 0.01$) (**Table 2**). The subunit I was more abundant in protein fractions of skeletal muscles after 28 of exposure in fish exposed to the highest concentration with a mean 2.4-fold increase ($p < 0.05$) (**Table 2**).

Table 2: Levels of mitochondrial proteins in brain and skeletal muscles of fish after exposure to U. Results are given relative to the control fish protein levels. These were normalised to the porin levels and set to the value of 100 (mean \pm standard deviation, $n = 3$). (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Proteins	Brain			10 days			28 days		
	C0	C1	C2	C0	C1	C2	C0	C1	C2
NADH dehydrogenase (CI) 30 kDa subunit	100 \pm 43	117 \pm 30	136 \pm 44	100 \pm 38	130 \pm 21	122 \pm 31			
Succinate dehydrogenase (CII) Fe/S protein subunit	100 \pm 32	100 \pm 11	106 \pm 27	100 \pm 15	213 \pm 48	150 \pm 41			
Cytochrome c oxydase (CIV) subunit I	100 \pm 11	81 \pm 18	105 \pm 15	100 \pm 18	113 \pm 17	153 \pm 38			
Cytochrome c oxydase (CIV) subunit IV	100 \pm 22	258 \pm 137*	200 \pm 67**	100 \pm 31	98 \pm 50	66 \pm 45			
ATPsynthase, α subunit (CV)	100 \pm 20	83 \pm 19	81 \pm 4	100 \pm 19	97 \pm 28	128 \pm 23			

Proteins	Muscles			10 days			28 days		
	C0	C1	C2	C0	C1	C2	C0	C1	C2
NADH dehydrogenase (CI) 30 kDa subunit	100 \pm 1	81 \pm 22	104 \pm 82	100 \pm 27	137 \pm 51	149 \pm 33			
Succinate dehydrogenase (CII) Fe/S protein subunit	100 \pm 47	165 \pm 71	150 \pm 50	100 \pm 28	142 \pm 46	169 \pm 29			
Cytochrome c oxydase (CIV) subunit I	100 \pm 45	148 \pm 87	115 \pm 52	100 \pm 49	180 \pm 33	240 \pm 60*			
Cytochrome c oxydase (CIV) subunit IV	100 \pm 66	184 \pm 48	135 \pm 76	100 \pm 36	97 \pm 66	114 \pm 63			
ATPsynthase, α subunit (CV)	100 \pm 39	92 \pm 26	84 \pm 37	100 \pm 7	90 \pm 29	85 \pm 20			

Electron transport chain complex gene expression analysis

The electron transport chain gene expression study confirmed that of protein contents (**Table S2**). The COXI subunit gene expression exhibited a 1.5-fold increase after 28 days of U exposure in the muscles, corresponding to the 140 % increase in the COXI protein content (**Table S2**). Nevertheless, due to the high measure variability, this mean differential expression was not statistically significant. For the 6 other subunit-encoding genes tested, no significant differential expression could be observed.

U exposure leads to histological damage

Muscular fibers are composed of myofibrils, cylindrical and parallel structures occupying the sarcoplasm (**Figure 3**). Each myofibril presents a repeated feature of transversal stripes

corresponding to the contractile proteins. The intracellular space between two myofilaments corresponds to the endomysium. The sarcomere is the contractile unit delimited by two stripes. The contraction is permitted by the work of thin filaments. As we can observed for control muscles (**Figure 3**), the light ones are the actin filaments and the dark ones myosin filaments. Regulating proteins mediate muscular contraction and relaxation. Under the influence of the energy released from ATP, the actin and myosin filaments slip over themselves leading to a sarcomere shortening.

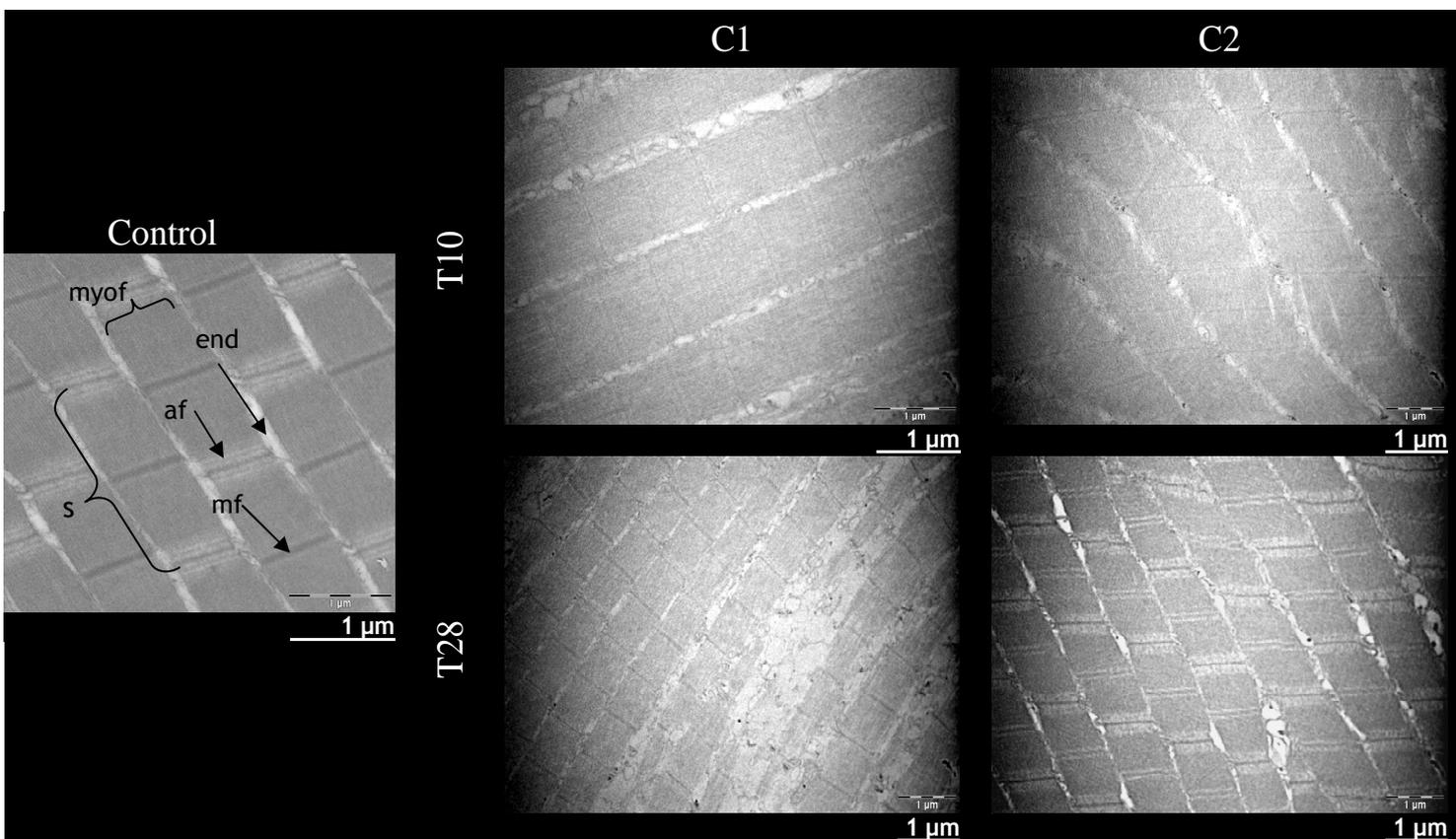


Figure 3: Ultrathin sections through skeletal muscles observed with a TEM showing the muscular cell structure for control fish and fish exposed to C1 and C2 condition after 10 (T10) and 28 (T28) days of exposure. (a/mf: actin/myosin filament, s: sarcomere, myof: myofibril, end: endomysium).

After 10 days of exposure to C1 and C2 concentrations of U, the results showed an effect of U in the internal structure of the skeletal muscles. A dilatation of the endomysium is observed between myofibrils. Numerous organelles in this widen structure are observed which presumably are part of the sarcoplasmic reticulum, T tubules and peaces of mitochondria. After 28 days of exposure to C1 condition myofibrils and sarcomere are disorganized and altered, whereas exposure to C2 concentration resulted in less pronounced alterations. These observations are more pronounced for fish exposed to the lowest concentration.

The axons of sensory neurons converge to a specific region of the olfactory bulb where they make synapses with the relay neurones. In control fish, the structure of the neuropil of the olfactory bulb, is characterized by synaptic connections formed between branches of axons and dendrites, and is composed of myelinated extensions. The three pictures presented here show the cell body of a neurone and the neuropil around (**Fig. 4**). After 10 days of exposure to U, the results showed an effect of U in the internal structure of the olfactory illustrated by an increase in the extracellular space in the neuropil, the effect being exacerbated under C2 exposure.

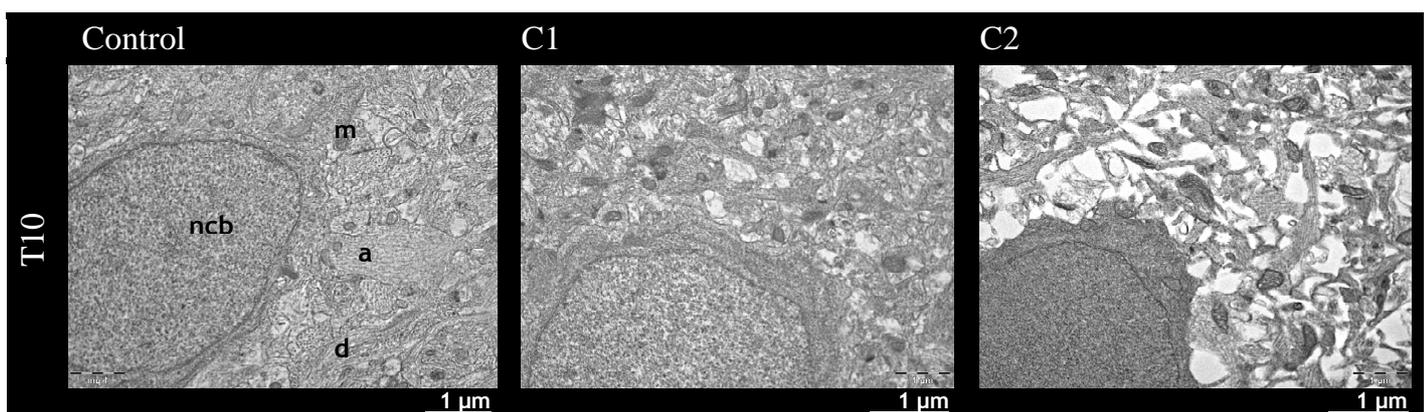


Figure 4: Ultrathin sections through olfactory bulb observed with a TEM showing the neuropil ultrastructure for control fish and fish exposed to C1 and C2 condition after 10 days (T10) of exposure (ncb: neurone cell body, m: mitochondria, d: dendrite, a: axon).

