

THESE

UNIVERSITE BORDEAUX 1

Ecole Doctorale Sciences et Environnements

Par Mlle **AL KADDISSI Simone**

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR

Spécialité : écotoxicologie

Comparaison de la réponse (en termes d'accumulation, d'impacts cellulaires et génétiques) de l'écrevisse *Procambarus clarkii* après exposition à un polluant métallique (cadmium) et un polluant radiologique (uranium 238 et 233).

Soutenue le : 13 janvier 2012

Après avis de :

M. COUTURE Patrice, Professeur titulaire/ INRS ETA Quebec (rapporteur)
MME. GIAMBERINI Laure, Directeur Adjoint (HDR)/ Université de Lorraine (rapporteur)

Devant la commission d'examen formée de :

M. DÖRR Martin, Chercheur, Université de Pérouse (examineur)
M. LAROCHE Jean, Professeur, Université de Bretagne Occidentale LEMAR (examineur)
M. CACHOT Jérôme, Professeur, Université de Bordeaux 1 (examineur)
M. SIMON Olivier, Chargé de recherche, IRSN (tuteur de thèse)
MME. LEGEAY Alexia, Maître de conférences, Université de Bordeaux 1 (tuteur de thèse)
M. MASSABUAU Jean-Charles, Directeur de recherche EA/Bordeaux 1/CNRS (directeur de thèse)

A mes parents et mon grand-père.

«Incertitude, ô mes délices
vous et moi nous nous en allons
comme s'en vont les écrevisses
à reculons, à reculons.»

Guillaume Apollinaire.

Remerciements

D'abord je tiens à remercier l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), le Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie (LRE) puis l'Unité Mixte de Recherche Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux commune à l'université de Bordeaux 1 et au Centre National de la Recherche Scientifique (UMR 5805-CNRS-Bordeaux1 -EPOC) et le laboratoire d'Ecotoxicologie aquatiques (EA). J'ai eu la chance de bénéficier des savoirs et des moyens de chacune de ces équipes durant ma thèse. Je tiens à remercier vivement le directeur du LRE, Rodolphe Gilbin pour son implication dans ce travail et pour avoir été toujours présent dans les moments difficiles. Je tiens aussi à remercier le directeur du EA et mon directeur de thèse Jean-Charles Massabuau ainsi que Jaqueline Garnier-Laplace et Antoine Grémare pour m'avoir accueillie et permis la réalisation de ce projet pluridisciplinaire. Je remercie également le laboratoire d'écotoxicologie du département de Biologie environnementale et cellulaire de l'université de Pérouse-Italie qui m'a accueillie pour me former aux dosages enzymatiques.

Cette étude a été réalisée dans le cadre du programme de recherche ENVIRHOM de l'IRSN et financée en partie par cet institut et par le CNRS. Je tiens à adresser mes remerciements à ces deux structures surtout à l'IRSN qui m'a permis la réalisation de ce projet dans d'excellentes conditions.

J'exprime toute ma reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail.

J'adresse un grand merci à mes encadrants de thèse qui m'ont emmenée sur ce sujet dès le master 2, Alexia Legeay et Olivier Simon. Merci d'avoir accepté de m'encadrer et de me diriger pendant toutes ces années.

Alexia merci pour la confiance que tu m'as accordée pour mener ce projet à distance, merci pour tes remarques constructives et les corrections que tu as apportées à ce manuscrit, aux articles et aux divers rapports rédigés au cours de cette thèse.

Olivier...Merci, de m'avoir fait partager ton expérience et de m'avoir guidée tout le long. Merci d'avoir toujours fait tout ton possible pour m'aider sur tous les plans que ce soit professionnels ou humains. Merci pour ton soutien et tes conseils depuis le début jusqu'à la fin. Tu m'as accompagnée dans les moments les plus importants de ma vie professionnelle,

depuis l'audition de thèse à l'IRSN jusqu'à la soutenance. Je n'oublierai jamais cette motivation et cette énergie que tu as investie dans la réalisation de ce projet. Je garderai aussi en mémoire toutes ces heures de travail passées auprès de toi et les longues discussions que nous avons pu avoir. Je n'oublierai surtout pas tes venues au laboratoire les weekends pour prendre le relais durant les expériences, sans toi ce travail n'aurait pas vu le jour... Les mots me manquent pour t'exprimer toute l'amitié, l'affection, la reconnaissance et le respect que je te porte.

Patrice Gonzalez, je te remercie énormément pour ton investissement dans ces travaux et les corrections des articles. Je te dois toutes mes connaissances en génétique.

J'adresse un grand merci à Antonia-Concetta Elia d'avoir accepté de collaborer avec moi, de m'avoir si bien accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir consacré du temps pour me sensibiliser à l'enzymologie.

Mes remerciements s'adressent également à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'aboutissement de ces travaux de thèse et à rendre ces 3 années aussi agréables.

Nicolas Gauthier, je tiens à te remercier pour ta grande contribution à la réalisation de ce projet. Merci de nous avoir offert les écrevisses tout au long de la thèse. Le jour où je t'ai connu fut un grand soulagement pour moi. Il faut dire que notre laboratoire a vu défiler une bonne variété d'espèces d'écrevisses (*Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus*, *Orconectes limosus*...) provenant de divers grossistes et pêcheurs. Cependant il n'y a que toi qui as pu satisfaire nos exigences et nos commandes.

La réalisation de cette thèse a été possible surtout grâce au travail et à la coopération de l'ensemble de l'équipe du LRE.

Fred Coppin, mon voisin de bureau, quand j'ai appris à te connaître, j'ai réalisé que tu étais quelqu'un de très serviable et pédagogue, toujours là pour aider les autres surtout les thésardes en galère. A tes côtés, la chimie devenait moins barbare, j'ai vraiment beaucoup appris en collaborant avec toi. Je te remercie pour toutes tes explications, pour l'aide que tu m'as apportée pour la fabrication de l'eau synthétique et pour les simulations sur JCHESS. Merci de ne pas avoir baissé les bras au moment où nous avons eu des problèmes de gestion de rejets de l'uranium et du cadmium au laboratoire. Je te remercie d'avoir pris le temps de m'aider à développer des techniques pour piéger ces métaux afin que je puisse réaliser mes expériences.

Magali Floriani, un énorme merci pour ton implication dans ce travail et pour toutes les belles images de microscopie. Virginie Camilleri, et Isabelle Cavalié, les soldats inconnus de cette thèse, je n'imagine même pas comment j'aurai pu m'en sortir sans votre aide pour les dosages des métaux. Claire Della-Vedova, les statistiques sont devenues moins pénibles à tes cotés. Daniel Orjollet, un grand merci pour les dosages de ^{233}U . Sandrine Frelon, merci pour les dosages à l'ICP-MS, pour tes corrections et tes bons gâteaux. Karine Beaugelin-Seiller pour les calculs de débit dose. Sylvie Pierrisnard, merci pour ton soutien quand j'en ai eu besoin et pour toutes les analyses de chromatographie ionique. Laureline Fevrier, l'experte en ACP, merci pour ton aide dans les analyses et pour avoir été là pour m'écouter et discuter de tout et de rien. Jean-Marc, merci pour les séances « photo-shoot », tu sais bien faire croire aux femmes qu'elles sont des stars !

Claudine Van Crasbek, la personne qui a le plus galéré avec moi du côté administratif. Franchement, chapeau pour ta réactivité et ton efficacité, tu m'as tant aidé et soutenu... grand merci.

Nadine, Cathy, Katy (bis), Arnaud, Pascale, Pierre, Beatrice, Christelle, Karine, Jean-François, Julien, les SPR, Bruno, Damien, Jean-Paul, Magalie, Flo et tous les thésards, merci pour votre bonne humeur, pour les échanges qu'on a pu avoir et pour la bonne ambiance qui régnait dans les locaux qui me motivait à travailler.

Benji, tu as joué un grand rôle dans cette thèse... Je te remercie d'abord pour ton aide au laboratoire quand tu étais encore au LRE (la dissection des écrevisses, mise en place de l'élevage...) et pour tout le partage scientifique que nous avons eu ensemble. Tu as subi mes investissements dans cette thèse, mes concessions, mes peines, mes paniques, mes coups de gueule, mes angoisses et mes sacrifices. Je te remercie d'avoir été toujours là pour m'écouter, m'apaiser, m'encourager, me soutenir et me conseiller quand j'en avais besoin. Sans ton support j'aurais eu plus de difficulté à accomplir ce travail. Tu es quelqu'un que j'admire pour ta force, ton caractère et pour ta façon de tirer les gens vers le haut.

Je tiens aussi à remercier du plus fort que je peux celui qui a été près de moi tout au long de la troisième année de thèse, avec complicité, attention et un soutien sans faille, mon colloque de labo, mon récupérateur de badge, mon technicien informatique et mon meilleur ami Guigui.

Nico ma bouffée d'oxygène, mon rayon de soleil tu m'as permis de tenir la plus dure des années de thèse. Merci d'avoir cru en moi, tes encouragements m'étaient d'un grand support. Ta bonne humeur, ta façon d'être étaient tout ce dont j'avais besoin. Merci du fond du cœur pour avoir été là pour moi durant les périodes difficiles et parfois douloureuses. Je

n'oublierai jamais tout ce que tu as pu faire pour moi et tous les bons moments que nous avons passé ensemble. J'ai eu de la chance de t'avoir dans ma vie, tu es quelqu'un de précieux.

Mes Parents, je vous dois tout ! Déjà mon existence et mon caractère ! C'est grâce à tous vos efforts et tous vos sacrifices que je suis devenue ce que je suis. Chacun de vous deux à apporter sa pierre à l'édifice et ceci pendant déjà 26 ans. J'espère que le résultat est à la hauteur de vos attentes et de vos mérites. C'est surtout votre soutien moral et affectif qui m'a toujours donné la force de me battre, de réaliser et entreprendre ce que je veux. Je ne pourrai jamais assez vous remercier.

Enfin j'adresse un grand remerciement à tous les membres de ma famille qu'ils soient encore de ce monde ou pas, pour leur amour, leur soutien et toutes les valeurs inculquées.

Communications

Ecrites

Effects of uranium uptake on transcriptional responses, histological structures and survival of the crayfish *Procambarus clarkii*.

[Al Kaddissi S., Simon O., Legeay A., Gonzalez P., Floriani M., Camileri V. and Gilbin R.](Article publié)

Effects of uranium on crayfish *Procambarus clarkii* mitochondria and antioxidant responses after chronic exposure: what have we learned?

[Al Kaddissi S., Legeay A., Elia A.C., Gonzalez P., Camilleri V., Gilbin R., and Simon O](Article publié)

Mitochondrial gene expression, antioxidant responses, and histopathology after cadmium exposure.

[Al Kaddissi S., Legeay A., Elia A.C., Gonzalez P., Floriani M., Cavalie I., Massabuau J.C., Gilbin R., and Simon O](Article soumis)

An attempt to discriminate the radio and chemo-toxicity of uranium in *Procambarus clarkii* using molecular responses.

[Al Kaddissi S., Frelon S., Legeay A., Elia C., Gonzalez P., Beaugelin-Seiller K, Coppin F., Orjolet D., Gilbin R., and Simon O.](Article soumis)

How toxic is depleted uranium to crayfish *Procambarus clarkii*? A comparative study to the uptake and biological effects of cadmium.

[Al Kaddissi S., Legeay A., Elia A.C., Frelon S., Gonzalez P., Floriani M., Camilleri V., Cavalie I., Massabuau J.C., Gilbin R., and Simon O](Article en cours de préparation)

Orales

The use of *Procambarus clarkii* as a bioindicator of cadmium and uranium pollution.

“ICC7 7th international meeting”. (Qingdao-Chine, 20-25 juin 2010).

Comparaison de la réponse (en termes d'accumulation, d'impacts cellulaires et génétiques) de l'écrevisse *Procambarus clarkii* après exposition à un polluant métallique (cadmium) et un polluant radiologique (uranium).

Séminaire des « Journées scientifiques IRSN ». (Arles-France, 21-24 Septembre 2010).

Affichées

Etude comparative de la bioaccumulation et des effets (à différentes échelles de l'organisation biologique) de l'uranium et du cadmium chez *P. clarkii*.

« journée des thèses CEA » (Cadarache, CEA-France, 21 septembre 2011). (3^{ème} prix).

The use of molecular responses of crayfish *Procambarus clarkii* as biomarkers of cadmium and uranium contamination.

“SETAC Europe 21th meeting”. (Milan-Italie, Mai 2011).

A comparative study of molecular responses during acute exposures to uranium and cadmium in crayfish *Procambarus clarkii*: linkage between gene expression and higher-level effects.

“SETAC Europe 20th meeting”.(Seville-Espagne, 23-27 Mai 210).

Etude comparative de l'impact de l'uranium et du cadmium chez l'écrevisse *Procambarus clarkii*.

« SEFA ». (Versailles-France, 31 mars 2010).

Comparaison des réponses de l'écrevisse *Procambarus clarkii* après exposition à un polluant métallique (cadmium) et un polluant radiologique (uranium).

Séminaire des « Journées des thèses IRSN ». (Aussois-France, 28 Septembre 2009).

Résumé

L'étude des effets des radionucléides dispersés dans l'environnement est un thème majeur dont l'un des enjeux est d'évaluer le risque écologique pour les organismes vivants. Le programme EnvirHom-Eco de l'IRSN a pour objectifs d'évaluer la toxicité des radionucléides et de mieux comprendre les réponses biologiques induites suite à une bioaccumulation de ces contaminants chez les organismes vivants. Une des approches proposées par ce programme est de comparer les effets des radioéléments (tel l'uranium) aux effets chimiotoxiques de polluants plus connus (en termes de spéciation biologique et d'études des effets sur les organismes) tels que les métaux (en particulier le cadmium). Une autre partie vise aussi à discriminer la radiotoxicité de la chimiotoxicité de ces éléments radioactifs. Cette thèse s'inscrit directement dans ce projet.

Pour répondre à cette problématique, notre approche a visé dans un premier temps à étudier les impacts du cadmium (Cd) sur différents niveaux biologiques de l'écrevisse *Procambarus clarkii*, retenue comme espèce modèle. En effet, nous avons évalué l'impact de ce métal sur les mitochondries, le fonctionnement de la chaîne respiratoire et sur les réponses face à un stress oxydant (expressions transcriptionnelles et activités enzymatiques). Durant cette étude, les gènes *mt* et *atp6* codant respectivement pour la metallothionéine (une protéine de stress) et l'ATP synthase ont été clonés, séquencés puis enregistrés dans GenBank sous les numéros d'accessions respectifs GU220368.1 et GU220369.1. De même, nous avons étudié les impacts au niveau histologique. Nous avons tenté de lier ces effets entre eux et à la bioaccumulation du Cd dans les branchies et l'hépatopancréas, organes cibles de l'exposition. Dans un second temps, nous avons étudié les mêmes paramètres biologiques après exposition à différentes durées (4, 10, 30 et 60 jours) et concentrations (0,1- 40 μM) de l'uranium (U) et appliqué la même démarche. De plus, nous avons essayé de différencier la chimio- et la radiotoxicité de ce radionucléide en exposant des lots d'écrevisses soit à l'U appauvri soit au ^{233}U (présentant une activité spécifique plus élevée) au travers des mêmes critères d'effets. Enfin nous avons comparé les effets du Cd et de l'U après exposition aiguë (40 μM -10 jrs) et chronique (0,1 μM -60 jrs).

Nous avons démontré que le gène *mt* était toujours surexprimé en présence du Cd dans nos conditions d'exposition, et qu'il semble être un bon biomarqueur de toxicité du Cd chez *P. clarkii*. Nous avons mis en évidence que l'U et le Cd affectent les mitochondries grâce au suivi des niveaux d'expressions des gènes mitochondriaux (*12s*, *atp6* et *cox1*), et que les mécanismes d'action de ces deux métaux ne semblent pas être toujours les mêmes. Nous

avons aussi prouvé que l'U génère plus de stress oxydant que le Cd grâce à la comparaison des niveaux d'expression de gènes qui codent pour des antioxydants (*sod(Mn)* et *mt*) et des réponses enzymatiques de la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion S transférase. Toutefois, les symptômes des atteintes histo-pathologiques semblent être les mêmes pour les deux métaux. En comparant les effets des métaux sur la survie des écrevisses, nous avons conclu que le Cd était plus toxique que le radioélément. D'autre part, nous avons démontré que les effets toxiques de l'U, aux concentrations rencontrées dans l'environnement, sont plus liés à la chimiotoxicité qu'à la radiotoxicité de cet élément. Nous avons démontré que les réponses moléculaires varient en fonction de l'intensité et la durée du stress chimique imposé aux organismes. Nous avons proposé d'utiliser les expressions de l'ensemble des gènes étudiés en tant que biomarqueurs de toxicité de l'U plutôt que les activités enzymatiques. Ce travail de thèse propose surtout des modes d'actions transcriptionnels, responsables des effets toxiques de l'uranium. Il confirme la nécessité d'approfondir l'étude du profil écotoxique de l'uranium.

Sommaire :

Liste des tableaux	1
Liste des figures	2
Liste des abréviations	8
Chapitre I : Introduction	11
Chapitre I-A : Contexte et objectifs	12
Chapitre I-B : Etude bibliographique	17
1. Le modèle biologique <i>Procambarus clarkii</i>	18
1.1. Systématique, origine et distribution.....	18
1.2. Biologie de l'écrevisse	21
1.2.1. Morphologie	21
1.2.2. Anatomie et physiologie.....	24
1.2.3. Croissance et mue.....	26
1.3. Ecologie et comportement.....	28
1.4. Intérêt économique	29
1.5. Intérêt scientifique et écologique	30
2. Evaluation de risques de contamination des milieux aquatiques	31
2.1. Bioindicateur et espèce sentinelle	31
2.2. Biomarqueurs	33
3. Généralités sur le Cadmium	39
3.1. Description	39
3.2. Origine et distribution	39
3.3. Spéciation du Cd	41
3.4. Mécanismes de contamination en milieu aquatique.....	45
3.5. Effets biologiques du Cd	46
3.5.1. Au niveau de l'organisme et des tissus	46
3.5.2. Effets Sub-cellulaires	47
3.5.2.1. Stress oxydant.....	48
3.5.2.2. Effets sur les mitochondries	55
3.5.2.3. Effets sur l'ADN et l'expression génique	58
4. Généralités sur l'uranium	62
4.1. Description	62
4.2. Origine et distribution	64
4.3. Spéciation chimique	67
4.4. Mécanismes de contamination	69
4.5. Effets biologiques de l'U.....	70
4.5.1. Au niveau de l'organisme et des tissus	70
4.5.2. Effets sub-cellulaires	71
4.5.2.1. Stress oxydant.....	72
4.5.2.2. Effets sur les mitochondries	74
4.5.2.3. Effets sur l'ADN et l'expression génique	75
Chapitre I-C :Choix stratégiques et démarche expérimentale.....	79
1. Choix du modèle biologique	80
2. Objectifs détaillés et justification de la démarche expérimentale	80

3.	Choix des concentrations	82
4.	Choix de l'exposition par voie directe et de la composition ionique de l'eau	84
5.	Choix des paramètres biologiques.....	84
6.	Choix des marqueurs de contamination	88
7.	Choix des organes	90
Chapitre II : Matériels et méthodes		92
1.	Conditions expérimentales	93
1.1.	Dispositifs expérimentaux	93
1.2.	Modélisation de la spéciation de l'U	95
1.3.	Gestion de l'exposition aux radionucléides en laboratoire	98
2.	Prélèvement des organismes et dissection	100
3.	Dosage des métaux et des ions	101
3.1.	Dosage des métaux dans la matrice biologique et l'eau.....	101
3.1.1.	Préparation des échantillons	101
3.1.2.	Techniques analytiques utilisées	102
3.1.2.1.	Dosage du cadmium par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE).....	102
3.1.2.2.	Spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES).....	104
3.1.2.3.	Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif(L'ICP-MS)...	105
3.1.3.	Calculs des débits de doses	107
3.2.	Chromatographie ionique	110
4.	Analyses des paramètres biologiques.....	111
4.1.	Microscopie	111
4.1.1.	Préparation des échantillons	111
4.1.2.	Microscopie optique	112
4.1.3.	Microscopie Electronique à Transmission couplée à une sonde EDX.....	112
4.2.	Dosages enzymatiques	113
4.2.1.	Préparations des échantillons	113
4.2.2.	Dosage des protéines	114
4.2.3.	Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)	115
4.2.4.	Dosage de l'activité de la catalase (CAT).....	117
4.2.5.	Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPX)	119
4.2.6.	Dosage de l'activité de la glutathion S transférase (GST)	120
4.3.	Expression des gènes.....	121
4.3.1.	Recherche et séquençage des régions codantes d'intérêt.....	121
4.3.1.1.	Extraction des ARN totaux.....	122
4.3.1.2.	Rétro-transcription.....	123
4.3.1.3.	PCR classique.....	124
4.3.1.4.	Electrophorèse	125
4.3.1.5.	Purification des fragments d'intérêt	126
4.3.1.6.	Clonage et transformation bactérienne	127
4.3.2.	PCR quantitative en temps réel	128
Chapitre III : Etude de l'impact du cadmium sur la survie, l'histologie, les mitochondries et les antioxydants chez <i>P. clarkii</i>		131
Abstract		133
1.	Introduction	134

2.	Materials and methods	136
2.1.	Biological model and acclimatization	136
2.2.	General experimental protocol for acute exposure	136
2.3.	General experimental protocol for chronic exposure	137
2.4.	Tissues sampling and preparation	138
2.5.	Metal quantification	138
2.6.	Total RNA extraction, reverse transcription of RNAs and Real-time quantitative PCR	138
2.7.	Enzymatic activities analysis	139
2.8.	Histological methods	140
2.9.	Statistical analysis	140
3.	Results	141
3.1.	Survival rate	141
3.2.	Cd bioaccumulation in crayfish organs	141
3.3.	Gene expression levels and enzymatic activities	142
3.4.	Biological responses and bioaccumulation	144
3.5.	Histological alterations	144
4.	Discussion	145
4.1.	Effects on survival rate	145
4.2.	Accumulation	146
4.3.	Molecular responses	147
4.3.1.	Mechanisms of toxicity in acute exposure	147
4.3.2.	Mechanisms of toxicity in chronic exposure	149
4.3.3.	Histopathology	151
5.	Conclusions	152
	Acknowledgments	152
	References	153

Chapitre IV : Etude de l'impact de l'uranium sur la survie, l'histologie, les mitochondries et les antioxydants chez <i>P. clarkii</i>	161
--	-----

Chapitre IV-A: Effet de la bioaccumulation de l'uranium sur les réponses transcriptomiques, les structures histologiques et la survie chez <i>P. clarkii</i>	162
--	-----

Abstract	164
1. Introduction	165
2. Materials and methods	167
2.1. General experimental protocol	167
2.2. Tissues sampling and preparation	168
2.3. Metals quantification	168
2.4. Histochemical and histological methods	169
2.5. Genetic analyses	169
2.5.1. Total RNA extraction and reverse transcription of RNAs	169
2.5.2. Cloning and sequencing of <i>mt</i> and <i>atp6</i> genes	169
2.5.3. Real-time quantitative PCR	170
2.6. Statistical analysis	171
3. Results	172

3.1.	Survival rate	172
3.2.	U bioaccumulation in crayfish organs.....	172
3.3.	U localization and histological alterations	173
3.4.	Gene expression levels	174
3.5.	Gene expressions vs bioaccumulation.....	175
4.	Discussion	176
4.1.	Effects on survival rate.....	176
4.2.	Accumulation	176
4.3.	Histopathological effects.....	177
4.4.	Molecular responses	178
5.	Conclusions.....	179
	Acknowledgments.....	180
	References	180

Chapitre IV-B : Effets de l'uranium sur les réponses moléculaires chez l'écrevisse *P. clarkii*

	après une exposition chronique :Les enseignements à tirer	186
	Abstract	188
1.	Introduction	189
2.	Materials and methods	190
2.1.	General experimental protocol	190
2.2.	Uranium quantification	191
2.3.	Total RNA extraction, reverse transcription of RNAs and Real-time quantitative PCR	192
2.4.	Enzyme activity.....	193
2.5.	Statistical analysis	194
3.	Results	195
3.1.	Experimental conditions.....	195
3.2.	Uranium bioaccumulation	195
3.3.	Gene expression levels after long term exposure.....	195
3.4.	Enzyme activity.....	196
4.	Discussion	197
4.1.	Bioaccumulation.....	197
4.2.	Transcriptional responses after long-term exposure to U	198
4.3.	Evolution of transcriptional responses over time and their use as biomarkers ..	200
4.4.	Oxidative stress responses after long-term exposure to U	201
4.5.	Linking cellular oxidative stress to the dysfunction of mitochondria	202
5.	Conclusions and perspectives.....	203
	Acknowledgments.....	203
	References	204

Chapitre IV-C : Les antioxydants et les réponses transcriptomiques sont-ils des biomarqueurs pertinents pour discriminer la chimio et la radiotoxicité de l'uranium chez *P. clarkii* ?.....

	Abstract	211
1.	Introduction:	212
2.	Materials and methods	213
2.1.	Experimental design	213

2.2.	U analyses	214
2.3.	Enzyme activity determination.....	215
2.4.	Gene expression level determination	216
2.5.	Dose rate calculation for the hepatopancreas	216
2.6.	Statistical analyses.....	218
3.	Results	218
3.1.	U in water, in organs, and related dose rates.....	218
3.2.	Effects on enzyme activities and gene expression levels.....	219
4.	Discussion	221
4.1.	Accumulation of U	221
4.2.	Dose rate in the hepatopancreas	222
4.3.	Effect on enzyme activities	223
4.4.	Effect on gene expression levels	224
4.5.	Linking effects to radio or chemotoxicity	225
5.	Conclusions	225
	Acknowledgments	226
	References	226
	Chapitre V : Comparaison des effets de l'uranium et du cadmium chez <i>P. clarkii</i>	232
	Abstract	234
1.	Introduction	235
2.	Materials and methods	236
2.1.	Experimental design.....	236
2.2.	Metal quantification	237
2.3.	Histochemical and histological methods.....	237
2.4.	Genetic analysis.....	238
2.5.	Enzymatic activities analysis	238
2.6.	Statistical analysis	239
3.	Results	239
3.1.	Survival rate	239
3.2.	Bioaccumulation of DU and Cd	240
3.3.	Cd localisation and histological alterations by U.....	241
3.4.	Enzymatic responses in gills contaminated chronically.....	243
3.5.	Expression factors of the studied genes	245
4.	Discussion	247
4.1.	Comparison of the mortality rates	247
4.2.	Comparison of the bioaccumulation and detoxification	248
4.3.	Comparison of histopathological effects between Cd and U	250
4.4.	Comparison of the antioxidant responses.....	251
4.5.	Comparison of the variations in transcriptional responses.....	252
	Acknowledgments	254
	References	255
	Chapitre VI : Synthèse générale et perspectives	262
1.	Rappel du contexte, des objectifs et de la démarche expérimentale	263
2.	Niveau d'atteinte des objectifs.....	264
2.1.	Le modèle biologique.....	264
2.2.	La bioaccumulation et la détoxification.....	265

2.3.	Les effets histopathologiques	269
2.4.	Les effets moléculaires	270
2.5.	Chimiotoxicité vs radiotoxicité	279
2.6.	Classification de la toxicité des métaux	281
3.	Perspectives de recherche.....	281
3.1.	Eclaircir les mécanismes de toxicité de l'U sur les mitochondries	281
3.2.	Eclaircir les mécanismes de toxicité de l'U sur la balance oxydative.....	282
3.3.	Lien entre le niveau génique et enzymatique	283
3.4.	Distribution de l'U dans différentes fractions cellulaires.....	283
3.5.	Etude d'impact de la mue sur les biomarqueurs retenus	284
3.6.	Etude des effets chez des organismes présentant différentes résistances à l'U..	284
3.7.	Etude des effets <i>in situ</i>	285
	Références	286
	Annexes	330

Liste des tableaux

Tableau 1 : Position systématique de <i>Procambarus clarkii</i>	18
Tableau 2 : Bruit de fond du cadmium dans l'environnement.....	40
Tableau 3 : Emissions de Cd en Europe.....	41
Tableau 4 : Bilan des concentrations des ions majeurs ($\mu\text{mol/L}$) présents dans les différents types d'eau étudiés au sein du laboratoire.....	44
Tableau 5 : Bilan des différents radicaux libres centrés sur l'oxygène.....	48
Tableau 6 : Composition isotopique en masse et en activité de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri à 0.2% en ^{235}U	63
Tableau 7 : Concentrations mesurées dans l'eau de consommation humaine issue de puits...	64
Tableau 8 : Bilan de la démarche expérimentale retenue.....	82
Tableau 9 : Comparaison de la similarité des séquences nucléotidiques et des acides aminés des gènes <i>mt</i> et <i>atp6</i> de <i>P. clarkii</i> à celles présentes dans la banque de données de NCBI.....	89
Tableau 10 : Concentration des solutions mères de sels nécessaires pour la préparation de l'eau synthétique.	94
Tableau 11 : Pourcentage d'espèces d'U majoritairement présentes dans une eau douce synthétique adaptée aux besoins des écrevisses à pH 6.5 et 7 (simulation de 30 $\mu\text{g U/L}$ avec le programme de spéciation géochimique J-CHESS).	96
Tableau 12: Nominal and measured Cd ($\mu\text{g/L}$) concentrations in water throughout the acute (n=20) and chronic (n= 60) experiments. Cd bioaccumulation ($\mu\text{g /g DW}$, mean \pm SEM, n= 4 to 5 in each treatment condition) in gills and in hepatopancreas of the crayfish <i>P. clarkii</i> after 4, 10, 30 and 60 days exposure to Cd(10 to 5000 $\mu\text{g/L}$).	137
Tableau 13: Gene names, accession numbers, specific primer pairs used in the quantitative PCR analysis of the six studied genes of <i>P. clarkii</i> and their function.	139
Tableau 14: Expression factors (EF) of the five genes studied in <i>P. clarkii</i> compared to the basal level of controls (n= 4 to 5 in each treatment condition).....	142
Tableau 15: Nominal and measured U (mg/L) concentrations in water throughout the experiment (n=20).U bioaccumulations ($\mu\text{g /g DW}$, mean \pm SEM, n= 4 to 5 in each treatment condition) in gills and in hepatopancreas of the crayfish <i>Procambarus clarkii</i> after 4 and 10 days exposure to U (0.03 to 8 mg/L).	168

Tableau 16: Gene names, primers deduced from alignment of corresponding sequences from different species and their accession numbers.	170
Tableau 17: Gene names, accession numbers and specific primers pairs used in the quantitative PCR analysis of the 6 studied genes of <i>P.clarkii</i>	171
Tableau 18: Expression's factors (EF) of the 5 genes studied in <i>P.clarkii</i> compared to the basal level of controls (n= 4 to 5 in each treatment condition).	175
Tableau 19: Genes, accession numbers, specific primers pairs used in the quantitative PCR analysis of the 6 studied genes of <i>P.clarkii</i> and their function.	193
Tableau 20: U bioaccumulation ($\mu\text{g} / \text{g}$ dry weight (DW), mean \pm SEM, n= 5 in each treatment condition) in gills and in hepatopancreas of the crayfish <i>Procambarus clarkii</i> exposed 30 (T30) and 60 days (T60) to 0 (control) and 30 $\mu\text{g}/\text{L}$ of U.....	195
Tableau 21: Expression's factors (EF) of the 5 studied genes in gills and hepatopancreas of <i>P. clarkii</i> compared to the basal level of controls (n= 5 in each treatment condition) at day 30 (T30) and 60 (T60).	196
Tableau 22: Isotopic lists of uranium (^{233}U , ^{234}U , ^{235}U , ^{236}U and ^{238}U), their related daughters selected for the source composition (obtained by Nuclides 2000) and corresponding DCC values (Gy/d)/[Bq/g] of U accumulated in Hepatopancreas after 10 days of exposure obtained by EDEN 2 software (Elementary Dose Evaluation for Natural Environment, developed by IRSN).	217
Tableau 23: Expression factors (EF) of the 5 genes studied in <i>P. clarkii</i> compared to the basal level of controls (n=5)	221
Tableau 24 : Gamme de variation des concentrations accumulées dans la branchie et l'hépatopancréas après exposition aiguë au Cd et à l'U.....	267

Liste des figures

Figure 1 : Distribution mondiale de <i>P. clarkii</i>	19
Figure 2 : Evolution de la répartition de <i>Procambarus clarkii</i>	20
Figure 3 : Aspect d'une écrevisse <i>Procambarus clarkii</i>	21
Figure 4 : Morphologie externe d'une écrevisse.	22
Figure 5 : Critères de détermination de <i>P. clarkii</i>	23
Figure 6 : Différence d'aspect entre une écrevisse mâle et une écrevisse femelle..	24
Figure 7 : Anatomie interne d'une écrevisse	26
Figure 8 : Cycle de la mue des écrevisses	28

Figure 9 : Production mondiale de <i>Procambarus clarkii</i>	29
Figure 10 : représentation des différents niveaux de l'organisation biologique pouvant être affectés par les polluants et de leur rapidité de réponse. Ce schéma illustre aussi l'intérêt écologique et mécanistique des différents niveaux dans la recherche	34
Figure 11 : Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques.....	34
Figure 12 : Progression de l'état de santé d'un individu à l'exposition d'une augmentation de la concentration d'un polluant.....	35
Figure 13 : Illustration des différentes voies de contamination d'une écrevisse et de complexation du Cd avec des phases organiques et inorganiques (dissoutes et particulaires).43	
Figure 14 : Spéciation chimique de 10µg/L de cadmium dans une eau douce synthétique adaptée aux besoins des écrevisses (simulation avec le programme de spéciation géochimique J-CHESS).	44
Figure 15 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène..	49
Figure 16 : Systèmes enzymatiques impliqués dans la défense contre le stress oxydant	50
Figure 17 : Schéma de la balance anti-oxydants/pro-oxydants représentant un stress oxydant	52
Figure 18 : Mécanismes possibles expliquant la génération de stress oxydant par le cadmium	54
Figure 19 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale	56
Figure 20 : Effets du cadmium sur les mitochondries.....	58
Figure 21 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.....	59
Figure 22 : Chaîne de désintégration de l' ²³⁴ U, ²³⁵ U et de l' ²³⁸ U.....	63
Figure 23: (A) Production mondiale d'uranium à partir de sites miniers en 2010 présentée en tonnes par pays. (B) Inventaire des résidus miniers d'uranium recensés dans le monde en 2009 exprimés en million de tonnes ou en tonnes suivant les pays	66
Figure 24 : Carte des mines d'uranium et sites de stockage en France (2009) superposée à la carte de distribution de <i>P. clarkii</i>	67
Figure 25 : Spéciation chimique de 30 µg/L d'uranium dans une eau douce synthétique adaptée aux besoins des écrevisses (simulation avec le programme de spéciation géochimique J-CHESS).	69

Figure 26 : Peroxydation d'une portion d'une chaîne d'acide gras insaturée.....	73
Figure 27 : Effets biologiques des rayonnements ionisants. Evolutions possibles au niveau cellulaire en fonction du temps	76
Figure 28 : Les cinq grands types de dégradation de l'ADN, présentés sur les quatre bases pouvant être touchées, les pyrimidines (cytosine C et thymine T) et les purines (adénine A et guanine G).....	77
Figure 29 : Représentation schématique d'un feuillet branchial d'une écrevisse.....	86
Figure 30 : Représentation schématique des différents types de cellules de l'hépatopancréas des écrevisses	87
Figure 31 : Séquences partielles de nucléotides et les séquences d'acides aminés déduits (5'3' cadre de lecture +1) du gène de la métallothionéine (<i>mt</i>) et de l'adénosine triphosphate synthase-sous unité six (<i>atp 6</i>) de l'écrevisse <i>Procambarus clarkii</i>	89
Figure 32 : Photos illustrant la taille des branchies et de l'hépatopancréas par rapport au corps entier de l'écrevisse <i>P. clarkii</i>	91
Figure 33 : Carte du lieu de prélèvement des écrevisses.....	94
Figure 34 : Dispositif expérimental.....	95
Figure 35 : Spéciation chimique de 600, 4000 et 8000 µg/L d'uranium dans une eau douce synthétique adaptée aux besoins des écrevisses (simulation avec le programme de spéciation géochimique J-CHESS).....	97
Figure 36 : Système de filtration de l'eau contaminée au Cd ou à l'U par la calcite pour minimiser les rejets.....	99
Figure 37 : Suivi des concentrations de Cd ou d'U dans l'eau filtrée en continu par la calcite en fonction du temps.	99
Figure 38 : Photo illustrant une mesure de la taille d'une écrevisse	100
Figure 39 : Photo illustrant une écrevisse disséquée.....	100
Figure 40 : Procédure de digestion des échantillons biologiques.	102
Figure 41 : Photographie d'un SAAE 4110 ZL Perkin-Elmer.....	103
Figure 42 : Photographie d'un ICP-AES Perkin Elmer Optima 4300 DV.	105
Figure 43 : Photographie d'un ICP-MS Agilent 7500 Cx et schéma de la trajectoire des ions dans le quadripôle.....	106
Figure 44 : Schéma de fonctionnement du comptage en scintillation liquide et photographie d'un compteur en scintillation liquide de type Wallac quantulus 1400	107

Figure 45 : Schéma de fonctionnement d'une chromatographie ionique en phase liquide (ILC) et photographie d'une ILC Dionex ICS 3000	110
Figure 46 : Illustration de l'ultramicrotome équipé d'un couteau de diamant (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France).	112
Figure 47 : Observation de l'hépatopancréas de <i>P. clarkii</i> au microscope optique	112
Figure 48 : Photographie d'un microscope électronique à transmission TecnaiG ² 12 BioTwin avec sa sonde microanalyse EDX	113
Figure 49 : Différentes gammes d'étalon pour le dosage des protéines totales	115
Figure 50 : Spectrophotomètre (SOFTmax® PRO).....	115
Figure 51 : Principe du dosage de la SOD.	116
Figure 52 : Pourcentage d'inhibition de la réaction colorimétrique par la présence de différentes concentrations de SOD (U/ml) (n=3 par concentration).	117
Figure 53 : Absorbances de différentes concentrations de catalase allant de 0 (blancs) à 100 U/ml en fonction du temps.	118
Figure 54 : Mise au point du dosage de la GPX : suivi de l'absorbance de blancs et des fractions S100 des hépatopancréas (Hp) et des branchies (Br) en fonction du temps.	120
Figure 55 : Mise au point du dosage de la GST: suivi de l'absorbance des blancs et des fractions S100 des hépatopancréas (Hp) et des branchies (Br) en fonction du temps.	121
Figure 56 : Extraction des ARN totaux.....	123
Figure 57 : Schéma simplifié de la rétro-transcription.....	124
Figure 58 : Principe d'un cycle de PCR classique	125
Figure 59 : Gel d'agarose renfermant les ADN d'intérêt.....	126
Figure 60 : Purification des fragments de gènes d'intérêts	126
Figure 61 : Clonage et transformation bactérienne	127
Figure 62 : Principe général de la PCR quantitative en temps réel.....	130
Figure 63: Antioxidants activities (SOD, CAT, GPX, and GST) (mean ± SEM, n=5) in gills and hepatopancreas of crayfish <i>P. clarkii</i> exposed 30 and 60 days to 0 and 10 µg/L of Cd. 143	
Figure 64: Histopathological alterations in <i>P. clarkii</i> hepatopancreas tubules after 10 days of acute exposure to Cd: (1) 0 mg/L; (2) 0.05 mg/L; (3) 0.5 mg/L (4) 5 mg/L; and 60 days of chronic Cd exposure: (5) 10 µg/L	145

Figure 65 : Kaplan-Meier's presentation of the survival rate of <i>Procambarus clarkii</i> exposed to U during 240 h of exposure.....	172
Figure 66: Transmission electron micrographs coupled with energy dispersive X-ray results of <i>P.clarkii</i> gills exposed for 10 days to 4 mg/L of U	173
Figure 67: Histopathological alterations in <i>P.clarkii</i> hepatopancreas tubules after 10 days of exposure to dissolved heavy metals: (1) control; (2) 0.6 mg/L U; (3) 4 mg/L U; (4) 8 mg/L U	174
Figure 68: Spearman correlation coefficients (r) between U concentrations in organs and gene expression levels of the 5 genes studied.....	175
Figure 69: Enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD) (U/mg Prot, mean \pm SEM, n= 5 in each treatment condition), catalase (CAT) (μ mol /min/mg Prot, mean \pm SEM, n= 5 in each treatment condition), glutathione peroxidase (GPX) (nmol /min/mg Prot), and glutathione S transferase (GST) (μ mol /min/mg Prot, mean \pm SEM, n= 5 in each treatment condition) in gills and in hepatopancreas of the crayfish <i>Procambarus clarkii</i> exposed 30 and 60 days to 0 (control) and 30 μ g/L of U.....	197
Figure 70: Concentrations (μ g/g dW, mean \pm SEM, n=5) of depleted uranium (DU) and enriched uranium (^{233}U) in: gills, hepatopancreas, stomach, intestine, green glands, muscles and carapace of the crayfish <i>P. clarkii</i> exposed 4 (4d) to 10 (10d) days to 0 (control) and 30 μ g/L of the metals	219
Figure 71: Enzymatic activities of catalase (CAT) (μ mol/min/mg Prot, mean \pm SEM, n=5), glutathione peroxidase (GPX) (nmol/min/mg Prot, mean \pm SEM, n=5), glutathione S transferase (GST) (μ mol/min/mg Prot, mean \pm SEM, n=5) and superoxide dismutase (SOD) (U/mg Prot, mean \pm SEM, n=5) in the hepatopancreas and gills of crayfish <i>P. clarkii</i> exposed 4 (4d) and 10 (10d) days to 0 (control) and 30 μ g/L of depleted uranium (DU) or enriched uranium (^{233}U).....	220
Figure 72: Concentrations of U and Cd in gills and hepatopancreas of crayfish <i>P. clarkii</i> exposed to 40 μ M of Cd or U for 4 to 10 days (μ g/g, mean \pm SEM, n=4 except for U contaminated organs at T10, where n=5).....	240
Figure 73: Concentrations of U and Cd in gills and hepatopancreas of crayfish <i>P.clarkii</i> exposed to 0.1 μ M of Cd or U for 30 to 60 days (μ g/g, mean \pm SEM, n=4 except for U contaminated organs at T10, where n=5).....	241
Figure 74: Transmission electron micrographs coupled with energy X-ray results of <i>P.clarkii</i> gills exposed for 10 days to 40 μ M of Cd.....	242
Figure 75: Histological alterations in <i>P.clarkii</i> hepatopancreas tubules after 60 days of exposure to dissolved U: (1) control, (2 and 3) 0.1 μ M U	243
Figure 76: Principal components analysis (PCA) ordination of gills of crayfish <i>P.clarkii</i> exposed to 0.1 μ M of U or Cd at T30 and T60 characterized by the activities of SOD	

(Superoxide dismutase: U/mg Prot), CAT (Catalase: $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Prot), GPX (Glutathione peroxidase: $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Prot), and GST (Glutathione S transferase: $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Prot).. 244

Figure 77: Principal components analysis (PCA) ordination of hepatopancreas and gills of crayfish *P.clarkii* exposed to 40 μM of U or Cd at T4 and T10 using the expression factors of *12s*, *atp6*, *cox1*, *sod(Mn)* and *mt* compared to the basal level of controls (n=5) 245

Figure 78: Principal components analysis (PCA) ordination of hepatopancreas and gills of crayfish *P.clarkii* exposed to 0.1 μM of U or Cd at T30 and T60 characterized by the expression factors of *12s*, *atp6*, *cox1*, *sod(Mn)* and *mt* compared to the basal level of controls (n=5).. 246

Figure 79 : Présentation du ratio entre l'écart-type à la moyenne et la moyenne des concentrations de Cd ou d'U accumulées dans les branchies ou l'hépatopancréas (en pourcentage) en fonction des concentrations d'exposition. 269

Figure 80 : Corrélation de Spearman (r) entre la bioaccumulation des métaux dans les branchies et l'hépatopancréas et l'expression des 5 gènes étudiés suite à l'exposition aiguë (0, 0.05, 0.5 et 5 mg Cd/L ; 0, 0.6, 4 et 8 mg U/L ; à 4 et 10 jours). 272

Figure 81 : Corrélation de l'expression des 5 gènes étudiés dans les branchies et les hépatopancréas contaminés en fonction du temps (4, 10, 30 et 60 jrs) suite à une exposition de 30 $\mu\text{g}/\text{L}$ d'U. 273

Figure 82 : Cinétique d'expression du gène *atp6* normalisée par rapport au témoin après exposition chronique (4 ; 10 ; 30 ; 60 jours) à faible dose d'U (30 $\mu\text{g}/\text{L}$). 273

Figure 83 : Synthèse de la tendance de l'expression des gènes étudiés suite à une forte (0.6, 4 et 8 mg/L) ou faible (30 $\mu\text{g}/\text{L}$) exposition à l'U. (↑) surexpression. (↓) répression. 276

Figure 84 : Proposition d'un mécanisme de cytotoxicité induit par la présence de l'U..... 279

Liste des abréviations

Note : les mots en italique désignent des gènes.