Discussion

We have already found that brain and muscles are much weaker U accumulators than gills and liver, since U concentrations within brain and muscles were around 10-fold less important than those in gills and liver for the same range of waterborne U concentrations (7). A high variability of uranium accumulation is observed between individuals. This variation is much less important for fish exposed to waterborne cadmium concentrations (19). One hypothesis may be the ability of heavy metals to cross the biological barriers. Indeed, in brains of fish exposed to $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ of cadmium, the bioconcentration factors reach 71 and 230 after 7 and 21 days of exposure respectively (19). Moreover, the variability of Cd concentrations measured in brains under this exposure condition represents 33% and 4% of the mean at day 7 and 21 respectively. In the present study, in brains of fish exposed to $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ of uranium, bioconcentration factors of 1 and 3 were found after 10 and 28 days of exposure and the variability reaches 96% and more than 100% of the mean. These high variabilities of U accumulations in brain among fish were already observed in a recent study (9). Moreover, whereas at C1 exposure the U concentrations increased 2.5-times between 10 and 28 days in brain and muscles, under C2 exposure we observed a 3.5-times decrease in brain and a stagnation at $1.5 \mu\text{g U/g}$ in muscles. This kinetic pattern might be due to the onset of an adapted response such as higher expression of metal ATPase pumps or the lower expression of metal transporters. The histological damages were more pronounced in the brain after 10 days of U exposure at the highest concentration which is consistent with the higher brain U burden at that time. However, a direct relationship between U concentration in tissues and the observed biological effects is not always granted at these low doses: for instances, the major effects of U are observed in the C1 group in muscles and in brain after 28 and 10 days of exposure, respectively. This holds true for the increase in respiratory flux at state IV and for the histological damages observed in muscles which were more pronounced in the C1 than in

the C2 group although the former contained 4-times less U than the later. In brain, the respiratory control ratio dropped in the C1 group, and the increase in COX-IV subunit concentration was more important under C1 than C2 exposure although brains accumulated 18-times less U in the C1 than in the C2 group. Although, surprising at first glance, we already had found that the gene response to waterborne U contamination was more important in the C1 group than in the C2 group in muscles and in brain (this was more prominent after 10 days of exposure) (7). In keeping with this trend, it has been shown that U is an endocrine disruptor in mice at low but not at high doses. More precisely the large primary primordial ovarian follicle population decreased after exposure through drinking water at 0.5 or 2.5 $\mu\text{g U.L}^{-1}$ but not at 12.5 or 60 $\mu\text{g U.L}^{-1}$ (20). Possibly, the adaptive response or the triggering of rescue mechanisms arises above a threshold value of accumulated U concentration.

Only one reference can be found in the literature about the effect of U on mitochondrial respiration, however under non realistic environmental conditions. On suspensions of rabbit proximal tubules, very high concentrations of uranium ($\geq 1 \text{ mM}$) were required to inhibit Na^+ K^+ ATPase activity and to impinge on mitochondrial respiration (ADP-coupled, state 3, and uncoupled respiration, state 4) (21). However, the concentrations used ($\geq 238 \text{ mg.L}^{-1}$) were extremely high as compared to those used in the present study, and therefore irrelevant from an environmental point of view.

A recent study led on zebrafish exposed to dietary methylmercury revealed a disturbance of the respiratory mitochondrial chain and the mitochondrial protein synthesis in muscles. Oxygen consumption was decreased at state 3 and left unchanged at state 4. In addition, the maximal COX activity and the COXIV subunit protein concentration were decreased (18). The process by which MeHg inhibits mitochondrial energy metabolism may be linked to an oxidative stress and interactions with subunits of the respiratory chain through chemical binding with thiols. In the present study, oxygen consumption did not change at state 3 but

increased at state 4, the maximal COX activity was not modified and the COXI subunit concentration increased. U presents a high affinity with phosphate groups and uranyl ion forms stable complex species with ATP (22). Uranyl may interact with Pi carrier or disturb ATPsynthase activity. These results show that the mechanisms underlying these alterations are different from those involved in the case of dietary methylmercury contamination.

There is a lack of detailed ultrastructural information on different area of the zebrafish brain. To date, histological effects in the brain of fish induced by metal exposure have focused on the olfactory epithelium (OE) structure (23, 24). The olfactory system is sensitive to waterborne metal exposure (23-26). In the present work, low environmentally relevant concentrations were applied to fish, and nevertheless uranium exposure induced alterations of the olfactory bulb neuropil in brain of fish after ten days of exposure to the C2 concentration. Mitochondrial dysfunction and pro-oxydative effects may be involved in neuron injuries. In mouse brain mitochondrial-enriched fraction isolated from MeHg-treated mice, authors measured a reduction in GPx activity, a decreased mitochondrial activity, and an increase in ROS formation and lipid peroxydation (27). Apoptosis driven by mitochondrial disturbances usually involves alterations of the mitochondrial transmembrane potential and the release of cytochrome c into the cytoplasm, followed by caspase activation. In rat lung epithelial cells, exposure to uranium induced an increased activity of caspases-3 and -8 and an increased concentration of cytochrome c in the cytosol (28). These results highlight the onset of an apoptotic response. Nevertheless, the concentrations used were extremely high and ranged from 0.25 to 1 mM of uranium. The ultrastructure of kidneys and liver of rats intraperitoneally exposed to 0.1 mg/day of ²³⁷Np, a by-product of uranium in nuclear reactor, has been examined (29). At this very high dose, condensation of chromatin, nuclear fragmentation and mitochondria injuries were reported. These effects can be due to both radiological and chemical toxicity. Because apoptotic mechanisms lead in a first step to a chromatin

condensation and because this phenomenon was not observed during ultrastructure analysis on neural cell body, apoptosis was not responsible for neuropil injuries.

In muscle cells, the endomysium of exposed fish appears dilated and presents some remains of mitochondria, parts of tubule T or sarcoplasmic reticulum. These effects were more pronounced after 28 days of exposure in organisms exposed to the lowest concentration. Under the same condition, an increase of the respiratory rate consumption is observed suggesting a permeability of the membrane. These histological and biochemical results may suggest a lipid peroxidation of the muscle cells as it was previously shown in the liver and kidney of the lake whitefish dietary exposed to U (5). Further experiments consisting in malondialdehyde measurements could confirm our hypothesis. Moreover, because the myofilaments were altered it would be relevant to study U consequences on the muscular contraction function by assessing swimming performances.

Acknowledgments

The authors wish to thank Sébastien Cambier for its scientific support. This study is a part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.

Supplemental material

Table S1: Accession numbers and specific primer pairs for the 10 genes from *Danio rerio* used in our study.

Gene name	Accession number	Primer (5'-3')
<i>ndufs3</i>	NM_001017755	AGACGCATCTTGACAGATTATGG ^a CCCCCGGTATGCAGGA ^b
<i>sdhb</i>	NM_001098740	GGACAGCACACTGACCTT ^a GTTGCTCATGTTCGGGCAC ^b
<i>mt-cyb</i>	AJ388456	CGCCATTCTACGATCTATCCC ^a GGTGTCTACTGGTATCCCTCC ^b
<i>coxI</i>	NC_002333	GGAATACCACGACGGTACTCT ^a AGGGCAGCCGTCTAAT ^b
<i>cox4i1</i>	NM_214701	AGAGTGGAAATCTGTGGTTGC ^a CCAGCGTTGTTTTTCATAGTCCC ^b
<i>atp5a1</i>	NM_001077355	GGCCTACCCCGGTGAC ^a CGGGACGGATACCCTTGT ^b
<i>atp5f1</i>	NM_001005960	GTGTGACAGGGCCTTATATGC ^a CTGAGCCTTTGCTATTTTATCCGC ^b
<i>bactin1</i>	NM_131031	AAGTGCGACGTGGACA ^a CTTTAGGTTGGTCGTTTCGTTTGA ^b

Abbreviations : *ndufs3*: NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, (NADH-coenzyme Q reductase) ; *sdhb*: succinate dehydrogenase complex, subunit B ; *mt-cyb*: cytochrome b, mitochondrial ; *coxI*: cytochrome *c* oxydase subunit I ; *cox4i1*: cytochrome *c* oxydase subunit IV; *atp5a1*: ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1 ; *atp5f1*: ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1.

^a Upstream primer ^bForward primer

Table S2: Differential gene expression observed in muscles and brain of zebrafish exposed to 30 and 100 $\mu\text{g U/L}$ after 28 days of exposure.

MUSCLES					
Genes	C0	C1	C2	factor C1/C0	factor C2/C0
<i>zgc:112520</i>	2.20 \pm 0.48	2.20 \pm 0.23	1.46 \pm 0.21	1.0	0.7
<i>sdh(Fe/S)</i>	0.66 \pm 0.15	0.82 \pm 0.06	0.91 \pm 0.26	1.2	1.4
<i>cytb</i>	230 \pm 24.9	248 \pm 22.9	232 \pm 65.6	1.1	1.0
<i>coxI</i>	242 \pm 34.8	296 \pm 26.5	351 \pm 132	1.2	1.5
<i>coxIV</i>	26.9 \pm 5.35	18.9 \pm 1.83	17.8 \pm 5.51	0.7	0.7
<i>atp5a1</i>	9.20 \pm 2.10	9.59 \pm 1.74	7.08 \pm 2.77	1.0	0.8
<i>atp5f1</i>	6.25 \pm 0.96	9.23 \pm 0.39	7.54 \pm 1.84	1.5	1.2

BRAIN					
Genes	C0	C1	C2	factor C1/C0	factor C2/C0
<i>zgc:112520</i>	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.9	1.1
<i>sdh(Fe/S)</i>	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.9	1.0
<i>cytb</i>	18 \pm 6.0	13 \pm 1.5	20 \pm 7.4	0.7	1.1
<i>coxI</i>	20 \pm 1.6	20 \pm 2.9	24 \pm 6.2	1.0	1.2
<i>coxIV</i>	1.4 \pm 0.3	0.9 \pm 0.1	1.2 \pm 0.4	0.6	0.8
<i>atp5a1</i>	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	0.4 \pm 0.1	0.8	0.7
<i>atp5f1</i>	0.6 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.9	0.5

References

- (1) WHO (World Health Organization) *Depleted uranium: Sources, exposure and health effects*; WHO/SDE/PHE/01.1; 2001.
- (2) Bywater, J. F.; Banaczowski, R.; Bailey, M. Sensitivity to uranium of six species of tropical freshwater fishes and four species of cladocerans from Northern Australia. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1991**, *10*, 1449-1458.
- (3) Labrot, F.; Narbonne, J. F.; Ville, P.; Saint Denis, M.; Ribera, D. Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **1999**, *36*, 167-78.
- (4) Poston, T. M. Observations on the bioaccumulation potential of thorium and uranium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **1982**, *28*, 682-690.
- (5) Cooley, H. M.; Evans, R. E.; Klaverkamp, J. F. Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* **2000**, *48*, 495-515.
- (6) Bourrachot, S.; Simon, O.; Gilbin, R. The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* **2008**, *90*, 29-36.
- (7) Lerebours, A.; Gonzalez, P.; Adam, C.; Camilleri, V.; Bourdineaud, J.-P.; Garnier-Laplace, J. Comparative Analysis Of Gene Expression in Brain, Liver, Skeletal Muscles, and Gills Of Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to Environmentally Relevant Waterborne Uranium Concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2009**, *28*, 1271-1278.
- (8) Barillet, S.; Adam, C.; Palluel, O.; Devaux, A. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2007**, *26*, 497-505.
- (9) Lerebours, A.; Bourdineaud, J. P.; van der Venn, K.; Vandembrouck, T.; Gonzalez, P.; Camilleri, V.; Floriani, M.; Garnier-Laplace, J.; Adam-Guillermin, C. Sublethal effects of waterborne uranium exposures on the zebrafish brain: transcriptional responses and alterations of the olfactory bulb ultrastructure. *Environmental Science and Technology* **2010**, *44*, 1438-1443.
- (10) Barillet, S.; Buet, A.; Adam, C.; Devaux, A. Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection Suppl.1* **2005**, *40*, S175-S180.
- (11) Oliver, J. A further study of the regenerated epithelium in chronic uranium nephritis. An anatomical investigation of its function. *J. Exp. Med.* **1916**, *23*, 301-321.

- (12) Taulan, M.; Paquet, F.; Maubert, C.; Delissen, O.; Demaille, J.; Romey, M. C. Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environmental Health Perspectives* **2004**, *112*, 1628-1635.
- (13) Taulan, M.; Paquet, F.; Argiles, A.; Demaille, J.; Romey, M. C. Comprehensive analysis of the renal transcriptional response to acute uranyl nitrate exposure. *BMC Genomics* **2006**, *7*.
- (14) Antunes, S. C.; Pereira, R.; Gonçalves, F. Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **2007**, *53*, 207-213.
- (15) Kurttio, P.; Harmoinen, A.; Saha, H.; Salonen, L.; Karpas, Z.; Komulainen, H.; Auvinen, A. Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *American Journal of Kidney Diseases* **2006**, *47*, 972-982.
- (16) WHO (World Health Organization). Guidelines for drinking-water quality, third edition. In World Health Organization: Geneva, 2004; pp 197-209.
- (17) Letellier, T.; Malgat, M.; Coquet, M.; Moretto, B.; Parrot-Roulaud, F.; Mazat, J. P. Mitochondrial myopathy studies on permeabilized muscle fibers. *Pediatr. Res.* **1992**, *32*, 17-22.
- (18) Cambier, S.; Bénard, G.; Mesmer-Dudons, N.; Gonzalez, P.; Rossignol, R.; Brèthes, D.; Bourdineaud, J. P. At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebrafish (*Danio rerio*). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **2009**, *41*, 791-799.
- (19) Gonzalez, P.; Baudrimont, M.; Boudou, A.; Bourdineaud, J. P. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *BioMetals* **2006**, *19*, 225-235.
- (20) 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.; Dyer, C. A. Drinking water with uranium below the U.S. EPA water standard causes estrogen receptor-dependent responses in female mice. *Environmental health perspectives* **2007**, *115*, 1711-1716.
- (21) Brady, H. R.; Kone, B. C.; Brenner, R. M.; Gullans, S. R. Early effects of uranyl nitrate on respiration and K^+ transport in rabbit proximal tubule. *Kidney International* **1989**, *36*, 27-34.
- (22) de Stefano, C.; Gianguzza, A.; Pettignano, A.; Sammartano, S. Interaction of UO_2^{2+} with ATP in aqueous ionic media. *Biophysical Chemistry* **2005**, *117*, 147-153.
- (23) Hansen, J. A.; Rose, J. D.; Jenkins, R. A.; Gerow, K. G.; Bergman, H. L. Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to copper: Neurophysiological and histological effects on the olfactory system. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1999**, *18*, 1979-1991.

- (24) Moran, D. T.; Rowley Iii, J. C.; Aiken, G. R.; Jafek, B. W. Ultrastructural neurobiology of the olfactory mucosa of the brown trout, *Salmo trutta*. *Microscopy Research and Technique* **1992**, *23*, 28-48.
- (25) Blechinger, S. R.; Kusch, R. C.; Haugo, K.; Matz, C.; Chivers, D. P.; Krone, P. H. Brief embryonic cadmium exposure induces a stress response and cell death in the developing olfactory system followed by long-term olfactory deficits in juvenile zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2007**, *224*, 72-80.
- (26) Matz, C. J.; Krone, P. H. Cell death, stress-responsive transgene activation, and deficits in the olfactory system of larval zebrafish following cadmium exposure. *Environmental Science and Technology* **2007**, *41*, 5143-5148.
- (27) Franco, J. L.; Posser, T.; Dunkley, P. R.; Dickson, P. W.; Mattos, J. J.; Martins, R.; Bainy, A. C.; Marques, M. R.; Dafre, A. L.; Farina, M. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47*, 449-457.
- (28) Periyakaruppan, A.; Sarkar, S.; Ravichandran, P.; Sadanandan, B.; Sharma, C. S.; Ramesh, V.; Hall, J. C.; Thomas, R.; Wilson, B. L.; Ramesh, G. T. Uranium induces apoptosis in lung epithelial cells. *Arch. Toxicol.* **2009**, *83*, 595-600.
- (29) Pusset, D.; Fromm, M.; Poncy, J. L.; Kantelip, B.; Galle, p.; Chambaudet, A.; Baud, M.; Boulahdour, H. Ultrastructural lesions induced by neptunium-237: apoptosis or necrosis? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2002**, *80*, 654-661.

Principales avancées et conclusion

Dans la poursuite des travaux précédemment effectués au cours de la thèse sur les muscles et le cerveau du poisson zèbre, l'étude visait à évaluer l'impact d'une contamination à l'uranium sur la chaîne respiratoire mitochondriale. Un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire peut avoir des conséquences délétères sur le plan neurologique et musculaire. L'analyse oxygraphique a mis en évidence une perturbation du couplage énergétique. La synthèse protéique est modifiée et des atteintes sur l'ultrastructure cellulaire dans les muscles et le cerveau ont été identifiées. Les principales avancées de l'étude sont les suivantes :

Inhibition du contrôle respiratoire suggérant un problème de couplage énergétique.

Les résultats mettent en évidence une diminution du contrôle respiratoire dans le cerveau et les muscles des organismes exposés à la faible concentration après 10 et 28 jours d'exposition respectivement. Ces observations suggèrent une perturbation du couplage énergétique de la chaîne respiratoire pour la faible concentration dans les muscles et le cerveau des poissons.

Les résultats d'études antérieures suggèrent un lien entre une perturbation du métabolisme mitochondrial au niveau de tubes proximaux de mammifères et la néphrotoxicité de l'uranium (Brady *et al.*, 1984). D'autres auteurs montrent une altération de la mobilisation de l'ATP à la suite d'une contamination à l'uranium (Nechay *et al.*, 1980).

Ce mécanisme serait une autre cible de la toxicité de l'uranium au sein de la cellule.

Une étude récente met en évidence une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire et de la synthèse de protéines mitochondriales dans les muscles du poisson zèbre exposé par voie trophique au MeHg (Cambier *et al.*, 2009). Les auteurs constatent une forte inhibition de la respiration à l'état 3 et une diminution du contrôle respiratoire. L'activité

maximale de la cytochrome *c* oxydase et la synthèse protéique de COXIV sont inférieures chez les individus contaminés. De plus, l'inhibition de la synthèse d'ATP confirme le découplage de la chaîne induit par la contamination au MeHg (Cambier *et al.*, 2009). Il est possible que le MeHg en générant un stress oxydant puisse perturber le métabolisme mitochondrial. De plus, le MeHg possède une forte affinité avec les groupements thiols et peut ainsi interagir avec des sous-unités de la chaîne respiratoire et modifier leur fonctionnement. Dans notre étude la consommation d'oxygène à l'état 4 augmente et le contrôle respiratoire est plus faible chez les exposés. De plus, l'activité de la cytochrome *c* oxydase ne varie pas de façon significative et la synthèse de COXI dans les muscles est augmentée. Ces résultats suggèrent que la chaîne respiratoire mitochondriale est affectée lors d'une contamination à l'uranium mais que les mécanismes mis en jeu sont différents de ceux observés lors d'une contamination au MeHg. L'uranium ne possède pas d'affinité avec les thiols mais avec les phosphates. En outre, la constante de formation de l'ion uranyl avec l'ATP est très élevée (De Stefano *et al.*, 2006) L'uranium peut affecter de façon directe ou indirecte des protéines de la chaîne respiratoire. L'augmentation de la consommation d'oxygène à l'état 4 suggère une perméabilité de la membrane interne aux protons. L'exposition à l'uranium pourrait provoquer une peroxydation lipidique et endommager les membranes comme cela a été démontré dans le foie et les reins du grand corégone (Cooley *et al.*, 2000).

Augmentation de la synthèse protéique de COXI et COXIV dans les muscles et le cerveau respectivement.

Une modification du contenu protéique du complexe IV est remarquée à travers l'induction des deux sous-unités I et IV de la cytochrome *c* oxydase. Ces modifications de la synthèse protéique diffèrent selon l'organe considéré, la concentration et le temps d'exposition. Après 10 jours d'exposition à C1 et C2 une augmentation de la synthèse de

COXIV est observée dans le cerveau des poissons. Dans les muscles, une tendance à l'augmentation de la synthèse de COXI est observée chez les organismes exposés à la faible concentration (C1) et une augmentation significative apparaît chez les organismes exposés à la concentration plus élevée (C2) après 28 jours d'exposition.

L'expression génique analysée à 28 jours pour les deux conditions d'exposition dans le cerveau et les muscles ne révèle pas de perturbation de la réponse transcriptionnelle des gènes *atp5a1*, *atp5f1*, *coxI*, *cox4i1*, *mt-cyb*, *sdhb* et *ndufs3* codant pour des enzymes de la chaîne respiratoire. Les résultats obtenus sur la synthèse de protéines et l'expression de gènes suggèrent que des régulations au niveau post transcriptionnel prennent place. Le « turn-over » protéique peut également influencer la réponse transcriptionnelle. De plus, les régulations transcriptionnelles peuvent précéder dans le temps la synthèse protéique et s'éteindre au moment où la synthèse protéique prend le relais.

Dans la première étude nous avons remarqué une induction du gène *coxI* dans les muscles du poisson à 3 jours d'exposition aux deux concentrations. Après 10 jours, une induction plus faible est observée pour les individus exposés à C1 et un retour à l'expression basale pour les individus exposés à C2. Les résultats de la présente étude montrent une augmentation de la synthèse de la protéine pour laquelle code ce gène à 28 jours d'exposition.

Une augmentation de la synthèse de COXIV a été mise en évidence dans le cerveau des individus exposés pendant 10 jours ce qui laisse penser que le gène correspondant, *cox4i1* pourrait être induit avant 10 jours.

Spécificité des atteintes histologiques.

Dans les muscles des individus exposés à la faible concentration pendant 28 jours, des dommages au sein du sarcoplasme ont été constatés. En effet, des altérations des myofibrilles et des dilatations de l'endomysium (espace inter-myofibrille) sont constatées. L'écartement de l'endomysium laisse apparaître des morceaux de structures qui peuvent correspondre à des

débris de mitochondries, des tubules T ou du reticulum sarcoplasmique. Une peroxydation lipidique membranaire pourrait être à l'origine de ces débris. Dans le but d'approfondir ces observations microscopiques, des analyses chimiques à l'aide d'une sonde EDX (Energy Dispersive X-ray) ont été réalisées. Ces analyses n'ont pas montré la présence de composé chimique particulier.