'OH	radical hydroxyle
<i>12S</i>	ARN ribosomal 12S
<i>18S</i>	ARN ribosomal 18S
Ac eau	activité de l'élément
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
AF	accumulation factor
ALA	acide α -lipoïque
ANCOVA	analysis of covariance
ANOVA	analyse de la variance
ARN	acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Asc•-	radical ascorbyle
AscH-	ascorbate monoanion
ATP	adenosine triphosphate
<i>atp5f1</i>	ATP synthase H ⁺ transporting mitochondrial F0 complex subunit b isoform 1
<i>atp6</i>	ATP-synthase sous unité six
ATPase	adenosine triphosphate synthase
BCA	acide bicinchoninique
BSA	albumine sérum bovin
CAT	catalase
CBR	critical body residues
Cd	cadmium
cDNA	complementary acid desoxyribonucleide
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
coQ	coenzyme Q
coQH2	coenzyme QH2
COX I/ <i>cox1</i>	cytochrome c oxydase sous unité I
COX IV	cytochrome c oxydase sous unité IV
Ct	threshold cycle
cytP450	cytochrome P450
DCCs	dose conversion coefficient
ddext	débit de dose externe
ddint	débit de dose interne
ddt	débit de dose total
DEPC	diéthylpyrocarbonate
DNA	acid desoxyribonucleotide

DNase I	désoxyribonucléase
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DTT	1,4-dithiothreitol
DU	depleted uranium
DW	dry weight
EA	laboratoire d'écotoxicologie aquatique
EDX	energy-dispersive X-ray
EF	expression factor
ERO	espèce réactive de l'oxygène
FAO	food and agriculture organization of the United Nations
FIAM	free ion activity model
<i>gls1</i>	glutaminase like
GPS	global positioning system
GPX	glutathione peroxidase/glutathion peroxydase
GR ou Gred	glutathion réductase
GSH	reduced glutathione/glutathion réduit
GSSG	oxidized glutathione/glutathion oxydé
GST	glutathione s transferase/glutathione s transférase
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HO	hème oxygénase
HO ₂ ·	radical perhydroxyle
HOO·	radical hydroperoxyde
HP	hepatopancreas
HSP70	heat shock protein de 70 kilodalton
ICP-AES	spectrométrie d'émissionatomique par plasma à couplage inductif
ICP-MS	spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif
J-CHESS	java chemical equilibrium with species and surfaces
L·	radical lipidique
LB	milieu Luria Bertani
LC50	concentration létale entraînant 50% de mortalité
LOO·	radical lipidique peroxydé
LOOH	hydroperoxyde lipidique
LRE	laboratoire de radioécologie et d'écotoxicologie
MDA	malondialdéhyde
MET	microscopy electronic transmission
MMP	mitochondrial membrane potential
MPT	mitochondrial permeability transition pore opening
MT/ <i>mt</i>	metallothionein/ métallothionéine
NaDPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCBI	national center for biotechnology information

NO·	monoxyde d'azote
NOEC	no observed effect concentration
O ₂ ^{·-}	radical superoxyde
oligodT	deoxy-thymine nucleotides
ONOO ⁻	peroxynitrite
PCA	principal component analysis
PCR	polymerase chain reaction
Pi	phosphate inorganique
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PS	poids sec
PTP	permeability transition pore
PVC	polychlorure de vinyle
QQplot	quantile-quantile plot
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonucléases
RO·	radical alkoxyde (R est une chaîne carbonée)
RO ₂ [·]	radical peroxyde (R est une chaîne carbonée)
ROH	alcool
ROOH	hydroperoxyde
ROS	reactive oxygen species
RT	reverse-transcriptase
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SAAE	spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique
SEM	standard error of the mean
SH	groupement sulphydrile
SOD	superoxide dismutase
<i>sod(Mn)</i>	superoxyde dismutase mitochondriale
Tm	temperature de fusion
U	uranium
UA	uranium appauvri
UV	ultra-violet
<i>vchat</i>	vesicular acetylcholine transporter

Chapitre I

Introduction

Chapitre I-A

Contexte et objectifs

Les écosystèmes aquatiques sont depuis longtemps menacés par les activités anthropiques génératrices de pollutions (accidentelles ou chroniques). Avec l'urbanisation croissante et le fort développement économique de certains pays, les rejets des polluants sont de plus en plus importants au niveau mondial. Rejetés directement dans les eaux de surfaces, émis dans l'atmosphère, évacués dans les eaux usées ou répandus sur les sols, la plupart des polluants finissent par rejoindre les milieux aquatiques. Par conséquent, l'accroissement des activités humaines constitue un risque potentiel pour la biocénose. La prise de conscience de la nécessité de protéger l'environnement pour une bonne conservation ou une remise en l'état rapide des milieux naturels est grandissante. Cette préoccupation de la société et de la communauté scientifique a ainsi fait émerger certaines questions, notamment celles du devenir des polluants dans l'environnement ainsi que leurs effets sur les organismes vivants. La préoccupation européenne pour la préservation des ressources aquatiques et pour l'entrée sur le marché de substances chimiques potentiellement toxiques a fait l'objet de nombreux projets. Récemment, l'Europe a adopté en 2000 la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) qui vise à atteindre un bon état chimique et écologique des eaux en 2015. Trente-trois substances ont été ainsi qualifiées de substances prioritaires et dangereuses prioritaires. De plus, le règlement européen REACH (Registration, Evaluation, Autorisation, and Restriction of Chemicals) entré en vigueur en 2007, a pour objectif principal de protéger la santé humaine et celle de l'environnement tout en maintenant le développement des activités industrielles. Pour cela, il vise à améliorer la connaissance des usages et propriétés des substances chimiques fabriquées ou importées dans l'union européenne, à assurer la maîtrise des risques liés à leurs utilisations, et à restreindre ou interdire leur emploi en cas de besoin. Parmi les contaminants majeurs de l'environnement, les métaux traces-tel le cadmium- posent de sérieux problèmes écologiques surtout par leur rémanence et leur toxicité élevées. La démarche d'évaluation du risque des substances chimiques a été éprouvée et fait l'objet de consensus tant réglementaires que scientifiques. Actuellement, les 33 substances prioritaires et dangereuses prioritaires ont fait l'objet d'études écotoxicologiques spécifiques qui conduisent à l'établissement de Normes européennes de Qualité Environnementale (NQE). Parmi ces éléments métalliques, certains présentent aussi des caractéristiques radioactives- tel l'uranium¹- qui induisent des risques pour les écosystèmes et l'homme par la combinaison de leur chimio- et radio-toxicité.

¹L'uranium, contrairement au cadmium n'appartient pas aux groupes des 33 substances prioritaires. Cependant, il fait partie des substances pertinentes de la classification de la DCE.

Par ailleurs, le développement de méthodes d'évaluation du risque environnemental, associé aux rejets ou à la présence de radionucléides dans l'environnement, a fait l'objet de deux programmes de recherche européens, le projet ERICA (Environmental Risk for Ionising Contaminants : Assessment and Management) et le FASSET (Framework for Assessment of Environmental Impact). Ces programmes ont mis en évidence les lacunes de connaissances concernant les expositions chroniques des radionucléides à faibles doses. L'étude des effets des radionucléides dispersés dans l'environnement est devenue un thème majeur dont l'un des enjeux est d'évaluer le risque écologique pour les organismes vivants. Ceci a mené au lancement du programme ENVIRHOM (Radioprotection de l'ENVironnement à l'HOMme) à l'Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire en 2001 (Garnier-Laplace et Paquet, 2001). Ce programme a pour objectifs d'évaluer la toxicité des radionucléides et de mieux comprendre les réponses biologiques suite à une bioaccumulation de ces contaminants chez les organismes vivants. Depuis de nombreuses années, la radioécologie concerne l'étude des transferts des radioéléments dans les différents compartiments de la biosphère. A l'IRSN, et plus particulièrement au LRE, la démarche d'évaluation du risque suit et utilise les mêmes concepts que ceux développés pour l'écotoxicologie des éléments chimiques stables. L'approche retenue dite intégrée, étudie les interactions entre les facteurs de contamination (analyse fine de l'exposition au travers du concept de biodisponibilité) et la biocénose (analyse des effets). L'analyse des effets se divise en deux sous parties, concernant l'identification de marqueurs d'exposition/d'effet (biomarqueurs) et la caractérisation à différentes échelles d'organisation biologique des effets et des mécanismes responsables de la toxicité. Ce programme se consacre en partie à l'étude du devenir et des effets induits après exposition à l'uranium. Plusieurs thèses ont été consacrées à l'acquisition de premières données d'écotoxicologie sur différents modèles biologiques. Ces données concernent principalement la caractérisation de l'exposition à travers l'étude de la spéciation chimique de l'uranium associée à l'évaluation de la biodisponibilité. L'originalité de ce travail consiste à évaluer les effets de l'U chez une espèce sentinelle. Une des approches proposées par le programme ENVIRHOM est de comparer les effets des radioéléments (tel l'uranium) aux effets chimio-toxiques de polluants plus connus (en termes de spéciation biologique et d'études des effets sur les organismes) tels que les métaux (en particulier le cadmium). Une autre partie vise aussi à discriminer la radio-toxicité de la chimio-toxicité de ces éléments radioactifs. Cette thèse s'inscrit directement dans ce projet. Notre travail devra *in fine* permettre d'identifier d'une part des marqueurs d'effets pouvant être utilisés dans l'évaluation du risque environnemental et d'autre part, les mécanismes de toxicité.

Dans ce contexte, nous nous sommes consacrés à cinq objectifs majeurs au cours des travaux de cette thèse². Un des buts a été (i) d'étudier les paramètres toxicocinétiques (bioaccumulation, distribution des éléments dans l'organisme et dans les tissus) de l'uranium (U) et du cadmium (Cd) chez l'écrevisse *Procambarus clarkii* retenue comme espèce modèle. Ensuite, le second objectif a été (ii) d'évaluer les effets des deux métaux à différentes échelles de l'organisation biologique ; allant de l'étude d'impact au niveau de l'expression des gènes mitochondriaux et des gènes marqueurs de stress oxydant, des activités des enzymes de stress oxydant, des impacts histologiques, jusqu'à la survie des individus. La troisième approche a concerné (iii) la mise en évidence du lien entre les effets des différents paramètres biologiques étudiés entre eux, de les corrélés à la bioaccumulation des contaminants et d'essayer d'identifier des biomarqueurs pertinents de toxicité. Le 4^{ème} axe de recherche s'est attaché à (iv) évaluer la part relative des effets chimiques et radiologiques de l'U chez l'écrevisse. Enfin, le dernier objectif(v) a visé à évaluer la toxicité de l'U en la comparant à celle du Cd afin de classer la toxicité de ce radioélément.

Afin de présenter l'étude menée en ce sens, ce manuscrit s'articule en 6 chapitres majeurs.

Le premier chapitre vise à introduire les objectifs des travaux de thèse. En effet, le présent sous chapitre décrit le contexte et les objectifs de nos études. Dans un second sous chapitre, une description du modèle biologique, une synthèse bibliographique sur les propriétés physico-chimiques du Cd et de l'U, leurs répartitions dans l'environnement, ainsi que leurs mécanismes de contamination et leurs effets à différents niveaux de l'organisation biologique d'intérêts sont développés. De plus, un résumé sur les connaissances concernant les biomarqueurs et les bioindicateurs des polluants sera présenté. Dans un troisième sous chapitre, nous avons présenté une justification de la stratégie expérimentale.

Le chapitre II concerne la description du matériel et des méthodes, en présentant plus particulièrement les différentes techniques analytiques utilisées. Un point particulier est consacré au clonage de deux gènes d'intérêt.

Le chapitre III est consacré à l'approche expérimentale menée pour évaluer les impacts du Cd sur les différents paramètres biologiques retenus après exposition aiguë et

²Pour plus de détails voir chapitre I-C.

chronique de l'écrevisse *P. clarkii*. Cette approche sera présentée sous la forme d'un article (soumis).

Le quatrième chapitre aborde les expériences réalisées dans le but d'étudier les effets de l'U sur les différents niveaux d'intégration biologiques déjà mentionnés. Un sous chapitre (chapitre IV-A) sera dédié à la présentation des réponses génétiques, les structures histologiques et la survie des écrevisses après une exposition de courte durée (4 et 10 jours) à différentes concentrations (0,1 μM à 40 μM). Dans un second sous chapitre (chapitre IV-B), nous présenterons les impacts de l'U au niveau moléculaire (génétique et enzymatique) après une longue durée d'exposition (60 jours) à une concentration environnementale (0,1 μM). Un troisième sous chapitre (chapitre IV-C), sera consacré à présenter l'approche utilisée pour discriminer la radio de la chimio-toxicité de l'U. Ces études seront présentées sous forme de trois articles dont les deux premiers sont publiés (*Ecotoxicology and Environmental Safety*) et le dernier soumis (*Ecotoxicology and Environmental Safety*).

Dans le cinquième chapitre, nous avons comparé les effets du Cd et de l'U après exposition aigüe (40 μM -10 jrs) et chronique (0.1 μM -60 jrs). Cette approche est aussi présentée sous forme d'un article en cours de préparation.

Enfin, la partie finale (chapitre VI) du document présente une synthèse générale et les perspectives de recherches issues de ce travail.

Chapitre I-B

Etude bibliographique

1. Le modèle biologique *Procambarus clarkii*

1.1. Systématique, origine et distribution

Avec plus de 640 espèces différentes, les écrevisses forment un groupe de crustacés décapodes très diversifié (Crandall et Buhay, 2008). Il existe deux super-familles d'écrevisses, Les *Astacoidea* (hémisphère nord) et les *Parastacoidea* (hémisphère sud). La première est formée deux familles, les *Cambaridae* et les *Astacidae* alors que les *Parastacoidea* sont composés d'une seule famille, les *Parastacidae* (Crandall et Buhay, 2008). La division entre les super-familles (astacoidea et parastacoidea) des hémisphères nord et sud est d'origine pangéenne datant au moins du triasique (185-225 millions d'années). Des fossiles d'écrevisses et des traces de terriers observées dans le Colorado et d'Utah datant de 265 millions d'années sont la preuve de cette phylogénie (Crandall, 2006). *Procambarus clarkii*, appartient à la famille des *Cambaridae* (Crandall, 2010) (**Tableau 1**). Originaire du Nord de l'Amérique et de l'Est de l'Asie (Crandall, 2006), elle est maintenant largement répandue sur le territoire français au détriment des espèces endémiques principalement rattachées à la famille des *Astacidae*.

Tableau 1 : Position systématique de *Procambarus clarkii* (Systema Naturae, 2011).

Classification	
Domaine	<i>Eukaryota</i>
Règne	<i>Animalia</i>
Sous-règne	<i>Bilateria</i>
Division	<i>Protostomia</i>
Infra-règne	<i>Ecdysozoa</i>
Super-embranchement	<i>Panarthropoda</i>
Embranchement	<i>Arthropoda</i>
Sous-embranchement	<i>Mandibulata</i>
Infra-embranchement	<i>Crustaceomorpha</i>
Super-classe	<i>Crustacea</i>
Classe	<i>Malacostraca</i>
Sous-classe	<i>Eumalacostraca</i>
Super-ordre	<i>Eucarida</i>
Ordre	<i>Decapoda</i>
Sous-ordre	<i>Pleocyemata</i>
Infra-ordre	<i>Astacidea</i>
Super-famille	<i>Astacoidea</i>
Famille	<i>Cambaridae</i>
Genre	<i>Procambarus</i>
Espèce	<i>clarkii</i>

L'écrevisse de Louisiane, *P. clarkii*, est comme son nom l'indique très abondante en Louisiane. Elle est native du Nord-Est du Mexique et du Sud des Etats-Unis (Henttonen et Huner, 1999; Boets et al., 2009) C'est une espèce largement répandue dans le monde entier et sur presque tous les continents (FAO; ISSG; NatureServe, 2003; Crandall, 2010) (**Figure 1**).

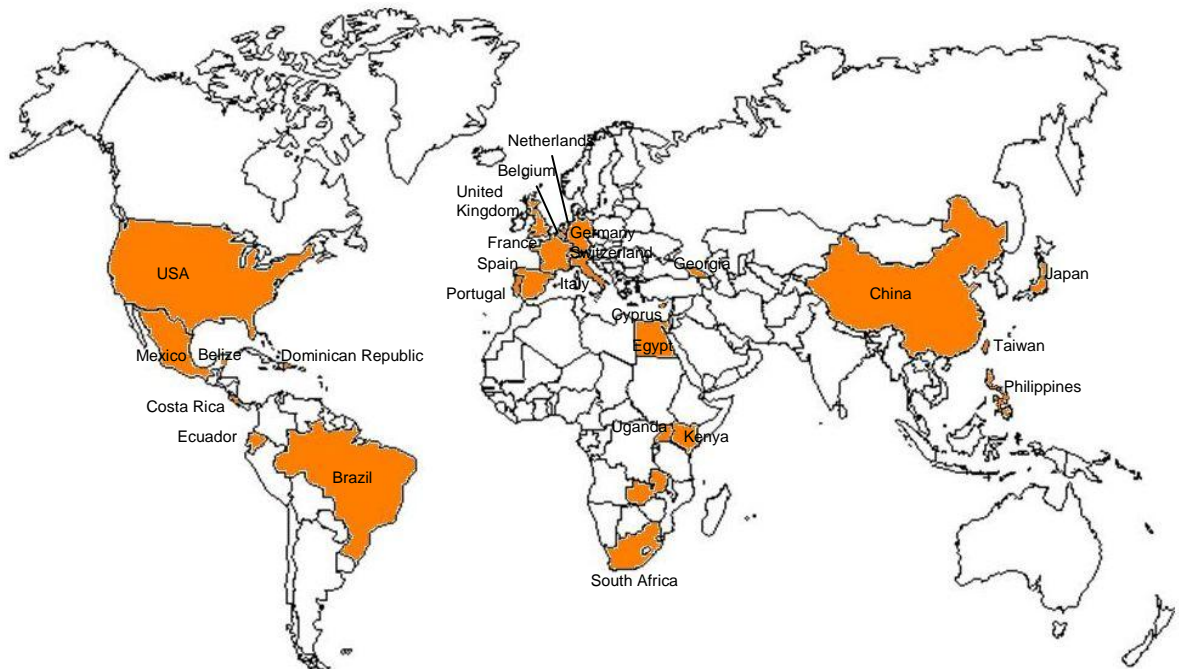


Figure 1 : Distribution mondiale de *P. clarkii* (Adapté de Holdich, 2002; FAO; ISSG; NatureServe, 2003;Crandall, 2010).

En effet, *P. clarkii* colonise les milieux avec succès grâce à sa forte compétitivité : fécondité élevée (200-500 œufs/femelle : strategy-R) (ISSG) et sa maturité sexuelle précoce. Une enquête réalisée en France en 2006 confirme la progression constante de cette espèce qui est désormais recensée dans 61 départements. En une quinzaine d'années, l'espèce a colonisé plus de la moitié du territoire national, confirmant par la même son extraordinaire capacité d'expansion. La carte de répartition de l'espèce en France (**Figure 2**) indique de fortes densités sur toute la façade atlantique, de la Loire-Atlantique, jusqu'au département des Landes, mais aussi sur la façade méditerranéenne (Hérault, Gard, Bouches-du-Rhône). Une explosion des densités de populations en Gironde, Charente-Maritime, Loire-Atlantique et dans les Deux-Sèvres a été observée ces dernières années. Cette espèce est sans doute celle qui présente le spectre écologique le plus large : elle est capable de coloniser des milieux variés allant des zones à truites aux étangs côtiers en passant par les marais. Elle peut supporter des mises à sec d'étangs de plusieurs mois. On la rencontre également dans certains

milieux temporaires (Loire Atlantique) et dans des milieux soumis aux marées (Pyrénées atlantiques) (Collas et al., 2007).

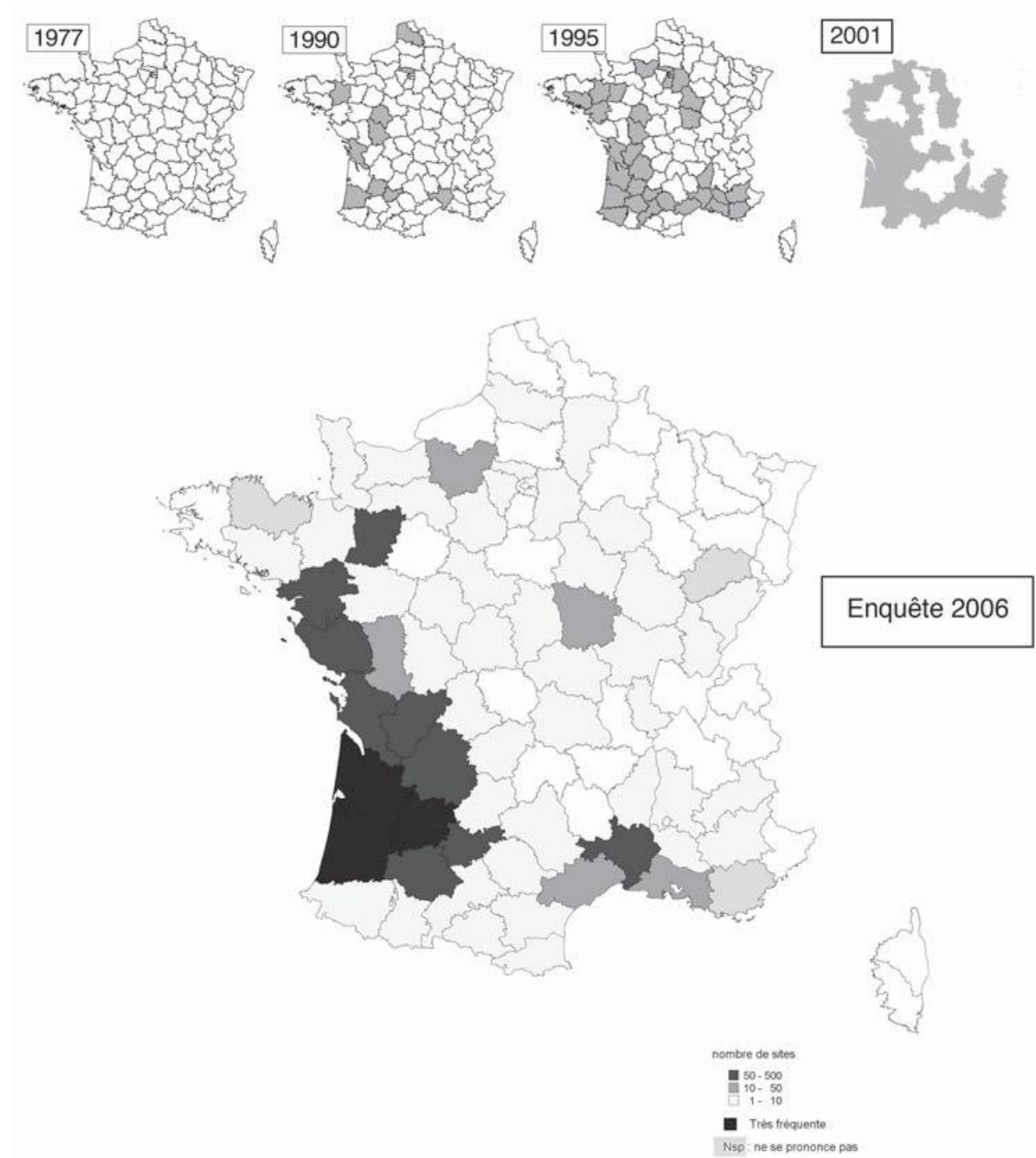


Figure 2 : Evolution de la répartition de *Procambarus clarkii*. Pour les cartes des années 1977 à 2001, le signalement de l'espèce est figuré par un grisé. Pour la carte 2006, l'intensité du gris reflète l'abondance de l'espèce à l'intérieur de chaque département (Collas et al., 2007).

1.2. Biologie de l'écrevisse

1.2.1. Morphologie

Comme toutes les écrevisses, *P. clarkii* possède une carapace (**Figures 3 et 4**) composée essentiellement de chitine et de carbonate de calcium. Leurs corps sont segmentés comme tous les arthropodes. Le corps est divisé en deux parties, l'une antérieure qui est le céphalothorax, l'autre postérieure qui est l'abdomen. Le céphalothorax est formé de la tête qui est fusionnée au thorax. Cet organe est terminé en avant par un éperon, le rostre, dont la pointe est l'apex. De part et d'autre du rostre, se trouvent deux yeux pédonculés. La tête porte les antennules, les antennes (organes sensoriels), les mandibules, maxilles et maxillules (appendices dévolus à la fonction de nutrition). Le sillon cervical sépare la partie céphalique du céphalothorax d'une région comprenant deux aires branchiales de part et d'autre d'une aire cardiaque. Sur cette région thoracique se trouvent trois paires de maxillipèdes (ou pattes mâchoires) impliquées également dans la fonction de nutrition, et cinq paires de périopodes (ou pattes locomotrices), la première paire se terminant par de grandes pinces. Les deux paires qui suivent se terminent par de petites pinces et les deux dernières paires se terminent par des griffes. L'abdomen est segmenté, chaque segment portant une paire de pléopodes et se termine par le telson qui porte l'anus.



Figure 3 : Aspect d'une écrevisse *Procambarus clarkii* (Lukhaup, 2005).

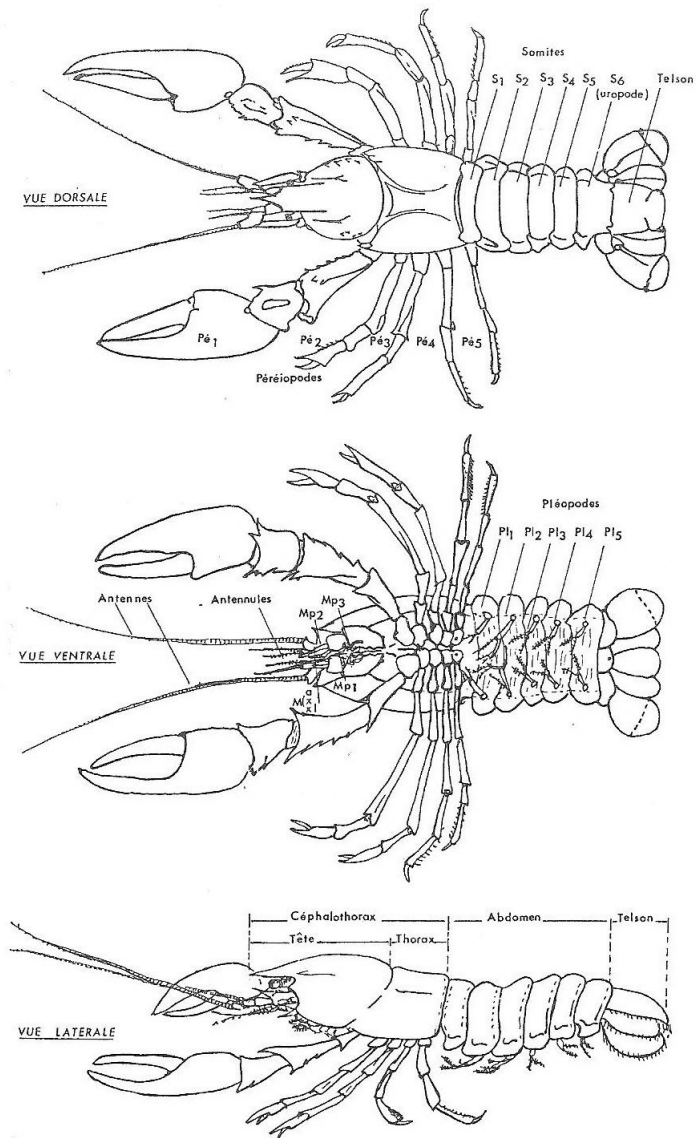


Figure 4 :Morphologie externe d'une écrevisse. Mp: maxillipède; Ma: mandibule; Mx: maxille (Arrignon, 1991).

La taille des écrevisses varie entre les espèces, allant de 2 cm chez les écrevisses naines adultes du genre *Cambarellus* à 40 cm (et plus de 5kg !) chez l'espèce la plus grande parmi les invertébrées d'eau douce *Astacopsis gouldi* actuellement en danger (Horwitz, 1994). Dans des conditions favorables à la croissance (bonne qualité de l'habitat, densité de population faible), *P. clarkii* peut atteindre 14 cm pour un poids de 76 à 84 g (Huner et Romaine, 1979; Dörr et al., 2006). Les couleurs des écrevisses sont aussi variées ; rouge (chez *P. clarkii*), bleue, orange, verte, marron et même sans pigment (blanche). La diversité morphologique se traduit aussi par l'existence d'écrevisses tachetées, rayées ou portant d'autres dessins (Crandall, 2006). *P. clarkii* présente des aspects morphologiques spécifiques qui aident à la détermination de cette espèce (**Figure 5**). Son céphalothorax présente une série d'épines bien visibles de part et d'autre du sillon cervical. La crête

postorbitale est simple ; on ne voit qu'une épine. Le rostre, a des bords convergents régulièrement pour se terminer par un triangle. La crête médiane dorsale est peu marquée et non denticulée. Les pinces possèdent des protubérances alternées sur leur tranchant ainsi que des épines et un ergot bien visible. Adulte, cette espèce est de couleur rougeâtre. Dörr et al. (2006) ont montré une corrélation entre les stades de croissance (maturité sexuelle) de *P. clarkii* et la couleur de l'écrevisse. Il semble que les écrevisses n'ayant pas atteint la maturité sexuelle présentent un gradient de couleur allant d'un vert-grisâtre pour les plus jeunes jusqu'à atteindre un marron-verdâtre.

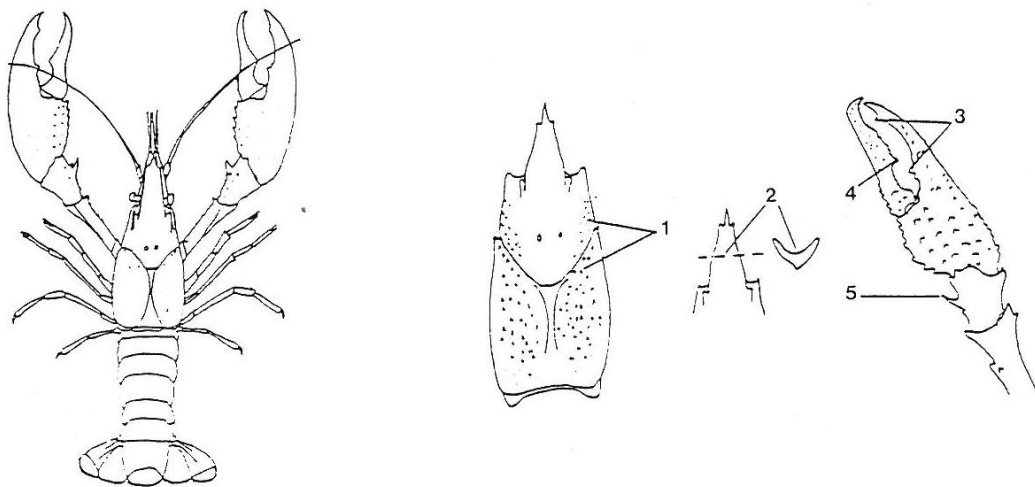


Figure 5 : Critères de détermination de *P. clarkii* (Roqueplo, 1992). (1) Le céphalotorax de cette espèce, présente une série d'épines bien visibles en arrière du sillon cervical. (2) La crête médiane dorsale est peu marquée et non denticulée. (3, 4) Les pinces possèdent des protubérances alternées sur leur tranchant ainsi que (5) des épines et un ergot bien visible.

Une différenciation bien apparente permet la détermination aisée des sexes (**Figure 6**).

- La morphologie des pinces, plus développées chez le mâle que chez la femelle.
- La largeur de l'abdomen, supérieure chez la femelle.
- Et surtout par la morphologie des deux premières paires de pléopodes :
 - L'examen de la face ventrale permet de différencier le mâle de la femelle : chez le mâle les deux paires antérieures d'appendices abdominaux sont dirigées en avant et transformées en stylets copulateurs en vue de l'écoulement du sperme.
 - Chez la femelle, toutes les pattes abdominales sont identiques, à l'exception de la première qui est atrophiée. Les orifices génitaux sont placés au niveau de la

troisième paire de pattes locomotrices chez la femelle et de la cinquième paire chez le mâle.

L'écrevisse est une espèce dite « gonochorique » dans le sens où les sexes sont séparés et qu'elle effectue une fécondation externe (Parnes et al., 2003).

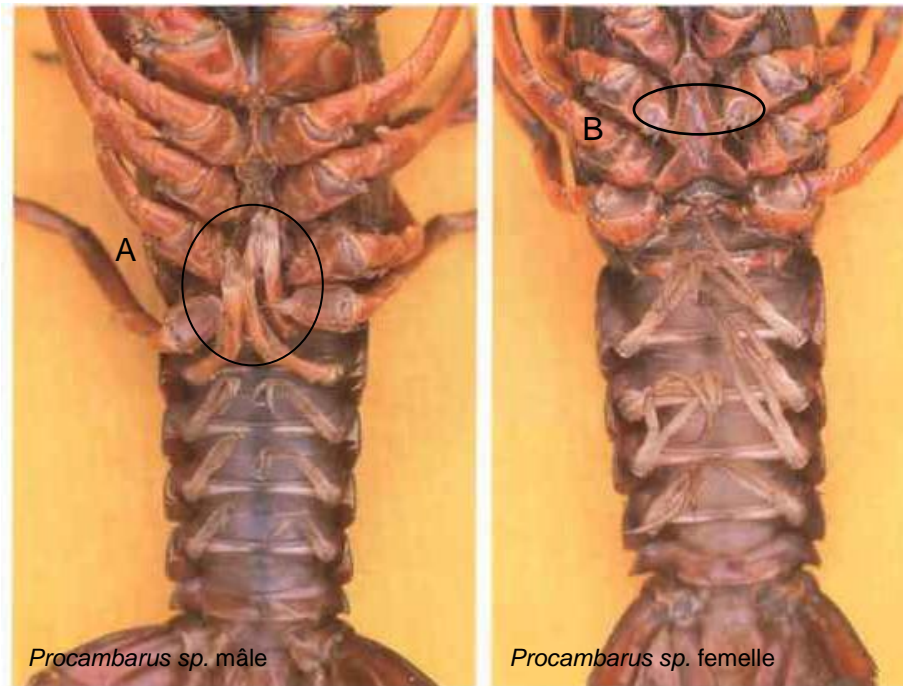


Figure 6 : Différence d'aspect entre une écrevisse mâle et une écrevisse femelle. (A) Stylets copulateurs. (B) Les orifices génitaux. (Source: Shi-wei Zhao/ NIGP: <http://www.mutagenes.net/yixian-formation/yanbin-shen.html>).

1.2.2. Anatomie et physiologie

Le tube digestif (**Figure 7**) des décapodes est caractérisé par un court œsophage, un estomac volumineux aux parois chitineuses, un intestin moyen ou mésentéron et un intestin postérieur ou proctodeum. Seul l'intestin moyen, d'origine endodermique, joue un rôle fonctionnel en termes de digestion et d'absorption. Les parties antérieures et postérieures, d'origine ectodermique, présentent un revêtement chitineux renouvelé à chaque mue et n'ont donc qu'un rôle mécanique dans la digestion. L'intestin postérieur aboutit à l'anus et est entouré par la masse musculaire abdominale. L'estomac est divisé en 2 régions par un sillon médian et transverse : une région antérieure ou cardiaque et une région postérieure nommée chambre pylorique. En fonction du stade de mue, la partie antérieure peut contenir une paire de pièces calcaires, discoïdes, les gastrolithes, réserve de calcium, nécessaire à l'élaboration de la carapace nouvelle. Cet appareil est doté de 3 dents chitineuses ou calcaires qui constituent un véritable broyeur gastrique, appelé « moulin gastrique ». Les glandes

antennaires (vertes) sont des organes excréteurs situés dans la région ventrale de la tête près de la bouche. Elles sont accompagnées d'un canal excréteur et d'une vessie. La glande digestive (ou hépatopancréas) est un organe plurilobé qui occupe la quasi-totalité de la cavité du céphalothorax. Elle est impliquée dans l'absorption et le stockage des nutriments. Chaque lobe est constitué de tubules fermés à une extrémité et s'ouvrant de l'autre dans un canal qui débouche au niveau de la chambre pylorique de l'estomac. Les glandes antennaires (ou glandes vertes) sont des organes excréteurs situés dans la région ventrale de la tête près de la bouche. Elles sont constituées d'un canal excréteur et d'une vessie. Les organes reproducteurs se situent près de la glande digestive. Les testicules des mâles sont blanchâtres et lisses, et les ovaires des femelles sont de couleur jaune orangée et d'aspect grenu. L'appareil circulatoire des crustacés est de type lacunaire : l'hémolymphe (sang incolore) est propulsée par le cœur dans des artères puis des capillaires qui s'ouvrent librement dans la cavité générale. Après avoir irrigué les différents organes, l'hémolymphe est collectée par des sinus veineux qui la ramène finalement aux branchies, lieu de l'hématose. Ce sang bien oxygéné va alors retourner au péricarde. Les branchies, véritable appareil respiratoire, se situent dans deux chambres latérales indépendantes à la périphérie de la carapace. La convection ventilatoire est assurée par les battements de deux appendices dérivant des deuxièmes maxilles, les scaphognathites : leurs mouvements de pompage créent une dépression dans les cavités branchiales qui entraîne le passage de l'eau sur les branchies (**Figure 7A**). Des chémorécepteurs périphériques sensibles à l'O₂ et au CO₂ sont localisés dans les cavités branchiales, ils sont responsables du réflexe de ventilation et jouent un rôle fondamental dans le maintien du métabolisme aérobie (Massabuau et al., 1980; Massabuau et Burtin, 1984). Ainsi, l'écrevisse est capable d'ajuster sa respiration et garde son indépendance à l'égard de la teneur en oxygène : elle est capable d'accroître son taux de ventilation dès que l'oxygène diminue. Les organes respiratoires jouent également un rôle dans les échanges ioniques. En effet, le milieu intérieur des écrevisses est plus concentré en ions que le milieu aquatique extérieur, ainsi l'osmorégulation se fait grâce à de nombreux transporteurs membranaires au niveau des branchies. Le système nerveux de l'écrevisse est essentiellement ganglionnaire, le cerveau (masse ganglionnaire) se situe dorsalement près de l'œsophage (Arrignon, 1991).