Des dilatations de la neuropile du bulbe olfactif des poissons sont constatées à 10 jours d'exposition à C2. Ces résultats sont cohérents avec ceux précédemment obtenus. Les analyses à 28 jours dans cette expérience n'ont pas été effectuées.

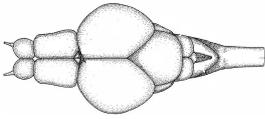
En résumé, les atteintes ultrastructurales ont été identifiées à des temps précoces dans le bulbe olfactif des poissons exposés à la forte concentration et à des temps plus longs dans les muscles des poissons exposés à la faible concentration. Les altérations ultrastructurales dépendent de l'organe étudié, et des conditions de temps et d'exposition.

L'analyse des altérations ultrastructurales s'avère sensible dans le cadre des expositions à faibles concentrations et pertinente dans l'estimation de l'ampleur des effets.

Chapitre VII: Discussion générale et perspectives

Ce travail de thèse repose sur l'évaluation des effets de l'uranium chez le poisson zèbre *Danio rerio* exposé à de faibles concentrations dans l'eau. Il s'insère dans la problématique du programme ENVIRHOM (Garnier-Laplace et Paquet, 2001) dédié à l'étude des effets des radionucléides dans les écosystèmes et chez l'homme, lors d'expositions chroniques à faibles doses. Ces expositions sont représentatives de situations environnementales comme celles retrouvées en aval de sites miniers. Les travaux menés jusqu'à présent sur les effets de l'uranium chez le poisson zèbre ont reposé sur l'étude du stress oxydatif, l'évaluation de la génotoxicité et l'impact sur le système cholinergique (Barillet, 2007). Plus récemment, les effets de l'uranium ont été étudiés à travers l'évaluation de critères d'effets individuels sur les jeunes stades de vie et la reproduction (Bourrachot, 2009). L'originalité de ce travail de thèse réside d'une part dans la comparaison des mécanismes affectés à travers la réponse transcriptionnelle dans quatre organes-cibles selon une exposition de 28 jours à deux concentrations en uranium et une phase de dépuraction, non explorée jusqu'à présent. Ces résultats complètent les informations précédemment obtenues et apportent de nouvelles connaissances sur les effets de l'uranium chez le poisson (**Figure 23**). D'autre part, les études menées sur le cerveau et les muscles à travers l'étude de gènes impliqués dans certaines voies métaboliques et l'observation d'effets sur l'ultrastructure du bulbe olfactif ou musculaire sont les premières dans la problématique des effets de l'uranium chez le poisson. De plus, des expériences ont été menées à plusieurs niveaux (ARNm, synthèse de protéines et fonctionnement) dans le cerveau et les muscles sur la chaîne respiratoire mitochondriale qui est un mécanisme encore peu étudié en écotoxicologie aquatique. Ce mécanisme est important car il fournit l'essentiel de l'énergie de la cellule et un dysfonctionnement mitochondrial peut notamment avoir des conséquences notables sur le fonctionnement neuronal et musculaire.

CERVEAU



Altérations de la structure de la neuropile du bulbe olfactif

Perturbations précoces de la réponse de gènes impliqués dans :

- le système cholinergique et glutamatergique
- la réception olfactive

Perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale :

- diminution du contrôle respiratoire
- augmentation de la synthèse de COXIV

Dépuration lente

MUSCLES



Altérations de la structure des myofibrilles et de l'endomysium

Perturbations précoces de la réponse de gènes impliqués dans :

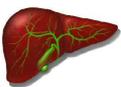
- le métabolisme mitochondrial
- la balance oxydative

Perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale :

- diminution du contrôle respiratoire
- augmentation de la synthèse de COXI

Dépuration lente

FOIE



Perturbations tardives de la réponse de gènes impliqués dans :

- la balance oxydative
- la détoxification
- la réponse inflammatoire

Dépuration efficace

BRANCHIES



Perturbations tardives de la réponse de gènes impliqués dans la balance oxydative

Dépuration efficace

Figure 23 : Synthèse des principaux résultats obtenus.

Afin de caractériser et de mieux comprendre les modes d'action toxiques de l'uranium, nos expériences se sont déroulées en conditions contrôlées afin de s'affranchir de paramètres pouvant interférer avec la réponse des organismes à l'uranium. Pour répondre aux objectifs scientifiques de notre programme de recherche certains choix ont été adoptés. Nous nous sommes intéressés à une comparaison des mécanismes affectés à travers le suivi de l'expression de gènes impliqués dans la réponse des cellules au stress. La bioaccumulation a été suivie en parallèle afin de confronter les résultats moléculaires obtenus avec les concentrations tissulaires correspondantes. Ensuite, le développement de la recherche des effets sub-cellulaires d'une exposition à l'uranium dans le cerveau du poisson a permis d'acquérir des informations supplémentaires aidant à la compréhension de la neurotoxicité de l'uranium. Le métabolisme mitochondrial a suscité une attention particulière dans les deux organes sensibles : le cerveau et les muscles. Nous discuterons d'une manière générale de nos résultats avec ceux issus de travaux antérieurs. Des processus biologiques intermédiaires, et notamment ceux concernant le transfert et le transport de l'uranium chez les organismes seront également discutés.

L'accumulation de l'uranium dans les différents organes

La quantification des concentrations en uranium dans les différents tissus permet de discuter du rapport entre un niveau d'accumulation et les effets moléculaires induits dans un organe donné. Quelques auteurs se sont intéressés à la distribution de l'uranium dans les différents organes ou tissus du poisson. Cooley et Klaverkamp (2000) ont souligné l'accumulation importante d'uranium dans le squelette, les écailles, le foie et les gonades du grand corégone contaminé à l'uranium par voie alimentaire. Chez le poisson zèbre *Danio rerio* exposé à l'uranium dans l'eau, les sites majeurs d'accumulation sont le foie et les branchies et, dans une moindre mesure, le cerveau, le squelette et les gonades après 20 jours

d'exposition à 100 µgU/L (Barillet, 2007, Barillet *et al.*, 2007). Les résultats de nos travaux corroborent ceux constatés par ces auteurs dans la mesure où les principaux sites d'accumulation sont le foie et les branchies. De plus, nos travaux montrent que ce constat est également observé chez les poissons exposés à une faible concentration de 20 µgU/L, à partir de 3 jours et jusqu'à 28 jours d'exposition. En effet, les valeurs mesurées dans le foie et les branchies des poissons sont environ 10 fois plus élevées que celles mesurées dans le cerveau et les muscles. Ces observations peuvent s'expliquer par le rôle physiologique des différents organes. Le foie joue un rôle majeur dans la prise en charge des métaux et leur détoxification. Cet organe accumulerait une quantité importante d'uranium après filtration du sang et stockage biliaire. L'uranium serait ensuite excrété *via* les sécrétions biliaires. Les branchies jouent un rôle important lors d'une contamination par l'eau car elles représentent la première barrière biologique exposée à l'uranium. Les concentrations tissulaires élevées laissent penser qu'une quantité importante d'uranium reste piégée au niveau des tissus branchiaux ou dans le mucus. Les branchies ont un rôle dans la respiration, l'osmorégulation et le métabolisme des xénobiotiques. Elles représentent une surface d'échange active avec le milieu extérieur. L'étude de la cinétique d'accumulation en uranium sur 28 jours a montré une grande variabilité des concentrations tissulaires en uranium dans ces deux organes. Le rôle physiologique de ces deux organes pourrait expliquer une telle fluctuation. De plus, la chute des concentrations en uranium dans ces organes après une phase de dépuración de 8 jours souligne leur rôle dans la détoxification.

Des expériences précédemment menées au laboratoire dans des conditions similaires ont montré que l'uranium pouvait s'accumuler dans le cerveau du poisson zèbre exposé à 100 µgU/L (Barillet *et al.*, 2007). Nos travaux révèlent une accumulation significative dans cet organe pour une concentration d'exposition 5 fois inférieure : 20 µg/L. Ces résultats laissent

matière à réfléchir sur l'entrée de l'uranium dans cet organe dans le cadre d'une accumulation à faible concentration d'exposition (passage des barrières biologiques).

Ces résultats sont en cours d'approfondissement à travers l'étude des pharmacocinétiques de l'uranium récemment menée au laboratoire. Le suivi des concentrations tissulaires en uranium dans dix organes/tissus du poisson zèbre exposé à 20 µg/L pendant une phase d'exposition et de dépuraction d'un mois permettra d'établir une cinétique approfondie d'accumulation et de dépuraction de l'uranium.

Uranium et passage des barrières biologiques

D'une manière générale, les études portant sur le passage de l'uranium à travers les barrières biologiques sont rares et la démonstration des mécanismes sous-jacents reste inachevée pour la plus grande partie des processus. La problématique du transport de l'uranium dans le foie, les muscles et les branchies du poisson n'est pas encore étayée dans la littérature. Plusieurs hypothèses sont envisagées concernant le passage de l'uranium dans le cerveau des modèles murins.

Lemercier *et al.*, (2003) ont mis en évidence le passage de l'uranium à travers la barrière hémato-encéphalique. Un transport de l'uranium par la voie olfactive a été envisagé chez le rat exposé à des inhalations répétées d'uranium. En effet, selon ce mode d'administration l'uranium s'accumule en plus forte concentration dans le bulbe olfactif (Monleau *et al.*, 2005). Les résultats suggèrent le rôle important des neurones de l'olfaction dans le transfert de l'uranium des récepteurs au cerveau (Tournier *et al.*, 2009). L'alternative d'un passage de l'uranium *via* la voie olfactive est ainsi envisagée dans deux études (Monleau *et al.*, 2005, Tournier *et al.*, 2009).

Nos résultats suggèrent une perturbation de la voie olfactive, à travers les indications transcriptionnelles (gènes codant pour des récepteurs olfactifs, des transporteurs d'ions et

pour des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire) et ultrastructurales (neuropile du lobe olfactif endommagée). Des lésions de l'épithélium olfactif sont mentionnées chez les poissons exposés aux métaux (Cd, Cu) par voie directe dans la littérature (Moran *et al.*, 1992, Hansen *et al.*, 1999, Blechinger *et al.*, 2007). Une étude menée chez la truite arc-en-ciel compare l'accumulation dans le cerveau des organismes exposés au Hg(II) dans l'eau et l'accumulation dans le cerveau lorsque le mercure est administré par injection intraveineuse. Le mercure n'est pas détecté par autoradiographie dans le cerveau des individus contaminés par intraveineuse, à l'inverse, des sites d'accumulation spécifiques sont détectés dans le système olfactif et d'autres parties du cerveau des individus exposés par l'eau. Les auteurs suggèrent que le mercure ne passerait pas la barrière hémato-encéphalique et que le Hg(II) dissous serait absorbé dans les cellules réceptrices des rosettes olfactives et transporté vers le bulbe olfactif par le transport axonal (Rouleau *et al.*, 1999).

Les transporteurs

Nos résultats montrent qu'une exposition à l'uranium induit l'expression d'un gène codant pour un transporteur transmembranaire lors de notre première expérience. Plusieurs études font référence à des surexpressions de transporteurs à la suite d'une contamination à l'uranium. Cependant, le transport de l'uranium à travers les membranes biologiques reste aujourd'hui peu défini.

Lors de notre première expérience, des inductions du gène codant pour le transporteur ABC (*abcb311*) sont observées après une phase de dépuraction de 8 jours dans le foie des poissons préalablement exposés à 20 et 100 µg/L pendant 28 jours. De plus les concentrations en uranium entre le 28^{ème} jour et le 8^{ème} jour de dépuraction diminuent de manière significative. Dans une étude menée sur le poisson zèbre exposé au Cd, ce gène est induit d'un facteur 100 dans les branchies. En parallèle, une diminution de la concentration tissulaire en Cd est

observée (Gonzalez *et al.*, 2006). Des expériences menées chez le bivalve exposé à 80 µg/L d'uranium montrent une induction de la protéine MXR, l'homologue des MDR chez les bivalves (Tran *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que l'uranium induit la synthèse de cette protéine comme c'est le cas d'autres métaux : cadmium, zinc ou mercure. L'uranium induit l'expression du gène codant pour le transporteur DMT1 (Divalent Metal Transporter1) dans le cerveau du rat. Les auteurs suggèrent alors une augmentation de la concentration en fer intracellulaire (Lestaevel *et al.*, 2009). D'autres auteurs montrent qu'une exposition chronique à l'uranium entraîne une perturbation transcriptionnelle et traductionnelle de ce transporteur dans les reins du rat (Berradi *et al.*, 2008). Une étude, portant sur la contamination du rat au cadmium et au plomb, a mis en évidence une augmentation de la synthèse protéique de DMT1 dans le cerveau, parallèlement à une augmentation des concentrations en cadmium et en plomb dans le sang de l'animal (Gu *et al.*, 2009). Chez l'homme, des expériences menées post-mortem sur les tissus cérébraux de patients sains et de patients atteints de la maladie de Parkinson montrent une augmentation de la synthèse de DMT1 parallèlement à une accumulation en fer plus importante au niveau des neurones dopaminergiques soulignant le rôle du transporteur dans les phénomènes de dégénérescence neuronale (Salazar *et al.*, 2008). Le passage du fer dans le cerveau est également régi par la transferrine permettant le transport du fer à travers la barrière hémato-encéphalique (Taylor *et al.*, 1991). Dans des fractions sériques humaines, Vidaud *et al.*, (2005, 2007), ont montré que l'uranium pouvait se lier à la transferrine. La constante de complexation de l'apotransferrine sérique humaine serait supérieure à celle d'autres métalloprotéines (Michon *et al.*, soumis). Ainsi, ces résultats indiquent que plusieurs transporteurs pourraient être impliqués dans la prise en charge de l'uranium.

D'autres transporteurs sont susceptibles de prendre en charge l'uranium. Des études ont corrélié la surexpression des cotransporteurs NaPi-IIa avec des phénomènes cytotoxiques

dû à l'uranium dans des lignées cellulaires (Muller *et al.*, 2006). Les auteurs évoquent également l'implication de ces transporteurs dans l'internalisation d'une partie de l'uranium au niveau des cellules rénales (Muller *et al.*, 2008).

L'étude de ces transporteurs dans la prise en charge de l'uranium à travers les membranes biologiques dans un processus d'accumulation ou de détoxification pourrait constituer une voie de recherche.

La neurotoxicité de l'uranium

Des études réalisées précédemment au laboratoire montrent que dans le cerveau des poissons exposés à 20 et 100 µg/L, l'activité de l'acétylcholinestérase est inhibée dès 1 jour et demi, puis elle augmente à partir de 5 jours (Barillet *et al.*, 2007). Lors de nos expériences qui ont consisté à suivre l'expression de gènes impliqués dans la réponse neuronale, nous avons observé que le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine est induit dès 3 jours d'exposition à la faible concentration en uranium. Ce transporteur prend en charge l'acétylcholine dans les vésicules synaptiques. Une fois libérée dans la fente synaptique, l'acétylcholinestérase hydrolyse et désactive l'acétylcholine, régulant ainsi la concentration du neurotransmetteur dans la synapse. Ces résultats, obtenus pour des temps d'exposition courts à faible concentration, sont le signe d'une perturbation du système cholinergique. A des temps plus longs et à une concentration plus élevée, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase compenserait un taux d'acétylcholine trop élevé dans la synapse (réponse adaptative) ou viendrait perturber, par une action inappropriée, la transmission (réponse inopportune, conséquence de la toxicité de l'uranium).

Le système cholinergique serait également une cible de la toxicité de l'uranium chez le rat. L'uranium serait responsable de l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase et par conséquent de perturbations comportementales (Bensoussan *et al.*, 2009).

La perturbation du métabolisme de la dopamine chez le rat (Bussy *et al.*, 2006) ou la génération d'un stress oxydant (Lestaevel *et al.*, 2009) seraient également liées à la neurotoxicité de l'uranium. En outre, une corrélation positive est observée entre les capacités locomotrices du rat et l'augmentation des lipides peroxydés (Briner et Murray, 2005). En effet, le taux de lipides peroxydés reflète l'intensité des dommages membranaires et éventuellement des phénomènes de dégénérescence neuronale.

Effets de l'uranium sur la balance oxydative

A partir de 20 jours d'exposition à 100 µg/L d'uranium appauvri (correspondant à la concentration élevée dans nos expériences), une inhibition significative de l'activité de la superoxyde dismutase est observée ainsi qu'une tendance à l'inhibition de l'activité de la catalase dans les extraits hépatiques de poisson zèbre (Barillet *et al.*, 2007). Ces résultats démontrent que l'activité anti-oxydante serait amoindrie et que la balance pencherait en faveur d'un état pro-oxydant. Nos résultats montrent une induction de gènes codant pour la superoxyde dismutase cytoplasmique et mitochondriale ainsi que pour la catalase au niveau du foie des individus exposés à la faible concentration : 20 µg/L, pendant 28 jours. De telles inductions laissent penser qu'une compensation par l'activité des enzymes neutralisantes des espèces réactives de l'oxygène s'établit. Cette réponse correspondrait donc à la mise en place d'un mécanisme compensatoire. Pour une exposition plus forte à 100 µg/L, une répression importante de la catalase est observée à 21 jours et les réponses transcriptionnelles d'autres gènes impliqués dans la balance oxydative ne sont pas modifiées. Nos résultats sont donc en accord avec ceux précédemment obtenus par Sabrina Barillet mettant en évidence une inhibition des enzymes anti-oxydantes et notamment de la catalase à 20 jours d'exposition à 100 µgU/L. En effet, les enzymes superoxyde dismutase et catalase sont paradoxalement endommagées par les radicaux libres, et seule une augmentation de la synthèse protéique,

autorisée par une augmentation de l'expression génique, peut rendre compte d'une permanence homéostatique des concentrations de ces enzymes. La mise en place d'un mécanisme compensatoire pour la faible concentration souligne ici la sensibilité de l'échelle transcriptionnelle. Nos résultats ainsi que ceux de Barillet, en 2007, mettent en avant la perturbation de la balance oxydative à la suite d'une contamination à l'uranium dans le foie. Les résultats d'expression de gènes obtenus dans les branchies et les lésions des lamelles branchiales (Barillet, 2007) suggèrent également une perturbation de ce processus ainsi qu'une réponse inflammatoire dans les branchies du poisson.

Toxicité et métabolisme mitochondrial

Les effets de l'uranium sur le métabolisme mitochondrial sont peu documentés dans la littérature. Cependant, quelques travaux se sont focalisés sur un dysfonctionnement de ce mécanisme dans la problématique de la néphrotoxicité de l'uranium. L'uranium inhiberait l'utilisation de l'ATP ainsi que le transport de solutés ayant pour conséquences des dysfonctionnements rénaux. Une étude parue en 1989 met en évidence l'inhibition de la respiration mitochondriale ainsi que l'activité de la pompe $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase (Brady *et al.*, 1989). Plus récemment, une analyse SAGE réalisée au niveau des reins de souris exposées au nitrate d'uranyle met en évidence une induction de 10 gènes codant pour plusieurs complexes de la chaîne respiratoire (Taulan *et al.*, 2004). Par comparaison aux autres processus biologiques cités dans l'étude, un grand nombre de gènes différenciellement exprimés sont répertoriés dans ce mécanisme, soulignant son importance. Ces résultats ne sont pas interprétés ou discutés par les auteurs (Taulan *et al.*, 2004). Dans notre étude, des inductions de gènes codant pour des complexes de la chaîne apparaissent au niveau des muscles du poisson dès les premiers jours pour les deux conditions d'exposition. Pour des temps d'exposition plus longs, des mesures de respiration mitochondriale révèlent une diminution du

contrôle respiratoire. Ces observations montrent que le fonctionnement de la chaîne respiratoire est affecté par une exposition à une faible concentration en uranium. Par conséquent, le métabolisme mitochondrial serait un mécanisme sensible à une exposition à l'uranium pertinente d'un point de vue environnemental dans le cerveau et les muscles des poissons.

Faibles concentrations vs fortes concentrations

Les modifications moléculaires révélatrices des premiers signes de stress ont été étudiées dans le cadre d'expositions à de faibles concentrations qui sont 30 à 150 fois moins fortes que la dose létale 50 à 96 h chez le poisson zèbre (i.e. 3 mgU/L d'après Labrot *et al.*, 1996).

Le stress cellulaire se traduit par une perturbation du fonctionnement normal de la cellule. Lorsque les systèmes parviennent à neutraliser ces perturbations, la réponse à un stress cellulaire peut être considérée comme adaptative : elle correspond au maintien de l'homéostasie cellulaire. Si les désordres persistent et que les systèmes de régulations ou de défenses sont dépassés, les perturbations auront probablement des conséquences délétères.

La difficulté dans l'évaluation des effets à l'échelle subcellulaire réside dans l'estimation du caractère adaptatif ou délétère des perturbations.

Lors de nos différents travaux, nous avons constaté, pour la faible concentration d'exposition, des modifications de mécanismes à travers les approches transcriptionnelles et fonctionnelles.

Des études antérieures montrent que certains effets sont plus importants pour une concentration plus forte : augmentation des dommages à l'ADN à 20 jours d'exposition à 500 µg/L (Barillet *et al.*, 2007) ou diminution de la synthèse de la vitellogénine chez les femelles après 20 jours d'exposition à 250 µg/L d'uranium (Bourrachot, 2009). A une échelle d'organisation biologique supérieure, des études menées sur les jeunes stades de vie du

poisson mettent en évidence un retard d'éclosion pour l'exposition à 250 µg/L. Ce retard n'est pas observé pour les expositions à 20, 50, 100 et 150 µgU/L (Bourrachot *et al.*, 2009). Les effets de la concentration d'exposition dépendent des paramètres étudiés, du niveau d'organisation biologique et, de façon évidente, du stade de vie de l'organisme. Les modifications transcriptionnelles et protéiques restent les plus sensibles dans le cadre d'une exposition à faible concentration. De plus, chez les individus exposés à 20 et 100 µg/L, les dommages observés au niveau de l'ultrastructure de la neuropile du bulbe olfactif et des cellules musculaires montrent la pertinence de cet examen pour les faibles concentrations.