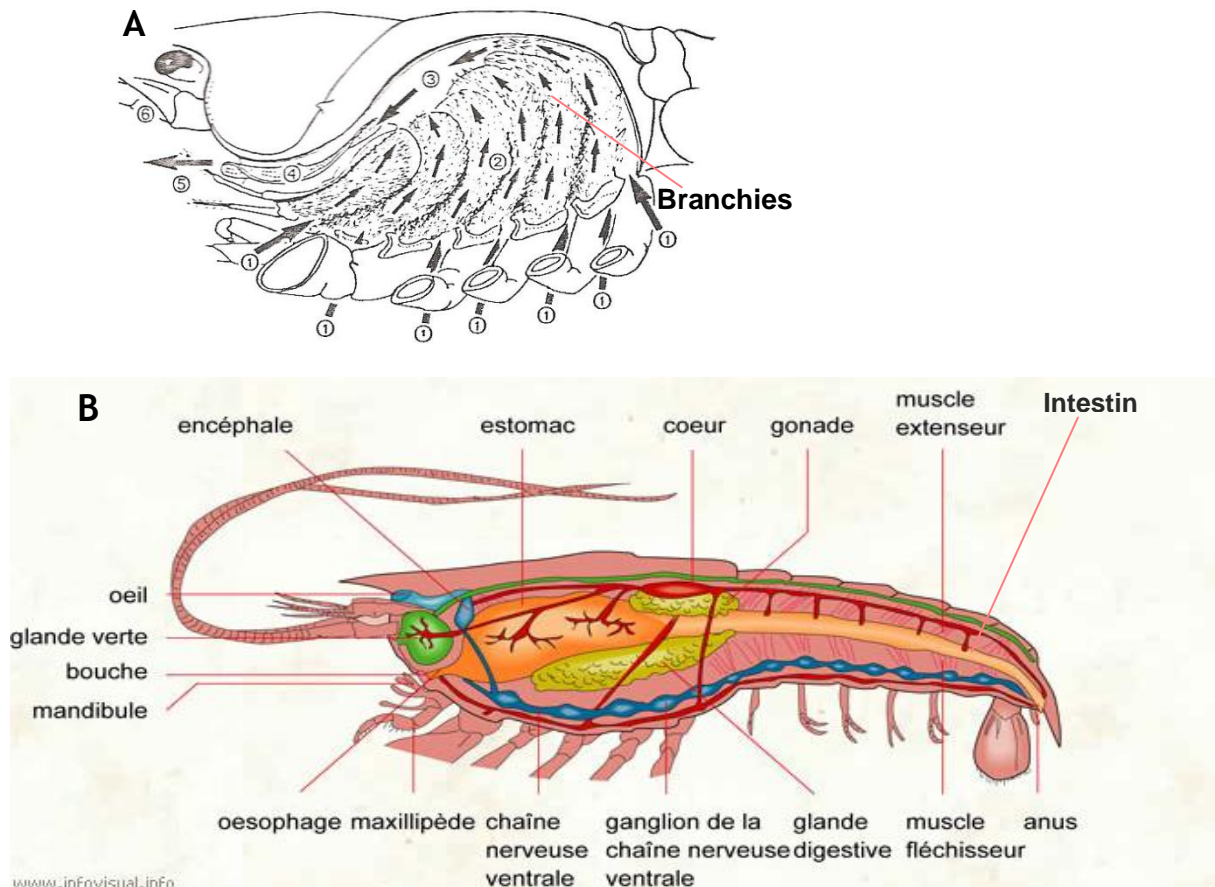


Figure 7: Anatomie interne d'une écrevisse.(A) Branchies: Les flèches indiquent le sens d'écoulement de l'eau dans la masse branchiale (d'après Massabuau, 1984). (B) reste des organes.

1.2.3. Croissance et mue

En moyenne, les écrevisses *P. clarkii* peuvent vivre jusqu'à trois ans (Dörr et al., 2006). Frutiger et al., (1999) ont trouvé que cette espèce peut atteindre l'âge de cinq ans. Il est possible de déterminer l'âge des écrevisses à partir de la mesure de la longueur du corps (šmietana et Krzywosz, 2006). La croissance des crustacés se fait grâce à des mues. Ces changements périodiques de l'exosquelette dominant toute la physiologie des crustacés car ils sont précédés et suivis par une série de modifications tissulaires et comportementales, comme la formation et la calcification de l'exosquelette à chaque fois (Adelung, 1971) (**Figure 8**). Les jeunes écrevisses muent un grand nombre de fois (Arrignon, 1991). Par exemple, dans une eau de 18 à 20°C, les juvéniles *Astacus leptodactylus* muent tous les 17 à 20 jours pendant les premiers mois (Lassalle, 1985). Chez *P. clarkii*, les adultes mâles et femelles (~ 7.5-9.6 cm) muent surtout en avril quand la température de l'eau se réchauffe. Seules les femelles muent une seconde fois entre juin et juillet. Puis une autre période de mue pour les deux sexes peut survenir vers novembre (11.2°C) (Dörr et al., 2006). Le phénomène de mue

semble être lié étroitement aux changements de la température de l'eau (Huner, 1978) et au cycle de reproduction (mue avant et après la période de frai) (Dörr et al., 2006).

On distingue principalement quatre étapes :

a. L'intermue ou inter-ecdysis:

Ce stade est défini comme étant la période de stabilité de l'animal.

b. La prémue ou Proecdysis :

Avant la mue, les réserves de calcium ne sont pas uniquement contenues dans la carapace. Elles sont principalement constituées par les gastrolithes (60%), par le calcium contenu dans l'hépatopancréas (0.6 à 1%) et dans l'hémolymphe (un peu plus de 1%). Durant cette période les gastrolithes vont se constituer et grossir.

c. La mue ou ecdysis ou exuviation:

C'est le moment où s'effectue le changement de l'exosquelette. La jointure membraneuse qui relie l'arrière du céphalothorax au premier segment abdominal se déchire et le corps fait saillie, couvert de sa nouvelle carapace molle. Pendant ce temps l'animal est mou, sans défense et ne se nourrit pas. Il ne peut se déplacer que faiblement.

d. La postmue ou post-ecdysis :

Au cours de la postmue, l'exosquelette se constitue et se consolide. Les gastrolithes y contribuent et, de ce fait, diminuent rapidement. Au début de la postmue, la quantité de calcium de l'animal mou est de 10 à 14 fois supérieure à celle de l'animal calcifié. Les gastrolithes ne peuvent donc suffire. De plus, l'animal, faute d'un appareil masticateur solidifié, ne peut trouver le complément de calcium dans sa nourriture. L'apport se fait alors au niveau de l'appareil branchial. La calcification de la nouvelle carapace est conditionnée par la teneur de l'eau ambiante en calcium. Simultanément se manifeste une croissance accélérée des tissus, à partir du moment où l'appareil masticateur s'est solidifié, la phase d'inanition s'achève (Arrignon, 1991).

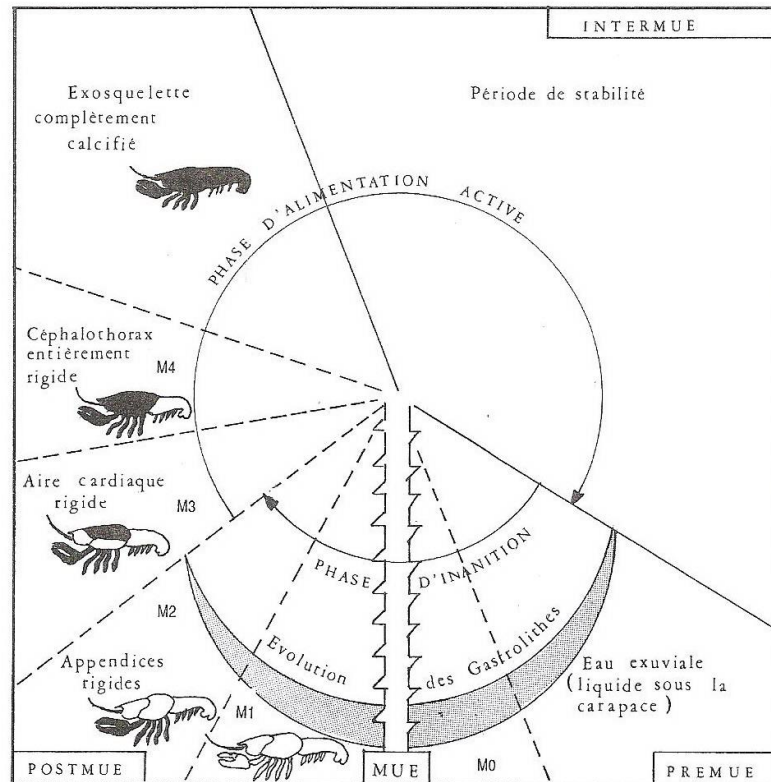


Figure 8 : Cycle de la mue des écrevisses (Arrignon, 1992)

1.3. Ecologie et comportement

Procambarus clarkii est adaptée pour vivre dans une grande variété de milieux aquatiques, comme les rivières, les étangs, les ruisseaux, les canaux, les marais et les marécages alternativement dans des zones inondées et exondées (FAO ; ISSG ; NatureServe, 2003). De plus, elle habite fréquemment les environnements perturbés comme les champs de riz, les canaux d'irrigation et les barrages (Oliveira et Fabiao, 1998). Cette espèce tolère une grande variation des facteurs abiotiques : elle supporte des niveaux bas en oxygène, des températures extrêmes (10-22 °C à 30 °C ou plus), une salinité modérée et la pollution (FAO; NatureServe, 2003; Gherardi et Vadim, 2006; Cruz et Rebelo, 2007). *P. clarkii* peut tolérer des périodes de sécheresse allant jusqu'à 4 mois (Henttonen et Huner, 1999). On trouve les plus fortes densités d'écrevisses dans les plans d'eau ensoleillés de moins de 40 cm de profondeur. Les fonds les plus propices sont turbides et couverts d'herbiers (Arrignon, 1991). Son comportement fouisseur s'accompagne de la construction de terriers. Ces organismes sont omnivores (Rodriguez et al., 2005). Les écrevisses sont des animaux nocturnes (Miranda-Anaya, 2004), elles sortent de leur passivité et de leur cachette (herbier, racines, pierres, galeries) le soir, période au cours de laquelle elles se déplacent et cherchent leur nourriture. Dans les cours d'eau à forte biomasse d'invertébrés, les écrevisses occupent une position

trophique supérieure et ont un taux de croissance plus élevé que les écrevisses dans les cours d'eau à faible biomasse d'invertébrés (Olsson et al., 2008). Le cannibalisme est courant chez les écrevisses (Holdich, 1993). Dans des situations extrêmes, elles peuvent réduire ou éliminer d'autres animaux ou plantes de l'écosystème (Momot, 1995). C'est une source de nourriture pour les mammifères et les oiseaux, jouant un rôle important entre les interactions trophiques terrestres et aquatiques (Correia, 2001). Elles peuvent même servir de nourriture pour les insectes (Herberholz et al., 2004), les amphibiens (Hirai, 2004), les reptiles (Bondavalli et Ulanowicz, 1999), les poissons (Garvey et al., 1994) et pour d'autres écrevisses. Une compétition existe aussi inter-spécifiquement et ceci pour des raisons diverses comme pour l'espace et l'abri (Garvey et al., 1994).

1.4. Intérêt économique

L'écrevisse est un animal fort ancien dont la capture, plus aisée que celle du poisson, a constitué à l'aurore de la vie humaine, une source de nourriture souvent vitale pour certaines hordes d'hommes préhistoriques (Arignon, 1991). L'une des premières mentions de l'écrevisse a été faite par Aristote en 300 A.J.C et c'est surtout au moyen âge que sa popularité a augmenté et d'énormes quantités ont commencé à être consommées (Skurdal et Taugbol, 2001). Ceci continue jusqu'à nos jours, où au moins 85% de la consommation mondiale des écrevisses est assurée par *P. clarkii* (Kerby et al., 2005) en relation avec ses capacités de croissance rapide et d'adaptation aux changements saisonniers (Henttonen et Huner, 1999) (**Figure 9**). Le commerce de *P. clarkii* participe d'une façon importante à l'économie de certains pays (Antón et al., 2000).

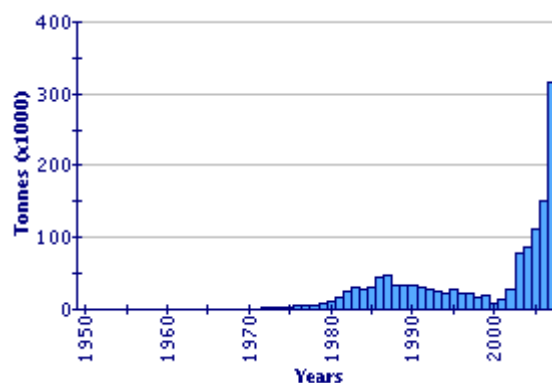


Figure 9 : Production mondiale de *Procambarus clarkii* (FAO Fishery Statistic).

En 2003, la production de *P. clarkii* aux Etats-Unis était évaluée à 48.6 millions de dollars (~35.33 millions d'euros). La production mondiale (**Figure 9**) de cette espèce provient principalement de Louisiane et d'autres états du Sud des Etats-Unis, mais aussi de Chine, du Kenya et d'Espagne où cette espèce a été introduite (FAO). En 2005, la FAO a enregistré une production significative de cette espèce en Chine, s'élevant à plus de 88 000 tonnes, avec une valeur excédant 303 millions d'USD. Le succès commercial de cette espèce en Europe est surtout lié à sa résistance à coloniser les milieux perturbés et à la peste de l'écrevisse, *Aphanomyces astaci* à qui les écrevisses indigènes sont sensibles (Lindqvist et Huner, 1999).

La production d'écrevisse en France est faible. Il y a pourtant un marché de consommateurs puisque la France importe environ 1 000 tonnes/an et ne produit qu'environ 10 tonnes. 98% des importations se font sous forme d'écrevisses surgelées, voire cuisinées (majoritairement *Procambarus clarkii*), les 2% restant correspondent à des écrevisses importées vivantes, essentiellement de Turquie et de Grèce (majoritairement *Astacus leptodactylus*). L'exploitation de la ressource sauvage de *Procambarus clarkii* en France est faible car elle conditionnée par deux points réglementaires:

- le transport d'animaux vivants est interdit de façon à éviter sa propagation dans des endroits où l'espèce n'est pas présente ;
- la vente d'animaux ne peut être effectuée que par des pêcheurs professionnels (Miossec, 2004).

Tout au long de notre étude, nous avons donc bénéficié des techniques de pêches d'un professionnel (N. Gauthier) et des autorisations réglementaires pour l'approvisionnement et pour le transport de cette espèce vivante.

1.5. Intérêt scientifique et écologique

En recherche, les écrevisses servent d'organismes modèles depuis plus de 25 ans, dans des champs disciplinaires variés tels que la neurobiologie, la vision, la toxicologie, l'écophysiologie, la biologie de la conservation et l'évolution, etc. Parmi les écrevisses, le maintien et l'élevage de *P. clarkii* dans les laboratoires sont relativement faciles à gérer. Il y a déjà 125 ans que Huxley (1880) a rédigé des textes d'études zoologiques sur ces animaux. Par ailleurs, du fait de son caractère invasif, cette espèce se trouve en abondance dans les milieux naturels et son prélèvement, en période favorable, est aisé.

Au Kenya, *P. clarkii* a été introduite comme moyen de lutte biologique contre les parasites trématodes *Schistosoma haematobium*, vecteur de la schistosomiase, car elle

s'alimente de gastéropodes d'eau douce, hôte intermédiaire de ces parasites. Sous certaines conditions, *P. clarkii* a significativement réduit la dispersion de la schistosomiase dans certaines régions du Kenya (Mkoji et al., 1999; Lodge et al., 2005; Foster et David, 2007).

De même, *P. clarkii* sont souvent utilisées comme indicateurs de pollution métallique aquatique puisque ces crustacés tendent à accumuler les métaux dans leurs tissus (Anderson et al., 1997; Sánchez López et al., 2004; Alcorlo et al., 2006; Suárez-Serrano et al., 2010).

2. Evaluation des risques de contamination des milieux aquatiques

Dans un contexte de surveillance de l'état écologique (biomonitoring) des milieux aquatiques (Loi n°2006-1772 du 30 décembre 2006 sur l'eau et les milieux aquatiques), la France s'est engagée à caractériser l'état écologique de ses écosystèmes et à surveiller d'éventuels changements de ses milieux. Les mesures des paramètres physiques, chimiques et bactériologiques de l'eau renseignent sur la qualité de cette ressource (Li et al., 2010) mais leur caractère ponctuel ne permettra pas de révéler d'éventuelles perturbations perpétrées en dehors des périodes de mesures. De même, ces techniques ne renseignent pas sur l'état des organismes aquatiques ni sur les conséquences écologiques engendrées par les changements survenus dans ces écosystèmes. Dans le cas d'une pollution métallique, la mesure des concentrations des métaux dans le biotope (eau, sédiment) peut révéler l'existence d'une pollution, mais ne met pas en évidence le degré d'accumulation des métaux par les organismes, ni la toxicité engendrée sur les individus et l'écosystème (Zhou et al., 2008). En conséquent, ces dernières années, les études en écotoxicologie se sont développées afin de mettre en place des outils permettant une bonne évaluation de l'état écologique des milieux. Ces études passent notamment par la recherche de bioindicateur ou d'espèces sentinelles servant de support pour la mesure de marqueurs biologiques (biomarqueurs). Ces derniers reflèteront le degré des atteintes de l'environnement.

2.1. Bioindicateur et espèce sentinelle

Un bioindicateur est un organisme (ou partie d'un organisme ou une communauté d'individus) qui renseigne sur la qualité de l'environnement (ou partie de l'environnement) (Li et al., 2010). Lorsque ces derniers existent dans l'écosystème, ils sont appelés espèces sentinelles (surveillance passive). Ils peuvent y être introduits de façon standardisée (surveillance active) par encagement (caging). D'après Lagadic et al. (1998) et Lagadic et Caquet (1996), un bioindicateur peut aussi être un organisme qui par sa disparition ou par sa présence et/ou son abondance, renseigne sur l'état de santé d'un milieu (dans ce cas appelés

aussi : indicateurs biologiques). Nous pouvons ainsi distinguer des espèces « pollusensibles » (bioindicateurs négatifs) et des espèces « pollurésistantes » ou « pollutolérantes » (bioindicateurs positifs). Des outils tels que les indices biocénotiques reposent sur ce principe et permettent d'évaluer la structure et la santé d'un écosystème à un instant donné. Cependant, le recensement des différentes espèces peuplant un écosystème donné présente une tâche lourde avec plusieurs limites: il apporte peu ou pas d'informations sur la cause réelle de la disparition des espèces (prédation, facteurs abiotiques...), sur les contaminants éventuellement responsables de la mortalité des individus, sur les mécanismes de toxicité ayant conduit à leur mort.

D'après Zhou et. al. (2008), un organisme bioindicateur doit présenter idéalement les caractéristiques suivantes:

- être capable d'accumuler les polluants à des niveaux élevés sans que ceux-ci ne conduisent à sa mortalité.
- avoir une mobilité réduite afin de refléter une contamination localisée du milieu.
- être abondant et présenter une grande distribution pour un échantillonnage répétitif.
- avoir une durée de vie assez longue pour la comparaison des effets et des niveaux de contamination entre les différents stades de développement.
- fournir suffisamment de tissus biologiques pour d'éventuelles recherches d'impacts sur des différents niveaux biologiques.
- être faciles à pêcher et à maintenir au laboratoire.
- vivre dans l'eau.
- occuper une position importante dans la chaîne trophique.
- Présenter des relations effet-dose.

P. clarkii remplit un certain nombre de critères énumérés par Zhou et al. (2008): elle est présente en abondance dans des milieux aquatiques variés et peut être pêchées aisément. Les adultes peuvent fournir des quantités de tissus suffisantes pour effectuer diverses analyses biologiques ou toxicologiques. A ceci s'ajoute le fait que les écrevisses sont des organismes benthiques en contact étroit avec les sédiments dans lesquels les polluants peuvent être stockés et concentrés. Ce sont également des animaux qui supportent d'être encagés sur de longues périodes dans le cadre de programmes de surveillance (Alcorlo et al., 2006). Enfin, du fait qu'elle occupe une place centrale dans la chaîne trophique, cette espèce est un vecteur

potentiel de contamination des niveaux trophiques supérieurs. *P. clarkii* peut être donc considérée comme une espèce bioindicatrice pertinente. D'ailleurs, cette espèce a déjà contribué à des études de suivi de contaminations des écosystèmes aquatiques par différents métaux et polluants organiques (ex : PCB, HCB DDT, Cd, Cu, Zn, Hg...) (Anderson et al., 1997; Sánchez López et al., 2004; Alcorlo et al., 2006; Faria et al., 2010; Suárez-Serrano et al., 2010).

2.2. Biomarqueurs

Les polluants peuvent impacter différents niveaux de l'organisation biologique (**Figure 10**). Les progrès de la biologie cellulaire ont permis une identification des mécanismes moléculaires de leur action toxique. Ces événements peuvent aussi engendrer à leur tour des altérations pathologiques à des niveaux biologiques plus élevés. Ces connaissances fondamentales ont ouvert la possibilité de forger de nouveaux outils d'évaluation et de surveillance fondés sur les réponses biologiques induites par l'exposition d'organismes à des xénobiotiques (**Figure 11**). Ceci a donné naissance au concept de biomarqueurs, en référence à des mesures de modifications des réponses biologiques suite à une contamination. La **Figure 11** présente la place des biomarqueurs d'exposition et d'effet(s) dans les différents champs d'investigations de l'écotoxicologie. Plusieurs définitions concernant les biomarqueurs ont été énoncées au cours de ces dernières années (Schlenk, 1999). Nous retiendrons la suivante: «un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental révélant l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant» (Amiard et al., 1998). Les biomarqueurs sont mesurés au sein d'espèces capables d'accumuler les contaminants (ex : bioindicateurs) et vont permettre de réaliser des études d'écotoxicité des substances chimiques (chemical testing) (au laboratoire) et de biomonitoring (*in situ*). De plus, cette figure illustre la diversité des biomarqueurs pouvant être identifiés et utilisés en écotoxicologie.

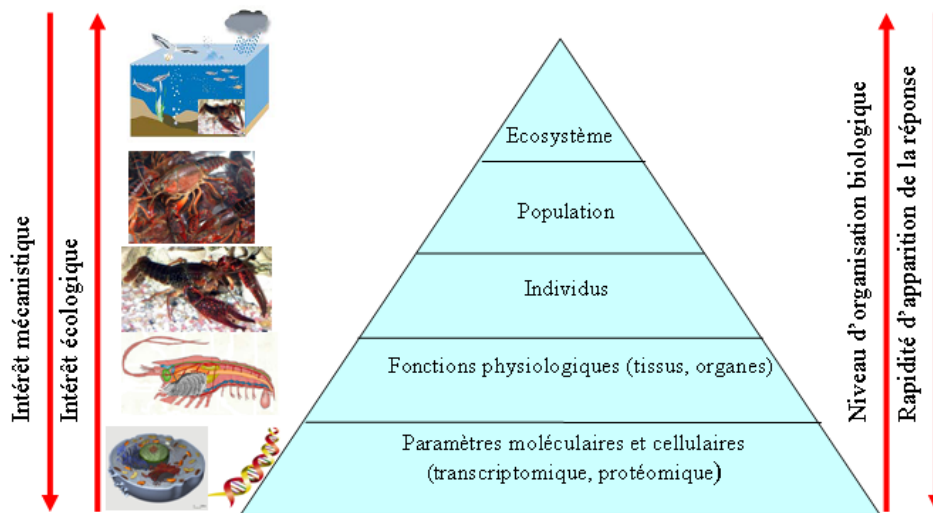


Figure 10 : représentation des différents niveaux de l'organisation biologique pouvant être affectés par les polluants et de la rapidité de réponse. Ce schéma illustre aussi l'intérêt écologique et mécanistique des différents niveaux dans la recherche. Modifié d'après Snape et al. (2004).

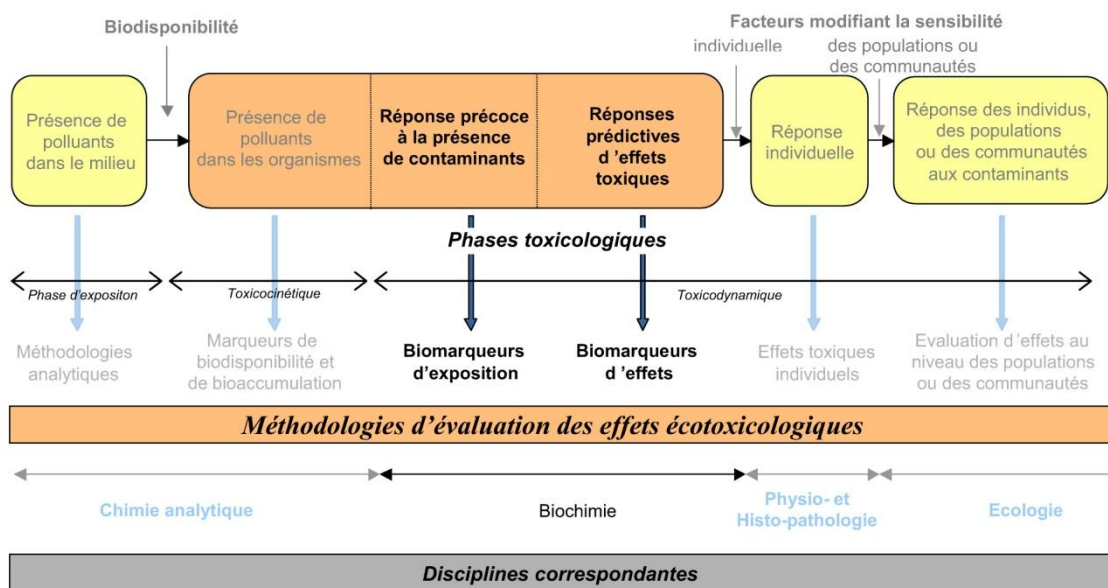


Figure 11 : Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques modifiée d'après Lagadic & Amiard (1997).

L'approche « biomarqueur » peut être illustrée par une relation entre l'état de santé d'un organisme et sa réponse à des concentrations croissantes de contaminants dans son environnement. Un organisme est en « bonne santé », dans un état d'homéostasie en absence de contamination. En présence d'une contamination croissante, cet organisme va présenter des altérations fonctionnelles visibles pouvant entraîner sa mort à plus ou moins long terme. Durant cette phase, l'individu peut compenser le stress subi jusqu'à un certain seuil, une fois ce dernier dépassé il sera incapable d'effectuer une compensation. Si le contaminant est retiré de l'environnement, il peut retrouver son état normal (l'altération est réversible). Lorsque la quantité de polluant est trop importante, l'organisme atteint un stade où les altérations deviennent irréversibles entraînant inéluctablement sa mort (**Figure 12**). De plus, cette figure illustre la diversité des biomarqueurs pouvant être identifiés et utilisés en écotoxicologie.

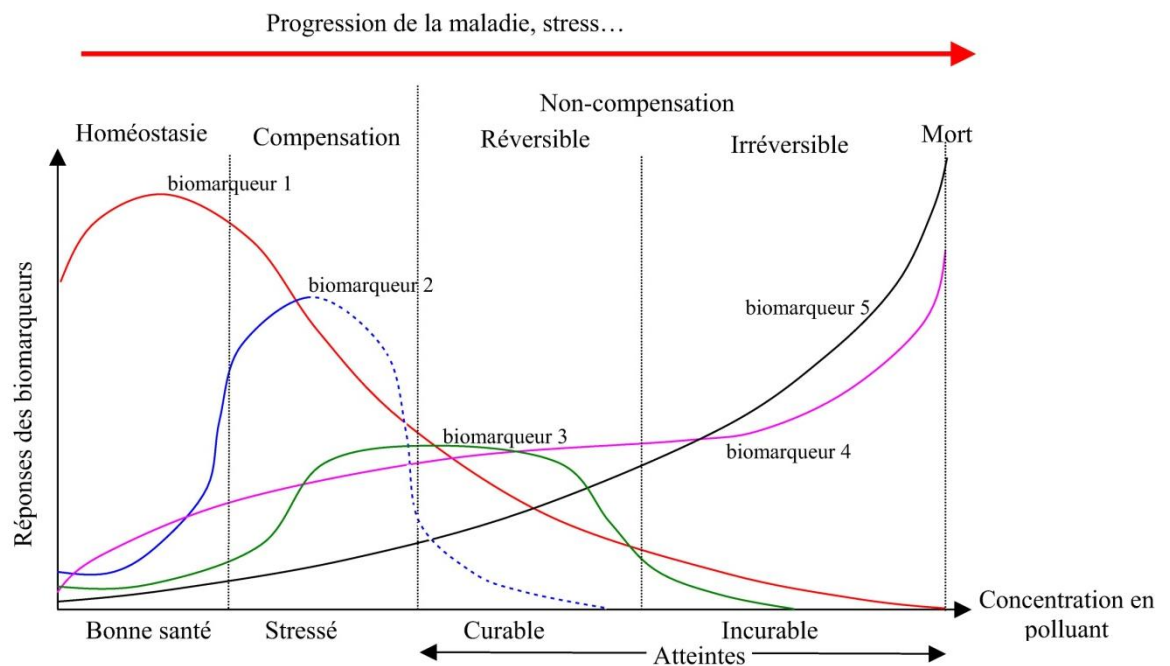


Figure 12 : Progression de l'état de santé d'un individu à l'exposition d'une augmentation de la concentration d'un polluant (Allen et Moore, 2004). Les biomarqueurs 1 à 3 peuvent correspondre aux biomarqueurs d'exposition et 4 et 5 aux biomarqueurs d'effets.

Les biomarqueurs ont été classifiés en trois catégories: Les biomarqueurs d'exposition, d'effet et de susceptibilité (Timbrell et al., 1994; Lagadic et al., 1997; Van der Oost et al., 2003).

Les biomarqueurs d'exposition sont des indicateurs de la contamination des systèmes biologiques par un (des) xénobiotique(s). Ils sont en général impliqués dans les mécanismes de défense cellulaire (ex : enzymes antioxydantes) et de détoxification des xénobiotiques. Leurs variations n'entraînent pas obligatoirement d'effets délétères. Ils témoignent de la présence d'un contaminant dans le milieu et par conséquent de sa disponibilité pour l'organisme. Leur suivi peut aussi consister en la détection au sein d'un individu de métabolites issus de la métabolisation du xénobiotique ou de produits issus de son interaction avec certaines biomolécules ou cellules cibles.

Les biomarqueurs d'effet correspondent à des altérations biologiques qui en fonction de l'intensité des réponses peuvent être associées de manière avérée statistiquement ou possible du point de vue mécanistique à une pathologie ou un état physiologique altéré.

Les biomarqueurs de susceptibilité/sensibilité indiquent quant à eux la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre au stress induit par l'exposition à un xénobiotique. Cette sensibilité individuelle peut résulter de polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques ou dans la réparation des lésions de l'ADN. Néanmoins, malgré l'intérêt croissant suscité par le phénomène de variation d'origine génétique de la réponse à la contamination par les polluants, les études incluant le suivi de biomarqueurs de susceptibilité sont rares. Les facteurs impliqués sont en effet très complexes tant au niveau de la multiplicité des nuisances rencontrées en milieu environnemental que de la multiplicité des voies métaboliques et des mécanismes de réponse.

Cette subdivision est quelque peu imprécise du fait que les réponses des biomarqueurs peuvent être interprétées comme étant des effets biologiques ou biochimiques induits suite à l'exposition à l'agent toxique; ceci donnant théoriquement à ces réponses la capacité de mettre en évidence à la fois l'exposition et les effets toxiques. Dans le but d'éviter des confusions, l'ensemble des marqueurs biologiques (qu'ils soient biochimiques ou histologiques) mesurés au sein des organismes durant cette thèse sera regroupé sous le terme de "biomarqueurs".

Différents biomarqueurs ont été proposés dans la littérature pour analyser les impacts des agents toxiques (polluants métalliques et organiques) sur les écrevisses et pour les utiliser en biomonitoring. Citons entre autre le suivi des niveaux de composés protéiques (ex: métallothionéine et vitellogénine) (Martín-Díaz et al., 2006) et non protéiques (ex : GSH, glutathion total (tGSH), glutathion oxydé (GSSG)) (Kovačević et al., 2008); des atteintes (induction/répression) enzymatiques (ex : estérases, topoisomérase, cytochrome P450...) (Escartín et Porte, 1996; Fernandes et al., 2002; Paolucci et al., 2004; Vioque-Fernández et al., 2007a; Vioque-Fernández et al., 2007b); des modifications de l'osmorégulation (variation dans les concentrations de sodium, calcium et chlorure de l'hémolymphe) (Demers et al., 2006) ; des symptômes histopathologiques (Martín-Díaz et al., 2006) ; des modifications des systèmes oxydants et pro-oxydants (Stolyar et al., 2006; Elia et al., 2007; Tan et al., 2007; Dörr et al., 2008; Faria et al., 2010), des variations dans les réponses immunitaires (ex : lysozyme) et des niveaux des produits de peroxydations lipidiques (ex : le malondialdéhyde (MDA)) (Tan et al., 2007).

En ce qui concerne plus spécifiquement les biomarqueurs de contamination au Cd chez les crustacés, nous retrouvons dans la littérature que la protéomique est utilisée régulièrement comme technique pour évaluer le stress engendré par ce xénobiotique. Le suivi des niveaux d'induction des métallothionéines (MT) est la méthode la plus utilisée dans la littérature pour mettre en évidence ce stress (Pedersen et al., 1998; Guan et Wang, 2004; Martín-Díaz et al., 2005; Wu et Chen, 2005; Amiard et al., 2006; Martín-Díaz et al., 2006; Nunez-Nogueira et al., 2006; Liberge et Barthélémy, 2007; Erk et al., 2008; Ma et al., 2008; Wang et Wang, 2009; Wen-Hong et al., 2009; Geffard et al., 2010; Khan et al., 2010) suivi par l'étude des variations des niveaux de la vitellogénine (Martín-Díaz et al., 2004; Martín-Díaz et al., 2005; Martín-Díaz et al., 2006). Nous pouvons trouver aussi des études qui ont utilisé les réponses histopathologiques (Martín-Díaz et al., 2006; Lei et al., 2011), des marqueurs de stress oxydants (Silvestre et al., 2006; Liberge et Barthélémy, 2007; Wang et Wang, 2009; Wen-Hong et al., 2009; Lei et al., 2011) et de peroxydation lipidique (Wang et Wang, 2009) pour mettre en évidence le stress causé par le Cd.

Par contre, jusqu'à ce jour les études qui portent sur l'utilisation de biomarqueurs subcellulaires d'U sont rares chez les organismes aquatiques, voire inexistantes chez les crustacés. En effet, les études écotoxicologiques des effets de ce radionucléide concernent le zooplancton. Ces études sont basées sur l'observation des individus *via* des tests de mortalité ou d'immobilisation (Barata et al., 1999; Semaan et al., 2001; Kuhne et al., 2002; Antunes et al., 2007a; Antunes et al., 2007b; Zeman et al., 2008; Khangarot et Das, 2009). D'autres ont

évalué les impacts sur la reproduction (Semaan et al., 2001; Zeman et al., 2008; Massarin et al., 2010), sur l'assimilation de la nourriture et la croissance (Kuhne et al., 2002; Zeman et al., 2008; Massarin et al., 2010; Massarin et al., 2011) et sur d'autres processus physiologiques (ex : consommation de l'oxygène) (Zeman et al., 2008; Massarin et al., 2010). Une étude s'est aussi fondée sur l'utilisation des indices biologiques fonctionnels pour évaluer l'état des écosystèmes près de sites miniers. Les auteurs ont eu recours au recensement des espèces de micro-crustacés (présence/ absence) *in situ* et ont évalué les impacts sur la diversité et l'abondance du zooplancton à différentes périodes (Melville, 1995). Massarin et al., (2011) ont aussi utilisé l'histopathologie comme biomarqueur pour révéler les atteintes de l'épithélium intestinal des daphnies après exposition à l'U.

Cooley et al (2000) ont utilisé les MT, le MDA (produit de la peroxydation lipidique) et l'histopathologie comme marqueurs pour détecter l'impact de l'U sur les poissons *Coregonus clupeaformis*. Labrot et al., (1996; 1999) ont évalué l'induction du malondialdéhyde chez *Danio rerio*, le mollusque *Corbicula sp.* et le vers *Eisenia fetida* pour mettre en évidence une éventuelle peroxydation lipidique générée par l'U. Dans plusieurs études d'impacts de l'U sur poissons, mollusques et vers de terre, les changements de l'activité de certaines enzymes (ex : catalase, glutathion peroxydase, superoxyde dismutase) et de niveau de molécules hydrosolubles (glutathion total) antioxydantes impliquées dans la défense contre le stress oxydant ont été utilisés comme biomarqueurs de contamination (Labrot et al., 1996; Labrot et al., 1999; Barillet et al., 2007; Barillet et al., 2011). Le niveau de l'acétylcholinestérase a été aussi déterminé pour évaluer la neurotoxicité de l'U chez *Danio rerio* (Labrot et al. 1996 ; Barillet et al. 2007, 2011) le mollusque *Corbicula sp.* et le vers *Eisenia fetida* (Labrot et al. 1996). Simon et al. (2011a) et Barillet et al. (2011) ont étudié la génotoxicité (test comète) induite par l'U chez le bivalve *Corbicula fluminea* et le poisson zèbre *Danio rerio* respectivement. De plus, Barillet et al. (2010) ont étudié les atteintes structurales des cellules (histologie) de cette même espèce de poisson afin d'évaluer la toxicité de l'U. De même, Lerebours et al. (2009; 2010a; 2010b) ont utilisé l'histopathologie et les réponses transcriptomiques comme biomarqueurs de contamination à l'U chez cette espèce.

3. Généralités sur le Cadmium

3.1. Description

Quarante huitième élément de la table périodique, le Cd un métal trace non essentiel. À l'état pur il est malléable, inodore et de couleur métal blanc-argent, légèrement bleuté. Son poids atomique est de 112.41 g/mol (Lide, 1998-1999) et il possède 8 isotopes naturels stables et 14 isotopes radioactifs. L'isotope radioactif ^{109}Cd est utilisé comme traceur isotopique (Martin-Garin et al., 2004). La masse volumique du Cd à 20°C est égale à 8.65 g/cm³ et sa température de fusion est égale à 321.07°C (Lide, 1998-1999). Ce métal possède une température de vaporisation basse de 767°C qui permet l'inhalation de vapeur de cadmium (ex: cigarette) (Lide, 1998-1999; Pinot et al., 2000). En solution, il se trouve principalement sous la forme de cation, à l'état d'oxydation +II (Tricot, 1999).

3.2. Origine et distribution

Le Cd est présent dans l'environnement (roches, sédiments, sol, poussière, air, eau, plantes et animaux, tableau). Il est naturellement présent dans la croûte terrestre (0,11 µg/g) et les roches où il est généralement associé au zinc (WHO, 1992; Pinot et al., 2000). Il est présent dans des roches phosphatiques et les sols à des concentrations allant de 0,1 à 100 mg/g (Pinot et al., 2000) et de 0,1 à 1 mg/g respectivement (Korte, 1983). La pluie et l'érosion naturelle font en sorte que le Cd rejoint les milieux aquatiques et intègre le cycle de l'eau (**Tableau 2**) (WHO, 1992). L'activité volcanique est une source naturelle majeure d'émission de cadmium atmosphérique. Les volcans marins sont aussi à l'origine de la présence de ce métal en mer, mais la quantification de la part de Cd apportée par ces processus n'a pas encore été réalisée (WHO, 1992). Toutefois, le bruit de fond naturel du Cd (**Tableau 2**) ne semble pas avoir de conséquences graves sur la survie et la santé des organismes vivants ni sur l'environnement (Pinot et al., 2000).

Tableau 2 : Bruit de fond du cadmium dans l'environnement (d'après Pinot et al., 2000).

Milieux	Concentration du Cd
Croute terrestre	0.11 µg/g
Roches phosphatiques	0.1 - 100 mg/g
Sols	0.1- 1 mg/g
Sols de surface	0.07 - 1.1 µg/g
Poussière ménagère	0.42 - 6.6 µg/g
Air de régions inhabitées	< 1 ng/ m ³
Eau non pollué (en général)	< 1 µg/L
Eau de mer	0.02 - 0.1 µg/L
Eaux côtières et eaux douces	< 0.1 µg/L

Les activités anthropiques contribuent à l'augmentation des concentrations des métaux dans l'environnement. Durant la seconde moitié du siècle précédent, la production et la consommation du cadmium ont augmenté considérablement dans la plupart des pays industrialisés (Pinot et al., 2000). Les quantités mondiales de Cd retrouvées dans l'environnement ont été estimées entre 25 000 à 30 000 tonnes par an, dont 4000 à 13000 tonnes sont générées par les activités humaines telles que les exploitations minières et la consommation des combustibles fossiles (Denmark, 2002). Jackson et Macgillivray, (1995) ont reporté que le Cd total présent dans les effluents aquatiques provenant de toutes activités et de toutes les régions du monde est supérieur à 1110 tonnes. Toutefois, Mahler et al. (2006) rapportent que cette contamination d'origine anthropique tend à diminuer dans certains pays certainement grâce aux réglementations liées à l'utilisation et au rejet du Cd mises en place au cours de ces dernières décennies (WHO, 1992; Denmark, 2002).

Le Cd est principalement obtenu (comme sous-produit) à partir des extractions minières de zinc afin d'être utilisé dans le secteur industriel et la manufacture de divers produits. Il est utilisé essentiellement dans les applications suivantes (Thornton, 1992):

- Les batteries (nickel- cadmium)
- Pigments de peinture (plastique, verre et l'émail)
- Stabilisant dans le traitement des polymères de PVC
- Dans l'industrie de plastique
- Dans la préparation d'alliages spéciaux.