Dans le cadre de nos recherches et de celles effectuées précédemment au laboratoire, les résultats montrent la pertinence d'études couplées comprenant les niveaux d'ARNm, la synthèse protéique, l'activité enzymatique et l'ultrastructure cellulaire afin d'appréhender, le plus rigoureusement possible, les processus affectés par une exposition à l'uranium à de faibles concentrations.

Sensibilité de la réponse transcriptionnelle

Dans le cadre d'expositions à de faibles concentrations en uranium le suivi de la réponse transcriptionnelle est apparu comme particulièrement sensible dans la réponse des cellules au stress pour des concentrations tissulaires modérées. Lors de l'analyse de la réponse transcriptionnelle à grande échelle dans le cerveau du poisson, dès 3 et 10 jours d'exposition, 56 gènes sont différenciellement exprimés. Une réponse plus importante de gènes est observée pour la faible concentration correspondant à la valeur conseillée par l'organisation mondiale de la santé : 15 µgU/L. L'intensité de la réponse transcriptionnelle est plus importante pour la faible concentration. Dans le cerveau des organismes exposés à la faible concentration, des répressions de gènes impliqués dans la réception olfactive (i.e. *or111-7*, *or102-5*), l'adhésion cellulaire (*ncam3*) ou le transport ionique (i.e. *atp1a1a.4*) sont constatées. L'analyse

transcriptionnelle est très informative pour les faibles concentrations. Par exemple, la répression de gènes codant pour des récepteurs de l'olfaction suggère une perturbation du système olfactif. De plus, les dommages observés sur l'ultrastructure du bulbe olfactif (dilatations de la neuropile) corroborent ces résultats et illustrent des atteintes à un niveau d'organisation biologique supérieur. Ces résultats sont en accord avec des études montrant que le système olfactif des poissons serait une partie du cerveau sensible à des expositions métalliques (Cd, Cu) par voie directe (Moran *et al.*, 1992, Hansen *et al.*, 1999, Blechinger *et al.*, 2007).

Lors de nos expériences de dépuración, la réponse de gènes impliqués dans les mécanismes de détoxicación, les mécanismes apoptotiques ainsi que dans la réponse inflammatoire sont fortement induits dans le foie des individus préalablement exposés à 100 µg/L et induits dans une moindre mesure chez ceux préalablement exposés à la faible concentration : 20 µg/L d'uranium. D'autre part, les concentrations tissulaires chutent entre le 28^{ème} jour de contamination et le 8^{ème} jour de dépuración pour atteindre les valeurs mesurées dans le foie des témoins. Plus précisément, les valeurs chutent de 512 à 81 et de 2599 à 371 ngU/g dans le foie des organismes préalablement exposés à C1 et C2 respectivement. Ces résultats suggèrent que les mécanismes moléculaires se mettent en place en réponse à un stress lorsque les concentrations tissulaires sont modérées c'est-à-dire après 8 jours d'une phase de dépuración. Lors de notre première expérience, aucun des gènes étudiés dans le cerveau, les muscles et le foie des poissons n'est différentiellement exprimé après 28 jours d'exposition à 100 µg/L d'uranium. Cette condition d'analyse correspond à une concentration accumulée très élevée dans le foie (2599 ngU/g) et à la concentration accumulée la plus importante dans le cerveau (476 ngU/g) et les muscles (707 ngU/g). Les résultats montrent que la réponse transcriptionnelle retourne à son état basal pour des concentrations tissulaires élevées dans le cerveau, les muscles et le foie des poissons. Ces observations sont interprétées

comme un dysfonctionnement de la mise en place de processus cellulaires dans la réponse au stress.

Ainsi, la vision selon laquelle plus les concentrations sont fortes, plus les réponses de gènes attendues sont des surexpressions élevées est à nuancer. En effet, plutôt qu'une linéarité de la réponse des systèmes biologiques en fonction de la concentration en toxique, c'est-à-dire une augmentation de leur intensité avec le degré de contamination, il convient d'adopter une nouvelle vision de l'écotoxicologie, en admettant que la nature des réponses varie selon la pression de contamination à de très faibles concentrations environnementales ; le dogme liant l'intensité de la réponse aux doses de toxiques restant vrai aux hautes doses. D'ailleurs, des résultats obtenus chez la souris exposée à l'uranium (Taulan *et al.*, 2004, 2006) montrent que l'expression génique dans le rein est fort différente selon que le mode d'exposition est aigu (forte dose appliquée sur un court laps de temps) ou chronique (faible dose appliquée pendant plusieurs mois).

Perspectives

Ces travaux ouvrent plusieurs perspectives. Ils sont la base pour de nombreux axes de recherches comme la réversibilité des effets, la comparaison des réponses observées avec une approche *in situ*, les mécanismes de neurotoxicité de l'uranium ainsi que les effets sur la transmission au niveau des jonctions neuromusculaires.

La réversibilité des effets

Dans le prolongement des résultats obtenus, il serait intéressant d'étudier la réversibilité des effets lors d'une phase de dépuration. Cet axe de recherche pourrait s'orienter sur le cerveau, les muscles, le foie et les branchies du poisson. Une étude de la réversibilité des effets sur ces organes à travers l'évolution des dommages liés à un stress oxydatif, les mécanismes de détoxification et l'état de l'ultrastructure tissulaire serait pertinente.

Jonctions neuromusculaires

La jonction musculaire est une structure de communication extrêmement importante pour la locomotion de l'organisme permise par le contact nerf-muscle et dans l'organisation du système nerveux périphérique. Chez les mammifères un motoneurone innerve une fibre musculaire permettant la commande très fine du système. La jonction neuromusculaire est une plaque motrice, une synapse où la molécule la plus importante est le récepteur nicotinique de l'acétylcholine. Il est important pour la cellule de posséder une grande quantité de ces récepteurs. En outre, des molécules sont impliquées dans le recrutement de ces récepteurs. Chez le poisson zèbre exposé à l'uranium nos résultats et ceux de Barillet en 2007 révèlent une perturbation du système cholinergique dans le système nerveux central. Le projet de recherche envisagé consisterait à évaluer les perturbations de ce système dans les jonctions

neuromusculaires du système nerveux périphérique. En particulier, sur la base de nos travaux réalisés dans le cerveau et les muscles des poissons, un travail très intéressant serait l'estimation des récepteurs nicotiques au niveau de la membrane postsynaptique de l'acétylcholine en utilisant des toxines de serpent préalablement marquées.

Neurotoxicité

Dans un premier temps, il serait important de caractériser le passage de l'uranium dans le cerveau. Par exemple, la mesure de la concentration en uranium dans le lobe olfactif en comparaison d'autres parties cérébrales pourrait directement compléter notre étude. Une expérience envisageable consisterait à mesurer la distribution de l'uranium dans les différentes parties du cerveau lors d'une exposition par l'eau et par l'alimentation. D'une part cette étude permettrait d'évaluer les sites privilégiés de l'accumulation en uranium dans le cerveau et d'autre part d'estimer l'importance du passage de la barrière olfactive par rapport au passage de la barrière hémato-encéphalique.

Dans un second temps, la caractérisation des effets sur le système olfactif serait judicieuse. Un marqueur spécifique du système olfactif (OMP chez *Danio rerio*) permettrait de visualiser par immunohistologie l'état des neurones et, en particulier, des récepteurs. L'examen, au microscope électronique à transmission, de l'ultrastructure de l'épithélium olfactif (constituant la rosette olfactive) pourrait compléter ces travaux.

Enfin, le comportement serait un bon sujet d'étude dans la poursuite de nos travaux, car il intègre les mécanismes sous-jacents. La fonction olfactive du poisson pourrait être examinée dans une expérience visant à caractériser la réaction du poisson en présence d'une « substance d'alarme ». Une étude portant sur l'olfaction et la reproduction du poisson zèbre exposé à l'uranium serait intéressante. En effet, des études récentes ont montré une diminution du succès reproducteur des poissons exposés par voie directe à l'uranium

(Bourrachot, 2009). De plus, plusieurs réponses endocriniennes impliquées dans la reproduction sont régulées et initiées par les neurones de l'olfaction chez les poissons (Tierney *et al.*, 2009). Les effets d'une exposition par voie directe à l'uranium sur l'expression de gènes et la sécrétion d'hormones par les neurones de l'olfaction impliqués dans la régulation de la fonction de reproduction permettraient d'étayer les mécanismes sous-jacents relatifs à la perturbation de la physiologie de reproduction des organismes. En outre, les neurones à GnRH se développent au niveau de l'épithélium olfactif puis migrent dans la partie antérieure du cerveau et notamment dans le bulbe olfactif.

En raison des dommages observés sur les fibres musculaires et des perturbations bioénergétiques mitochondriales relevées, l'étude de la vitesse de nage ferait l'objet d'une autre analyse comportementale intéressante.

Références

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for uranium. *Department of Health Services* **1999**, Atlanta, U.S.
- Antunes, S. C.; Pereira, R.; Gonçalves, F. Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **2007**, *53*, 207-213.
- Barber, D. S.; Ehrich, M. F.; Jortner, B. S. The effect of stress on the temporal and regional distribution of uranium in rat brain after acute uranyl acetate exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* **2005**, *68*, 99-111.
- Barillet, S. Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). *Thèse IRSN/Université Paul Verlaine de Metz* **2007**.
- Barillet, S.; Adam, C.; Palluel, O.; Devaux, A. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2007**, *26*, 497-505.
- Barillet, S.; Buet, A.; Adam, C.; Devaux, A. Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection Suppl.1* **2005**, *40*, S175-S180.
- Barth, A. L.; Justice, N. J.; Ngai, J. Asynchronous onset of odorant receptor expression in the developing zebrafish olfactory system. *Neuron* **1996**, *16*, 23-34.
- Bem, H.; Bou-Rabee, F. Environmental and health consequences of depleted uranium use in the 1991 Gulf War. *Environment International* **2004**, *30*, 123-134.
- Bensoussan, H.; Grandcolas, L.; Dhieux-Lestaevel, B.; Delissen, O.; Vacher, C. M.; Dublineau, I.; Voisin, P.; Gourmelon, P.; Taouis, M.; Lestaevel, P. Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure. *Toxicology* **2009**, *261*, 59-67.
- Berradi, H.; Bertho, J. M.; Dudoignon, N.; Mazur, A.; Grandcolas, L.; Baudelin, C.; Grison, S.; Voisin, P.; Gourmelon, P.; Dublineau, I. Renal anemia induced by chronic ingestion of depleted uranium in rats. *Toxicological Sciences* **2008**, *103*, 397-408.
- Blechinger, S. R.; Kusch, R. C.; Haugo, K.; Matz, C.; Chivers, D. P.; Krone, P. H. Brief embryonic cadmium exposure induces a stress response and cell death in the developing olfactory system followed by long-term olfactory deficits in juvenile zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2007**, *224*, 72-80.
- Bleise, A.; Danesi, P. R.; Burkart, W. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): A general overview. *Journal of Environmental Radioactivity* **2003**, *64*, 93-112.
- Bonin, B.; Blanc, P. L. L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine (Chapitre 1). *L'uranium de l'environnement à l'homme* **2001**, EDP science, p. 7-42.

- Bourrachot, S. Etude des effets biologiques de l'exposition à l'uranium chez le poisson zèbre (*D. rerio*). Impact sur les stades de vie. *Thèse IRSN/Université de provence*. **2009**.
- Bourrachot, S.; Simon, O.; Gilbin, R. The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* **2008**, *90*, 29-36.
- Brady, H. R.; Kone, B. C.; Brenner, R. M.; Gullans, S. R. Early effects of uranyl nitrate on respiration and K⁺ transport in rabbit proximal tubule. *Kidney International* **1989**, *36*, 27-34.
- Briner, W.; Murray, J. Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats. *Neurotoxicology and Teratology* **2005**, *27*, 135-144.
- Buet, A.; Barillet, S.; Camilleri, V. Changes in oxidative stress parameters in fish as response to direct uranium exposure. *Radioprotection, Suppl. 1* **2005**, *40*, S151-S155.
- Bussy, C.; Lestaevel, P.; Dhieux, B.; Amourette, C.; Paquet, F.; Gourmelon, P.; Houpert, P. Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *NeuroToxicology* **2006**, *27*, 245-252.
- Bywater, J. F.; Banackowski, R.; Bailey, M. Sensitivity to uranium of six species of tropical freshwater fishes and four species of cladocerans from Northern Australia. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1991**, *10*, 1449-1458.
- Cambier, S.; Bénard, G.; Mesmer-Dudons, N.; Gonzalez, P.; Rossignol, R.; Brèthes, D.; Bourdineaud, J. P. At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **2009**, *41*, 791-799.
- Clulow, F. V.; Dave, N. K.; Lim, T. P.; Avadhanula, R. Radionuclides (lead-210, polonium-210 thorium-230, and -232) and thorium and uranium in water, sediments, and fish from lakes near the city of Elliot Lake, Ontario, Canada. *Environmental Pollution* **1998**, *99*, 199-213.
- Colle, C.; Garnier-Laplace, J.; Roussel-Debet, S. Comportement de l'uranium dans l'environnement (Chapitre 6). *L'uranium de l'environnement à l'homme* **2001**, *EDP Science*, p. 187-212.
- Cooley, H. M.; Klaverkamp, J. F. Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* **2000a**, *48*, 477-494.
- Cooley, H. M.; Evans, R. E.; Klaverkamp, J. F. Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* **2000b**, *48*, 495-515.
- Coryell, V. H.; Stearns, D. M. Molecular analysis of hprt mutations generated in Chinese hamster ovary EM9 cells by uranyl acetate, by hydrogen peroxide, and spontaneously. *Molecular Carcinogenesis* **2006**, *45*, 60-72.

- Denison, F. Uranium(VI) speciation : modelling, uncertainty and relevance to bioavailability models. Application to uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve. Université de Provence Aix-Marseille I, 2004.
- De Stefano, C., Gianguzza, A., Pettignano, A., and Sammartano, S. (2005). Interaction of UO_2^{2+} with ATP in aqueous ionic media. *Biophysical Chemistry* **117**, 147-153.
- Environnement-Canada. Liste des substances d'intérêt prioritaire *Rejets de radionucléides des installations nucléaires* **2003**, Rapport d'évaluation.
- Favier, A. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique - Mécanismes biochimiques* - **2003**, 108-115.
- Frengstad, B.; Midtgard Skrede, A. K.; Banks, D.; Reidar Krog, J.; Siewers, U. The chemistry of Norwegian groundwaters: III. The distribution of trace elements in 476 crystalline bedrock groundwaters, as analysed by ICP-MS techniques. *Science of the Total Environment* **2000**, 246, 21-40.
- Friedrich, J. Uranium contamination of the Aral Sea. *Journal of Marine Systems* **2009**, 76, 322-335.
- Garnier-Laplace, J.; Paquet, P. Radioprotection de l'ENVironnement à l'HOMme (ENVIRHOM) – Bioaccumulation de radionucléides dans des situations d'exposition chronique des écosystèmes et des personnes du public. *IPSN*: **2001**; p 63.
- Gonzalez, P.; Baudrimont, M.; Boudou, A.; Bourdineaud, J. P. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *BioMetals* **2006**, 19, 225-235.
- Gonzalez, P.; Dominique, Y.; Massabuau, J. C.; Boudou, A.; Bourdineaud, J. P. Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Technology* **2005**, 39, 3972-3980.
- Gottesman, M. M.; Pastan, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual Review of Biochemistry* **1993**, 62, 385-427.
- Gu, C.; Chen, S.; Xu, X.; Zheng, L.; Li, Y.; Wu, K.; Liu, J.; Qi, Z.; Han, D.; Chen, G.; Huo, X. Lead and cadmium synergistically enhance the expression of divalent metal transporter 1 protein in central nervous system of developing rats. *Neurochemical Research* **2009**, 34, 1150-1156.
- Guéguen, Y.; Souidi, M.; Baudelin, C.; Dudoignon, N.; Grison, S.; Dublineau, I.; Marquette, C.; Voisin, P.; Gourmelon, P.; Aigueperse, J. Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Archives of Toxicology* **2006**, 80, 187-195.

- Hansen, J. A.; Rose, J. D.; Jenkins, R. A.; Gerow, K. G.; Bergman, H. L. Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to copper: Neurophysiological and histological effects on the olfactory system. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1999**, *18*, 1979-1991.
- Helmer, D. A.; Rossignol, M.; Blatt, M.; Agarwal, R.; Teichman, R.; Lange, G. Health and exposure concerns of veterans deployed to Iraq and Afghanistan. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* **2007**, *49*, 475-480.
- Holdway, D. A. Uranium toxicity to two species of Australian tropical fish. *Science of the Total Environment* **1992**, *125*, 137-158.
- Houpert, P.; Frelon, S.; Monleau, M.; Bussy, C.; Chazel, V.; Paquet, F. Heterogeneous accumulation of uranium in the brain of rats. *Radiation Protection Dosimetry* **2007**, *127*, 86-89.
- ISO (International Organization for Standardization). Norme ISO 7346-1 relative à la qualité de l'eau: Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téléostei, Cyprinidae)] - Partie 1: Méthode statique. **1996a**.
- ISO (International Organization for Standardization). Norme ISO 7346-2 relative à la qualité de l'eau: Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téléostei, Cyprinidae)] - Partie 2: Méthode semi-statique. **1996b**.
- ISO (International Organization for Standardization). Norme ISO 7346-3 relative à la qualité de l'eau: Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téléostei, Cyprinidae)] - Partie 3: Méthode avec renouvellement continu. **1996c**.
- Korsching, S. I.; Argo, S.; Campenhausen, H.; Friedrich, R. W.; Rummrich, A.; Weth, F. Olfaction in zebrafish: What does a tiny teleost tell us? *Seminars in Cell and Developmental Biology* **1997**, *8*, 181-187.
- Kratz, S.; Schnug, E. Rock phosphates and P fertilizers as sources of U contamination in agricultural soils. In *Uranium in the Environment*; 2006; pp 57-67.
- Kurttio, P.; Auvinen, A.; Salonen, L.; Saha, H.; Pekkanen, J.; Mäkeläinen, I.; Väisänen, S. B.; Penttilä, I. M.; Komulainen, H. Renal effects of uranium in drinking water. *Environmental Health Perspectives* **2002**, *110*, 337-342.
- Kurttio, P.; Harmoinen, A.; Saha, H.; Salonen, L.; Karpas, Z.; Komulainen, H.; Auvinen, A. Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *American Journal of Kidney Diseases* **2006**, *47*, 972-982.
- Labrot, F.; Narbonne, J. F.; Ville, P.; Saint Denis, M.; Ribera, D. Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **1999**, *36*, 167-78.

- Labrot, F.; Ribera, D.; Saint-Denis, M.; Narbonne, J. F. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinestérase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers* **1996**, *1*, 21-28.
- Leggett, R. W. The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: A reassessment. *Health Physics* **1989**, *57*, 365-383.
- Lemercier, V.; Millot, X.; Ansoborlo, E.; Ménétrier, F.; Flüry-Hérard, A.; Rousselle, C.; Scherrmann, J. M. Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiation Protection Dosimetry* **2003**, *105*, 243-245.
- Lestaevel, P.; Bussy, C.; Paquet, F.; Dhieux, B.; Clarençon, D.; Houpert, P.; Gourmelon, P. Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicology and Teratology* **2005**, *27*, 835-840.
- Lestaevel, P.; Romero, E.; Dhieux, B.; Ben Soussan, H.; Berradi, H.; Dublineau, I.; Voisin, P.; Gourmelon, P. Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats. *Toxicology* **2009**, *258*, 1-9.
- Madic, C.; Genet, M. Propriétés physiques et chimiques de l'uranium (Chapitre 2). *L'uranium de l'environnement à l'homme* **2001**, EDP science, p.43-82.
- Mao, Y.; Desmeules, M.; Schaubel, D.; Bérubé, D.; Dyck, R.; Brûlé, D.; Thomas, B. Inorganic components of drinking water and microalbuminuria. *Environmental Research* **1996**, *71*, 135-140.
- Martinez, A. B.; Mandalunis, P. M.; Bozal, C. B.; Cabrini, R. L.; Ubios, A. M. Renal function in mice poisoned with oral uranium and treated with ethane-1-hydroxy-1,1-bisphosphonate (EHBP). *Health Physics* **2003**, *85*, 343-347.
- Matz, C. J.; Krone, P. H. Cell death, stress-responsive transgene activation, and deficits in the olfactory system of larval zebrafish following cadmium exposure. *Environmental Science and Technology* **2007**, *41*, 5143-5148.
- Michon, J.; Frelon, S.; Garnier, C.; Coppin, F. Fluorescence Quenching Determination of Uranium(VI) Binding Properties by Four Metalloproteins (Human Serum Transferrin - Human Serum Albumin - Rabbit Liver Metallothionein - Equine Spleen Ferritin). *Journal of Fluorescence* **submitted**.
- Miller, A. C.; Stewart, M.; Brooks, K.; Shi, L.; Page, N. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: Absence of significant alpha particle decay. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2002**, *91*, 246-252.
- Miller, A. C.; Xu, J.; Stewart, M.; Brooks, K.; Hodge, S.; Shi, L.; Page, N.; McClain, D. Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: Dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints. *Radiation Protection Dosimetry* **2002**, *99*, 275-278.