Ces usages conduisent à répandre le Cd dans l'environnement à cause des émissions atmosphériques, des effluents liquides, des eaux usées, des déchets solides, de boues et de vases. Le **Tableau 3** résume les sources les plus importantes et les quantités d'émission de Cd en Europe reportées par Pinot et al. (2000). En France, quelques cours d'eau souffrent de contaminations importantes au Cd à cause des activités anthropogéniques comme par exemple le Riou Mort, petit affluent du Lotoù les concentrations annuelles moyennes peuvent atteindre 22µg Cd/L (Morin et al., 2007). Les concentrations en Cd des eaux côtières de Patras en Grèce peuvent atteindre la concentration de 9 µg/L (Koliadima et Karaiskakis, 1990). Les concentrations de Cd retrouvées dans le delta de l'Ebre en Espagne sont de l'ordre de 4.24 à 5.22 µg Cd/L (Schuhmacher et al., 1995). Dans l'estuaire Reghaia en Algérie les concentrations de Cd peuvent atteindre 200 à 1000 µg/L (Belabed et al., 1994).

Tableau 3 : Emissions de Cd en Europe (d'après Pinot et al., 2000).

Émissions du cadmium en Europe	Cadmium (tonnes/an)
Dépôts de déchets solides	4425
Rejets issues des incinérations	29
Emissions des industries d'acides phosphoriques	157
Déchets solides issues de la production du fer et de l'acier	300
Combustion du pétrole	49
Fertilisants	374
Epanchages et boues d'épuration	52
Activités industrielles	55
Cycle de l'eau	98

3.3. Spéciation du Cd

La spéciation chimique des espèces dissoutes en solution concerne la distribution d'un élément selon différentes catégories d'espèces chimiques dans un système (Campbell et Couillard, 2004). Pour un métal cationique, on peut considérer les formes suivantes (**Figure 13**):

- L'ion métallique libre (ex : Cd^{2+}).
- Des complexes impliquant des anions inorganiques (phase dissoute < 10 nm) présents dans les milieux naturels (HO^- , F^- , Cl^- , HCO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , $S_2O_3^{2-}$...).
- Des complexes impliquant des ligands organiques simples (acides aminés, hydroxamiques, polycarboxyliques...) ou complexes (acides humiques, fulviques, protéines...) (phase dissoute < 0.45 µm).

Le métal peut aussi s'associer à des phases particulières ($>0.45 \mu\text{m}$) organiques (ex : débris de végétaux, bactéries, zooplancton, phytoplanctons, copépodites...) et inorganiques (ex : Argiles, oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse). L'abondance relative de chaque espèce chimique va être dépendante de plusieurs facteurs, et notamment de la composition ionique de l'eau, qui va moduler les caractéristiques physico-chimiques telles que la salinité (**Figure 13**) ou le **pH** (**Figure 14**), ainsi que la composition et la richesse en matière organique. Le Cd^{2+} est l'espèce la plus présente à faible pH et à faible pCl (**Figure 13**), exception faite des formes adsorbées.

Les formes ioniques dissoutes ou ion libres, Cd^{2+} , sont les plus biodisponibles pour les organismes aquatiques (Campbell, 1995), du fait de leur capacité à traverser les membranes biologiques des branchies (contamination par voie directe) (Di Toro et al., 2001). Selon le modèle de l'ion libre (FIAM : free ion activity model-(Morel, 1983)), tout ligand capable de complexer l'espèce M^{n+} (avec M un métal et n le nombre d'électrons) peut diminuer ses capacités de bioaccumulation. En effet, la complexation de Cd^{2+} avec les phases organiques ou inorganiques présentes dans l'eau va rendre ce métal moins biodisponible aux organismes aquatiques par voie directe (Van Ginneken et al., 1999; Niyogi et Wood, 2004; Clifford et McGeer, 2010), hormis pour les espèces susceptibles d'ingérer ces particules (organismes fouisseurs, déposivores et mollusques filtreurs), qui peuvent ainsi se contaminer par voie trophique (voie indirecte). De plus, une diminution de l'accumulation de l'ion libre peut survenir à cause d'une compétition entre les ligands présents dans le milieu et les sites de fixation au niveau de la membrane biologique (Di Toro et al., 2001; Niyogi et Wood, 2004).

Afin de s'assurer que les espèces chimiques de Cd sont toujours les mêmes entre les différentes conditions d'exposition, nous avons choisi d'effectuer toutes nos expériences dans une eau artificielle à pH 6-7. La composition chimique de cette eau est donnée dans le (**Tableau 4**) (eau Al Kaddissi/écrevisses) et la spéciation chimique du Cd dans ces conditions expérimentales est donnée dans la **figure 14**. Les espèces chimiques prépondérantes du Cd dans cette eau à pH 6-7 correspondent aux cations Cd^{2+} et CdCl^+ .

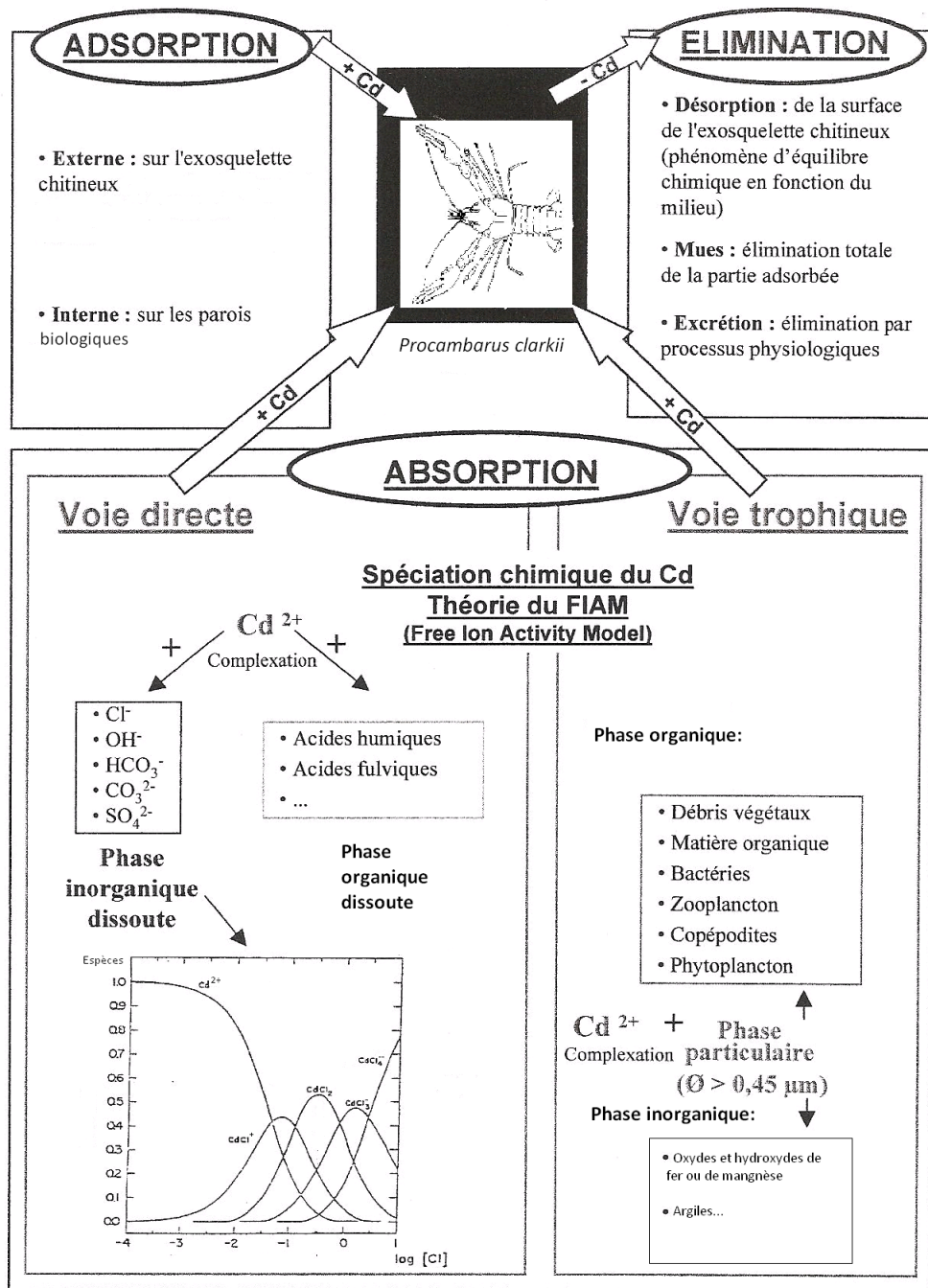


Figure 13 : Illustration des différentes voies de contamination d'une écrevisse et de complexation du Cd avec des phases organiques et inorganiques (dissoutes et particulières) (source: S.AL.K/IRSN/CNRS).

Tableau 4 : Bilan des concentrations des ions majeurs ($\mu\text{mol/L}$) présents dans les différents types d'eau étudiés au sein du laboratoire

Ions majeurs ($\mu\text{mol/L}$) et pH	Eau-Esparron (écrevisses)	Eau robinet-LRE (écrevisses)	Eau Zeman (daphnies/écrevisses)	Eau Bourrachot (poissons)	Eau Lerebours (poissons)	Eau robinet-EA (écrevisses)	Eau Al-Kaddissi (écrevisses)
Ca^{2+}	1300	1985.8	2000	289	218	2440	1640
Mg^{2+}	218.9	434.1	500	195	60	610	500
Na^+	783	700.3	870	324	221	490	870
K^+	88	36.6	81	152	25	86	80
Cl^-	1074.7	702.3	4100	919	378	820	4100
SO_4^{2-}	724.5	997.3	510	100	130	650	509
NO_3^-	124.7	54.8	3.2	310	148	58	76.5
HCO_3^-	n.d	n.d	770	X	X	n.d	15*
CO_3^{2-}	n.d	n.d	X	7	7.5	n.d	X
PO_4^{3-}	<0.1	4.2	2.1	X	X	n.d	X
NO_2^-	26.1	X	X	X	X	2	X
pH	8.6	8.37	8	6.5	6.5	8.4	6.7

(X) absent. (n.d) non déterminé. Note : Les concentrations ioniques des eaux synthétiques (Eau Zeman, Eau Bourrachot, Eau Lerebours, Eau Al Kaddissi) présentées dans le tableau correspondent aux concentrations apportées par les sels au moment de la fabrication; le reste des résultats correspond aux concentrations mesurées dans les eaux naturelles (Eau-Esparron, Eau robinet-LRE, Eau robinet-EA). (*) l'eau adaptée à *P. clarkii* après équilibre avec la $\text{PCO}_{2\text{atmo}} = 0.000316$ présente une concentration de HCO_3^- égale à $281 \mu\text{mole/L}$. (Écrevisses) Eau adaptée aux besoins des écrevisses. (Daphnies) Eau adaptée aux besoins des daphnies. (Poissons) eau adaptée aux besoins des poissons.

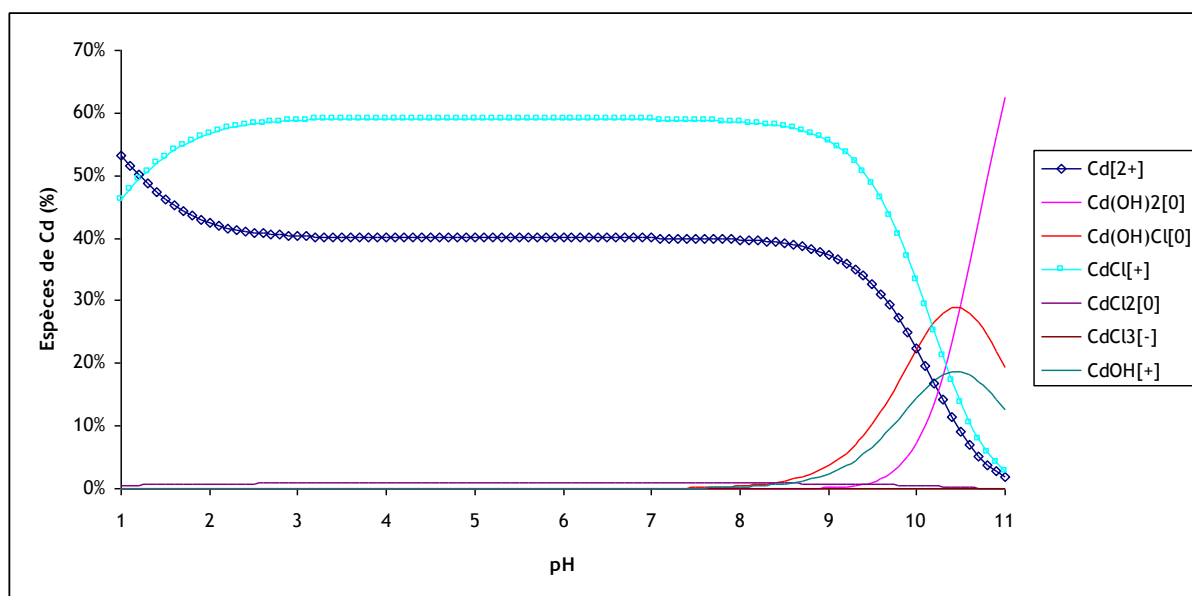


Figure 14 : Spéciation chimique de 10 $\mu\text{g/L}$ de cadmium dans une eau douce synthétique adaptée aux besoins des écrevisses (simulation avec le programme de spéciation géochimique J-CHESS).

3.4. Mécanismes de contamination en milieu aquatique

La bioaccumulation des métaux par les organismes aquatiques implique un transfert du métal du milieu environnant vers le milieu intérieur, au travers des barrières épithéliales (ex : branchies, paroi du tractus digestif, revêtement tégumentaire). La première phase d'accumulation des métaux est donc liée aux phénomènes de traversée des membranes biologiques (bicouche phospholipidique incluant des protéines). Dans le cas d'une contamination par voie directe, le Cd de la phase dissoute est absorbé par les surfaces directement en contact avec le milieu extérieur (ex : branchies). Mentionnons que la présence de mucus à la surface des échangeurs respiratoires peut représenter une barrière très efficace limitant l'accessibilité des métaux à la membrane biologique (Lacroix et al., 1993). Les métaux adsorbés sur la phase particulaire seront plutôt ingérés puis internalisés après solubilisation dans le tube digestif (**Figure 13**). Chez les crustacés, l'entrée du Cd par voie directe ne peut se faire que par les parties perméables de l'exosquelette donc notamment par les branchies (Rainbow, 1997). Le mécanisme d'entrée du Cd utilise les mêmes voies que celle du calcium (Verbost et al., 1989; Bjerregaard et Depledge, 1994; Silvestre et al., 2004; Bondgaard et Bjerregaard, 2005). La substitution des ions Ca^{2+} par Cd^{2+} au niveau des canaux calciques est expliquée par le rayon atomique du Cd très proche de celui du Ca (0.96 et 0.99 Å respectivement) (Silvestre et al., 2004). Le Cd peut être également absorbé par simple diffusion passive, mais cette voie non spécifique ne serait efficace que pour les fortes concentrations du métal dans le milieu extracellulaire (Grouselle et al., 1996). Rainbow (1995) évoque une autre possibilité de transport des ions métalliques libres chez les crustacés où le métal pourrait se lier à une protéine de transport et être transféré à la cellule par diffusion facilitée. Le passage du Cd dans le milieu interne des organismes dépend également de leur état physiologique: en effet la bioaccumulation du métal va augmenter chez les crustacés après la mue car le pompage du calcium augmente (Bondgaard et Bjerregaard, 2005). Ce phénomène est accru chez les crustacés d'eau douce qui doivent en plus lutter contre la fuite des ions en milieu hypotonique (Mantel et Farmer, 1983). L'hémolymphe des crustacés est capable de transporter le Cd vers différents organes (Martin et Rainbow, 1998; Silvestre et al., 2004). A titre d'exemple, une contamination du crabe *Carcinus maenas* à 3 µg/L de Cd par voie directe et pour une période de 21 jours a conduit à une bioaccumulation massive du métal au niveau des branchies puis de l'hépatopancréas (Martin-Díaz et al., 2005). Une même tendance a été observée chez *Procambarus clarkii* exposé 21 jours à 10 ou 30 µg/L de Cd par voie directe (Martín-Díaz et al., 2006).

3.5. Effets biologiques du Cd

3.5.1. Au niveau de l'organisme et des tissus

Reddy et Fingerman (1995) ont étudié un impact physiologique du Cd conduisant à un changement de couleur chez le crabe *Uca pugilator* après 48h d'exposition à 10 mg/L de Cd (forte dose) par voie directe. Ces auteurs ont démontré que la diminution de la dispersion des pigments noirs dans les mélanophores (cellules contenant les pigments noirs) était significative suite à cette contamination. Apparemment, ce métal n'affecte pas directement les mélanophores, mais agit sur le processus neuroendocrinien qui contrôle le phénomène de dispersion.

Rodríguez Moreno et al. (2003) ont montré que 0.5 mg/L de Cd administré par voie directe peut entraîner une inhibition de la mue chez les crabes adultes *Chasmagnathus granulata*. Les auteurs reportent que le Cd empêche la production des quantités nécessaires d'ecdysones (hormone de mue) pour déclencher la mue.

Le Cd peut altérer le comportement des organismes. Une étude a montré que ce métal diminue le taux de prise de nourriture de *Gammarus pulex* (après 168h, diminution de 30% à 7.5 µg/L et de 36% à 15 µg/L). Il diminue aussi sa locomotion (après 120h, diminution de 20% à 7.5 µg/L et de 31% à 15 µg/L ; après 168h, diminution de 38% et de 39 % à 7.5 et 15 µg/L respectivement) et sa ventilation (après 120h l'effet sur l'hypoventilation est significatif à 15 µg/L ; après 168h la même réponse est observée dans les deux cas de contamination) (Felten et al., 2008). Des études ont aussi montré que le Cd est capable de perturber l'ouverture valvaire du bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea* (Tran et al., 2003), de perturber l'orientation et la capacité de nage de *Neomysis integer* (Roast et al., 2000) et de diminuer la vitesse de locomotion des crevettes *Hippolyte inermis* (Untersteiner et al., 2005). Il faut mentionner que le comportement des animaux est de plus en plus utilisé comme une mesure d'exposition sub-létale aux contaminants toxiques (Felten et al., 2008).

Le Cd peut affecter la reproduction des crevettes *Palaemonetes pugio*. Une exposition à 2.51 µg/L de Cd a entraîné une diminution de 50% des femelles gravides, une diminution significative du nombre de larves par portée (diminution de 27% à 1.51 µg/L ; et de 36% à 2.51 µg/L). La fertilité a diminué d'environ 50% à 1.51 µg/L et de 75% à 2.51 µg/L (Manyin et Rowe, 2008). Chez l'écrevisse *Procambarus clarkii*, l'injection de 0.5 µg Cd/ g de poids corporel a entraîné une inhibition de la maturation des ovaires, ce qui peut avoir une conséquence négative importante sur la reproduction (Reddy et al., 1997). Des femelles d'écrevisses *Procambarus Clarkii* exposées par voie directe à 0.5 mg/L de Cd pendant 4 mois montrent une diminution significative du nombre d'œufs par portée (48 ± 22.97) par rapport

au contrôle (203 ± 145.57) et du succès d'éclosion (95% des contrôles ont éclos *versus* 17% des contaminés). Ainsi, le Cd a affecté d'une façon considérable la production des œufs et leur éclosion (Naqvi et Howell, 1993).

Le Cd peut causer des changements structuraux. Citons à titre d'exemple les changements observés au niveau des épipodites et des branchies chez les crevettes *Penaeus japonicus* (Soegianto et al., 1999). L'exposition directe à 2000 et 4000 $\mu\text{g/L}$ Cd durant 4 jours a entraîné des changements structuraux profonds au niveau des branchies. Les cellules épithéliales branchiales étaient nécrosées, désorganisées et vacuolisées. Les expositions à 200 $\mu\text{g/L}$ durant 15 jours et à 2000 et 4000 $\mu\text{g/L}$ durant 4 jours, ont provoqué des altérations profondes des épipodites: augmentation de leur épaisseur, diminution du nombre de microvillosités apicales, des invaginations basales, des mitochondries... Les auteurs suggèrent que ces altérations peuvent conduire à une perturbation de la respiration et de l'osmorégulation chez les organismes contaminés. Une exposition de *P.clarkii* pendant 21 jours à 10 et 30 $\mu\text{g Cd/L}$ a conduit à des changements histologiques au niveau des branchies et de l'hépatopancréas, dont les symptômes majeurs observés étaient une vacuolisation des tissus et une désintégration de l'épithélium (Martín-Díaz et al., 2006). Les hépatopancréas d'écrevisses *Astacus astacus* présentaient des atteintes structurales similaires avec une nette dilatation des tubules après 10 semaines d'exposition à 2 $\mu\text{g/L}$ (Meyer et al., 2006).

3.5.2. Effets Sub-cellulaires

Au sein de la cellule le Cd peut impacter l'ADN, l'expression des gènes, certaines activités enzymatiques, les mitochondries et/ou induire des espèces réactives de l'oxygène (Verbost et al., 1989; Almeida et al., 2002; Hartwig et al., 2002; Rainbow, 2002; Wang et al., 2004; Sokolova et al., 2005; Gonzalez et al., 2006). A ce titre, le Cd est parfois utilisé comme xénobiotique modèle afin d'exprimer un stress cellulaire et induire une réponse spécifique aux métaux traces comme les MT (protéines de faibles poids moléculaires capables de séquestrer le Cd), ou bien afin de générer un stress thermique ou oxydatif, comme l'HSP (heat shock proteins) ou l'HO (hème oxygénase) (Pinot et al., 2000). Le Cd est surtout connu pour sa capacité à modifier l'état redox de la cellule. Toutefois certains effets peuvent être liés à sa structure similaire au calcium (Pinot et al., 2000). En effet, le Cd pénètre dans la cellule par les mêmes voies d'entrée que le calcium, affectant ainsi sa mobilisation et son homéostasie dans la cellule (Staessen et al., 1996).

3.5.2.1. Stress oxydant

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO), ou « Reactive Oxygen Species » (ROS) en anglais, incluent les radicaux libres dérivés de l'oxygène (**Tableau 5**), l'oxygène singulet ($\text{O}^{\cdot}\text{O}^{\cdot}$) qui est un dérivé très réactif de l'oxygène et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) instable contenant un ou plusieurs électrons célibataires (non appariés, noté par un point) (Tessier et Marconnet, 1995). Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (Afonso et al., 2007). Les radicaux libres vont oxyder les protéines, l'ADN et les membranes cellulaires (attaque des lipides constitutifs par peroxydation lipidique) et perturber ainsi le fonctionnement normal des cellules (Wang et al., 2004).

Tableau 5: Bilan des différents radicaux libres centrés sur l'oxygène (Gardès-Albert et al., 2003 ; Valko et al. 2006).

Radicaux libres centrés sur l'oxygène	
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Radical superoxyde
HO_2^{\cdot}	Radical perhydroxyle
OH^{\cdot}	Radical hydroxyle
RO_2^{\cdot}	Radical peroxyde (ex: (HOO^{\cdot}) le radical hydroperoxyde)
RO^{\cdot}	Radical alkoxyde (où R est une chaîne carbonée)

En plus des radicaux oxygénés libres (**Tableau 5**), les radicaux libres rassemblent aussi ceux dérivés d'acides gras insaturés (ex : (LOO^{\cdot}) radical lipidique peroxydé), le peroxyde d'azote (ONOO^{\cdot}) et le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}). L'origine de la production des ERO peut être endogène (ex : mitochondrie, peroxysome, cytp450, NADPH-oxydase, Xanthine oxydase, réactions immunitaires) ou bien exogène (ex : rayons γ , X, UV, électrons, métaux, xénobiotiques, pathogènes) (Stohs et Bagchi, 1995; Afonso et al., 2007) (**Figure 15**).

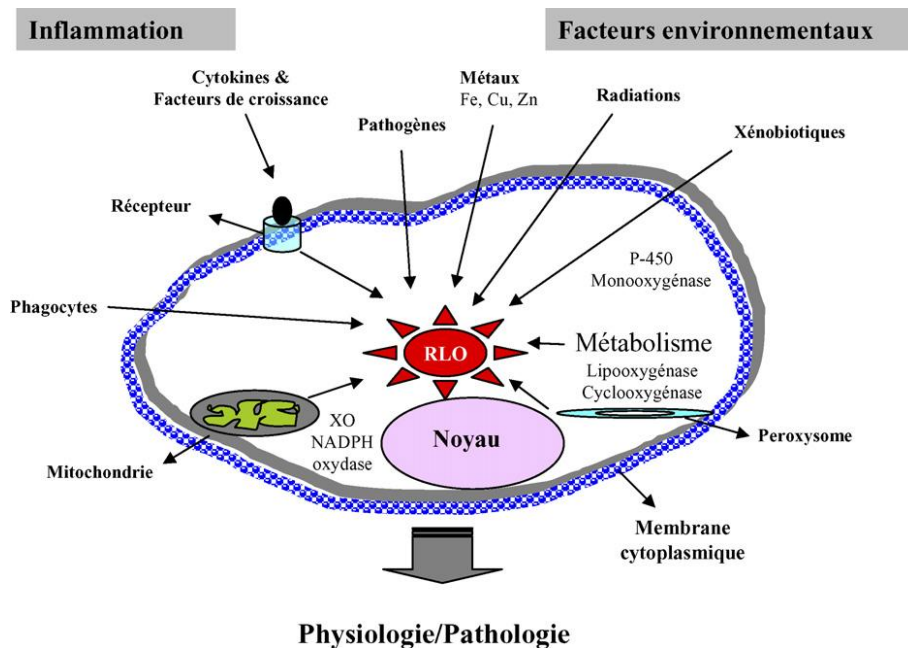


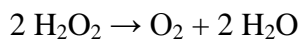
Figure 15 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l’oxygène. XO: xanthine oxydase. P-450 : cytochrome P-450. RLO : radicaux libres dérivés de l’oxygène (Afonso et al., 2007).

Ainsi, les cellules des êtres aérobies, en état d’oxydoréduction normal, ont une concentration basale en radicaux libres de l’oxygène non nulle. Par ailleurs, au sein de certaines cellules immunitaires, des enzymes interviennent dans la production de radicaux libres pour détruire les microorganismes, des macromolécules étrangères ou les cellules en décomposition de tissus nécrotiques (Wilson et Salamatian, 2003). La source principale de génération d’ERO endogènes dans la cellule est la respiration mitochondriale (Tessier et Marconnet, 1995). En effet, lors de la respiration cellulaire, la réduction de l’oxygène moléculaire par les cytochromes respiratoires peut être réalisée de façon incomplète et s’accompagner ainsi d’une formation parallèle d’espèces extrêmement réactives de l’oxygène. Il faut aussi noter qu’au sein du cytosol, diverses réactions chimiques peuvent produire ces dérivés de l’oxygène. Pour lutter contre un excès de production de ERO, l’organisme dispose d’un arsenal important d’antioxydants (**Figure 16**) comme les superoxydes dismutases (SOD), les glutathions peroxydases (GPx), les catalases (CAT), les métallothionéines (MT) et les glutathions S-transférases (GST)...

enzymes vont intervenir dans la neutralisation de cette espèce : la catalase et la glutathion peroxydase (Kono et Fridovich, 1982; Michiels et al., 1994; Arthur, 2000).

La catalase (CAT)

C'est une enzyme héminique, elle contient donc des atomes de fer au sein de hèmes qui constituent les sites actifs de la protéine. Sa fonction principale est la protection contre les effets toxiques du peroxyde d'hydrogène en catalysant sa décomposition en eau et oxygène (Kono et Fridovich 1982; Michiels et al. 1994):

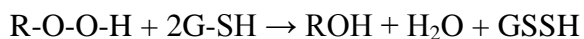


La glutathion peroxydase (GPx)

La glutathion peroxydase est une enzyme qui intervient, avec la catalase, dans la destruction de l' H_2O_2 (Blum et Fridovich, 1985; Labrot et al., 1996), et aussi dans la neutralisation des hydroperoxydes issus de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Valko et al., 2006).

Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène par le glutathion (tripeptide constitué de glutamate, cystéine et glycine):

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



La glutathion S transférase (GST):

La glutathion-S-transférase est une enzyme qui catalyse la conjugaison entre un peptide, le glutathion réduit, et les composés électrophiles. Elle intervient au niveau de la phase II du processus de détoxification cellulaire (Elia et al., 2003). Cette conjugaison du glutathion avec certains substrats permet la formation de composés moins toxiques. La GST joue également un rôle dans la destruction des peroxydes et des époxydes provenant de l'oxydation non enzymatique des acides gras (Valko et al., 2006). Des études ont aussi montré que le H_2O_2 peut aussi induire la GST (Hayes et Pulford, 1995; Solé et al., 2004).

La métallothionéine (MT) :

Cette protéine de faible poids moléculaire (6 kDa possédant 57-58 acides aminés chez les crustacés) très riche en cystéine (18 des acides aminés), (Pedersen et al., 1996; Vašák, 2005), possède de fortes potentialités de fixation des métaux (peut lier jusqu'à sept atomes de métaux divalents) basées sur les propriétés thioloprives de ces xénobiotiques (forte affinité

pour les groupements thiols) (Overnell et al., 1988; Sparla et Overnell, 1990). De plus, sa structure lui confère des capacités redox (Hamer, 1986). Ainsi, cette protéine joue un rôle important dans l'homéostasie des métaux essentiels, dans la détoxification des métaux toxiques (Ahearn et al., 2004; Paul-Pont et al., 2010), mais également dans la protection contre les radicaux libres et les dommages oxydatifs (Palmiter, 1998) en piégeant les ions superoxydes et les radicaux hydroxyles (Thornalley et Vasak, 1985; McAleer et Tuan, 2001b, a).

Les cellules possèdent également d'autres systèmes de défense contre les espèces réactives de l'oxygène tels que des molécules antioxydantes hydrosolubles (glutathion, vitamine C, acide urique) et liposolubles (Vitamine E, caroténoïdes, bilirubine), intervenant tout particulièrement au niveau des membranes cellulaires et des lipoprotéines plasmatiques. Ainsi, les antioxydants ont été définis comme des substances capables de concurrencer d'autres substrats oxydables à des concentrations relativement basses et donc de retarder ou d'empêcher l'oxydation de ces substrats (Afonso et al., 2007). Lorsque la production des ERO est maîtrisée par les systèmes de défense, la balance anti-oxydants/pro-oxydants est dite en équilibre. Lorsque ces espèces sont produites en trop grande quantité et/ou que les défenses anti-oxydantes sont insuffisantes, une rupture de l'équilibre oxydatif survient et un stress cellulaire se produit appelé "stress oxydant" (Jensen, 2003) dont les conséquences pour la cellule peuvent prendre la forme de dommages irréversibles (**Figure 17**).

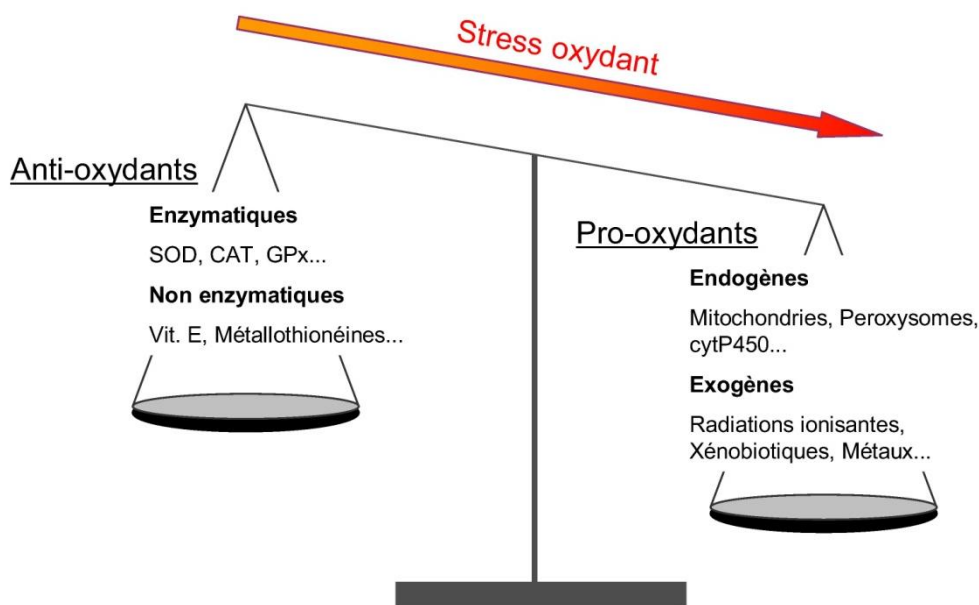
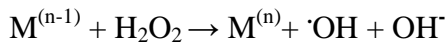
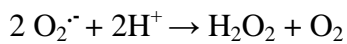
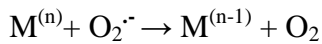


Figure 17: Schéma de la balance anti-oxydants/pro-oxydants représentant un stress oxydant (Barillet, 2007).

Le Cd est incapable de générer directement des radicaux libres (Watjen et Beyersmann, 2004; Jomova et Valko, 2011). Ce métal ne peut pas catalyser de réactions redox dans les systèmes biologiques. Les métaux « redox-active » quant à eux, (ex : fer, cuivre) peuvent directement augmenter la production des radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) grâce à la réaction Fenton (Ercal et al., 2001; Cuypers et al., 2010):



(avec M un métal « redox-active » et n le nombre d'électrons).

Le Cd peut cependant générer un stress oxydant indirectement en remplaçant dans diverses protéines le fer et le cuivre (ex : ferritine et apoferritine), contribuant à une augmentation de leurs concentrations intracellulaires augmentant ainsi la quantité de métaux « redox-active » (Casalino et al., 1997; Dorta et al., 2003; Watjen et Beyersmann, 2004).

Le Cd peut aussi affecter directement le système de défense cellulaire et les molécules possédant des groupements thiols (Ercal et al., 2001). En effets, les MT sont chargées de piéger le Cd pour le rendre inactif (Viarengo et al., 2000). Toutefois, si la synthèse de ces protéines n'est pas suffisante pour prendre en charge l'ensemble du Cd présent, le métal libre va alors affecter d'autres systèmes de défenses (Klaassen et Liu, 1997). Vue la forte affinité de ce contaminant pour les groupements thiols, le Cd peut se lier au glutathion (GSH) (Zalups et Ahmad, 2003), connu pour ses propriétés antioxydantes, perturbant la balance oxydative de la cellule (Ercal et al., 2001) (**Figure 18**). Rappelons que ce métabolite est le substrat de plusieurs enzymes antioxydantes (GST et GPx) et qu'une diminution du taux de GSH cellulaire peut conduire à une perturbation du fonctionnement de ces enzymes.

Les effets du Cd sur la balance oxydative sont complexes: il peut aussi bien diminuer la concentration et/ou l'activité des antioxydants (**Figure 18**) ou conduire à leur augmentation dans les cellules en fonction de l'importance du stress (Ochi et al., 1987; Yang et al., 1997; Dagnino et al., 2007; Cuypers et al., 2010). Casalino et al. (2002) supposent que la diminution de l'activité de la SOD chez des rats exposés au cadmium peut être liée à une interaction SOD/ Cd qui conduirait à des changements dans la topographie de la protéine et modifierait sa fonction catalytique. Une diminution de l'activité CAT est également possible comme le supposent Wrońska-Nofer et al., (1999) chez la souris où une possible interaction entre le métal et la sous-unité catalytique de cette enzyme pourrait expliquer une telle diminution. Jurczuk et al. (2004) ont pour leur part observé une déficience en fer dans le foie de rats exposés 12 semaines au Cd qui serait à l'origine d'une baisse de l'activité CAT car le fer est

un élément essentiel du centre actif de la protéine. Une étude récente chez la crevette *Litopenaeus vannamei* a montré que le Cd peut se lier directement au site de fixation du glutathion dans la GST (Salazar-Medina et al., 2010). Une peroxydation lipidique (oxydation des lipides insaturés des membranes, cf. chapitre I, 4.5.2.1) peut aussi survenir durant une contamination au Cd (Manca et al., 1994). Ercal et al. (2001) pensent que des perturbations dans le système de défense (ex : le niveau de concentrations en GSH et MT) vont conduire les ERO (ex: $\cdot\text{OH}$ et $\text{O}_2^{\cdot-}$) à être libres dans la cellule et ainsi déclencher des peroxydations lipidiques. Le stress oxydant généré par le Cd peut aussi être lié à des impacts au niveau des mitochondries (Pinot et al., 2000; Ercal et al., 2001) (cf. chapitre I, 3.5.2.2) (**Figure 18**).

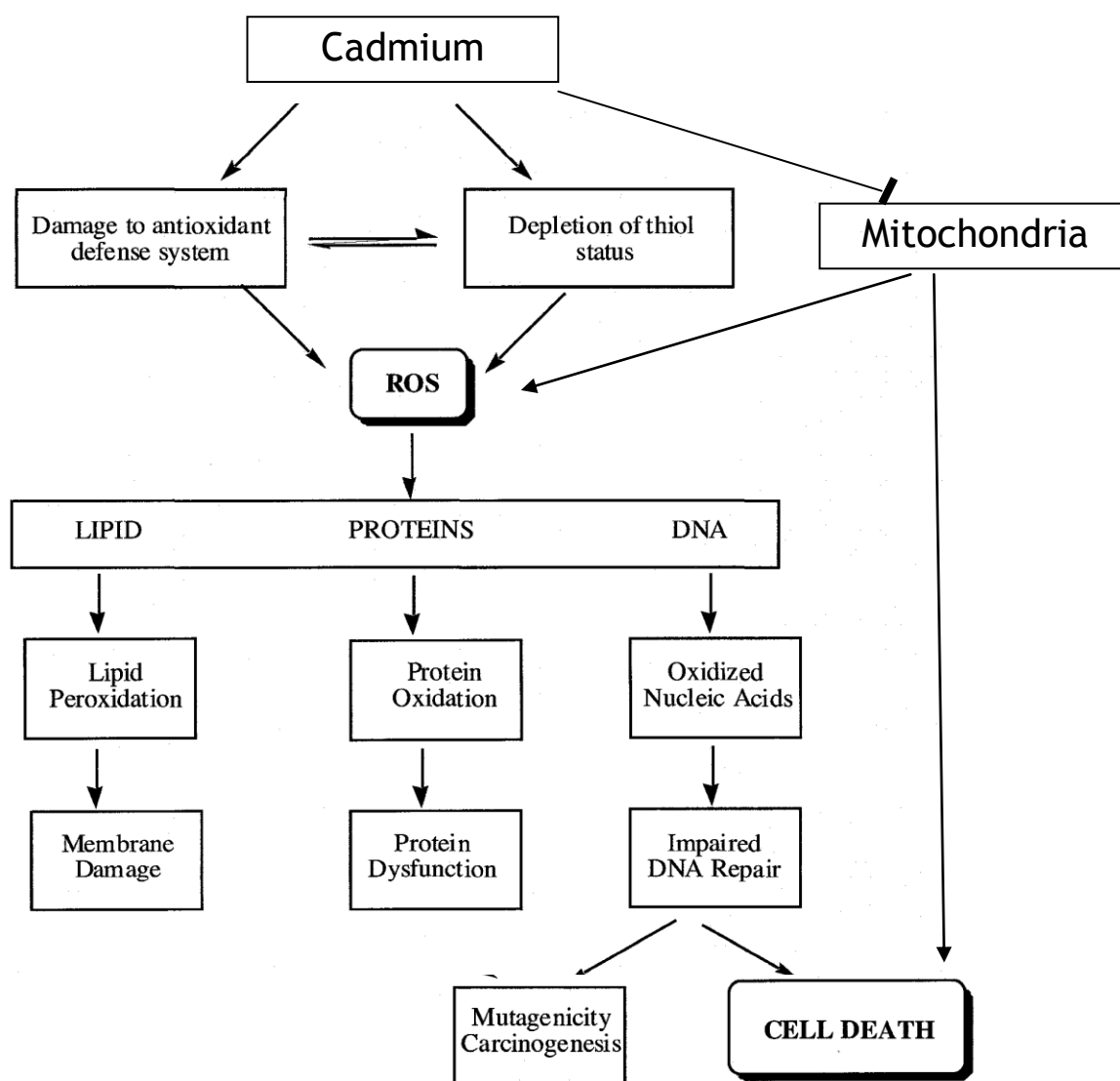


Figure 18: Mécanismes possibles expliquant la génération de stress oxydant par le cadmium d'après Ercal et al., 2001 et Cuypers et al., 2010.

3.5.2.2. Effets sur les mitochondries

La mitochondrie est le site de la respiration cellulaire, de la phosphorylation oxydative et de la production d'ATP (principale source d'énergie pour la cellule) (McBride et al., 2006). Elle intervient également dans le déclenchement de l'apoptose (mort cellulaire programmée). 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, IV) ; les vecteurs d'électrons entre les complexes sont deux molécules mobiles dans la bicouche phospholipidique: l'ubiquinone et le cytochrome *c*. 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 19**). Le complexe I ou NADH-déshydrogénase, oxyde le NADH en NAD^+ et réduit le coenzyme Q (coQ) en coenzyme QH2 (coQH2). La réaction s'accompagne d'un pompage de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le complexe II ou succinate-déshydrogénase, oxyde le succinate en fumarate et réduit le coQ en coQH2. Le complexe III ou cytochrome-*c*-réductase oxyde le coQH2 en coQ 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'espace intermembranaire. Le complexe IV ou cytochrome *c* oxydase, oxyde le $\text{cytc}(\text{Fe}^{2+})$ en $\text{cytc}(\text{Fe}^{3+})$ et réduit l' O_2 en H_2O . La réaction s'accompagne d'un pompage de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le complexe V ou l'ATP-synthase, est une 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 avec un courant de protons de l'espace intermembranaire vers la matrice. 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 qui s'effectue à travers Fo vers la face de la membrane où se situe F1 (**Figure 19**) (Raisonnier, 2004). Il faut mentionner que dans certains cas pathologiques, l'ATP synthase peut fonctionner dans le sens inverse de l'état physiologique normal, hydrolysant ainsi l'ATP au lieu d'en produire (Nevière, 2008). A l'état physiologique normal et en absence de toute contamination, les mitochondries sont les sources majeures de la production des ERO dans les cellules (Cuypers et al., 2010). En effet, les ERO sont naturellement produits au niveau du complexe I et du complexe III à l'état normal (Gao et al., 2008).

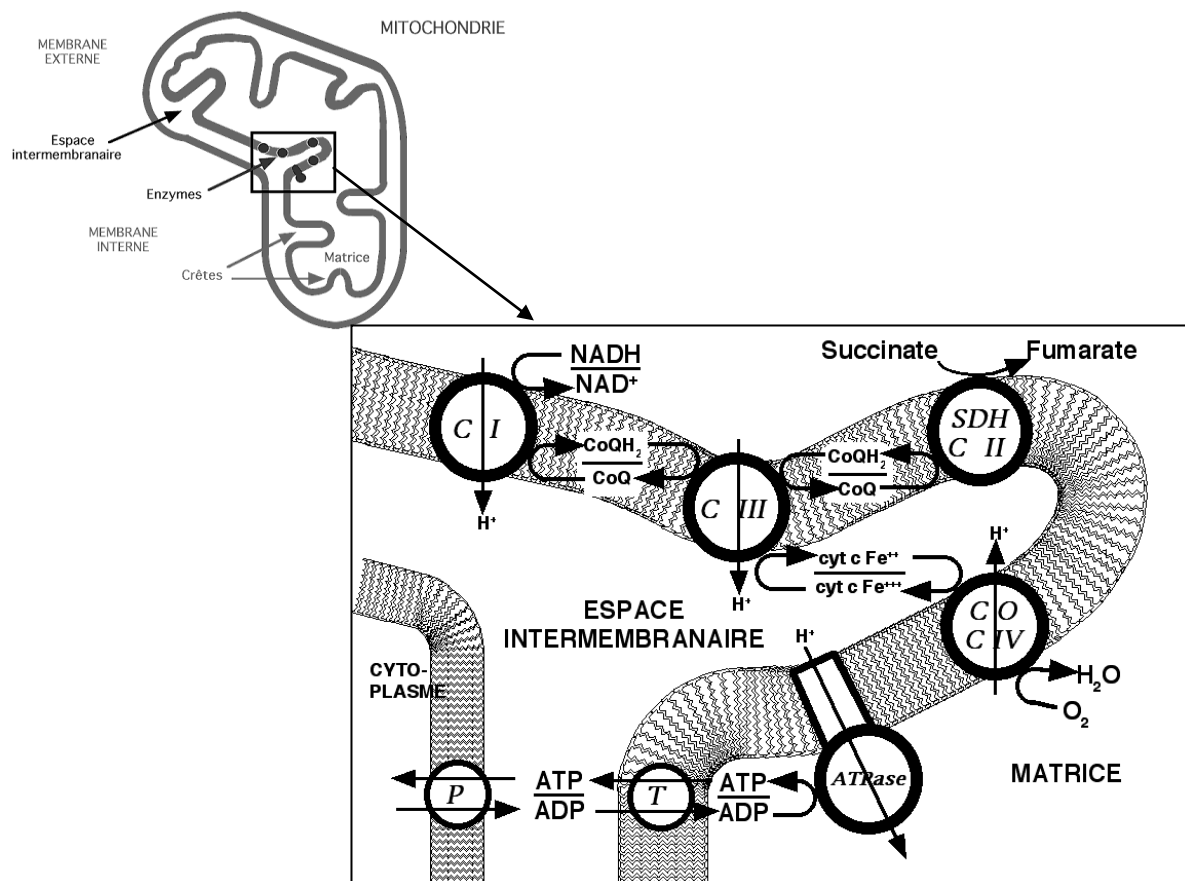


Figure 19 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale. (T) ATP translocase, facilite le transport d'une molécule d'ATP de la matrice vers l'espace intermembranaire, en échange d'une molécule d'ADP dans l'autre sens. (P) La Porine, protéine transporteuse, permet à l'ATP de franchir la membrane externe de la mitochondrie pour sortir dans le cytoplasme (d'après Raisonier, 2004).

Le Cd peut inhiber plusieurs enzymes participant aux processus de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ivanina et al., 2008; Garceau et al., 2010). Il peut se lier aux groupements thiols des molécules mitochondriales critiques et inactiver ainsi les enzymes. Wang et al. (2004) ont montré que les complexes II et III sont plus sensibles à l'inhibition du Cd que les autres. De plus, l'inactivation des groupements thiols peut générer un stress oxydant, une dépolarisation (diminution du potentiel membranaire) et une perméabilité membranaire conduisant à un dysfonctionnement de la mitochondrie. L'altération du potentiel membranaire et le découplage de la phosphorylation oxydative par le Cd conduisent à une diminution de la synthèse de l'ATP. Ceci peut être suivi par l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (Pinot et al., 2000). Ces pores sont des canaux (complexes protéique) au niveau de la membrane mitochondriale dont l'ouverture libère dans le cytosol plusieurs facteurs pro-apoptotiques à l'origine de la mort cellulaire (Berson, 2005).

Les espèces réactives de l'oxygène et le cytochrome c sont alors rejetés de la mitochondrie vers le cytosol où ils activent les caspases qui à leur tour vont conduire à l'apoptose (**Figure 20**). De plus, les ERO relâchées vont dégrader des protéines cellulaires. Dans le cas d'une diminution sévère de l'ATP, une nécrose cellulaire survient, alors que dans le cas d'une diminution modérée, la cellule va tenter de stabiliser tant que possible la dégradation des protéines (ex: grâce à la protéine Hsp70 qui va se complexer aux protéines affectées et les conduire en dehors de la cellule). Suite à cet effet, des mécanismes cellulaires vont être perturbés et d'autres vont se mettre en place pour essayer d'atténuer la toxicité du Cd (ex: surexpression de certains gènes de détoxification ou de compensation) (Pinot et al., 2000). Des études *in vitro* de fibroblastes- fœtal de poumons humains ont montré que les ERO générés par le Cd conduisent à une dépolarisation membranaire de la mitochondrie, à une altération dans le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire et à une diminution de l'ATP suite à une inhibition de l'ATP synthase et à l'oxydation de l'ADN mitochondrial (Freeman et Crapo, 1982; Doelman et al., 1990; Yang et al., 1997). Le Cd est aussi capable de déplacer le zinc des MT (Dallinger et al., 1997), or une augmentation en ion libre de zinc dans les mitochondries peut conduire à un blocage de la respiration mitochondriale, qui en conséquence va conduire à une ouverture du pore de transition de la perméabilité membranaire, puis un rejet du cytochrome c, la génération de ERO (Bossy-Wetzel et al., 2004) et à l'apoptose.

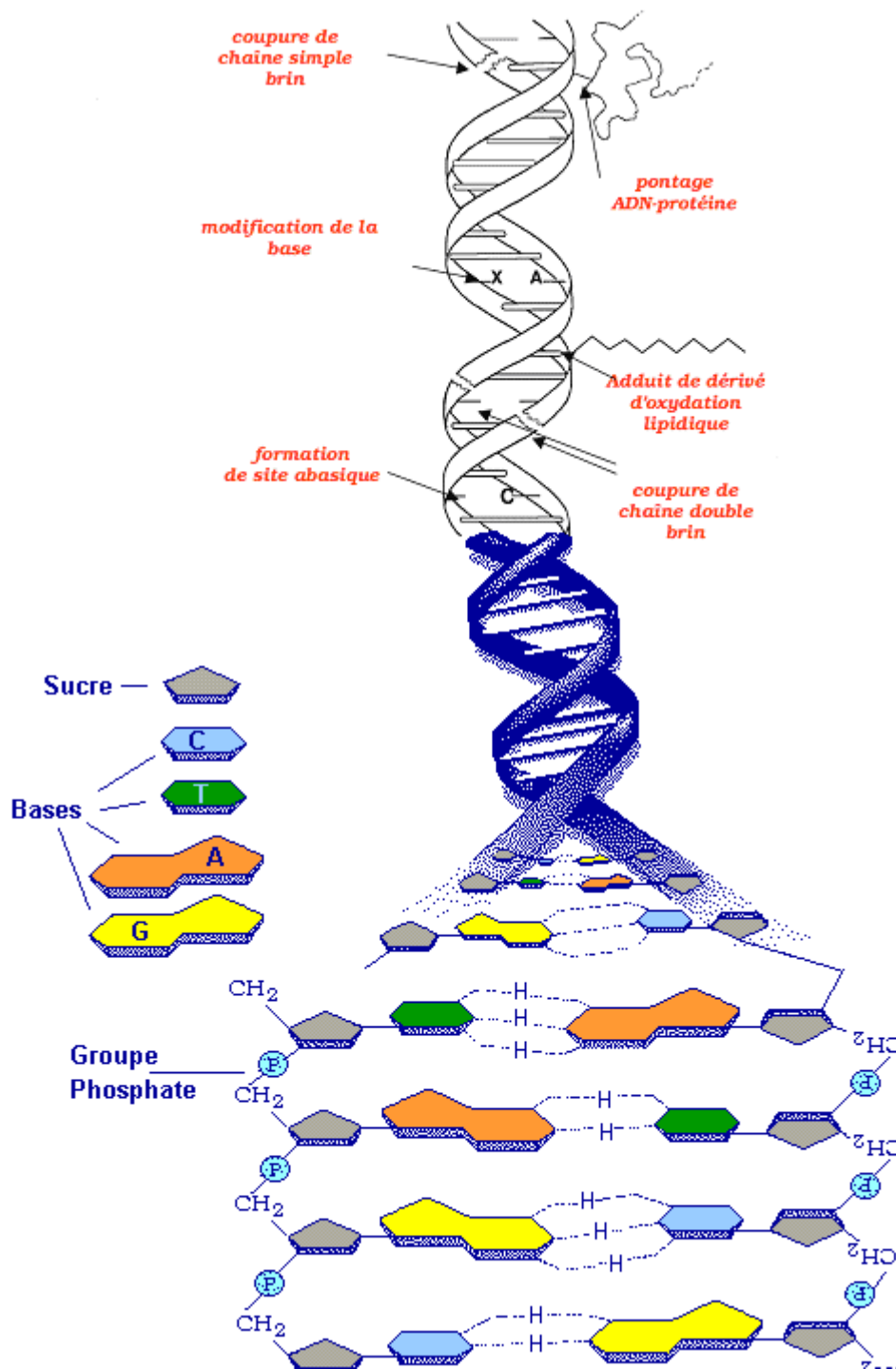


Figure 21 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (d'après Favier, 2003).

Comme nous avons pu le voir précédemment, le Cd peut générer un **stress oxydant**, or l'ADN est très sensible à l'attaque par les dérivés réactifs de l'oxygène. En effet, les espèces réactives de l'oxygène peuvent causer des dommages oxydatifs à l'ADN, à la fois nucléaire et mitochondrial. La formation de dommages oxydatifs à l'ADN n'est possible que

pour les ERO qui possèdent l'énergie suffisante à l'induction des atteintes (ex: $1O_2$ (oxygène singulet), H_2O_2 et $\cdot OH$). Ces réactions peuvent conduire à la formation de **cassures simples ou doubles brins** (Yu et Anderson, 1997; Jacobi et al., 1998). L'attaque de la liaison entre la base et le désoxyribose est aussi possible créant ainsi un **site abasique** (Ramana et al., 1998). Les bases 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** (Cadet et al., 1999). L'attaque radicalaire des protéines qui sont en contact avec l'ADN (ex : protéines d'histones, enzymes et facteurs de réplication ou de la transcription), entraîne des **pontages des protéines** (ADN- protéine) (Dizdaroglu, 1998; Favier, 2003). De plus, les **aldéhydes mutagènes** qui résultent de la peroxydation lipidique, peuvent se fixer sur une des bases de l'ADN, formant ainsi des adduits sur les bases (ex : MDA-guanine) (Favier, 2003). L'ion Cd^{2+} est capable de se lier directement à l'ADN (Yang et al., 2002) et aux acides nucléiques isolés et induire des changements conformationnels aux ligands (Beyersmann et Hechtenberg, 1997). Des cassures des brins de l'ADN et les aberrations chromosomiques peuvent se produire mais seulement quand les concentrations d'exposition sont très élevées (Beyersmann et Hechtenberg, 1997).

Ce métal provoque également des changements dans l'expression de plusieurs gènes conduisant soit à leur répression soit à leur induction. Dans une étude récente, Pierron et al. (2011) ont corrélé les réponses transcriptionnelles de plusieurs gènes à la concentration de Cd accumulée dans le foie de *Perca flavescens* suite à une exposition chronique *in situ*. Les corrélations établies étaient le plus souvent négatives. En effet, une diminution dans les niveaux de transcription de nombreux gènes impliqués dans la biosynthèse de protéine, dans le système immunitaire, dans le métabolisme énergétique et lipidique a été observée. Les auteurs suggèrent que cette diminution marquée provient d'un dysfonctionnement du métabolisme des acides biliaires et de la restriction d'énergie par le Cd. De plus, ils émettent l'hypothèse que des modifications épigénétiques des histones et de l'ADN peuvent mener à la mise sous silence d'un gène (gene silencing)/ répression d'un gène. Les analyses de puces à ADN (appelées aussi *puces à gènes*, *biopuces*, *DNA chip*, *DNA-microarray* et *biochip*) en écotoxicologie sont de plus en plus utilisées pour évaluer les impacts de polluants sur l'expression d'un grand nombre de gènes (Reynders et al., 2006). Cette biotechnologie récente permet d'analyser le niveau d'expression des gènes transcrits dans une cellule, un tissu, un organe, ou encore un organisme, à un moment donné et dans un état donné par rapport à un échantillon de référence. Une analyse utilisant cette technique a été effectuée sur le foie de la carpe pour déterminer les mécanismes biologiques affectés par le Cd. Pour cela,

les poissons ont été contaminés par voie trophique (9.5- 144 µg/g) et directe (9-480 µg/L) simultanément pendant 28 jours à différentes concentrations. Les résultats ont montré que parmi 643 gènes testés, 95 gènes dont le rôle est connu étaient affectés par la présence du Cd. Ces derniers sont impliqués dans divers mécanismes cellulaires, tels le métabolisme énergétique, le métabolisme lipidique, les réponses immunitaires, le stress (ex: Hsp, les marqueurs de stress oxydant et les enzymes de métabolisation des xénobiotiques), la détoxification... L'expression des gènes codant pour les MT, analysée par la technique de RT-PCR a montré une surexpression de ces gènes, alors que le gène codant pour la cytochrome c oxydase était inhibé indiquant la mise en place d'un métabolisme anaérobie (Reynders et al., 2006). Les résultats d'une analyse de puce à ADN et de RT-PCR chez le poisson *Platichthys flesus* montrent aussi qu'en présence du Cd, l'expression des gènes codant pour les protéines marqueurs de stress oxydant et des gènes codants pour les MT est affectée. De plus, les mécanismes impliqués dans la synthèse protéique, le transport et la dégradation sont modifiés. Les gènes de la cytokine, du cytosquelette, de la détoxification (cytochrome P450) et les gènes impliqués dans l'apoptose et le cycle cellulaire sont impactés (Williams et al., 2006). Chez le micro-crustacé *Daphnia magna* après exposition au Cd, les résultats d'une puce à gène ont montré que 29% des gènes dont l'expression était altérée participent au métabolisme et à la production d'énergie, 31% sont impliqués dans la transcription et la traduction, et 40% sont associés aux processus de croissance, de transport d'ions, de la mue et aux réponses de stress (comme le stress oxydant) (Connon et al., 2008). L'analyse d'une biopuce effectuée sur les ARNm totaux de *Saccharomyces cerevisiae* après exposition au Cd a montré que 310 gènes ont été surexprimés en présence de ce métal et 322 gènes ont été réprimés. Parmi les gènes les plus surexprimés, 13% participent aux mécanismes de sauvetage, de défense, de vieillissement et de la mort cellulaire, 9% codent pour des transporteurs, 9% participent dans les mécanismes énergétiques, 8% dans le métabolisme et 7% sont impliqués dans l'homéostasie ionique. Les gènes les plus réprimés mis en évidence dans cette étude participent à la synthèse protéique (surtout les protéines ribosomales) (Momose et Iwahashi, 2001). Plusieurs études sur différents organismes (levures, crustacés, poissons, rats) confirment que les gènes codant pour les MT et les protéines de stress (ex : Hsp) sont hautement surexprimés dans les cellules exposées au Cd (Bartosiewicz et al., 2001; Momose et Iwahashi, 2001; Shaw et al., 2007; Connon et al., 2008; Tokumoto et al., 2011). Le grand nombre de gènes impliqués dans divers processus biologiques, impactés par le Cd montre la complexité de la cyto-toxicité de ce métal.

4. Généralités sur l'uranium

4.1. Description

L'**uranium** (U) correspond au quatre-vingt douzième élément du tableau périodique. C'est un élément radioactif appartenant à la famille des actinides. A l'état pur, c'est un métal gris et dur, très dense (sa masse volumique est de $19,05 \text{ g/cm}^3$), avec une température de fusion de $1\ 133 \text{ °C}$ et de poids atomique égal à $238,02891 \text{ g/mole}$. Il a dix-sept isotopes, tous radioactifs (WHO, 2001). L'U se désintègre pour donner un élément plus stable ; ceci s'accompagne de l'émission de rayonnements ionisants (ASTDR, 1999). L'atome d'uranium possède 6 électrons périphériques qui sont facilement extractibles. Il peut adopter quatre états de valence associés aux formes ioniques suivantes: III (U^{3+}), IV (U^{4+}), V (UO_2^+) et VI (UO_2^{2+}). En solution aqueuse, l'uranium est retrouvé en conditions oxydantes sous la forme soluble de valence VI alors que les composés sous forme U(V) et la plupart des composés U(IV) sont insolubles.

L'**uranium naturel** (U nat) se présente sous la forme d'un mélange de trois isotopes : 0.0055% de ^{234}U , 0.72% de ^{235}U et 99.27% ^{238}U (Aigueperse et al., 2001; WHO, 2001). Parmi ces trois isotopes, seuls ^{235}U et ^{238}U sont primordiaux (c'est à dire qu'ils existent depuis l'origine de la Terre, donc depuis 4,5 milliards d'années). L'isotope ^{234}U est quant à lui un produit de la décroissance de ^{238}U (Madic et Genet, 2001) (**Figure 22**). Les trois isotopes (^{234}U , ^{235}U et ^{238}U) présentent les mêmes propriétés chimiques mais possèdent des propriétés radioactives différentes. Il est donc nécessaire de déterminer le pourcentage des trois isotopes dans un échantillon pour y déterminer la radioactivité totale de l'U. Cette différence de radioactivité s'exprime à travers la demi-vie des isotopes (244 mille ans pour ^{234}U , 710 millions pour ^{235}U et 4.5 milliards d'années pour ^{238}U). En effet, l' ^{234}U très radioactif, possède la plus courte demi-vie, alors que l'isotope le moins radioactif *i.e.* ^{238}U , possède la plus longue. Ainsi grâce à sa forte activité spécifique ($2.3 \cdot 10^8 \text{ Bq/g}$) (Delacroix et al., 2004), l' ^{234}U contribue à environ 49.5% de la radioactivité de l'U naturel. L' ^{238}U (activité spécifique est de $1.24 \cdot 10^4 \text{ Bq/g}$) (Aigueperse et al., 2001), quant à lui ne contribue qu'à 48.2% de l'activité totale en dépit de sa forte abondance dans l'U naturel et les 2.3% restants sont liés à la décroissance radioactive de ^{235}U (activité spécifique est de $8 \cdot 10^4 \text{ Bq/g}$) (Bleise et al., 2003) (**Tableau 6**). Il faut cependant noter que l'activité spécifique totale de l'Unat est faible. De ce fait, sa toxicité est principalement attribuable aux caractéristiques chimiotoxiques et non radiotoxiques (ASTDR, 1999, Barillet et al, 2007 ; Bourrachot et al., 2008). Les activités anthropiques contribuent à changer l'isotopie de l'U générant ainsi de l'**U appauvri** (UA ou DU: « depleted uranium ») et de l'**U enrichi**. Avec une teneur en ^{235}U comprise entre 0.2 et

0.3 %, l'UA est moins radioactif que l'Unat (Aigueperse et al., 2001) (ATSDR.1999). L'augmentation de la radioactivité de l'U est réalisée en enrichissant la quantité de ^{234}U et de ^{235}U ou en produisant d'autres isotopes très radioactifs tel le ^{232}U ($7.92 \cdot 10^5 \text{ Bq/g}$) et le ^{233}U ($3.57 \cdot 10^8 \text{ Bq/g}$) (ATSDR.1999 ; WHO, 2001, Delacroix et al., 2004).

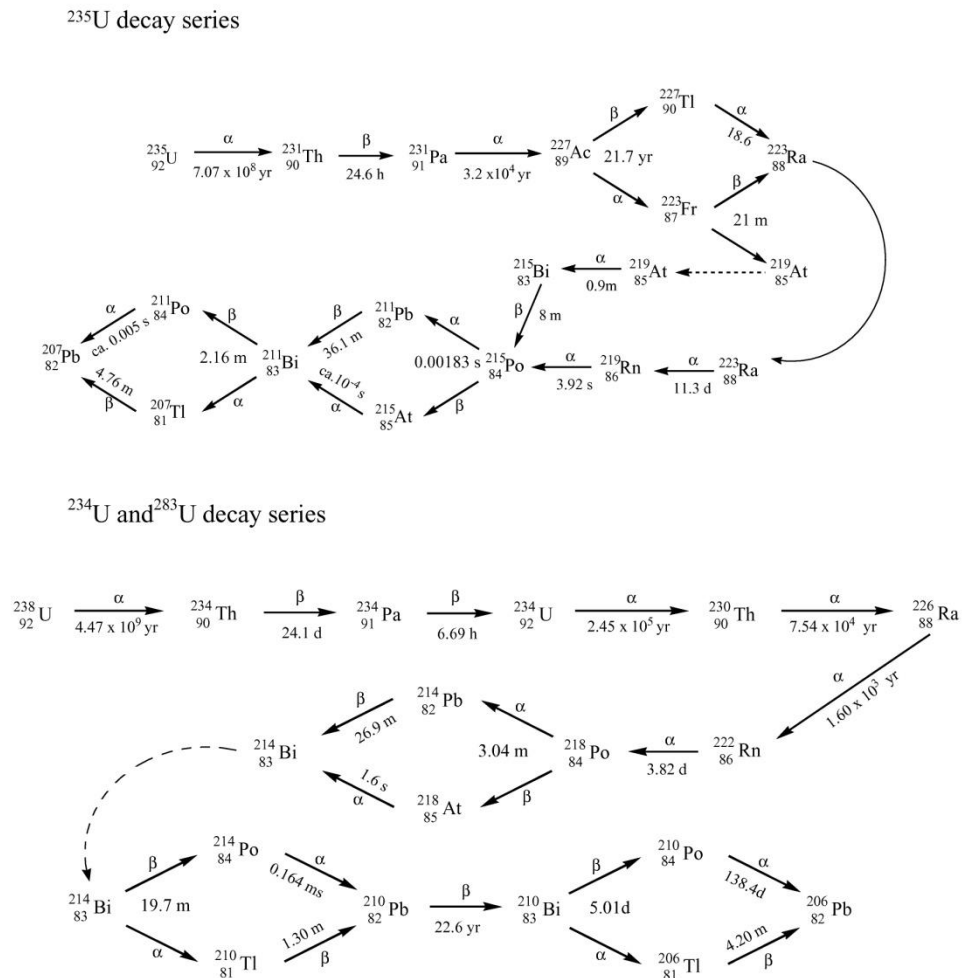


Figure 22 : Chaîne de désintégration de l' ^{234}U , ^{235}U et de l' ^{238}U . (U) uranium; (Th) thorium; (Pa) protactinium; (Ac) actinium; (Tl) thallium; (Fr) francium; (Ra) radium; (At) astatine; (Bi) bismuth; (Rn) radon; (Po) polonium; (Pb) plomb (Craft et al., 2004).

Tableau 6 : Composition isotopique en masse et en activité de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri à 0.2% en ^{235}U (d'après Aigueperse et al., 2001).

Uranium	Masse (%)			Activité (%)			Activité (Bq/g)		
	^{238}U	^{235}U	^{234}U	^{238}U	^{235}U	^{234}U	^{238}U	^{235}U	^{234}U
Uranium naturel	99.274	0.72	0.0055	48.2	2.3	49.5	12400	580	12474
Uranium appauvri	99.797	0.202	0.0008	86.1	1.1	12.8	12400	158	1843

4.2. Origine et distribution

L'U est un élément naturel présent dans les roches, le sol, et l'eau. Il est largement représenté dans la croûte terrestre où sa teneur moyenne s'élève de 2 µg/g à 4 µg/g (Ribera et al., 1996; Bonin et Blanc, 2001; WHO, 2001). La concentration moyenne en U dans les sols est d'environ 1.8 µg/g. Sa répartition dans le sol va dépendre de la lixiviation (transport par l'eau), la diffusion, le transport biologique (plantes, microorganismes, insectes...) et la dispersion par le vent et la pluie (Ribera et al., 1996). Les sources hydrothermales représentent une des principales sources d'U (Ribera et al., 1996). Dans les eaux douces, les concentrations sont très variables allant de 0.01 µg/L à plus de 1.5 mg/L (WHO, 2001 ; Kurttio et al., 2006) et sont le reflet des abondances naturelles en U dans les roches et les sols environnants. Plusieurs études ont rapporté des concentrations en U élevées dans l'eau de consommation humaine au niveau de puits (forage en profondeur) (**Tableau 7**). Les eaux souterraines se chargent en minéraux et notamment en U 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 les océans les concentrations retrouvées sont de l'ordre de 3.3 µg/L (Ragnarsdottir et Charlet, 2000).

Tableau 7: Concentrations mesurées dans l'eau de consommation humaine issue de puits

localisation	concentration (µg U/L)	références
Canada	2-781	Limson Zamora et al. (1998)
Canada	0.7-19.6	Mao et al., (1996)
Etats-Unis	1.8-7780	Orloff et al., (2004)
Finlande	0.03-1500	Kurttio et al., (2006)
Norvège	0-750	Frengstad et al., (2000)

Les activités anthropiques contribuent à l'augmentation des concentrations en U dans les différents compartiments de l'environnement et peuvent provoquer localement des pollutions importantes (Saari et al., 2008). L'U d'origine anthropique peut provenir des activités médicales (Saari et al., 2008) et de recherche. L'intérêt que suscite l'utilisation de l'U dans diverses activités industrielles est surtout lié à sa résistance et sa densité. L'utilisation civile de l'U se fait surtout dans les centrales nucléaires électriques (ATSDR, 1999). De l'UA est généré par l'industrie nucléaire, cet élément peut provenir soit des usines d'enrichissement en ^{235}U de l'uranium naturel pour la fabrication du combustible des

réacteurs nucléaires, soit du retraitement de combustibles irradiés (Aigueperse et al., 2001). Dans le domaine militaire, l'UA est utilisé pour le blindage de certains chars et la fabrication d'obus perforants (Aigueperse et al., 2001). Lors des tirs d'armes à l'UA, ce dernier 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). Certains pays utilisent l'U comme source de pouvoir et pour la fabrication d'armes nucléaires (ATSDR, 1999). Dans le domaine industriel, l'UA entre dans la fabrication d'ailes et de gouvernails d'avion, d'hélicoptères, de quilles de voilier, et de protections contre les effets biologiques des rayonnements ionisants comme les collimateurs d'appareils d'irradiation médicale. Une très faible quantité est aussi utilisée pour la fabrication de vernis à céramique, des ampoules électriques, des fertilisants et de certains produits chimiques ménagers et photographiques (ATSDR, 1999) L'utilisation d'engrais contenant des impuretés d'U participe à l'augmentation de ses concentrations dans l'environnement. Ces concentrations dépendent du type de roche utilisée pour la production de ces fertilisants ; les engrais produits à partir de roches riches en phosphates peuvent contenir des concentrations d'U pouvant atteindre 129 µg/g (Kratz et Schnug, 2006).

Une partie de l'U est arrachée à la terre par l'activité minière et les phénomènes naturels (ex : le vent et la pluie) qui peuvent aussi effriter les roches. Ainsi, la pluie va pouvoir transporter l'U vers les systèmes aquatiques, tandis que le vent va transporter des aérosols chargés d'U. A leur tour les petites particules d'U dans l'air peuvent tomber sur les surfaces de sols ou d'eau (ATSDR, 1999). En conséquent, la proximité des milieux aquatiques d'une zone impactée par l'activité humaine (p. ex. exploitation d'une mine, sites de stockage de déchets nucléaires) peut résulter en une élévation localement importante des teneurs en uranium, pouvant aller jusqu'à 10 voire 20 mg/L (Ragnarsdottir et Charlet, 2000). Il faut mentionner que la capacité des sédiments à fixer l'U est considérable, ils ont un rôle de stockage de l'élément dans l'environnement. Cette fixation dépend de la granulométrie ; les plus grandes quantités d'U sont retrouvées dans les fractions granulométriques les plus fines (< 50 µm). Ainsi, une partie de l'U présent dans la colonne d'eau peut précipiter et/ou se fixer aux sédiments.

Dans le contexte de l'évaluation des apports anthropiques d'U dans l'environnement par les activités d'extraction minière, la production mondiale d'U et la localisation des ressources mondiales (**Figure 23**) permettent d'avoir un aperçu des risques potentiels de contamination. D'après la banque de données « World Nuclear association », en 2010 la contribution la plus importante pour l'approvisionnement mondial en U revient au Kazakhstan (33%), suivi du Canada (18%) et de l'Australie (11%). Au 1^e janvier 2009, les ressources

identifiées (< 260 US\$/Kg) dans le monde (**Figure 23**) s'élevaient à **6 298 500** tonnes d'U (NEA-IAEA, 2010). La France quant à elle n'a produit que 7 tonnes en 2010 (**Figure 24**).

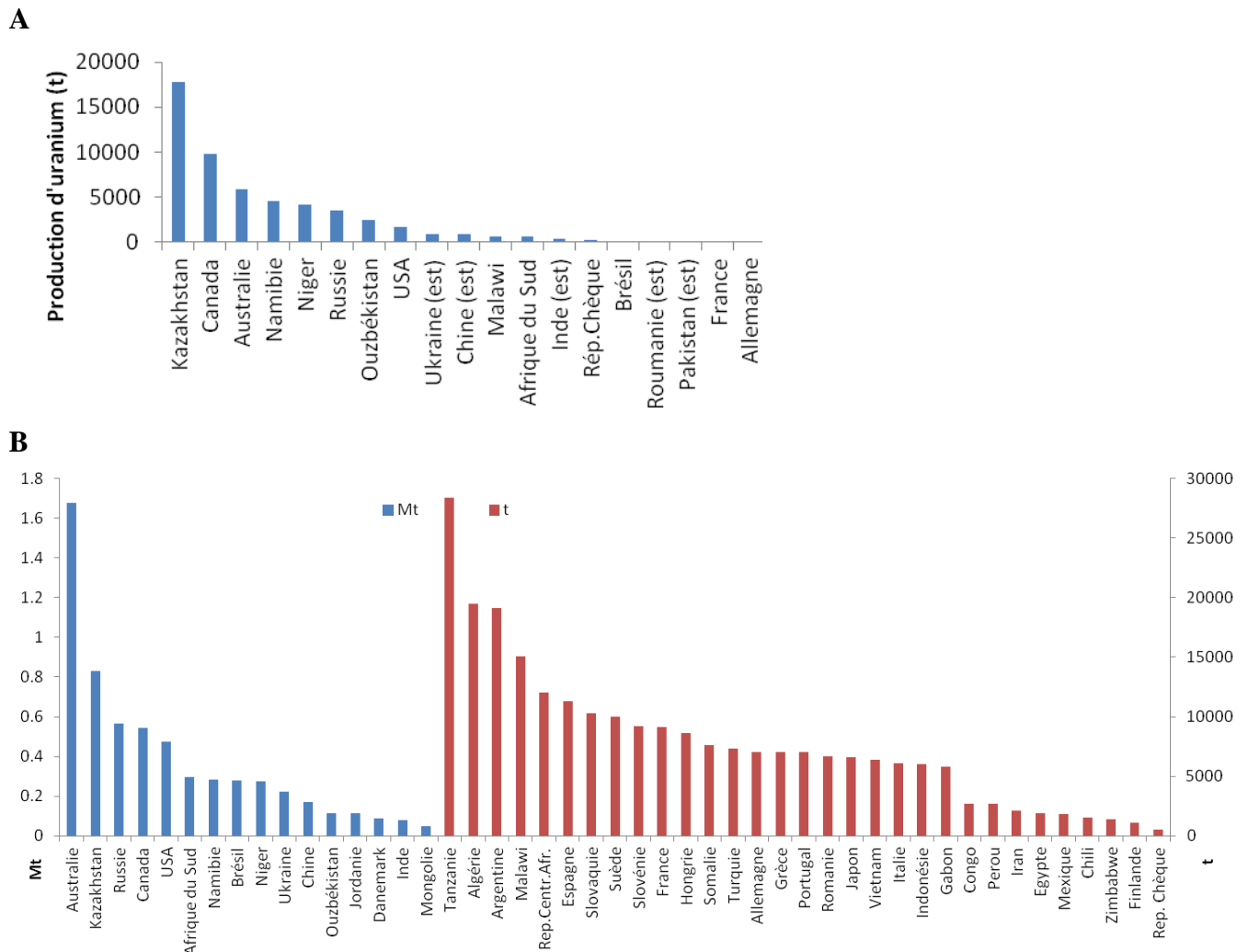


Figure 23: (A) Production mondiale d'uranium à partir de sites miniers en 2010 présentée en tonnes par pays. (B) Inventaire des résidus miniers d'uranium recensés dans le monde en 2009 exprimés en million de tonnes ou en tonnes suivant les pays (d'après NEA-IAEA 2010).

La **Figure 24** indique la distribution des sites miniers au niveau national. Près de 210 sites miniers d'U sont répartis en France principalement sur le pourtour du Massif-Central, la Vendée, la Bretagne et l'Alsace. Suite à 50 ans d'exploitation de l'U (de 1945 à 2001), 52 millions tonnes de résidus de traitement de minerais extraits des mines françaises ont été traités pour produire au total 76 000 tonnes d'uranium (IRSN, 2009).

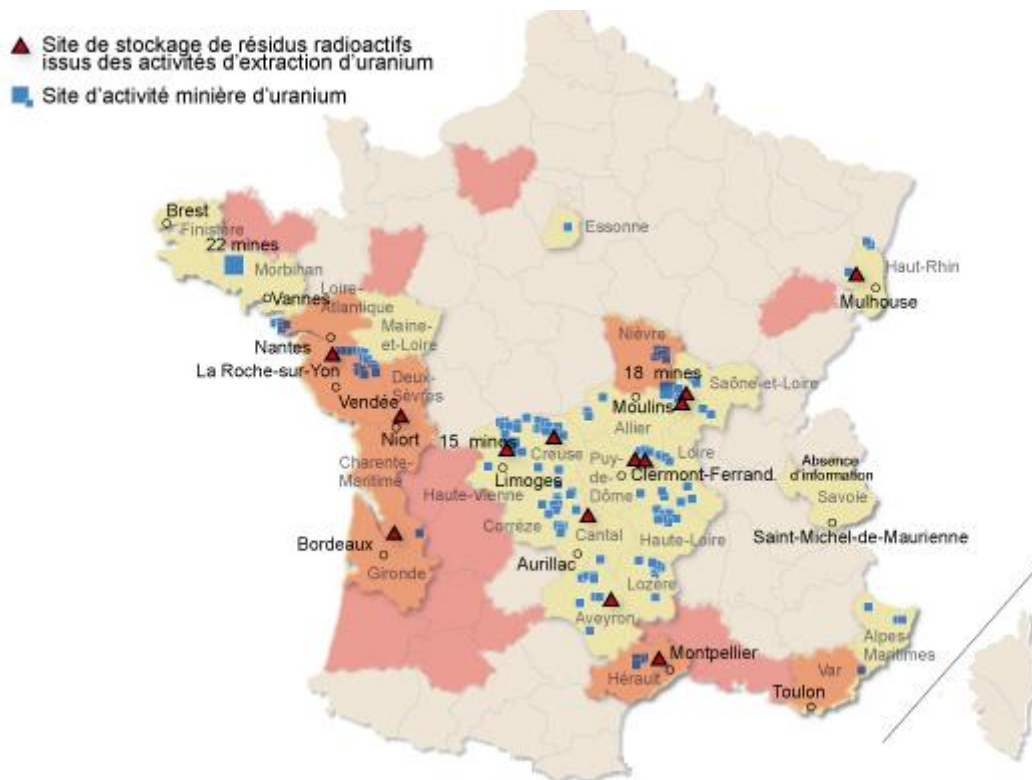


Figure 24: Carte des mines d'uranium et sites de stockage en France (2009) (source IRSN) superposée à la carte de distribution (zone en rose) de *P. clarkii* (Collas et al., 2007).

4.3. Spéciation chimique

Pour qu'un métal exerce un effet sur la composante biotique, il doit être sous une forme chimique ayant la capacité d'atteindre les cibles biologiques. Seules certaines formes (ou espèces) du métal peuvent être assimilables pour les organismes aquatiques. L'ion uranyle (UO_2^{2+}) et l'espèce hydroxylée UO_2OH^+ seraient les espèces 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). En effet, ces deux espèces sont connues pour être les formes les plus biodisponibles pour les espèces aquatiques (Markich, 2002; Fortin et al., 2004; Fortin et al., 2007). 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 $\text{UO}_2(\text{OH})_2$ ce qui nuance l'hypothèse précédente (Denison, 2004). Les études de transfert des métaux nécessitent dans un premier temps, le développement d'outils permettant d'évaluer la spéciation de l'U dans l'eau (en la mesurant et non pas juste par modélisation). Dans un second temps, il faudra établir un lien entre cette spéciation, la fraction d'U bioaccumulée et les effets biologiques engendrés pour mettre en évidence les espèces biodisponibles.

La spéciation de l'uranium en eau douce est complexe et est influencée par la composition ionique de l'eau (ions inorganiques), le pH, la température, le potentiel d'oxydoréduction, la présence de ligands organiques, l'alcalinité (concentration des carbonates), la dureté (concentrations de calcium ou de magnésium) et la matière organique dissoute du milieu. En effet, les substances humiques représentant jusqu'à 75 % du carbone organique dissous dans les hydrosystèmes fluviaux favorisent la formation de complexes organiques stables de l'ion uranyle (Colle et al., 2001). Concernant les échanges avec les particules, la rétention de l'uranium est d'autant plus faible que les conditions sont oxydantes et alcalines (Bird et Evenden, 1996). Ainsi dans les eaux fortement **carbonatées**, on note une diminution de l'adsorption de l'uranium sur les particules du fait d'une augmentation de la solubilité de l'élément (complexes uranyles carbonatés dominants). La présence de **phosphates**, diminue la biodisponibilité de l'U (Fortin et al., 2004). Elle peut entraîner la précipitation des ions uranyles et leur transfert vers le compartiment sédimentaire. En effet, la complexation des métaux avec des ligands (tels les phosphates, les carbonates, les hydroxydes et les matières organiques) diminue leur disponibilité aux organismes (Fortin et al., 2004). La toxicité chimique de l'**ion uranyle** diminue avec l'augmentation de la **dureté, de l'alcalinité** (Sheppard et al., 2005) et de la concentration en matières **organiques dissoutes** de l'eau (Markish et al., 1996). L'explication de cette diminution de la toxicité repose sur une compétition de l'ion uranyle avec les espèces cationiques présentes dans l'eau. De plus, le pH influence significativement la spéciation de l'U et donc sa biodisponibilité. En effet, lorsque le pH est faible, la concentration en ion uranyle est forte, alors que dans le cas contraire les formes carbonatées deviennent dominantes (Fortin et al., 2007). Zeman et al. (2008), confirment que la CL 50-48h du micro-crustacé *Daphnia magna* varie de 0.39 ± 0.04 mg/L à pH 7 à 7.8 ± 3.2 mg/L à pH8. Une autre étude a montré que la toxicité de l'U chez cette même espèce diminue quand la dureté et l'alcalinité de l'eau augmentent (CL 50-48h plus forte) (Poston et al., 1984). Chez les poissons, les CL 50 à 96 h s'étendent de 0,7 à 135 mgU/L en fonction des facteurs biotiques (espèce, stade de maturité) et abiotiques (température, dureté, pH) (Garnier-Laplace et al., 2001). Ainsi, le risque de toxicité que présente l'U pour un organisme vivant dépend de sa biodisponibilité.

Dans une eau douce synthétique adaptée aux besoins des écrevisses et équilibrée avec la pression atmosphérique de CO₂ (pCO₂ atm), la modélisation de la spéciation de 30µg U/L (logiciel J-CHESS), dans la gamme $5 < \text{pH} < 6$ présente majoritairement les espèces suivantes (**Figure 25**): UO_2^{2+} , UO_2OH^+ , UO_2CO_3^0 . Dans la gamme $6 < \text{pH} < 6.5$ les espèces majoritaires sont: $(\text{UO}_2)_2\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$, UO_2CO_3^0 , UO_2OH^+ et UO_2OH_2^0 , Tandis que dans la

gamme $6.5 < \text{pH} < 7$ les espèces majoritaires sont: $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3$ (aq), $(\text{UO}_2)_2\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$, UO_2CO_3^0 et $\text{CaUO}_2(\text{CO}_3)_3^{2-}$. Au-delà de cette dernière gamme et jusqu'au pH 8, les espèces dominantes sont le $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^0$ et le $\text{CaUO}_2(\text{CO}_3)_3^{2-}$.