- Monleau, M.; Bussy, C.; Lestaevel, P.; Houpert, P.; Paquet, F.; Chazel, V. Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations. *Neuroscience Letters* **2005**, *390*, 31-36.
- Monleau, M.; De Méo, M.; Paquet, F.; Chazel, V.; Duménil, G.; Donnadiou-Claraz, M. Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicological Sciences* **2006**, *89*, 287-295.
- Morello, M.; Cavalié, I.; Grasset, G.; *et al.* Uranium: propriétés des isotopes et méthodes de dosage susceptibles d'être mises en oeuvre au Laboratoire de Radioécologie Expérimentale. IRSN/DEI/SECRE. *Rapport DPRE-SERLAB-01-45*. **2001**.
- Muller, D.; Houpert, P.; Cambar, J.; Hengé-Napoli, M. H. Role of the sodium-dependent phosphate co-transporters and of the phosphate complexes of uranyl in the cytotoxicity of uranium in LLC-PK1 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2006**, *214*, 166-177.
- Muller, D. S.; Houpert, P.; Cambar, J.; Hengé-Napoli, M. H. 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. *Toxicological Sciences* **2008**, *101*, 254-262.
- Nechay, B. R.; Thompson, J. D.; Saunders, J. P. Inhibition by uranyl nitrate of adenosine triphosphatases derived from animal and human tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1980**, *53*, 410-419.
- OCDE (Organisation for Economic Co-operation and Development). OCDE guidelines for testing of chemicals, advance copy. *Test 203: Fish, acute toxicity test, OCDE/ed.* **2004a**.
- OCDE (Organisation for Economic Co-operation and Development). OCDE guidelines for testing of chemicals, advance copy. *Test 204: Fish, prolonged toxicity tes: 14 day studyt, OCDE/ed.* **2004b**.
- OCDE (Organisation for Economic Co-operation and Development). OCDE guidelines for testing of chemicals, advance copy. *Test 210: Fish, earl- life stage toxicity test, OCDE/ed.* **2004c**.
- Orloff, K. G.; Mistry, K.; Charp, P.; Metcalf, S.; Marino, R.; Shelly, T.; Melaro, E.; Donohoe, A. M.; Jones, R. L. Human exposure to uranium in groundwater. *Environmental Research* **2004**, *94*, 319-326.
- Ostrander, G. K.; Bullock, G.; Bunton, T. E. The Laboratory Fish (Handbook of Experimental Animals) **2000**.
- Parkhurst, B. R.; Elder, R. G.; Meyer, J. S. An environmental hazard evaluation of uranium in a Rocky Mountain stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1984**, *3*, 113-124.

- Pellmar, T.; Fuciarelli, A.; Ejniak, J.; Hamilton, M.; Hogan, J.; Strocko, S.; Emond, C.; Mottaz, H.; Landauer, M. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicological Sciences* **1999**, *49*, 29-39.
- Poston, T. M. Observations on the bioaccumulation potential of thorium and uranium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **1982**, *28*, 682-690.
- Pyle, G. G.; Swanson, S. M.; Lehmkuhl, D. M. Toxicity of uranium mine receiving waters to early life stage fathead minnows (*Pimephales promelas*) in the laboratory. *Environmental Pollution* **2002**, *116*, 243-255.
- Ribera, D.; Labrot, F.; Tisnerat, G.; Narbonne, J. F. Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects. *Reviews of environmental contamination and toxicology* **1996**, *146*, 53-89.
- Rouleau, C.; Borg-Neczak, K.; Gottofrey, J.; Tjälve, H. Accumulation of Waterborne Mercury(II) in Specific Areas of Fish Brain. *Environmental Science and Technology* **1999**, *33*, 3384 - 3389.
- Salazar, J.; Mena, N.; Hunot, S.; Prigent, A.; Alvarez-Fischer, D.; Arredondo, M.; Duyckaerts, C.; Sazdovitch, V.; Zhao, L.; Garrick, L. M.; Nuñez, M. T.; Garrick, M. D.; Raisman-Vozari, R.; Hirsch, E. C. Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 18578-18583.
- Sato, Y.; Miyasaka, N.; Yoshihara, Y. Hierarchical regulation of odorant receptor gene choice and subsequent axonal projection of olfactory sensory neurons in zebrafish. *Journal of Neuroscience* **2007**, *27*, 1606-1615.
- Sheppard, S. C.; Sheppard, M. I.; Gallerand, M. O.; Sanipelli, B. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity* **2005**, *79*, 55-83.
- Souidi, M.; Guéguen, Y.; Linard, C.; Dudoignon, N.; Grison, S.; Baudelin, C.; Marquette, C.; Gourmelon, P.; Aigueperse, J.; Dublineau, I. In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* **2005**, *214*, 113-122.
- Stearns, D. M.; Yazzie, M.; Bradley, A. S.; Coryell, V. H.; Shelley, J. T.; Ashby, A.; Asplund, C. S.; Lantz, R. C. Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis* **2005**, *20*, 417-423.
- Swanson, S. M. Food-chain transfer of U-series radionuclides in a northern Saskatchewan aquatic system. *Health Phys* **1985**, *49*, 747-70.
- Tarzwell, C. M.; Henderson, C. Toxicity of less common metals to fishes. *Industrial Wastes* **1960**, *5*.

- Taulan, M.; Paquet, F.; Argiles, A.; Demaille, J.; Romey, M. C. Comprehensive analysis of the renal transcriptional response to acute uranyl nitrate exposure. *BMC Genomics* **2006**, *7*.
- Taulan, M.; Paquet, F.; Maubert, C.; Delissen, O.; Demaille, J.; Romey, M. C. Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environmental Health Perspectives* **2004**, *112*, 1628-1635.
- Taylor, E. M.; Morgan, E. H. Role of transferrin in iron uptake by the brain: a comparative study. *Journal of Comparative Physiology B* **1991**, *161*, 521-524.
- Tierney, K. B., Baldwin, D. H., Hara, T. J., Ross, P. S., Scholz, N. L., and Kennedy, C. J. Olfactory toxicity in fishes. *Aquatic Toxicology* **2010**, *96*, 2-26.
- Tommasini, R.; Vogt, E.; Fromenteau, M.; Hörtensteiner, S.; Matile, P.; Amrhein, N.; Martinoia, E. An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant Journal* **1998**, *13*, 773-780.
- Tournier, B. B.; Frelon, S.; Turlonias, E.; Agez, L.; Delissen, O.; Dublineau, I.; Paquet, F.; Petitot, F. Role of the olfactory receptor neurons in the direct transport of inhaled uranium to the rat brain. *Toxicology Letters* **2009**, *190*, 66-73.
- Tran, D.; Bourdineaud, J. P.; Massabuau, J. C.; Garnier-Laplace, J. Modulation of uranium bioaccumulation by hypoxia in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: Induction of multixenobiotic resistance protein and heat shock protein 60 in gill tissues. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2005**, *24*, 2278-2284.
- Vidaud, C.; Dedieu, A.; Basset, C.; Plantevin, S.; Dany, I.; Pible, O.; Quéméneur, E. Screening of human serum proteins for uranium binding. *Chemical Research in Toxicology* **2005**, *18*, 946-953.
- Vidaud, C.; Gourion-Arsiquaud, S.; Rollin-Genetet, F.; Torne-Celer, C.; Plantevin, S.; Pible, O.; Berthomieu, C.; Quéméneur, E. Structural consequences of binding of UO_2^{2+} to apotransferrin: Can this protein account for entry of uranium into human cells? *Biochemistry* **2007**, *46*, 2215-2226.
- Waite, D. T.; Joshi, S. R.; Sommerstad, H. The effect of uranium mine tailings on radionuclide concentrations in Langley Bay, Saskatchewan, Canada. *Arch Environ Contam Toxicol* **1988**, *17*, 373-80.
- Weigel, F.; Hellmann, H. On some sulphates of hevalent neptunium and plutonium. *Journal of The Less-Common Metals* **1986**, *121*, 415-423.
- Wheater, P. R.; Young, B.; Heath, J. W. Histologie fonctionnelle. *De Boeck & Larcier* **2001**.
- WHO (World Health Organization) Depleted uranium: Sources, exposure and health effects. WHO/SDE/PHE/01.1, **2001**.

WHO (World Health Organization). Guidelines for drinking-water quality, third edition. Geneva, **2004**, 197-209.

Wulliman, M. F.; Rupp, B.; Reichert, H. Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas. *Birkhäuser Verlag* **1996**.

Résumé

Ces travaux de thèse s'insèrent dans le cadre général de l'étude des effets biologiques de l'uranium chez le poisson zèbre *Danio rerio* exposé par voie directe à de faibles concentrations d'uranium (20 et 100 µg/L).

Lors d'une première expérience de contamination de 28 jours suivie d'une phase de dépuración de 8 jours, l'étude des profils d'expression de 20 gènes impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires a permis d'identifier la nature des effets potentiels d'une exposition à l'uranium dans quatre organes, le cerveau, le foie, les muscles et les branchies, en relation avec la bioaccumulation de l'uranium. Le foie et les branchies accumulent de fortes concentrations d'uranium et sont le siège d'une dépuración efficace alors que l'inverse est observé pour les muscles et le cerveau. L'exposition à l'uranium induit une réponse tardive dans le foie (inflammation, apoptose et détoxication) et les branchies (balance oxydative) et à l'opposé, une réponse précoce est observée dans le cerveau (réponse neuronale) et les muscles (métabolisme mitochondrial). Le cerveau et les muscles apparaissent donc comme des organes sensibles pour lesquels les capacités de défense sont dépassées au-delà de concentrations tissulaires faibles.

Une étude plus approfondie a porté sur ces deux organes, en termes d'altération fonctionnelle et protéique du métabolisme mitochondrial. Une altération du couplage énergétique de la chaîne respiratoire pour les faibles doses, une variation du contenu protéique (induction des sous-unités I et IV de la cytochrome *c* oxydase) ainsi que des dommages histologiques (dilatation et vacuolisation du tissu musculaire) sont observés. Une autre étude s'est focalisée sur le cerveau et les effets précoces d'une exposition à l'uranium à travers l'analyse des perturbations transcriptionnelles et de l'ultrastructure du bulbe olfactif. Une répression de gènes codant pour les récepteurs de l'olfaction *or111-7* et *or102-5* est observée dès 3 jours d'exposition à la plus faible concentration. Ces réponses et les lésions histologiques observées suggèrent que le système olfactif serait sensible à une exposition à l'uranium.

Mots clés: Poisson zèbre *Danio rerio*, uranium, bioaccumulation, mécanismes de stress, système nerveux central, voie olfactive, bioénergétique mitochondriale, histopathologies.

Abstract

This research explored several biological effects of uranium (U) in zebrafish exposed to low waterborne uranium concentrations (20 and 100 µg/L).

In tissue specific study (brain, liver, skeletal muscles and gills) of transcriptional responses in 20 genes identified the nature of the potential U effects during 28 days of exposure followed by an 8-day depuration phase in connection with U bioaccumulation. Liver and gills accumulate high concentrations of U and the depuration is efficient contrary to the brain and muscles. U exposure induced a later response in liver (inflammatory process, apoptosis and detoxification) and gills (oxidative balance) and an early one in brain (neuronal response) and muscles (mitochondrial metabolism). Brain and muscles appear sensitive since defence mechanisms are inefficient above low concentrations.

A further study on these two organs examined the function and protein content of the respiratory mitochondrial chain following U exposure. An inhibition of the respiratory control ratio for the lowest concentration, variation in the protein synthesis of the complex IV (induction of cytochrome *c* oxydase sub-unit I and IV) and histological damage (dilatation in brain and vacuolization in muscles) were observed. Another study focused on the early effects on the brain and was accomplished through a large transcriptional analysis coupled with examinations of the olfactory bulb ultrastructure. A depression of genes encoding olfactory receptor *or111-7* and *or102-5* was observed as rapidly as 3 days post-exposure to the lowest concentration of U. These responses and histological injuries suggest that the olfactory system could be sensitive to U exposure.

Key words: Zebrafish *Danio rerio*, uranium, bioaccumulation, stress mechanisms, central nervous system, olfactory pathway, mitochondrial energy metabolism, histopathology.