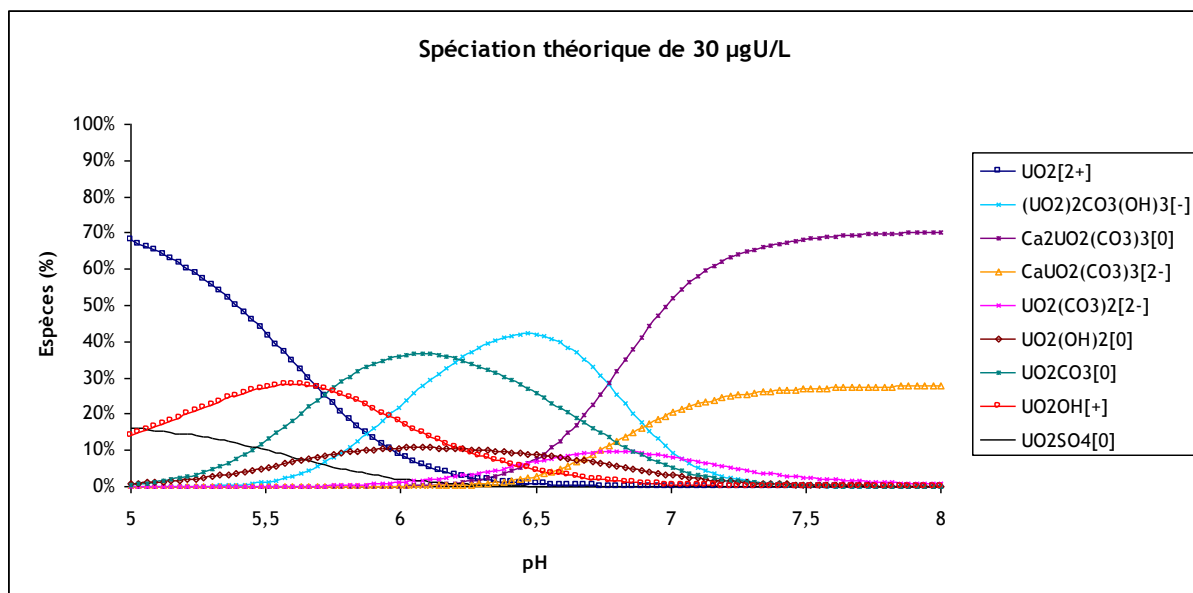


Figure 25 : Spéciation chimique de 30 µg/L d'uranium dans une eau douce synthétique adaptée aux besoins des écrevisses (simulation avec le programme de spéciation géochimique J-CHESS).

4.4. Mécanismes de contamination

La capacité des formes chimiques de l'U à accéder et interagir avec les interfaces entre les êtres vivants et le milieu environnant, à s'y complexer (adsorption) et éventuellement à traverser ces barrières biologiques (absorption), conditionnent les phénomènes de bioaccumulation et par conséquent, les atteintes structurales et fonctionnelles pouvant en découler. Le transfert de l'U aux organismes aquatiques se fait à partir de différents compartiments : la colonne d'eau (Barillet et al., 2007), les sédiments (cas des fouisseurs) (Lagauzère et al., 2009), la chaîne trophique (Simon et Garnier-Laplace, 2005) (plantes, consommateurs primaires et secondaires) et par voie maternelle (la reproduction) (Bourrachot et al., 2008). L'importance de la contamination dépend de plusieurs facteurs comme les capacités de l'animal à éliminer le métal, la persistance du contaminant dans le milieu (surtout les milieux fermés ex : les lacs...) et d'éventuelles désorptions des radionucléides fixés aux sédiments (Coulon, 1990). Dans le cas d'une contamination directe, c'est par les branchies que l'U entre dans le corps, mais cet organe peut aussi servir de barrière de protection en emprisonnant le métal dans le mucus qui les protège (Barillet et al., 2007). La partie de l'U

qui arrive à traverser cette barrière biologique est ensuite transportée par le sang (Tran et al., 2008), et gagne les organes cibles pour le xénobiotique. Suite à une exposition du poisson zèbre *Danio rerio*, l'U s'accumule préférentiellement dans deux organes, les branchies et le foie (Barillet et al., 2007). L'importance de la contamination par voie trophique dépend de l'absorption et de la rétention du métal par la voie gastro-intestinale. L'absorption de l'U au niveau de l'intestin dépend de la solubilité du composé, de la valence de l'U et de la taille de la particule (Durbin et Wrenn, 1975). Citons aussi à titre d'exemple, qu'une exposition de l'écrevisse *Orconectes limosus* à l'U par voie trophique a montré que l'hépatopancréas et l'estomac sont les deux organes cibles de l'U mais l'U était aussi présent en faible proportion dans les branchies, les muscles et la carapace (Simon et Garnier-Laplace, 2005).

4.5. Effets biologiques de l'U

4.5.1. Au niveau de l'organisme et des tissus

L'U comme la plupart des métaux cause des changements physiologiques, comportementaux, structuraux et affecte la reproduction (Domingo, 2001). Chez différentes espèces de poissons, les symptômes décrivant l'intoxication à l'uranium par voie directe à forte dose (5.8 mg/L) pendant 96h progressent depuis une augmentation de la ventilation respiratoire, vers une nage désordonnée, une perte d'équilibre, un changement de couleur (plus sombre), des hémorragies au niveau des nageoires puis la mort (Bywater et al., 1991). Tran et al. (2008) ont mis en évidence l'impact de U sur la physiologie du bivalve *Corbicula fluminea* qui diminue son débit cardiaque afin de limiter le transport de l'U du sang vers les organes. U affecte également son comportement valvaire puisqu'une fermeture des valves a été observée chez 50% des individus suite à une contamination de 0.05 $\mu\text{mol/L}$ ($\sim 12 \mu\text{g/L}$) d'U à pH 5.5 après 5h d'exposition (Fournier et al., 2004).

Des effets tératogènes et reprotoxiques de l'U ont été observés chez les poissons zèbres. Bourrachot et al. (2008) ont montré que l'U (250 $\mu\text{g/L}$) s'accumule dans l'embryon après avoir traversé le chorion et induit un effet significatif sur le succès d'éclosion des œufs du poisson zèbre *Danio rerio* avec un retard d'éclosion de 42% par rapport au contrôle. Une diminution temporaire de croissance et une mortalité post-larvaire élevée ont été aussi observées. Une étude récente a montré que l'exposition de la même espèce de poisson par voie trophique entraîne une réduction du succès reproducteur, du nombre des œufs ($\sim 50\%$ après exposition à 50 et 500 $\mu\text{g/g}$) pondus et de leur viabilité après 10 jours de la fertilisation (Simon et al., 2011b).

L'exposition à des effluents d'une extraction minière d'U a conduit à une diminution de la taille des larves de *Rana perezii seoane* accompagnée d'une diminution de la réponse face à un stimulus, d'une augmentation de la pigmentation et des malformations des queues (Domingo, 2001; Marques et al., 2008).

Des atteintes structurales de divers organes ont été observées chez les poissons suite à une contamination à l'U (Cooley et al., 2000; Barillet et al., 2010; Lerebours et al., 2010a; Lerebours et al., 2010b). Une exposition du poisson zèbre à des concentrations environnementales de l'U (15, 30 et 100 µgU/L) a conduit à des atteintes ultrastructurales du bulbe olfactif (Lerebours et al., 2010a; Lerebours et al., 2010b) et des muscles (Lerebours et al., 2010a). Des altérations des myofibrilles et des dilatations de l'endomysium (espace inter-myofibrille) des muscles ont été observées. De plus, l'écartement de l'endomysium a laissé apparaître des morceaux de structures qui pouvaient correspondre à des débris de mitochondries, des tubules T ou du reticulum sarcoplasmique (Lerebours et al., 2010a). Barillet et al. (2010) ont montré des atteintes structurales au niveau des branchies, des muscles et des gonades de *Danio rerio* exposé à 100 µg/L de UA ou 93.35 µg/L de UA mélangé à 6.65 µg/L de ²³³U (plus radiotoxique). Ces atteintes peuvent avoir des conséquences graves sur l'organisme puisqu'une diminution des performances reproductives du poisson, une diminution des échanges gazeux et un impact sur les capacités de nage peuvent en découler. De plus, l'intensité des impacts au niveau de ces organes semble dépendre de la radiotoxicité du contaminant. Un des résultats intéressants de cette étude a révélé que la radiotoxicité de l'U peut conduire à une distribution anormale des mitochondries dans les muscles. Cooley et al. (2000) ont montré que les atteintes histopathologiques au niveau des reins et du foie du poisson *Coregonus clupeaformis* étaient dose (100, 1000 et 10000 µg U/g de nourriture) et temps dépendants (10, 30 et 100 jours). Les lésions les plus prononcées dans le foie étaient la nécrose cellulaire et des altérations de l'épithélium des tubules. Au niveau des reins, les symptômes apparents étaient une nécrose des tubules rénaux, une inflammation, une hémorragie, une diminution des tissus hématopoïétiques, des altérations des tubules distaux et des canaux collecteurs, une dilatation des tubules, une prolifération de macrophages pigmentés et des lésions glomérulaires.

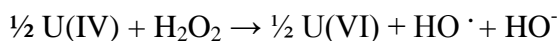
4.5.2. Effets sub-cellulaires

La toxicité chimique de l'U est due à son affinité pour les protéines et à la formation de complexes stables avec des ligands biologiques de faible poids moléculaire. De ce fait, les ions uranyles affectent sérieusement la réabsorption du glucose et les acides aminés (Bem et

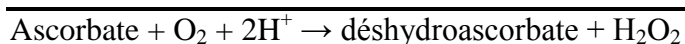
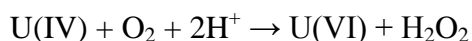
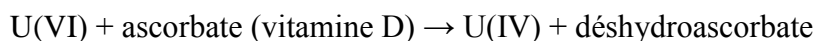
Bou-Rabee, 2004). Des études sur la toxicité de l'U appauvri chez les animaux mettent en évidence ses propriétés carcinogènes et mutagènes (McClain et al., 2001). L'U induit la génération de ERO (Tasat et al., 2007), perturbe les systèmes de défense antioxydants, génère une peroxydation lipidique, perturbe les activités métaboliques et celles des enzymes membranaires (Banday et al., 2008).

4.5.2.1. Stress oxydant

L'U est capable de générer un stress oxydant en induisant la formation de radicaux hydroxyles en présence du peroxyde d'hydrogène (Taqui Khan et Martell, 1969). Le schéma réactionnel de ce phénomène a récemment été décrit, basé sur un mécanisme d'oxydoréduction de type Fenton. Comme certains métaux de transition (ex : Fe^{2+} et Cu^{2+}), l'U serait susceptible d'induire une réduction du peroxyde d'hydrogène intracellulaire, induisant ainsi la formation d'un ion hydroxyde (OH^-) mais également d'un radical hydroxyle (Miller et al., 2002). Yazzie et al. (2003) suggèrent que la première des deux réactions initiées serait la suivante :



La seconde étape de réduction du métal assurerait le passage de la forme U(VI) en U(IV) (insoluble) sous l'action d'agents réducteurs tels que l'**ascorbate** ou le **glutathion** (Miller et al., 2002; Yazzie et al., 2003; Pourahmad et al., 2006; Viehweger et al., 2011). Le schéma réactionnel dans le cas de la réduction par l'ascorbate serait défini comme suit:



Pourahmad et al., (2006) suggèrent que le U(VI) peut être réduit en U(IV) par le glutathion, la NADPH-P450 réductase et le Cytochrome P450 réduit et générer des ERO (notamment l'ion superoxyde). Viehweger et al., (2011) ont montré que le GSH réduit U(VI) en U(V) et produit du glutathion oxydé. Ensuite le U(V) va subir simultanément des oxydations et des réductions générant ainsi du U(IV) et du U(VI). Notons que le glutathion est aussi un substrat de la glutathion peroxydase et de la glutathion S transférase, donc une baisse de la concentration en GSH va diminuer l'activité de ces deux enzymes antioxydantes, ce qui va affaiblir le système de défense cellulaire contre le stress oxydant et par conséquent générer un stress. D'après Taqui Khan et Martell (1969) et Miller et al (2002), l'U dans la cellule subit un cycle d'oxydoréduction, successivement présent sous les formes U(VI) et U(IV), libérant des espèces réactives de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène ou le radical hydroxyle. De

plus, l'U est un radionucléide capable d'arracher un électron à la matière (possède un rayonnement ionisant). Le rayonnement ionisant peut interagir avec la molécule d'eau. Ce phénomène est appelé radiolyse de l'eau et conduit à la formation d'espèces radicalaires et ioniques (ex: $\cdot\text{OH}$ et H^\bullet) (Jones et al., 2003). La production d'espèces réactives de l'oxygène pourrait être à l'origine d'un stress oxydant cellulaire dont les protéines, les phospholipides membranaires et les acides nucléiques sont les cibles principales (Ribera et al., 1996). Les protéines qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) sont les plus sensibles aux attaques radicalaires. L'oxydation altère leurs structures et leurs fonctions (Favier, 2003). Ainsi, les ERO peuvent oxyder les enzymes impliquées dans la défense contre le stress oxydant et les inactiver (Davies, 2005). De plus, les membranes étant constituées d'une double couche phospholipidique, les radicaux générés (surtout les $\cdot\text{OH}$) sont susceptibles de réagir avec les chaînes d'acides gras insaturés des phospholipides au niveau des doubles liaisons et causer une peroxydation lipidique (**Figure 26**) (Gutteridge, 1995).

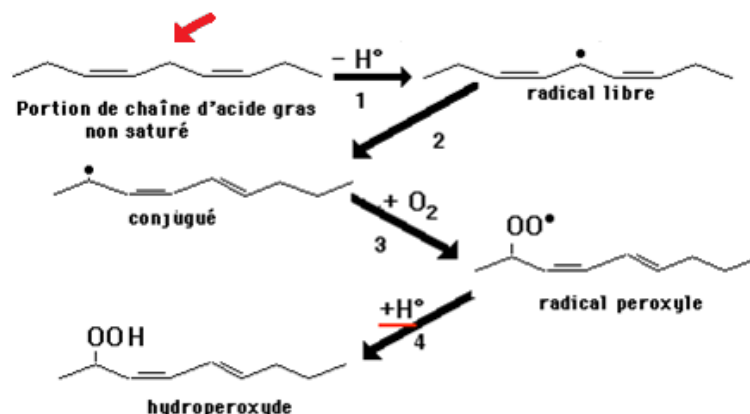


Figure 26 : Peroxydation d'une portion d'une chaîne d'acide gras insaturée (représentation topologique). La flèche rouge indique l'endroit de la chaîne qui subira l'enlèvement d'un atome H^\bullet . Le point illustre l'électron célibataire (Source: <http://www2.ulg.ac.be/cord/initiation%20au%20met%20oxygene/peroxlip.html>).

La peroxydation lipidique affecte les structures et les fonctions membranaires (membranes cellulaire et des organites). En effets, les hydroperoxydes instables formés sont responsables de la diminution de la fluidité membranaire (Rémita, 2001). Or, toute altération de la membrane peut conduire à la modification des flux calciques, lesquels sont impliqués par exemple, dans les mécanismes apoptotiques (Stark, 2005). Au niveau de la mitochondrie, ce phénomène peut conduire à une perte de l'activité du cytochrome oxydase. Les hydroperoxydes instables en se décomposant vont donner de nouveaux radicaux libres

provoquant des oxydations des biomolécules (Cillard et Cillard, 2006). Les produits formés par la dégradation des hydroperoxydes comme le malondialdéhyde (MDA) peuvent s'avérer toxiques pour le matériel génétique cellulaire *via* la formation d'adduits sur les groupements NH₂ des biomolécules (acides nucléiques, protéines, lipides) (Breton et al., 2003).

4.5.2.2. Effets sur les mitochondries

Des études ont montré que l'uranium est capable d'impacter les mitochondries (Gough, 1931; Carafoli et al., 1971; Brady et al., 1989; Pourahmad et al., 2006; Lerebours et al., 2009; Barillet et al., 2010; Lerebours et al., 2010a; Lerebours et al., 2010b). Cependant, les mécanismes d'induction de la toxicité sont loin d'être complètement connus. Des observations histologiques de néphrites de lapins contaminés à l'U (injection, 10µg/g pf) ont permis de mettre en évidence des altérations structurales de ces organites (Gough, 1931). L'auteur a observé que les mitochondries étaient en forme de petites granules ou étaient remplacées par des corps sphériques dispersés dans le cytoplasme. Une étude a aussi montré que l'U affecte le métabolisme calcique dans les mitochondries des rats (injection, 10mg/g pf) (Carafoli et al., 1971). Les mitochondries impactées ont accumulé environ 10 fois plus de calcium que le niveau basal. Ceci semble être lié à un impact au niveau des transporteurs calciques mitochondriaux. Il faut mentionner qu'une augmentation de la concentration en calcium peut conduire à l'ouverture du pore de transition de perméabilité membranaire des mitochondries et ainsi conduire à l'apoptose (Budd et al., 2000). 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 (238 mg/L) d'uranium. Lerebours et al. (2010a) ont mis en évidence une perturbation du couplage énergétique de la chaîne respiratoire dans les muscles et le cerveau des poissons zèbres *Danio rerio* exposés à 30 µg U/L après 10 et 28 jours. De plus, les auteurs ont remarqué une modification du contenu protéique du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale à travers l'induction des deux sous-unités I et IV de la cytochrome c oxydase. Les modifications de la synthèse protéique diffèrent selon l'organe considéré, la concentration et le temps d'exposition. Après 10 jours d'exposition à 30 et 100 µgU/L, une augmentation de la synthèse de COX IV est observée dans le cerveau des poissons. Dans les muscles, une tendance à l'augmentation de la synthèse de COX I est observée chez les organismes exposés à la faible concentration et une augmentation significative apparaît chez les organismes exposés à la concentration la plus élevée après 28 jours d'exposition (Lerebours et al., 2010a). De plus, des

études effectuées sur le poisson *Danio rerio* ont montré que même de faibles concentrations (15, 30, 100 µgU/L) d'exposition peuvent altérer l'expression de gènes codant pour des complexes enzymatiques (IV et V) de la chaîne respiratoire mitochondriale (Lerebours et al., 2009; Lerebours et al., 2010b). De fortes concentrations d'exposition de l'U peuvent conduire à une diminution du potentiel membranaire des mitochondries. En effet, l'incubation à 50µM (~ 12 mg/L) d'U(VI) de cellules d'hépatocytes de rats, a conduit à une diminution du potentiel membranaire de 46%, 55% et 70% après 5, 15 et 60 min respectivement (Pourahmad et al., 2006). En résumé, ces études révèlent qu'en présence de l'U, les mitochondries de diverses espèces (rats, lapins, poissons) fonctionnent anormalement quelles que soient les doses et les voies de contamination (*in vitro/ in vivo*) administrées.

4.5.2.3. Effets sur l'ADN et l'expression génique

Comme déjà mentionné, l'ADN est particulièrement sensible à l'attaque par les ERO (cf. chapitre I, 3.5.2.3). Ainsi, la chimio- et la radiotoxicité de l'U, capables de générer un stress oxydant et d'émettre des rayonnements ionisants (cf. chapitre I, 4.5.2.1) vont augmenter les risques des attaques à l'ADN. Il existe une très grande variété des degrés d'altération de l'ADN. Il est en effet classique d'observer des lésions primaires à l'ADN (l'ADN est ainsi chimiquement modifié: ex: cassures de brins, adduits, alkylations de bases, pontages...) (cf. chapitre I, 3.5.2.3). La survie de la cellule est assurée dans la majorité des cas par l'action de mécanismes de réparation de l'ADN qui éliminent les lésions avant qu'elles ne soient engagées dans des processus vitaux comme la réplication ou la transcription (Hartwell et Weinert, 1989; Moustacchi, 1999). Ces mécanismes assurent le maintien de la molécule d'ADN et en conséquence la stabilité de l'information génétique. Lorsque la réparation est absente ou incomplète (réparation fautive), et selon la nature des lésions, les modifications de l'ADN peuvent être à l'origine d'événements génétiques anormaux tels que des mutations géniques (mutations concernant une à quelques paires de bases), chromosomiques (mutations concernant des dizaines de kilobases) (effets clastogènes) et génomiques (modifications chromosomiques) (effets aneugènes) (Orsière et al., 2005). A leur tour, ces dommages pourront avoir des conséquences graves sur la santé de l'organisme, pourront être à l'origine de cancers ou peuvent encore induire la mort cellulaire (Bootsma et Hoeijmakers, 1991) (**Figure 27**). Certains auteurs suggèrent que l'U pourrait agir directement par fixation sur les groupements phosphate de l'ADN et catalyser une réaction d'hydrolyse de la liaison sucre-phosphate dont la manifestation directe serait l'apparition de cassures mono ou bicaténares (Lin et al., 1993; Stearns et al., 2005). De plus, le rayonnement ionisant peut avoir un effet

direct sur le matériel génétique qui consiste en un arrachement d'électron avec formation d'un radical cation, conduisant notamment à la formation de cassures mono- et bicaténares mais également à la formation de bases modifiées identiques à celles induites par le stress oxydant (Cadet et al., 2002; CEA/DSV, 2002) (**Figure 28**). Des études effectuées au sein de notre laboratoire ont déjà montré une augmentation significative des dommages à l'ADN des cellules d'embryons de poissons zèbres exposées *in vitro* à 20 et 100 µg/L d'uranium, et des cellules germinales mâles et femelles après 20 jours d'exposition *in vivo* à 250 µg/L (Bourrachot, 2009). Un effet génotoxique a été également observé au niveau des érythrocytes de *D. rerio* exposés à 500 µg U/L après 20 jours d'exposition (Barillet et al., 2007) et chez les bivalves *Corbicula fluminea* après 90 jours d'exposition à 10 µg U/L (Simon et al., 2011a).

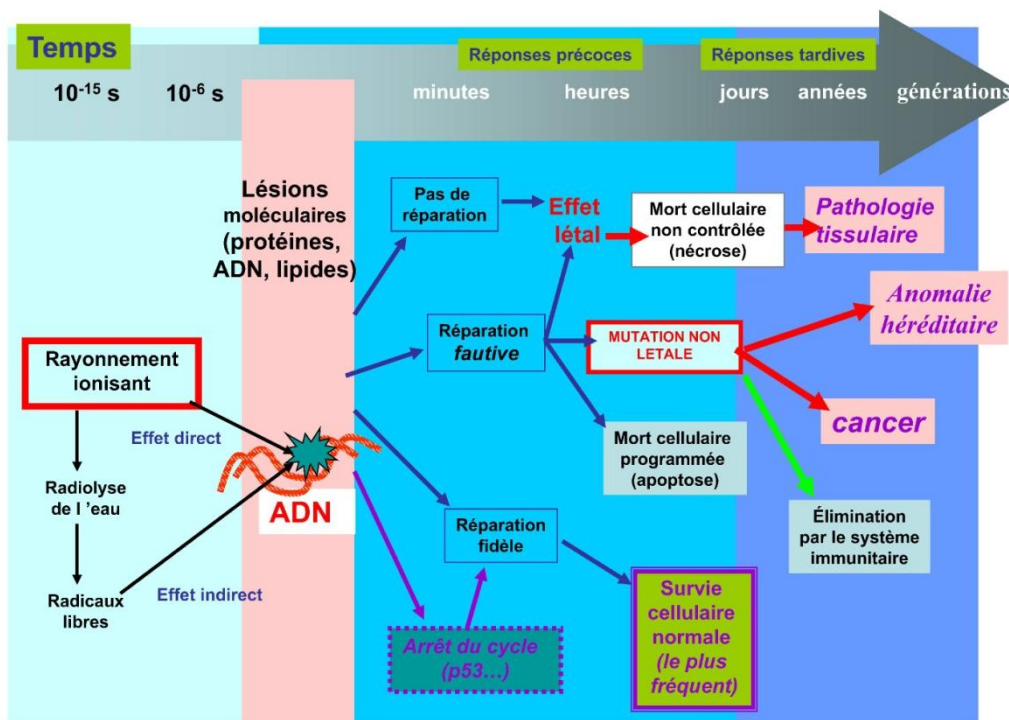


Figure 27: Effets biologiques des rayonnements ionisants. Evolutions possibles au niveau cellulaire en fonction du temps (Vuillez, 2011).

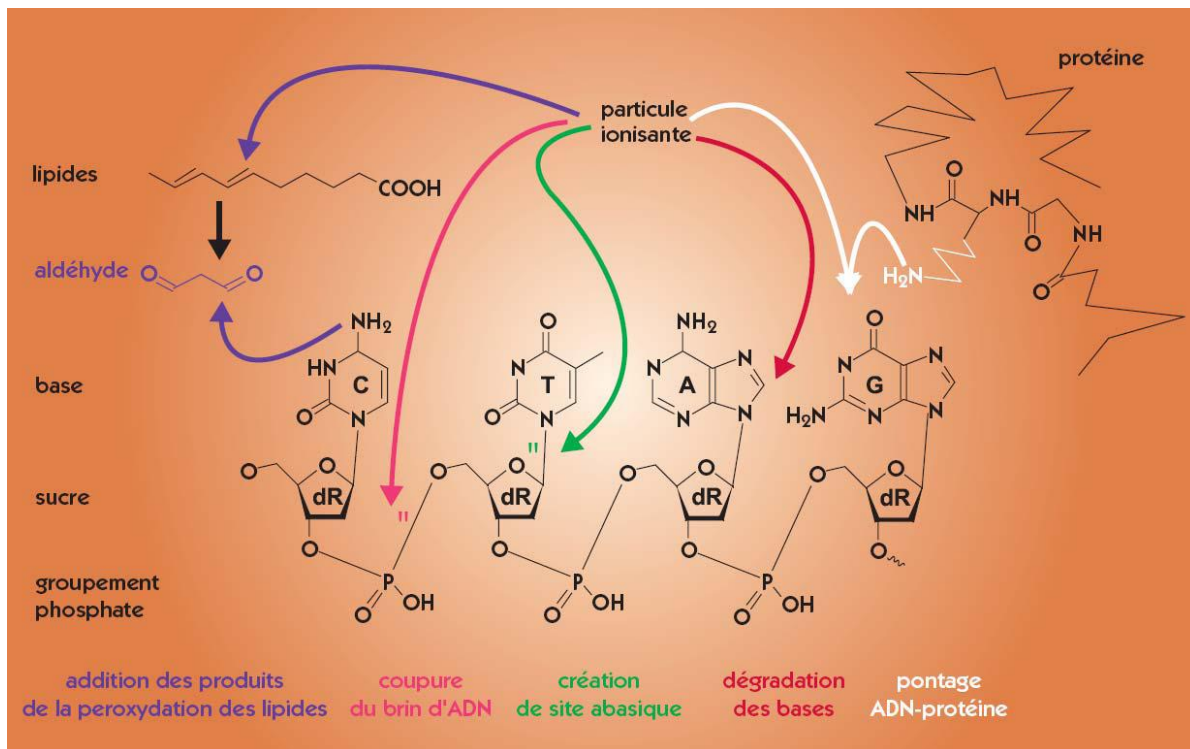


Figure 28 : Les cinq grands types de dégradation de l'ADN, présentés sur les quatre bases pouvant être touchées, les pyrimidines (cytosine C et thymine T) et les purines (adénine A et guanine G). Le pontage ADN-protéine, en particulier, est illustré par un exemple. Dans un premier temps, un électron est arraché à la base guanine, dans un second temps le groupement amine NH₂ de l'acide aminé (ici une lysine) se lie à la guanine ionisée (CEA/DSV, 2002).

L'U semble aussi altérer l'expression transcriptionnelle. L'exposition de poissons zèbres pendant 28 jours à 30 et 100 µg/L a induit une modification précoce (dès 3 jours) de l'expression génique dans le cerveau (synthèse du glutamate (*gls1*) ou le transport vésiculaire de l'acétylcholine (*vchat*)) et dans les muscles (métabolisme mitochondrial (*cox1*, *atp5f1*)). Une réponse tardive (28 jours d'exposition à 30 µgU/L) est observée dans le foie avec l'induction de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial (*cox1*, *atp5f1*), la réparation des dommages à l'ADN et la balance oxydative. Une réponse tardive est également observée dans les branchies après 21 jours d'exposition à 100 µgU/L avec l'induction de gènes impliqués dans la détoxication, la balance oxydative, le métabolisme mitochondrial et la réparation des dommages à l'ADN. Après 8 jours de dépuration, des réponses transcriptionnelles sont particulièrement importantes dans le foie des poissons avec l'induction de gènes impliqués dans l'apoptose, l'inflammation ou la détoxication (Lerebours et al., 2009). Pour évaluer l'impact de l'U sur l'expression d'un plus grand nombre de gènes, Lerebours et ses collaborateurs (Lerebours et al., 2010b) ont effectué une analyse d'une puce

à ADN où ils ont testé l'expression de 3479 séquences oligonucléotidiques représentant des gènes de fonctions connues ou prédites chez le poisson zèbre *Danio rerio* après exposition à 15 et 100 µg/L de UA pendant 3 et 10 jours. L'expression de 67 gènes était modifiée après exposition à l'U. Ces gènes ont été regroupés dans 8 catégories en fonction de leurs implications dans différents processus biologiques qui sont la transduction du signal, la régulation de l'expression des gènes, le processus de transcription, la synthèse protéique, l'organisation du cytosquelette, la croissance, les récepteurs de surface cellulaires et le métabolisme cellulaire (métabolisme général, détoxification, turnover protéique, métabolisme énergétique et lipidique, transport des ions et adhésion cellulaire). De même, Taulan et al.(2004) ont montré que le nitrate d'uranyle induit des altérations dans l'expression de plus de 200 gènes chez la souris (contamination *via* l'eau de boisson 80 et 160 mgU/L- 4 mois) dont les plus importantes sont impliquées dans la réponse au stress oxydant, le métabolisme cellulaire, la transduction de signaux, dans les protéines ribosomales et les transporteurs de solutés.

Chapitre I-C

*Choix stratégiques et démarche
expérimentale*

Cette partie vise à présenter les principaux choix ayant guidé l'élaboration du programme de recherche mis en place dans cette thèse.

1. Choix du modèle biologique

Procambarus clarkii est l'écrevisse la plus cosmopolite du monde. Elle est capable de tolérer des environnements extrêmes et pollués. Elle a été utilisée comme indicateur de pollution métallique dans de nombreuses études environnementales (Gherardi, 2006; cf. chapitre I-A). Ainsi, l'acquisition de biomarqueurs de toxicité du Cd et de l'U sur *P. clarkii* a de fortes chances d'être utilisable sur le terrain dans des études de biomonitoring/surveillance ou d'évaluation des risques écologiques.

Ces organismes peuvent accumuler les métaux et possèdent plusieurs caractéristiques appréciées en écotoxicologie (Finerty et al., 1990; Sánchez López et al., 2004; Higuera et al., 2006; Hothem et al., 2007; Richert et Sneddon, 2008; Faria et al., 2010; Moss et al., 2010; Suárez-Serrano et al., 2010). En effet, cette espèce est considérée comme une espèce sentinelle car elle a une mobilité réduite dans l'environnement et peut donc refléter une pollution locale. Les individus sont facilement capturés en milieu naturel. Au stade adulte, ils fournissent assez de matériel biologique pour effectuer plusieurs analyses biochimiques sur un même spécimen. L'étude multi-critères d'effet gagne ainsi en cohérence en limitant la variabilité inter-individuelle. De plus, cette espèce se conserve facilement en laboratoire et sa maintenance est peu coûteuse. Sa position dans la chaîne trophique fait en sorte que cet organisme peut être un vecteur potentiel de contamination pour les niveaux trophiques supérieurs (Gherardi, 2006).

En se basant sur les travaux de Dörr et al. (2008) et de Elia et al. (2007), il semblerait que les réponses enzymatiques de la plupart des antioxydants chez *P. clarkii* diffèrent entre les mâles et les femelles après une exposition au sélénium. Afin d'éviter tout facteur de confusion relatif à ces questions, il a été décidé de n'utiliser que des individus mâles dans la suite de notre travail.

2. Objectifs détaillés et justification de la démarche expérimentale

Le but *in fine* de notre programme de recherche est d'évaluer la toxicité de l'U par rapport à celle d'un contaminant bien documenté dans la bibliographie, le cadmium. La première partie de ce travail a consisté à comparer les mécanismes impliqués dans le stress oxydant, les atteintes mitochondriales et histologiques après une contamination aiguë (fortes doses, temps courts) et chronique (faible dose, temps longs) au Cd. Ensuite, nous avons

essayé d'identifier des biomarqueurs sensibles au Cd quelque soient la durée d'exposition et la concentration utilisée (Chapitre III). L'originalité de cette première approche consiste surtout à l'utilisation des réponses d'expression génique représentatives de différents mécanismes (fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, stress oxydant et détoxification) comme outils pour mettre en évidence les impacts de ce métal sur l'écrevisse *P. clarkii*.

Dans un deuxième temps, des expériences de contamination à l'uranium ont été menées. En effet, les études d'impact de U sur les crustacés font cruellement défaut dans la littérature. Il a donc été nécessaire de tester différentes concentrations (de 30 à 8000 µg/L de UA) pendant de courtes durées d'exposition (4 et 10 jours). L'objectif principal de cette étude était d'évaluer les atteintes de l'U à différentes échelles de l'organisation biologique (gènes, histologie et survie) et d'essayer de déterminer des biomarqueurs précoces. Nous avons également tenté de lier les réponses biologiques entre elles et à la bioaccumulation de l'U dans les organes correspondants (Chapitre IV-A).

Dans un troisième temps, nous avons soumis les écrevisses à une exposition chronique d'uranium appauvri (30 et 60 jours) à 30 µg/L de UA, ce niveau de contamination étant représentatif de concentrations rencontrées en milieu naturel. L'objectif était de vérifier l'évolution des réponses géniques, enzymatiques et histologiques au cours du temps (Chapitre IV-B) ainsi qu'une éventuelle histopathologie.

Dans une quatrième partie, nous avons essayé de discriminer les effets entre la radio- et la chimiotoxicité de l'U. Pour cela, nous avons exposé des écrevisses à une faible concentration soit 30 µg/L de UA ou de ²³³U (activité spécifique plus élevée) pendant 4 et 10 jours. Le choix de cette concentration et de cette durée d'exposition a été pris en relation avec l'expérience précédente. Elle permet de vérifier la répétabilité des réponses géniques étudiées après exposition à l'uranium appauvri. Durant cette étude, nous n'avons pas effectué d'analyses histologiques car les résultats de l'expérimentation précédente indiquaient que les atteintes structurales n'étaient pas significatives après exposition à 30 µg/L de UA. Cependant, les réponses d'un autre niveau de l'organisation biologique ont été testées durant cette expérience *via* le suivi d'activités enzymatiques impliquées dans la défense contre le stress oxydant (Chapitre IV-C).

La dernière partie de ce travail concerne la comparaison des impacts de l'U et du Cd sur les paramètres biologiques étudiés précédemment après exposition aiguë (40 µM : 8 mg U/L et 5 mg Cd/L; 4 et 10 jrs) et chronique (0.1 µM : 30 µg U/L et 10 µg Cd/L ; 30 et 60 jrs (Chapitre V). Il faut mentionner que les expositions au Cd et à l'U ont été réalisées au même

moment sur des lots d'écrevisses provenant d'un même lieu afin de limiter les variations des réponses liées à l'état physiologique des organismes. Un bilan de la démarche expérimentale retenue est présenté dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Bilan de la démarche expérimentale retenue. Note : les organes de *P. clarkii* en italique n'ont fait l'objet que d'étude de bioaccumulation. (UA) uranium appauvri. (Cd) cadmium.

Etudes	Métaux	Concentration(s)	temps (jrs)	Effets étudiés				Tissus cibles/ bioaccumulation	Stade de mue
				Mortalité	Histologie	stress oxydant	Mitochondries		
Chapitre III	Cd	Fortes: 50, 500 et 5000 µg/L	4 - 10	☑	☑	Expression génique	Expression génique	Branchies + hépatopancréas	Intermue
		Faible: 10 µg/L	30 - 60	☑	☑	Expression génique + activité enzymatique	Expression génique	Branchies + hépatopancréas	Intermue
Chapitre IV-A	UA	Fortes: 600, 4000 et 8000 µg/L Faible: 30 µg/L	4 - 10	☑	☑	Expression génique	Expression génique	Branchies + hépatopancréas	Intermue
Chapitre IV-B	UA	Faible: 30 µg/L	30 - 60	☑		Expression génique + activité enzymatique	Expression génique	Branchies + hépatopancréas	Prémue
Chapitre IV-C	UA vs 233U	Faible: 30 µg/L	4 - 10	☑		Expression génique + activité enzymatique	Expression génique	Branchies + Hépatopancréas + <i>Glande verte + Estomac + Intestin + Muscles + Carapace</i>	Intermue
Chapitre V	UA vs Cd	Fortes: 40 µM	4 - 10	☑	☑	Expression génique	Expression génique	Branchies + hépatopancréas	Intermue
		Faibles: 0.1 µM	30 - 60	☑	☑	Expression génique + activité enzymatique	Expression génique	Branchies + hépatopancréas	Intermue

3. Choix des concentrations

Dans l'expérience d'exposition aiguë des écrevisses au Cd, nous avons choisi d'utiliser une large gamme de concentrations (50, 500 et 5000 µg/L) pendant 4 et 10 jours. Rappelons que dans les pays en voie de développement, il est possible de trouver des zones fortement contaminées au Cd avec des concentrations pouvant atteindre 1000 µg/L (Belabed et al., 1994). La plus forte concentration testée en Cd (5 mg/L) équivaut à la concentration la plus élevée en U (8 mg/L) en termes de concentration molaire (40 µM). Cette concentration permet la comparaison des effets de l'U et du Cd à fortes doses. Il faut mentionner que la dose de Cd qui cause 50% de mortalité des écrevisses *P. clarkii* pendant 96h (LC₅₀-96h) reportée dans la littérature varie entre les études. En effet, Del Ramo et al. (1987) ont reporté une valeur équivalente à 58.5 mg/L pour les adultes (intervalles de confiance à 95%: 41.8- 81.9

mg/L), alors qu'une étude plus récente a montré que la LC₅₀-96h de cette espèce (au stade adulte) est égale à 2.66 mg/L (intervalles de confiance à 95%: 1.57- 4.44 mg/L) (Wigginton et Birge, 2007). Ces contradictions semblent être liées aux conditions physico-chimiques de l'eau utilisée durant les expériences, modifiant la biodisponibilité du Cd. Ainsi, nous avons décidé d'effectuer une exposition aiguë en utilisant notre eau synthétique dans le but de déterminer une LC₅₀-96h et une LC₁₀ qui auraient pu être utilisées dans la suite des expériences.

La concentration de 10 µg Cd/L a été choisie pour correspondre à la même concentration molaire (0.1 µM) de celle de l'U dans la condition d'exposition la plus faible (30 µg U/L) pour faciliter la comparaison des effets. De plus, cette concentration en Cd peut être retrouvée dans les milieux aquatiques pollués européens (Koliadima et Karaiskakis, 1990; Martín-Díaz et al., 2006; Morin et al., 2007).

Dans la première expérience d'exposition de *P. clarkii* à l'U, nous avons testé une large gamme de concentrations allant de 30 à 8000 µg U/L représentatives de situations environnementales. La concentration la plus faible est proche de la valeur conseillée par l'organisation mondiale pour la santé qui est égale à 15 µg/L (WHO, 2001) et se retrouve dans des milieux à proximité d'anciens sites miniers en France. La concentration de 600 µg/L est représentative des niveaux retrouvés dans l'eau de consommation humaine issue de puits de forage proche de zones industrielles fortement impactées (ex : Canada et la Norvège) (Limson Zamora et al., 1998; Frengstad et al., 2000). Les deux plus fortes concentrations (4 et 8 mg/L) simulent des conditions fortement impactées par les activités anthropiques et peuvent refléter des rejets accidentels ou des zones qui sont en aval immédiat de sites miniers (Ragnarsdottir et Charlet, 2000).

Dans les autres expériences, nous nous sommes focalisés sur la plus faible concentration d'U (30 µg/L) car 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'U) lors d'expositions chroniques à faibles doses.

4. Choix de l'exposition par voie directe et de la composition ionique de l'eau

Les différentes formes chimiques de l'U déterminent sa biodisponibilité et, par conséquent, son accumulation et les effets potentiels toxiques. Nous avons décidé de favoriser la biodisponibilité de ces deux métaux. Les connaissances actuelles respectant le modèle de l'ion libre considèrent que l'ion uranyle et les hydroxyles d'uranium sont les espèces les plus biodisponibles. Ainsi, nous avons utilisé une eau synthétique (**Tableau 4**) présentant des spécificités jugées intéressantes vis-à-vis de la spéciation de l'U comme un pH compris entre 6.5 et 7, une absence de phosphates (complexant majeur de l'U) et une faible concentration en nitrates. La composition ionique de cette eau représente un bon compromis entre le maintien de conditions physiologiques pour l'animal et l'optimisation de la biodisponibilité de l'U. Peu d'informations existent dans la littérature concernant les paramètres physico-chimiques optimaux pour le maintien de *P. clarkii*. D'après Roqueplo (1992), les écrevisses ont besoin d'une concentration de calcium dissous entre 5-120 mg/L (la concentration de Ca^{2+} dans notre eau est égale à 65.72 mg/L). Dans le **tableau 4** figure la composition ionique des eaux dans lesquelles les écrevisses ont été conservées (eau du lac d'Esparron et eau du réseau). Ce tableau renseigne sur la gamme de concentrations en ions majeurs tolérée par les écrevisses. Il présente également la composition des eaux synthétiques utilisées au sein de notre laboratoire pour assurer la disponibilité de l'U lors des expériences de contamination sur différents organismes (poissons, daphnies). Nous remarquons que les eaux utilisées pour les poissons sont très peu minéralisées et potentiellement incapables de fournir les ions nécessaires aux crustacés. Nous avons donc décidé de modifier la composition ionique de l'eau utilisée par Zeman et al. (2008) pour les micro-crustacés *Daphnia magna* en changeant les concentrations en Ca^{2+} , NO_3^- et HCO_3^- afin de diminuer le pH et favoriser une meilleure disponibilité de l'U. Enfin, nous avons choisi d'exposer les écrevisses par voie directe. En effet, les taux de transfert trophique de l'U sont généralement faibles (Simon et Garnier-Laplace, 2005).

5. Choix des paramètres biologiques

Comme nous l'avons déjà mentionné, il existe très peu d'informations dans la littérature concernant les réponses biologiques au niveau sub-cellulaire suite à une contamination par ce radioélément chez les crustacés. En revanche, la toxicité du Cd est bien documentée. De nombreuses études ont proposé l'utilisation des MT et des réponses des antioxydants comme biomarqueurs de contamination au Cd. Nous avons donc décidé de vérifier si ces biomarqueurs identifiés pour le Cd peuvent témoigner d'une toxicité de l'U chez l'écrevisse. De plus, les travaux de Barillet et al. (2007, 2011) et de Lerebours et al.

(2009, 2010b), sur *Danio rerio* ont déjà montré que l'U peut générer un stress oxydant chez les poissons. Vu que ces deux métaux semblent avoir un effet commun, cette piste a donc suscité notre intérêt. De plus, la comparaison des réponses face au stress oxydant permettra de mettre en évidence des différences potentielles dans les mécanismes d'action de ces deux métaux.

De même, nous nous avons étudié les impacts de l'U et du Cd sur les mitochondries. Ces organites ont un rôle primordial, puisque l'énergie fournie par les molécules organiques est récupérée sous forme d'ATP (énergie utilisable par les cellules) dans la mitochondrie, la source principale d'énergie pour la cellule eucaryote, par le processus de phosphorylation oxydative. Ils interviennent aussi dans des processus critiques pour les cellules comme la génération du stress oxydant ou la mort cellulaire programmée. D'après Chavez-Crooker et al. (2002), les mitochondries peuvent séquestrer les métaux. Ces organites peuvent être donc des cibles potentielles de l'U et du Cd dans le cas d'une contamination des écrevisses. Tout dysfonctionnement mitochondrial peut entraîner des changements au niveau du fonctionnement cellulaire, peut avoir des conséquences graves sur la santé des organismes et dans les cas extrêmes peut conduire à leur mort (Duchen, 2004a; Duchon, 2004b). Rappelons que Lerebours et al. (2009, 2010a, 2010b) ont montré que l'U peut impacter les mitochondries des poissons zèbres. De même, Gonzalez et al. (2006) ont mis en évidence des altérations de l'expression de gènes mitochondriaux chez *Danio rerio* exposés au Cd. Ces différentes études ainsi que le rôle important qu'occupent les mitochondries au sein des cellules ont conforté notre choix de suivre les impacts des métaux sur ce paramètre biologique.

L'histopathologie permet de rendre compte de réponses à un niveau d'organisation biologique supérieur. Ces réponses sont en effet consécutives de celles observées au niveau d'organisation inférieurs (interactions chimiques et cellulaires) et sont généralement indicatrices de pathologies et de dommages irréversibles (nécrose, apoptose). L'un de nos objectifs étant d'établir un lien entre les atteintes à différentes échelles de l'organisation biologique de l'écrevisse, ce niveau d'intégration nous semblait pertinent. Les réponses histopathologiques peuvent être aussi corrélées à des changements au niveau de l'individu tels des changements physiologiques, des dysfonctionnements des organes et la mortalité (paramètre biologique choisi pour évaluer l'impact des métaux).

Les tissus choisis pour les analyses d'histopathologie ont été les tissus branchiaux (**Figure 29**) et hépatiques (**Figure 30**). Cependant, la complexité de la morphologie des branchies (**Figure 29**) n'a pas permis de bien distinguer les effets des métaux sur les structures, nous n'avons donc pas donné suite à cette étude.

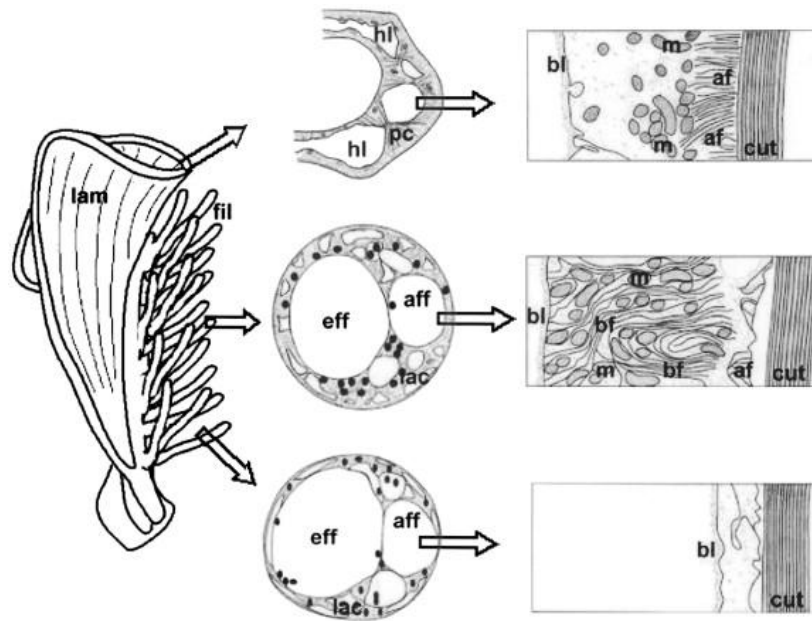


Figure 29: Représentation schématique d'un feuillet branchial d'une écrevisse. (lam) lamelle branchiale ; (fil) filaments ; (hl) hémolymphe ; (pc) cellules en pilastre ; (cut) cuticule ; (bl) niveau basal ; (af) plis apicaux ; (m) mitochondries ; (aff) vaisseau afférant ; (eff) vaisseau efférent ; (lac) lacune (espace) ; (bf) invagination basale. Note les cellules épithéliales sont très minces (Freire et al., 2008).

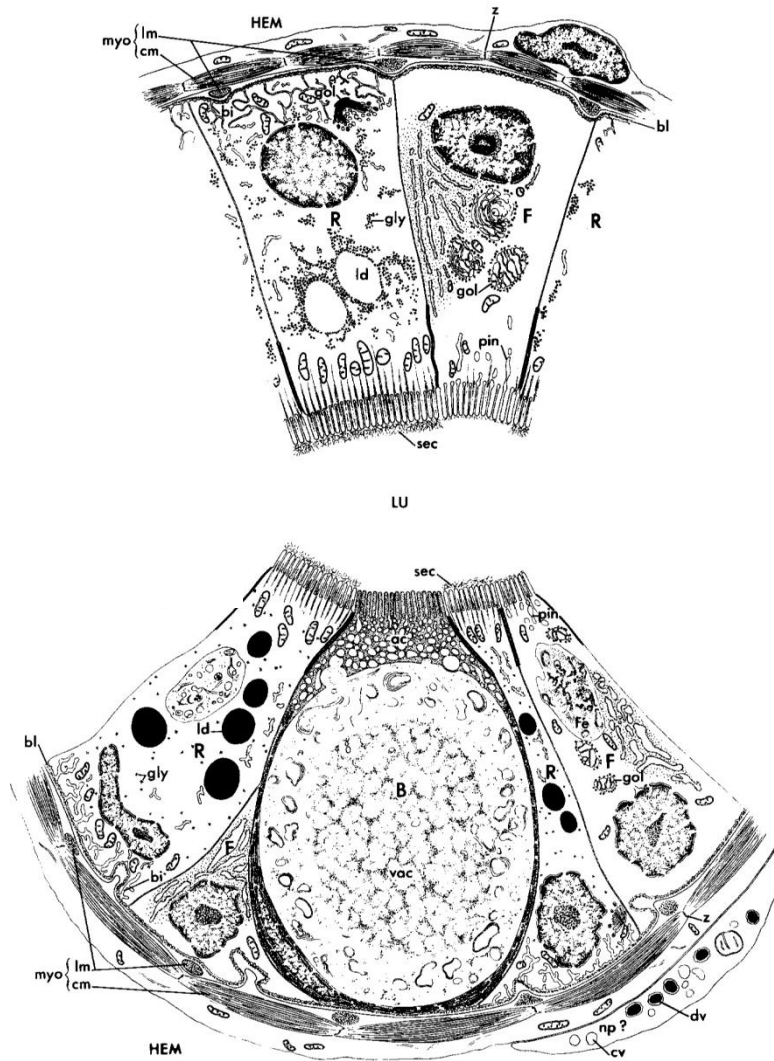


Figure 30: Représentation schématique des différents types de cellules de l'hépatopancréas des écrevisses. (R) cellule de type R : absorbe les nutriments, stocke et métabolise le glycogène et les lipides. (F) cellule de type F : synthétise des enzymes digestives et les stockent dans des vacuoles. (B) cellule de type B : c'est la transformation des cellules de type F présentant une énorme vacuole qui résulte de l'engorgement des enzymes digestives. Ce stade est suivi de l'excrétion des enzymes. (ac) complexe apical ; (bi) invagination basale ; (bl) lamina basal ; (cm) fibre musculaire circulaire ; (cv) vésicule ; (dv) corps vésiculaire dense ; (Fe) granules de fer dans des vacuoles ; (gly) glycogène ; (gol) corps de golgi ; (hem) hémolymphe ; (ld) gouttelettes lipidiques ; (lm) fibre musculaire longitudinale ; (lu) lumen du tubule ; (myo) réseau myoépithélial ; (hp ?) processus de neurosecrétion possible ; (pin) vésicules de la pinocytose (absorption de gouttelettes de liquide) ; (sec) surface d'entrée présentant des invaginations ; (vac) vacuole (Loizzi, 1971).

6. Choix des marqueurs de contamination

Au cours de ces travaux de thèse, comme les concentrations utilisées en U étaient très inférieures aux doses létales, l'utilisation des 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. Les marqueurs de transcription ont été choisis dans notre étude non seulement en raison de leur temps de réponse rapide et de leur sensibilité (He et al., 2011) mais aussi parce qu'ils permettent de caractériser et de mieux comprendre les modes d'actions toxiques et les cibles cellulaires d'un contaminant. En effet, 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'U ou du Cd.

Cependant le génome de *P. clarkii* est loin d'être complètement séquencé. Durant ce programme de recherche, nous avons réussi à séquencer le gène *atp6* codant pour la sous unité 6 de l'ATP synthase et le gène *mt* codant pour la métallothionéine (**Figure 31**). Les séquences nucléotidiques obtenues et les séquences des acides aminés déduits ont été comparées aux séquences présentes dans la base de données de NCBI (**Tableau 9**) pour vérifier la spécificité des séquences. Nous avons pu ainsi valider que les séquences obtenues après le séquençage n'appartiennent qu'aux gènes visés. Nos tentatives pour séquencer les gènes codant pour les enzymes d'intérêt impliqués dans les réponses face au stress oxydant (SOD cytosolique, CAT, GPX et GST) se sont avérées infructueuses. Les séquences nucléotidiques obtenues après le clonage et le séquençage n'étaient pas suffisamment spécifiques aux gènes visés (similarités avec d'autres gènes de la base de données). Ceci était dû au fait que leurs séquences nucléotidiques étaient la plupart du temps partiellement séquencées chez d'autres espèces et très rarement chez les crustacés. En conséquence, l'alignement de séquences provenant d'espèces différentes et codant pour une même enzyme d'intérêt n'a pas permis de déterminer une région bien conservée et spécifique du gène visé quelque soit l'espèce considérée. Ainsi, vu le manque d'informations actuelles dans la base de données (NCBI), nous n'avons pas pu donner suite à cette étude.

```

>mt
DNA: GAGTGTGCCGAGGCGGGTGCAGACTGGCTGTGTGTGCACCTCATGCCGCTGTGCACCCCTGCCACAAGTGTACGTCCGGGTGCAAG
+1: E C A E G G C K T G C V C T S C R C A P C D K C T S G C K

DNA: TGTCCATCCAAGGAGGAGTGTGCCAAGACCTGCTCCAAGCCCTGC 132 pb
+1: C P S K E E C A K T C S K P C 44

>atp6
DNA: CGATTGGCAGCAAATATAATTCCTGGTCATTTATTATTAAGGCTTTTAGGGGAATGGGTCTTCTATACCTTTAAGAATTCCTTGG
+1: R L A A N I I A G H L L L R L L G G M G S S I P L R I L W

DNA: GTTCTTATTATTTGCCAAATTCCTTTATTAAATATTAGAAATCTGCCGTTGCAATCAT 143 pb
+1: V L I I L Q I L L L I L E S A V A I 47

```

Figure 31: Séquences partielles de nucléotides et les séquences d'acides aminés déduits (5'3' cadre de lecture +1) du gène de la métallothionéine (*mt*) et de l'adénosine triphosphate synthase-sous unité six (*atp 6*) de l'écrevisse *Procambarus clarkii*. Les nombres à droites représentent le nombre de nucléotides (pb) et d'acides aminés. Le codon initial (ATG) est marqué en gras.

Tableau 9: Comparaison de la similarité des séquences nucléotidiques (NCBI-BLASTn) et des acides aminés (NCBI-BLASTp) des gènes *mt* et *atp6* de *P. clarkii* à celles présentes dans la banque de données de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Gènes de <i>P.clarkii</i>	séquence concernée	% de similarité des séquences concernées chez <i>P. clarkii</i> avec celles des espèces présentes dans la banque de donnée de NCBI
<i>mt</i>	séquence nucléotidiques	88% avec <i>Homarus americanus</i>
		88% avec <i>Pasifastacus leniusculus</i>
	séquence des acides aminés	95% avec <i>Astacus astacus</i>
		95% avec <i>Pacifastacus leniusculus</i>
		93% avec <i>Homarus americanus</i>
<i>atp6</i>	séquence nucléotidiques	70% avec <i>Schistocerca gregaria</i>
	séquence des acides aminés	70% avec <i>Cherax dispar</i>
		68% avec <i>Cherax destructor</i>

Afin de mieux caractériser le stress oxydant, nous avons étudié les activités enzymatiques de divers antioxydants (CAT, SOD, GPX, GST). Bien que les réponses de l'analyse fonctionnelle des protéines d'un mécanisme d'intérêt soient considérées moins sensibles que les réponses géniques (He et al., 2011), une fois détectées elles permettent 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. L'histopathologie pourra aider à mieux comprendre les effets au niveau moléculaire puisque les dysfonctionnements

cellulaires peuvent conduire à des atteintes aux niveaux supérieurs de l'organisation biologique (ex : tissus/organes, physiologie, comportement).

Les concentrations tissulaires en U ou Cd permettent d'évaluer les capacités d'accumulation et d'établir des relations entre les niveaux d'accumulation et les effets biologiques observés. Les mesures réalisées après différentes durées d'exposition (aigüe *versus* chronique) et après différents niveaux d'exposition contribuent à l'évaluation de la distribution de l'uranium dans les tissus.

7. Choix des organes

Deux organes majeurs ont été utilisés dans ce travail de thèse, les branchies et l'hépatopancréas.

Les branchies sont les principaux sites d'échanges gazeux et d'osmorégulation chez les organismes aquatiques. De plus, ces organes sont en contact direct avec l'eau, donc dans le cas d'une exposition *via* le milieu environnant (par voie directe) ce sont les premiers tissus à être contaminés. D'après Borovic et al. (2008), les branchies des écrevisses possèdent un seuil bas de réponse face au stress oxydant. Le système de défense va être stimulé pour former la première ligne de lutte de l'organisme contre les effets dommageables comme le stress oxydant.

L'hépatopancréas des crustacés est un organe à plusieurs fonctions. Il joue un rôle dans la digestion et l'absorption de diverses molécules organiques. De plus, c'est un site de stockage des métaux et de détoxification (Sterling et al., 2007). En effet, cet organe est un site important d'accumulation du Cd chez les crustacés (Wang et al., 2001). Martin-Diaz (2006) a montré que *P. clarkii* peut accumuler significativement le Cd dans cet organe après exposition par voie directe. Simon et Garnier-Laplace (2005) et Chassard-Bouchaud (1982) ont démontré que les écrevisses peuvent aussi accumuler l'U dans ce tissu. Vu les rôles importants que détient cet organe, l'hépatopancréas est le siège où se déroule de multiples réactions oxydatives et en conséquence un site où la génération des radicaux libres pourra être considérable dans le cas d'une contamination métallique (Borkovic et al., 2008).

Ainsi, en raison des fonctions physiologiques assurées par les branchies et l'hépatopancréas, leurs capacités d'accumulation des métaux et leurs potentielles sensibilités de réponses face au stress oxydant, nous avons choisi d'effectuer les analyses biochimiques sur ces deux organes. De plus, ces derniers fournissent assez de matériel biologique pour effectuer diverses analyses biologiques ou toxicologiques (**Figure 32**). En parallèle, nous

avons mené l'étude de la bioaccumulation de ce métal dans d'autres organes (estomac, intestin, glande verte, muscles et carapace) après exposition par la voie directe à une faible concentration (30 $\mu\text{g/L}$ de DU ou ^{233}U) pendant une courte durée (4 et 10 jours) pour contribuer à identifier l'organotropisme de l'U.

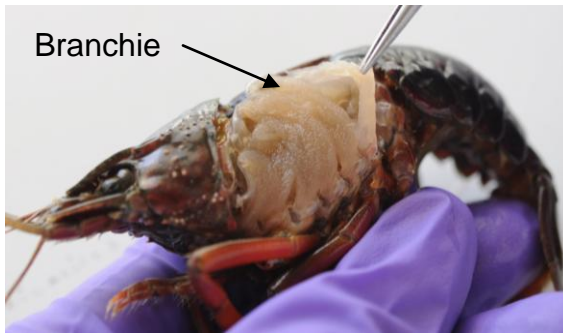


Figure 32: Photos illustrant la taille des branchies et de l'hépatopancréas par rapport au corps entier de l'écrevisse *P. clarkii*(source: J.M.B/IRSN/LRE).

Chapitre II

Matériels et méthodes

1. Conditions expérimentales

1.1. Dispositifs expérimentaux

Les organismes utilisés durant ces travaux ont été collectés dans le marais de Vigueirat en Camargue, au sud de la France (coordonnées GPS : 43°31.863'N- 4°45.417'E) (**Figure 33**). Ces organismes supportent aisément une courte période de transport à sec. Une fois dans le laboratoire, ils ont été acclimatés environ 3 semaines aux conditions de l'expérimentation : photopériode jour/nuit de 12/12h; eau synthétique à pH 6.5 à $17 \pm 1^\circ\text{C}$. Afin d'assurer l'homogénéité de la qualité de l'eau synthétique, celle-ci était fabriquée à partir de solutions mères de sels fortement concentrées (1000x) (**Tableau 10**). Le suivi des concentrations des anions majeurs dans cette eau a été réalisé par chromatographie anionique en phase liquide (cf. chapitre III 3.2). Lors des expériences de 10 jours, le renouvellement de l'eau synthétique (50 % par jour) se faisait manuellement et ponctuellement (une fois par jour) alors que pour les expériences chroniques (60 jours), des systèmes d'exposition spécifiques ont été mis en place (**Figure 34**). Dans ce cas de figure, le renouvellement de l'eau se faisait en continu (système ouvert) impliquant l'utilisation de nourrices de 300L pour servir de sources à ce système régulé par des pompes péristaltiques. Dans ce genre de dispositif, le taux de renouvellement quotidien était de 25 % ; compromis entre le respect du maintien de la spéciation et la réduction des volumes d'effluents. Mise à part cette différence, toutes les expériences se sont déroulées dans des unités expérimentales contenant environ 3 écrevisses/L et chaque individu était isolé par un grillage (cylindre, 1 cm de maille et 11 cm de diamètre) pour éviter le cannibalisme. L'oxygénation de l'eau était assurée par un bullage d'air permanent. Une pompe à eau placée à l'intérieur des unités expérimentales a permis d'assurer une circulation de l'eau et par conséquent l'homogénéisation de la contamination. Un système de régulation automatique du pH (pH-stat) relié à un pH-mètre a permis la rectification directe du pH par ajouts d'HCl (1 M) quand la valeur mesurée dépassait la valeur de consigne (pH 6.5). Le maintien de la température de l'eau des unités expérimentales a été assuré par l'utilisation de cryostat (refroidissement de la colonne d'eau par rapport à l'air ambiant) dans des bains-marie thermostatés. Un système de circulation de l'eau à l'intérieur de ces bains assurait l'homogénéisation de l'eau et donc de la température.



Figure 33 : Carte du lieu de prélèvement des écrevisses (source: <http://www.marais-vigueirat.reserves-naturelles.org/pages/page1.htm>).

Tableau 10 : Concentration des solutions mères de sels nécessaires pour la préparation de l'eau synthétique.

Sels	mg/L
CaCl ₂ , 2H ₂ O	233,60
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	9,03
MgSO ₄ , 7H ₂ O	123,15
NaCl	49,09
NaHCO ₃	1,26
KCl	5,96
CaSO ₄ , 2H ₂ O	1,55

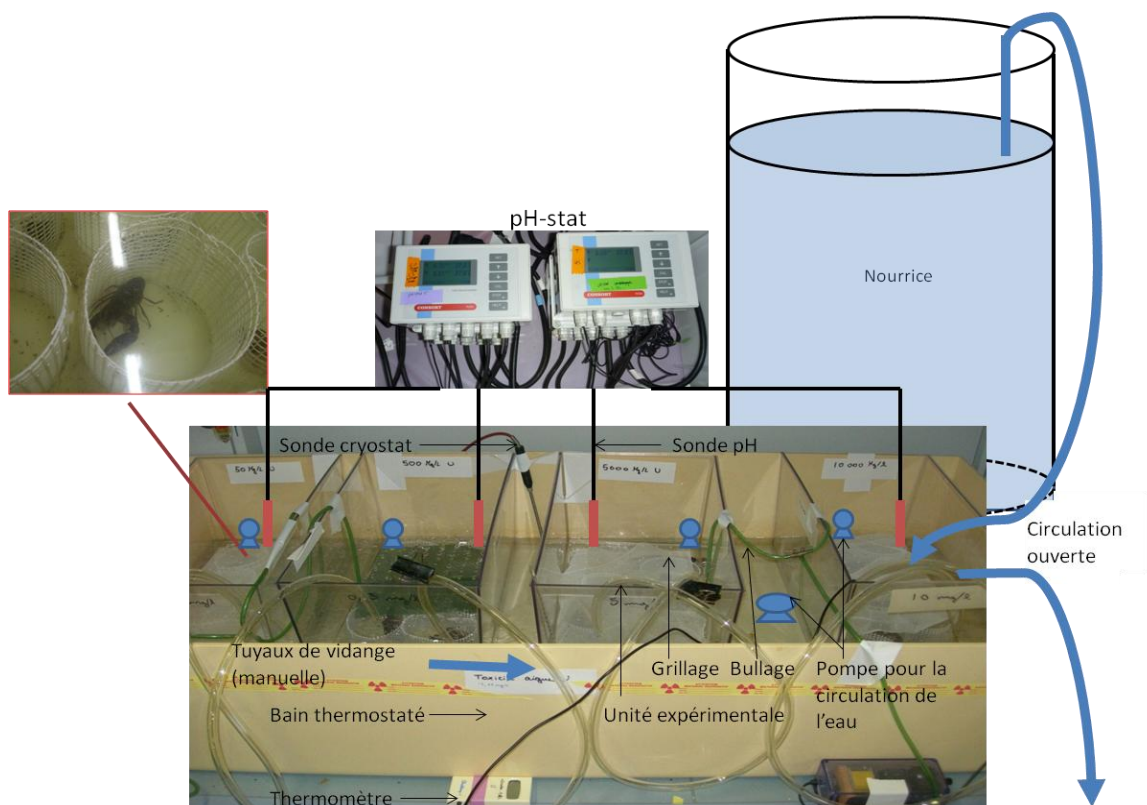


Figure 34 : Dispositif expérimental (source: S.AL.K/IRSN/LRE).

1.2. Modélisation de la spéciation de l'U

La modélisation de la spéciation de l'U dans nos conditions d'exposition a été effectuée avec le logiciel J-CHESS (base de données thermodynamiques, IRSN LRE V.6) pour les différentes conditions d'exposition (cf. chapitre II). Dans l'eau synthétique équilibrée avec la pression atmosphérique de CO_2 (pCO_2 atm), la modélisation de la spéciation de $30\mu\text{g U/L}$ a montré qu'à pH 6.5 les espèces dominantes dans l'eau étaient: 42% de $(\text{UO}_2)_2\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$, 25.7% de UO_2CO_3^0 , 8.8% de $\text{UO}_2(\text{OH})_2^0$ (**Figure 25 et Tableau 11**).

Dans le cas où l'eau utilisée était à pH 7, les espèces majoritaires étaient: 52.1% de $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^0$, 20.5% de $\text{CaUO}_2(\text{CO}_3)_3^{2-}$, 9.4% de $(\text{UO}_2)_2\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$ et 8% de $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ (**Tableau 11**). Notons que les formes carbonatées étaient les plus prédominantes.

De même, les espèces majoritaires à pH 7 pour une concentration d'U de 600 µg/L, 4000µg/L et 8000µg/L étaient le $(\text{UO}_2)_2\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$ (41.9%, 73% et 79.6% respectivement), le $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^0$ (35.7%, 15.6% et 7.1% respectivement) et le $\text{CaUO}_2(\text{CO}_3)_3^{2-}$ (13.9%, 6%, et 2.8% respectivement). Il faut mentionner que l'augmentation de la concentration en U dans la colonne d'eau augmente le risque de formation de précipités. En théorie à pH 7 un précipité apparaît uniquement à la plus forte concentration testée et ceci en proportion négligeable (7%) (**Figure 35**).

Tableau 11 : Pourcentage d'espèces d'U majoritairement présentes dans une eau douce synthétique adaptée aux besoins des écrevisses à pH 6.5 et 7 (simulation de 30 µg U/L avec le programme de spéciation géochimique J-CHESS).

pH	6.5	7
UO_2^{2+}	0.7%	0.024%
$(\text{UO}_2)_2\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$	42%	9.4%
$\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^0$	7.6%	52.1%
$\text{CaUO}_2(\text{CO}_3)_3^{2-}$	3%	20.5%
$\text{MgUO}_2(\text{CO}_3)_3^{2-}$	0.1%	0.5%
$\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$	6.8%	8.0%
$\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$	0.04%	0.3%
$\text{UO}_2(\text{OH})_2^0$	8.8%	3.1%
$\text{UO}_2(\text{OH})_3^-$	0.4%	0.5%
UO_2CO_3^0	25.7%	5.1%
UO_2OH^+	4.6%	0.5%
UO_2SO_4^0	0.2%	0.01%

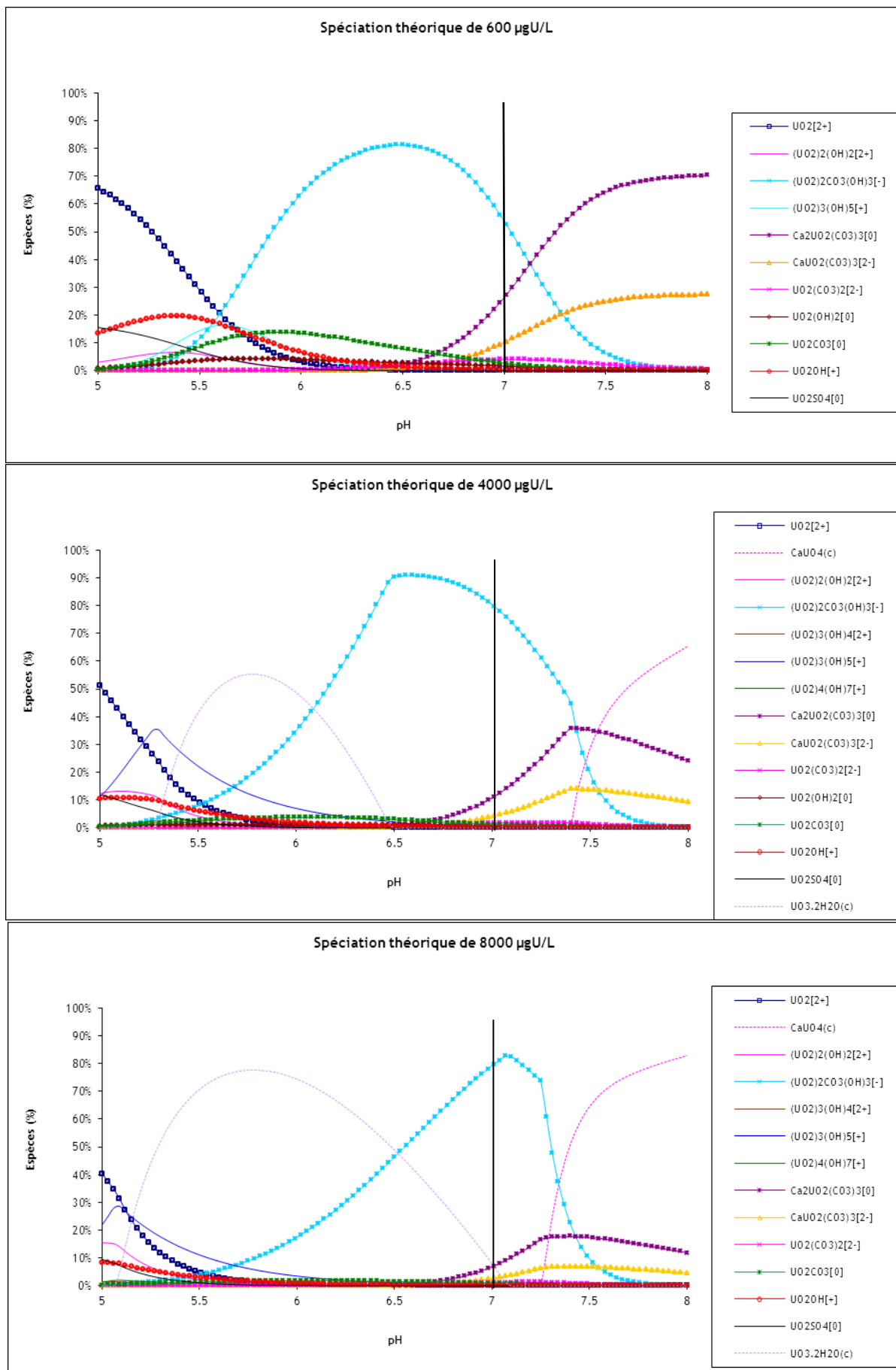


Figure 35: Spéciation chimique de 600, 4000 et 8000 µg/L d'uranium dans une eau douce synthétique adaptée aux besoins des écrevisses (simulation avec le programme de spéciation géochimique J-CHESS). (c) forme cristallisée.

1.3. Gestion de l'exposition aux radionucléides en laboratoire

L'utilisation de radionucléides en laboratoire nécessite de respecter des règles de radioprotection des travailleurs. Ainsi pour chaque type d'émetteur, une quantité maximale utilisable sur paillasse est définie en fonction de groupes de risque auquel il appartient et de la zone de manipulation (zone surveillée *versus* zone contrôlée) (cf. Annexe). C'est une des raisons qui a limité l'utilisation de l'uranium 233 dans de grands volumes (300 L) et à fortes doses. Les quantités maximales manipulables étaient respectivement égales à 0.226 mg et 153 mg pour l'²³³U et pour l'uranium appauvri. De plus, les effluents de déchets radioactifs et de métaux stables (Cd) nécessitaient une prise en charge particulière. Ils étaient stockés en cuve à effluents avant évacuation vers la station de traitement alors que les déchets solides très faiblement radioactifs étaient répartis dans les diverses filières de traitement en fonction de leur nature. Afin de minimiser les rejets de Cd et d'U, nous avons développé au cours de cette thèse une technique de piégeage de ces métaux. Nous avons utilisé un mini réacteur formé d'une colonne en PVC contenant de la calcite (265g de CaCO₃; Ø1mm), à travers lequel l'eau contaminée passait en circuit fermé de façon continue avec un débit de 15L/h (**Figure 36**). Ce système permettait d'épurer l'eau grâce à la sorption des métaux sur la calcite. Ainsi, 97% de sorption du Cd initialement présent dans 3L d'eau synthétique (10 µg Cd/L) a été observé en moins d'une heure. De même, 80% de sorption de l'U initialement présent dans 3L d'eau synthétique (100 µg U/L) a été noté en 24h et plus de 90% en 48h (**Figure 37**). Ces tests préliminaires ont été réalisés sur des eaux qui ne contenaient pas d'écrevisses. Au cours de nos expériences, nous avons noté une moindre efficacité du système probablement liée à la présence de matière organique excrétée par les organismes. Il est fort probable que cette matière organique soit entrée en compétition avec les métaux pour s'adsorber à la calcite, et ainsi diminuer les sites de fixation pour les métaux, ou que les complexes métaux-matière organique ne soient pas piégés par la calcite. Quoiqu'il en soit, ce système, facilement mis en place, a permis de réduire la concentration en métaux des effluents.

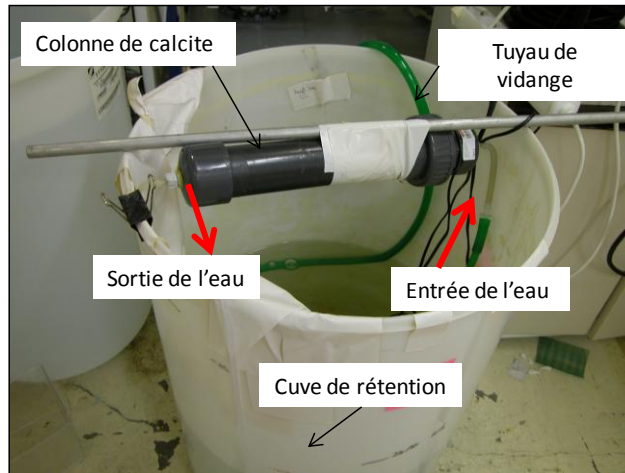


Figure 36 : Système de filtration de l'eau contaminée au Cd ou à l'U par la calcite pour minimiser les rejets (source: S.A.I.K/IRSN/LRE).

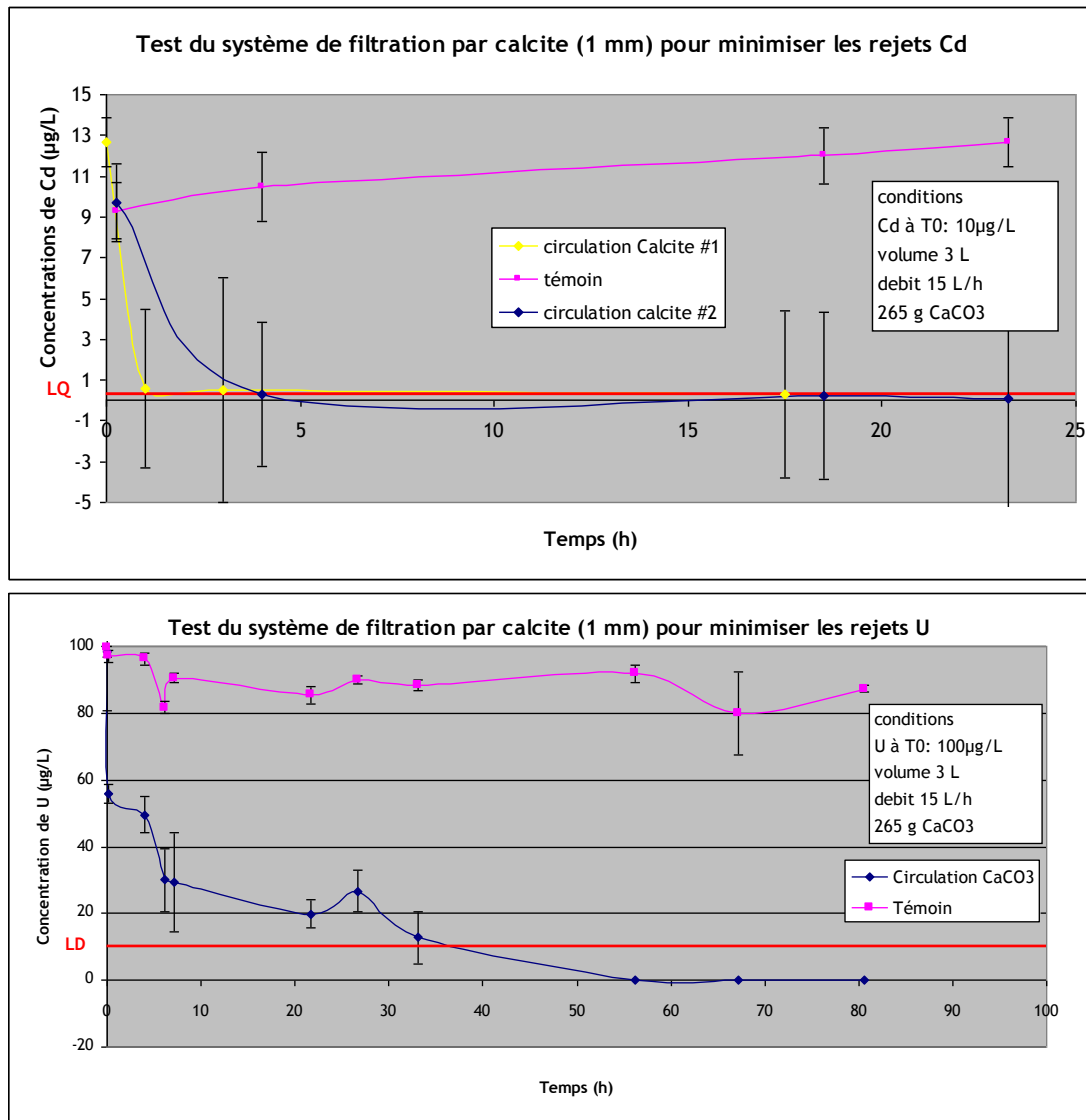


Figure 37 : Suivi des concentrations de Cd ou d'U dans l'eau filtrée en continu par la calcite en fonction du temps (h). (LQ) limite de quantification. (LD) limite de détection.

2. Prélèvement des organismes et dissection

A chaque temps d'analyse, quatre à cinq écrevisses ont été prélevées pour chaque condition d'exposition, pesées (poids total), mesurées du rostre jusqu'au telson par l'intermédiaire d'un pied à coulisse (**Figure 38**) puis sacrifiées (broyage du ganglion sous-œsophagien). Un maximum de 7 organes : les branchies, l'hépatopancréas, la glande verte, l'estomac, l'intestin, les muscles et la carapace ont été prélevés au cours des différentes expériences (**Figure 39**). Les analyses biochimiques et microscopiques ont été effectuées exclusivement sur les branchies et l'hépatopancréas. Ces deux organes ont été fractionnés au maximum en 4 parties suivant le type d'analyse auquel ils allaient être destinés. Les fractions dédiées aux analyses d'expression de gènes ont été congelées à -80° dans du « RNA later » (Qiagen) afin d'optimiser la conservation des ARNs. Les fractions dédiées aux analyses enzymatiques et à la bioaccumulation ont été stockées à -80°C. Les fractions des organes dédiées aux analyses microscopiques (~0.5 cm³) ont été immédiatement immergées dans une solution assurant la fixation chimique de la matière vivante (cf. chapitre III, 4.1.1).



Figure 38 : Photo illustrant une mesure de la taille d'une écrevisse (source: S.AL.K/IRSN/LRE).

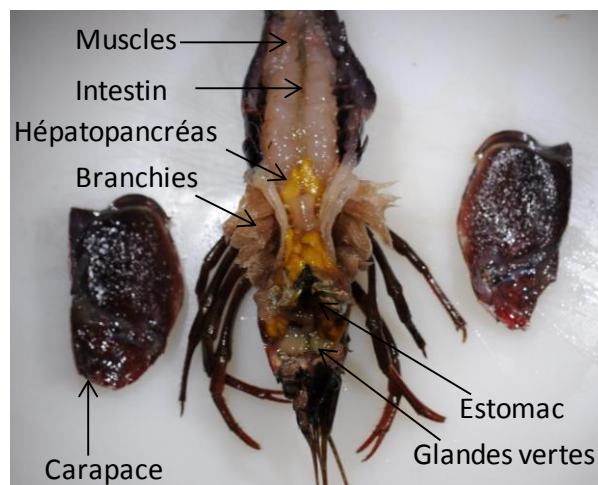


Figure 39 : Photo illustrant une écrevisse disséquée (source: J.M.B/IRSN/LRE).

3. Dosage des métaux et des ions

3.1. Dosage des métaux dans la matrice biologique et l'eau.

3.1.1. Préparation des échantillons

La mesure des contaminants dans les prélèvements d'eau effectués pour le suivi de la pression de contamination durant les expériences nécessitait une acidification à 2% par du HNO₃ (15.5 M). Les échantillons biologiques quant à eux étaient séchés à l'étuve 48h à 45°C puis pesés afin de pouvoir par la suite rapporter les quantités bioaccumulées à la masse de poids sec (PS). Une digestion des échantillons a été effectuée dans des tubes en polypropylène avec 3 ml de HNO₃ (15.5 M) pendant 90 min à 95°C afin de décomposer la matière organique (**Figure 40**). Ensuite, les échantillons étaient évaporés à sec pendant 60 min à 105°C. Ensuite, une seconde étape de minéralisation devait être réalisée, faisant intervenir du peroxyde d'hydrogène pour assurer la digestion des derniers résidus. Deux ml de H₂O₂ (33%) étaient rajoutés puis chauffés à 105°C jusqu'à évaporation (~20 min). Les matrices biologiques ainsi digérées étaient remises en solution et acidifiées en fonction de la technique analytique utilisée. Pour les analyses d'U en spectrométrie par plasma à couplage inductif (ICP-MS et ICP-AES), 5 ou 10 ml d'eau ultrapure acidifiée à 2% avec du HNO₃ (15.5 M) étaient rajoutés à chaque échantillon biologique. Pour le dosage du Cd par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE), une dilution à 0.2% avec du HNO₃ (15.5 M) a été effectuée. En ce qui concerne l'analyse de ²³³U par comptage en scintillation liquide, 1 ml de chaque minéralisat acidifié à 2% avec du HNO₃ (15.5 M) a été rajouté dans un flacon en verre contenant 19 ml de liquide scintillant (Instagel, Packard Instruments, Rungis, France).

La bioaccumulation a été calculée à partir de la formule suivante :

Concentration_{organe} (µg métal. g⁻¹ PS) = (quantité du métal détectée dans l'échantillon (µg/L) / masse du tissu en mg de poids sec) * facteur de dilution

Les facteurs de bioaccumulation (AF) observés ont été calculés comme le rapport :

$$AF = C_{\text{organe}} / C_{\text{eau}}$$

où C_{organe} est la concentration en uranium bioaccumulée dans l'organe (µg métal.g⁻¹PS) et C_{eau} la concentration en uranium du milieu d'exposition (µg métal.g⁻¹).

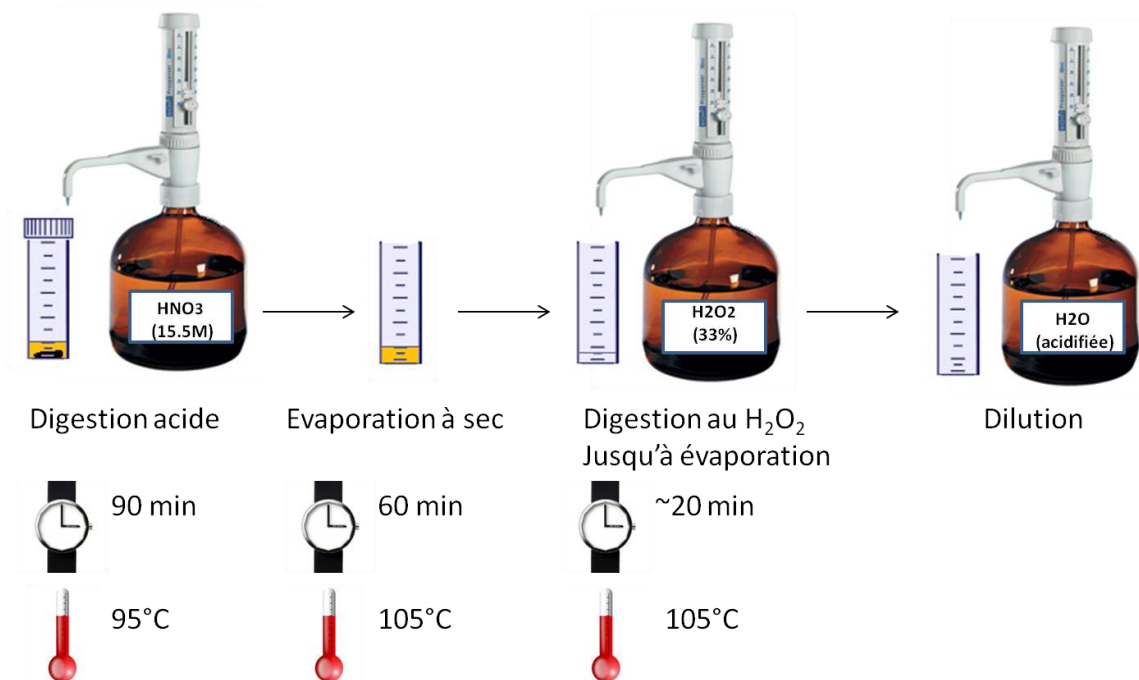


Figure 40: Procédure de digestion des échantillons biologiques (source: S.AL.K/IRSN/LRE).

3.1.2. Techniques analytiques utilisées

3.1.2.1. Dosage du cadmium par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE)

Le dosage du cadmium dans les échantillons a été effectué par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique (4110 ZL; Perkin-Elmer ; équipée d'un correcteur de bruit de fond à effet Zeeman) qui présente une limite de quantification de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour le Cd (**Figure 41**). Le principe de ce dosage repose sur une mesure de l'échantillon ramené à l'état d'atomes libres (atomisation). L'échantillon liquide est aspiré par un passeur automatique et introduit dans l'appareil puis porté à une température de 2 à 3000°C pour que les éléments présents se retrouvent sous forme ionisée. L'atomisation est réalisée sous atmosphère inerte dans un dispositif d'atomisation électrothermique sans flamme appelé « four graphite ». Le four est balayé par un flux d'argon (gaz inerte) qui protège les éléments de l'oxydation. Une lampe à cathode creuse émet un rayonnement spécifique de l'élément étudié (228 nm pour le Cd) qui traverse le tube graphite dans lequel la solution est déposée par l'échantillonneur. Les atomes qui apparaissent au cours de l'atomisation absorbent cette longueur d'onde. L'absorption est dépendante de la concentration d'un élément et peut être exploitée analytiquement en relation avec un calibrage préalable (en présence de modificateurs de matrice). Des modificateurs de matrice sont utilisés de manière à éviter toute

absorption non spécifique due à des composés présents dans la matrice. Ces derniers peuvent en effet engendrer un biais très important lorsque des éléments sont dosés à faible concentration (à l'échelle du $\mu\text{g.L}^{-1}$). Lors des dosages du Cd, nous avons utilisé un mélange de palladium (Pd) et de nitrate de magnésium ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) comme modificateur de matrice. Notons que des échantillons certifiés ont été analysés afin de contrôler et valider la qualité des dosages (TORT-2: $26.7 \pm 0.6 \mu\text{g Cd/g}$, Lobster hepatopancreas; DOLT-2: $20.8 \pm 0.6 \mu\text{g Cd/g}$, Dogfish liver; NCR/CRNC, Ottawa, Canada). Comme une contamination par le Cd aurait pu survenir lors de la préparation des échantillons, nous avons analysé des blancs représentatifs des réactifs et de la procédure de préparations. Les valeurs de Cd détectées étaient ainsi retranchées de celles décelées dans l'échantillon.

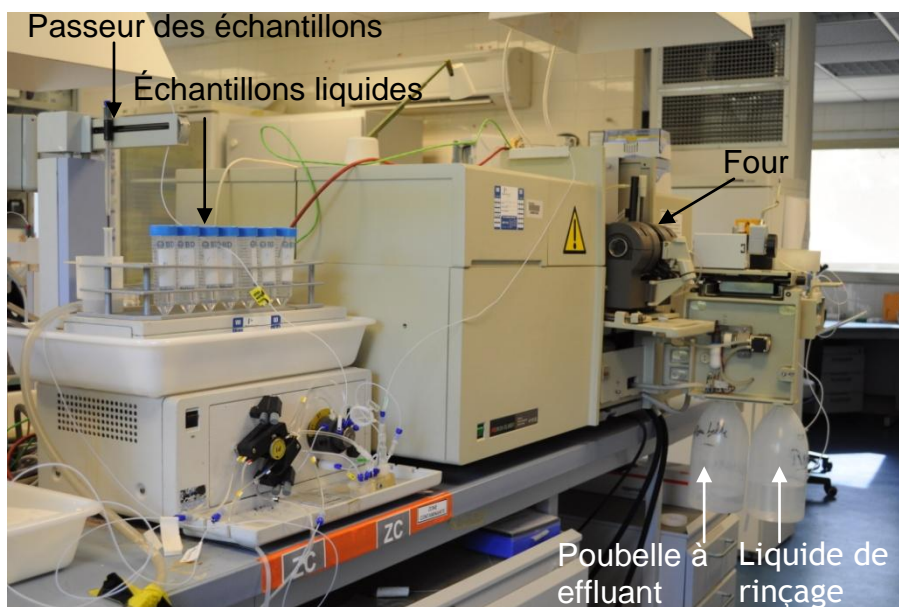


Figure 41 : Photographie d'un SAAE 4110 ZL Perkin-Elmer (source: J.M.B/IRSN/LRE).

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

La spectrométrie d'émission atomique est une méthode photométrique utilisant un plasma (gaz) maintenu à une température de l'ordre de 8000 ° K. A cette température, les atomes de l'échantillon sont excités et émettent des radiations électromagnétiques (photons) caractéristiques. Selon le modèle de Bohr, les électrons constituent autour du noyau un nuage électronique, réparti en couches et sous-couches, dont le nombre est défini pour chaque atome. A chacune de ces sous-couches est associé un niveau d'énergie. En règle générale, plus la sous-couche est éloignée du noyau, plus son niveau d'énergie est élevé. Lorsqu'un atome reçoit de l'énergie suite à une collision avec une autre particule ou à l'absorption d'un rayonnement, il va absorber cette énergie, ce processus correspondant à l'excitation. Cette excitation se traduit par un déplacement d'électron vers les sous-couches d'énergie supérieure. Pour retrouver un état stable, l'électron aura tendance à retrouver le niveau de départ. Ce phénomène se traduit par l'émission de photons de longueurs d'ondes caractéristiques de chaque élément (spectre de raies d'émission). Ainsi l'élément va pouvoir être quantifié en fonction du nombre de photons émis, puisqu'il est proportionnel au nombre d'atomes de l'élément considéré. Pour le dosage de l'uranium quatre raies d'émission sont utilisées 385, 409, 417 et 424 nm. L'échantillon est introduit dans l'ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin Elmer, limite de détection = 10 µg U/L ± 10%) sous forme liquide (**Figure 42**). Il est pris en charge par une pompe puis transformé en aérosol par un flux d'argon dans un nébuliseur. Il est ensuite transporté dans le plasma d'argon par un injecteur où il subit différentes étapes d'atomisation et d'ionisation, conduisant à une excitation des atomes et des ions. Une gamme d'étalonnage a été effectuée au préalable de chaque dosage. Les solutions étalons (10, 25, 60, 160 et 400 µg U/L) ont été préparées à partir d'une solution mère d'uranium à 1 g/L. Le contrôle qualité de ce dosage a été réalisé grâce à la mesure d'un étalon préparé dans la matrice des échantillons après l'analyse d'une série de dix échantillons. Un étalon interne, l'indium (50 mg/L ; acidifié à 2 % de HNO₃ 15.5M) a été aussi utilisé pour permettre une vérification du bon fonctionnement de l'appareil et de l'injection des étalons et de chaque échantillon à mesurer. Pour cela, il suffit de vérifier que l'intensité de l'indium est identique pour les échantillons d'une même matrice.

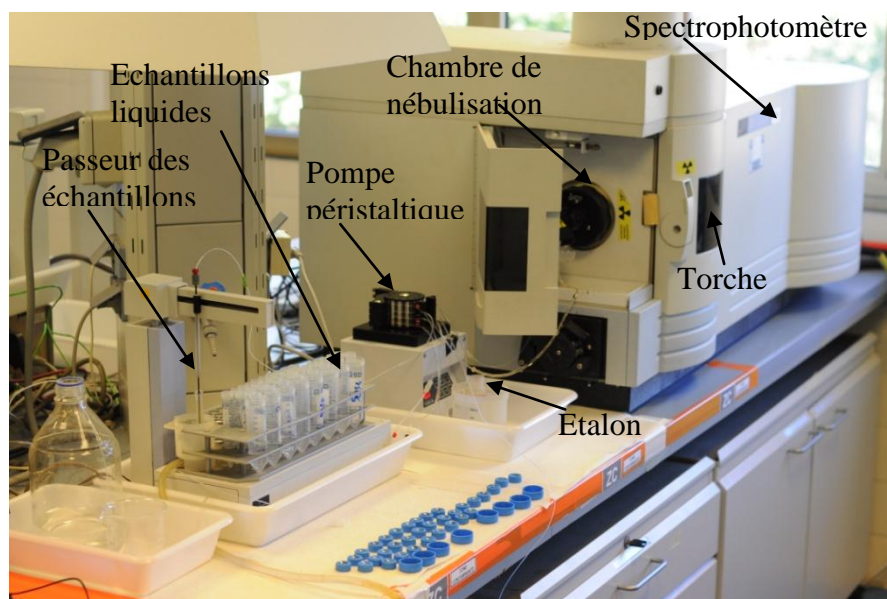


Figure 42 : Photographie d'un ICP-AES Perkin Elmer Optima 4300 DV (source: J.M.B/IRSN/LRE).

3.1.2.3. Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (*L'ICP-MS*)

L'avantage de l'ICP-MS pour le dosage de l'U réside dans une meilleure détection (limite de quantification: $10 \text{ ng U/L} \pm 7\%$) que l'ICP-AES ainsi que dans la possibilité de mesures isotopiques. Cette technique instrumentale d'analyse multiélémentaire permet la quantification des éléments d'un échantillon par analyse du signal émis (nombre de coups /seconde) à leur rapport masse/charge (m/z). Elle est basée sur le couplage d'une torche à plasma (argon ionisé, très haute température) qui permet une atomisation et une ionisation des éléments et d'un spectromètre de masse quadripolaire qui discrimine les ions formés suivant leur rapport m/z . Pour cela, l'échantillon acidifié est introduit à l'aide d'une pompe péristaltique dans une chambre de nébulisation où il est transformé en un aérosol à l'aide d'argon. Ceci est suivi d'une étape d'atomisation et d'ionisation des éléments, ainsi l'aérosol formé est envoyé dans un plasma d'argon à très haute température (entre 6 000 et 10 000 °C). Un système de vide différentiel permet la transmission des ions de la lentille de focalisation vers le quadripôle *via* un ensemble de lentilles ioniques. Ce quadripôle (**Figure 43**) est constitué de deux paires de barreaux cylindriques amenées à des potentiels électriques opposés. Seuls les ions présentant un rapport masse sur charge particulier, sont sélectionnés grâce à la fréquence appliquée au quadripôle et ont un parcours stable. Ils peuvent ensuite être mesurés. Les autres entrent en collision avec un des barreaux du quadripôle. Les ions arrivant sur le détecteur permettent la génération d'un signal proportionnel au nombre d'ions d'un même rapport m/z (nombre de coups/sec). Par le biais d'une courbe de calibration préparée à

partir d'un échantillon certifié (10 mg U/L), le signal est transformé en concentration. L'ensemble des échantillons a été préparé avec du HNO₃ 2% Suprapur. Notons que le bismuth a été utilisé comme étalon interne pour corriger un éventuel effet matrice. Au cours de l'analyse, des blancs HNO₃ 2% ainsi que des contrôles qualités (étalons certifiés) ont régulièrement été analysés, respectivement tous les 5 ou 10 échantillons.

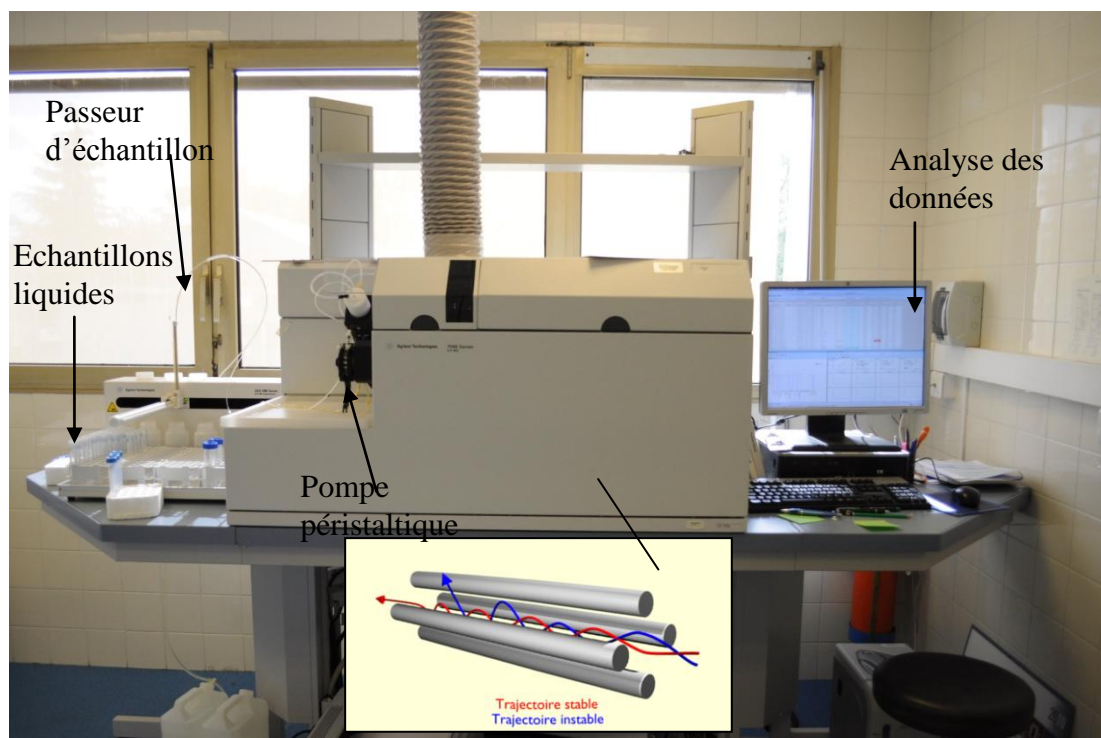


Figure 43 : Photographie d'un ICP-MS Agilent 7500 Cx et schéma de la trajectoire des ions dans le quadripôle(source: J.M.B/IRSN/LRE).

3.1.2.4. La scintillation liquide alpha

L'uranium 233 a été dosé par scintillation liquide alpha (Quantulus 1220, Wallac-PerkinElmer, Finland ; limite de détection 0.03 Bq/échantillon)(**Figure 44**). Cette technique consiste à convertir l'énergie cinétique de la particule radioactive en émission de lumière (photons) grâce à un liquide scintillant. Le liquide scintillant est un cocktail de différents composés organiques : un solvant et deux solutés. Les molécules du solvant s'excitent en absorbant l'énergie des particules α , puis transmettent cette énergie aux molécules du premier soluté (ou scintillateur primaire) qui passent à un état excité à leur tour. Lors de leur retour à un état stable qui s'accompagne de l'émission de photons entre 300 et 400 nm, elles excitent à leur tour les molécules du second soluté (ou scintillateur secondaire). Enfin, ces dernières en se désexcitant pour revenir à un état stable, émettent des photons entre 350 et 500 nm qui

interagissent avec les photocathodes des photomultiplicateurs. Lors de l'interaction photon/photocathode, un électron est émis en emportant une quantité d'énergie proportionnelle à celle du photon qui lui a donné naissance. La quantité de photons émise est donc proportionnelle à l'activité radioactive présente dans l'échantillon et permet alors de déterminer l'activité volumique de la solution (exprimée en Bq/mL). La vérification de l'efficacité de détection des particules α a été faite grâce à l'analyse d'étalons préparés à partir d'une source certifiée. Des blancs d'échantillons ont aussi été mesurés à chaque série d'analyse.

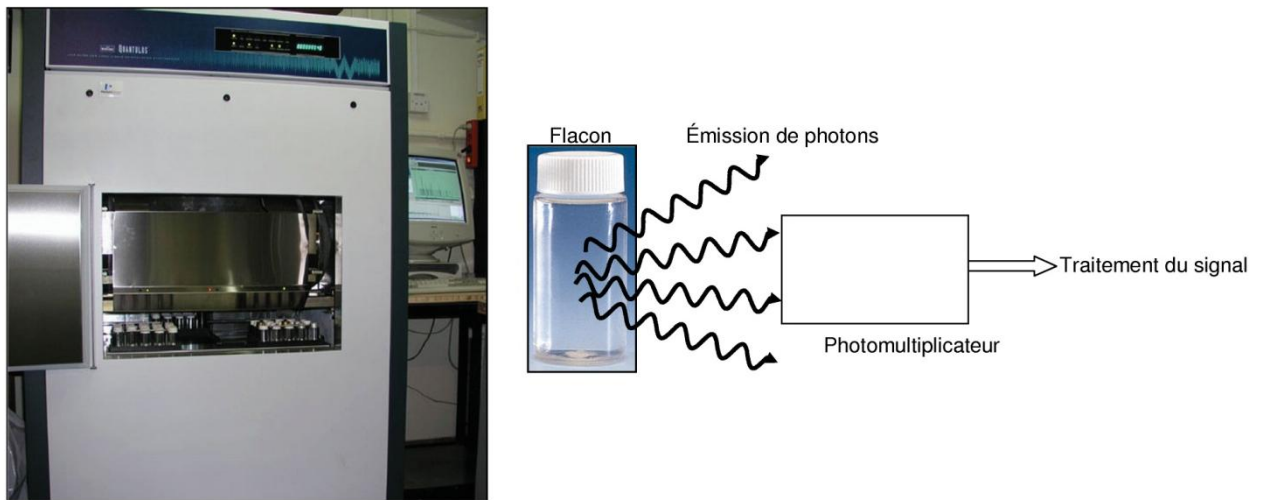


Figure 44 : Schéma de fonctionnement du comptage en scintillation liquide et photographie d'un compteur en scintillation liquide de type Wallac quantulus 1400 (Loffredo, 2011).

3.1.3. Calculs des débits de doses

L'accumulation d'uranium dans les organismes induit une irradiation interne et externe des tissus. La grandeur utilisée pour quantifier cette irradiation ainsi que l'énergie délivrée par le rayonnement s'appelle la dose absorbée et s'exprime en gray (Gy). Pour ces travaux, les doses ont été estimées par modélisation *via* le logiciel EDEN 2 :2 (Elementary Dose Evaluation for Natural Environment) conçu pour le calcul de la dose radiologique reçue par les espèces non humaines exposées à une substance radioactive. Cette dose est estimée par le biais de facteurs de conversion de l'activité présente qui prennent notamment en compte le type de rayonnement émis par chaque isotope ainsi que son énergie. Les facteurs de conversion de dose sont appelés DCCs (dose conversion coefficient), exprimés en gray par unité (i) de temps et (ii) d'activité par unité de masse du compartiment qui le contient: soit le

milieu environnant s'il s'agit d'une irradiation externe, soit de l'organisme même s'il s'agit d'une irradiation interne (Gy/ j par Bq/g poids frais). On obtient ainsi un débit de dose, correspondant à l'accroissement de la dose par intervalle de temps et traduisant l'intensité de l'irradiation (énergie absorbée par matière par unité de temps en Gy/h ou Gy/j).

Dans cette étude, le débit de dose total (dd_t) résultant de la somme du débit de dose interne (dd_{int}) et du débit de dose externe (dd_{ext}) a été calculé pour l'hépatopancréas des écrevisses avec :

$$dd_{int} = (DCC_{\text{hépatopancréas } i} \cdot Ac_i)$$

$$dd_{ext} = (DCC_{\text{eau } i} \cdot Ac_{\text{eau } i})$$

où i est un isotope ou descendant donné ;

$DCC_{\text{hépatopancréas } i}$, le coefficient de conversion calculé par EDEN pour l'élément i pour l'organisme ;

Ac_i est l'activité de l'élément i dans l'organisme (Bq/kg) calculée à partir de la concentration mesurée (g_i/kg de poids sec) multipliée par l'activité spécifique de i (Bq/g) ;

$DCC_{\text{eau } i}$, le coefficient de conversion calculé par EDEN pour l'élément i pour le milieu extérieur (eau).

$Ac_{\text{eau } i}$, i est l'activité de l'élément i dans le milieu (Bq/g) calculée à partir de la concentration mesurée (g_i/kg) multipliée par l'activité spécifique de i (Bq/g).

Les hypothèses utilisées pour ces calculs étaient :

- *Géométrie et composition de l'hépatopancréas*

Les principes de calcul du logiciel EDEN pour les DCCs sont fonction des radionucléides étudiés mais aussi du scénario d'exposition ainsi que de la géométrie de l'organe et de sa composition élémentaire:

(i): Afin de calculer les DCCs pour l'hépatopancréas, la géométrie de cet organe a été assimilée à une ellipse (longueur : 4 cm ; hauteur : 0.65 cm ; largeur : 2 cm) composée d'hydrogène, de carbone, d'oxygène et d'azote, contribuant à 10.2, 9.5, 77, et 2.3% de la masse totale respectivement (valeurs prises par défaut par le programme pour les matières organiques). Mentionnons que la forme des branchies est trop complexe pour être modélisable par le logiciel.

(ii): La distribution de l'uranium a été considérée homogène dans l'organe pour l'utilisation du logiciel.

- *Débit de dose externe (dd_{ext}) :*

Quel que soit l'uranium utilisé, on considère pour le calcul du débit de dose externe l'activité de tous les isotopes de cet uranium ainsi que celle de l'ensemble des descendants à 10 jours

(activité à 10 jours calculée *via* le logiciel Nuclides 2000) pour les solutions d'uranium appauvri et 233.

- *Débit de dose interne* (dd_{int}) :

Pour ce calcul, l'activité de l'uranium accumulé a été calculée à partir des données de bioaccumulation mesurées par ICP-MS ou par scintillation liquide et de la connaissance de l'isotopie des différentes solutions utilisées:

Uappauvri: 99.65% ^{238}U , 0.33% ^{235}U , 0.0019% ^{234}U , 0.011% ^{236}U .

Uranium 233 : ^{233}U (100%).

La modélisation des descendants de l'uranium a été réalisée par le logiciel Nuclides 2000 (Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany). Le débit de dose interne a été calculé suivant 3 scénarios :

(i) Seuls les isotopes de l'U ont été accumulés dans l'hépatopancréas.

(ii) Les isotopes de l'U présents dans le milieu ont été accumulés dans l'hépatopancréas avec leurs fils. Dans ce cas, un facteur de transfert (obtenu d'après la littérature) est appliqué pour chaque élément afin d'évaluer l'activité des descendants de l'U (ex : 110 pour le Th et 10 pour le Pa).

(iii) identique à (ii) + les descendants des éléments accumulés après 10 jours de décroissance correspondant à la durée d'exposition.

Pour les deux derniers scénarios, tous les radionucléides ont été considérés comme ayant pu être internalisés dès le premier jour d'exposition tout en ayant la même cinétique (taux de transfert et d'élimination) et les mêmes cibles biologiques.

Les DDCs calculés pour chaque isotope d'U et les descendants sont présentés dans le chapitre IV-C.

3.2. Chromatographie ionique

La chromatographie ionique est une technique séparative couplée à une technique analytique (**Figure 45**). Elle a été utilisée pour mesurer les anions présents dans nos milieux d'exposition. La solution à quantifier en anions (minimum 10 mL) est entraînée dans une colonne échangeuse d'anions (Dionex IonPack AS19) à l'aide d'un éluant d'hydroxyde de potassium (10 mM). La colonne sépare les anions en fonction de leur affinité avec la phase solide. En sortie de colonne, un conductimètre permet de mesurer la conductivité dont la valeur est fonction de la concentration en anion en solution. Une gamme étalon de 0 à 2 mg/L en différents anions (F, Br, Cl, SO₄, NO₃, NO₂, PO₄), a été préparée et préalablement mesurée, permettant de quantifier les anions présents dans la solution à doser.

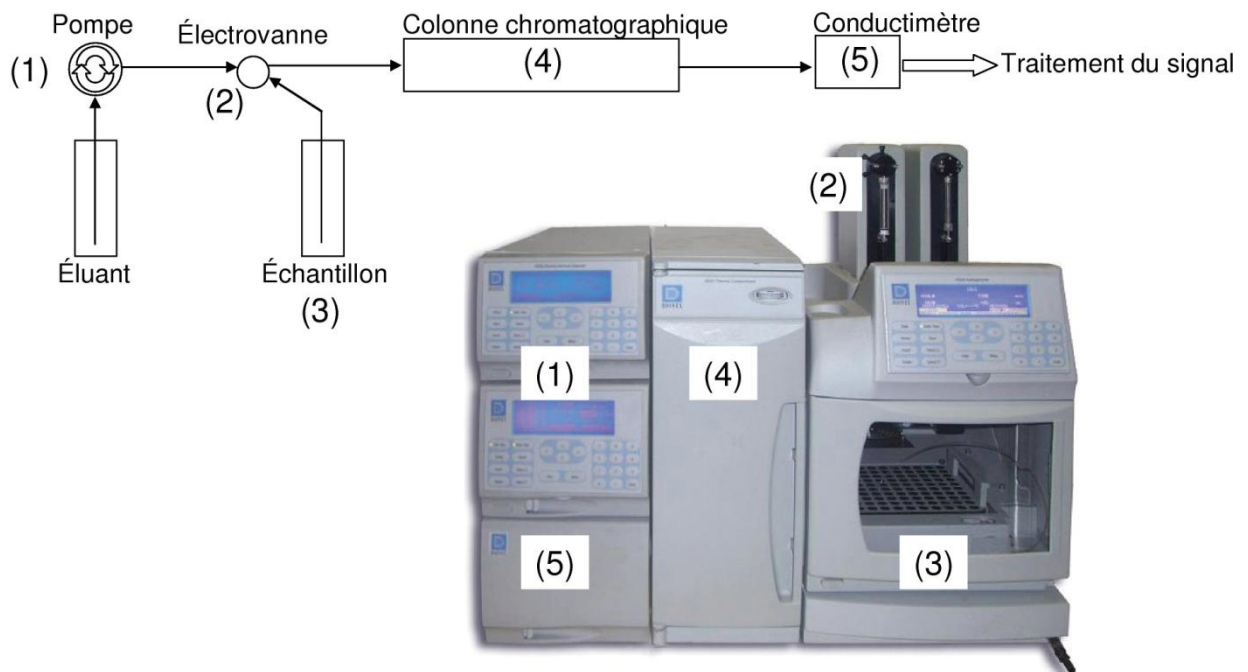


Figure 45 : Schéma de fonctionnement d'une chromatographie ionique en phase liquide (ILC) et photographie d'une ILC Dionex ICS 3000 (Loffredo, 2011).

4. Analyses des paramètres biologiques

4.1. Microscopie

4.1.1. Préparation des échantillons

Une étape de fixation chimique des échantillons a été réalisée directement après le prélèvement des organes. Cette étape consistait à baigner les tissus dans un mélange de solutions (2.5% de glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate 0.1 M, pH 7.4) pendant 48h à 4°C afin de bloquer les systèmes enzymatiques et de rendre les molécules insolubles dans l'eau mais aussi dans les solvants organiques utilisés lors de l'étape de déshydratation. Après rinçage (2x5 min) dans du tampon cacodylate (0.1M à pH 7.4), une étape de post-fixation était effectuée. Il s'agissait d'imprégner les échantillons avec du tetroxyde d'osmium (mélange OsO₄ 1% dans le tampon cacodylate) pendant 1 heure en absence de lumière pour obtenir un meilleur contraste lors des observations au microscope électronique en transmission (MET). Ensuite, les tissus ont été rincés (3x5 min) au tampon cacodylate puis déshydratés par des bains successifs d'alcool éthylique de concentrations croissantes (de 50 à 100% d'éthanol) et enfin avec de l'oxyde de propylène (2x30min). Une fois déshydratés, les échantillons ont été inclus dans une résine Epoxy monomérique, l'Epon 812 préparée en mélangeant 48 % d'EPON 812, 27 % d'accelerator MNA, et 23,5 % d'hardener DDSA magnétiquement, puis 1,5 % de DMP 30 a été rajouté à l'ensemble. Les échantillons étaient donc placés dans un mélange de cette résine et d'oxyde de propylène (v: 1/1) une nuit à 4°C jusqu'à évaporation de ce dernier. Enfin, la résine était remplacée et les échantillons étaient coulés dans une gélule puis placés dans une étuve à 60°C afin que l'EPON polymérise et forme ainsi un bloc plastique dur prêt à être coupé. Des coupes de 80 à 500 nm ont été alors réalisées grâce à un ultramicrotome équipé d'un couteau de diamant (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) (**Figure 46**). Le choix des épaisseurs des coupes dépend des techniques d'analyses auxquelles elles sont destinées. Pour les observations au microscope optique, des coupes semi-fines de 200 à 500 nm d'épaisseur et des coupes ultrafines de 80 nm et 140 nm ont été réalisées pour les observations au microscope électronique en transmission (MET) et pour les analyses chimiques par la sonde EDX respectivement. Ces coupes ont été déposées sur des grilles de cuivre de 3 mm de diamètre.

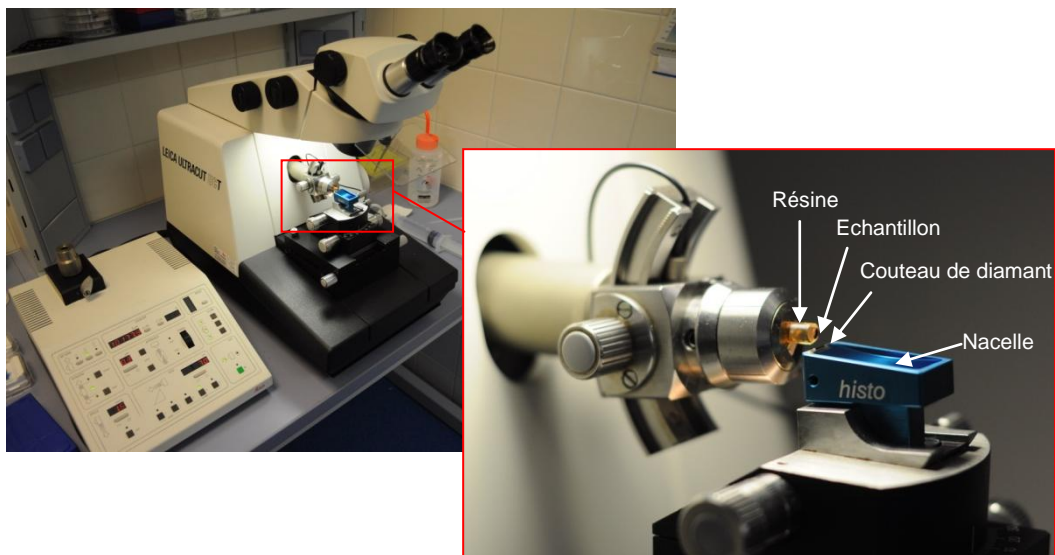


Figure 46 : Illustration de l'ultramicrotome équipé d'un couteau de diamant (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France)(source: J.M.B/IRSN/LRE).

4.1.2. Microscopie optique

Avant observation, les coupes étaient colorées au bleu de toluidine puis examinées au microscope photonique (Leica, DM750) équipé d'une caméra ICC50 et du logiciel de capture des images LAS EZ (**Figure 47**).

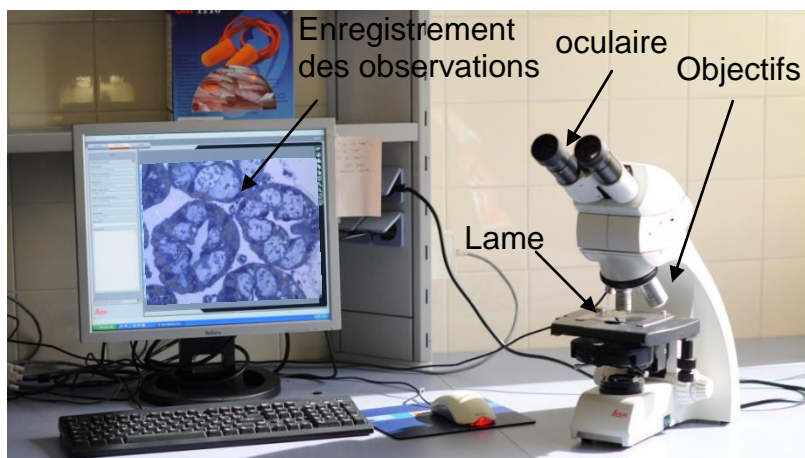


Figure 47 : Observation de l'hépatopancreas de *P. clarkii* au microscope optique(source: J.M.B/IRSN/LRE).

4.1.3. Microscopie Electronique à Transmission couplée à une sonde EDX

La microscopie électronique en transmission (MET) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est « transmis » à travers un échantillon solide très mince. Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image, dont la résolution est bien plus fine qu'en microscopie optique (0,2 nm vs 0,2 μ m). Au contact de l'échantillon, les électrons incidents (provenant de la source) sont soit arrêtés, soit déviés et

ralentis, soit transmis. Le diaphragme objectif éliminant les électrons déviés, la formation de l'image se fait à partir des électrons arrêtés (zones sombres) et des électrons transmis (zones claires). Le microscope utilisé (Tecnaï 12 G² Biotwin ; FEI, Eindhoven, Pays-Bas)(**Figure 48**) possède un grossissement possible de 390 à 300 000 fois.

Il est aussi possible de caractériser la composition chimique de l'échantillon grâce à une sonde EDX (Energy dispersive Xray) couplée au microscope qui capture et analyse les rayonnements X émis suite aux interactions de la matière biologique avec les électrons incidents (processus de désexcitation). L'énergie de ces photons X est caractéristique des atomes dont ils sont issus. Enfin, ces photons sont présentés sous forme d'un spectre élémentaire en fonction de leur énergie (KeV).

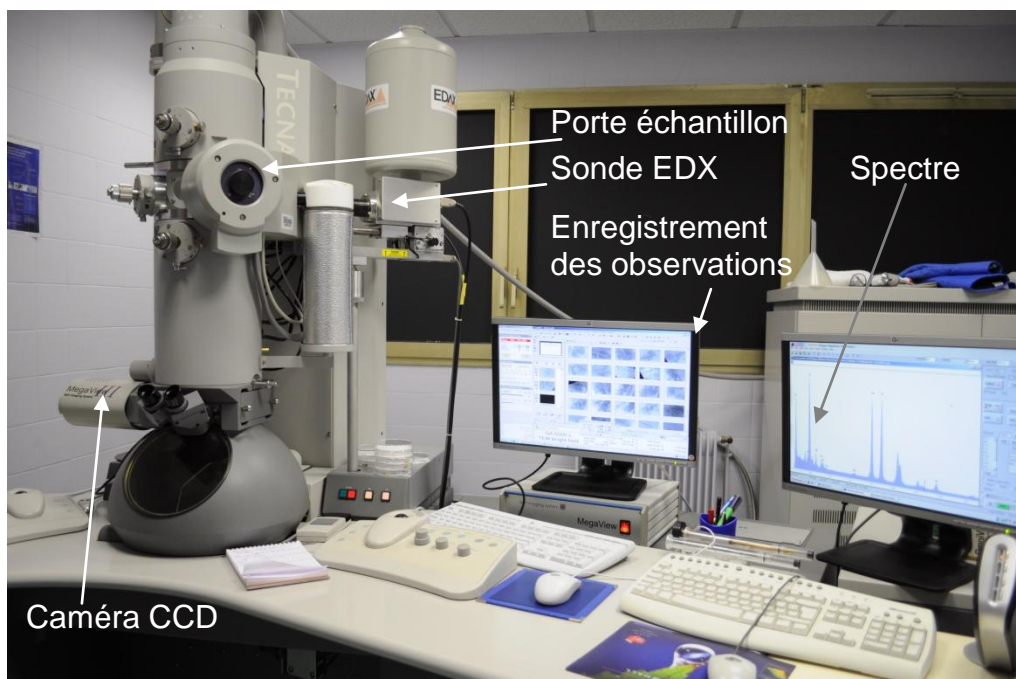


Figure 48 : Photographie d'un microscope électronique à transmission TecnaïG² 12 BioTwin avec sa sonde microanalyse EDX(source: J.M.B/IRSN/LRE).

4.2. Dosages enzymatiques

4.2.1. Préparations des échantillons

La décongélation des échantillons stockés précédemment à -80°C a été réalisée lentement sur glace. Environ 0.2g du tissu d'intérêt était pesé et transvasé dans un tube à hémolyse dans lequel était ajouté un tampon Tris-HCl (100mM, pH 7.8) contenant 100 µM de phenylméthanesulfonyl fluoride (PMSF), 0.008 TIU/ml d'aprotimine et 0.1 mg/ml de bacitracine (inhibiteur des oligopeptides des enzymes protéolytique) afin d'empêcher les protéinases d'agir (dilution 1 :20 pour l'hépatopancréas et 1 :10 pour les branchies). Une

homogénéisation a été ensuite réalisée à l'aide d'un potter sur la glace en moins d'une minute avec des cycles de 15 secondes, puis le broyat a été centrifugé 30min à 15000 \times g à 4°C. Le surnageant a été ensuite centrifugé à 100000g (Fraction cytosolique S₁₀₀) pendant 1h à 4°C, aliquoté dans des tubes eppendorf de 1.5 ml, congelé avec de l'azote liquide (quick freeze) puis stocké à -80°C pour les dosages ultérieurs des concentrations de protéines totales et des activités enzymatiques.

4.2.2. Dosage des protéines

Le dosage des concentrations de protéines totales dans les fractions S₁₀₀ permet de normaliser les résultats des dosages enzymatiques réalisés dans ces mêmes fractions. Ce dosage a été fait à l'aide du kit « Micro BCA™ Protein Assay Kit » (Thermo scientific). Ce kit a été optimisé pour être utilisé dans une gamme de concentrations de 0.5µg/ml à 20 µg/ml. Il s'agit d'une méthode colorimétrique qui permet la détection et la quantification des protéines totales. Cette technique est basée sur l'utilisation de l'acide bicinchoninique (BCA) pour détecter le Cu⁺ qui est formé quand le Cu²⁺ est réduit par les protéines dans un milieu alcalin. Une coloration mauve apparaît lorsque deux molécules de BCA chélatent un ion Cu⁺. Ce complexe exhibe une absorption optique maximale à 562nm. L'absorbance du mélange des réactifs et de l'échantillon est linéaire et proportionnelle à la concentration de protéines présentes. Il faut cependant réaliser avec chaque série d'analyse des échantillons une gamme d'étalonnage (de 0 à 40 µg/L) avec une protéine référence, l'albumine de sérum bovin (BSA). Suivant la concentration protéique des échantillons, des dilutions préalables peuvent s'avérer nécessaires afin que les valeurs d'absorbance des échantillons soient comprises dans l'intervalle des valeurs d'absorbance de la gamme d'étalon. Ainsi, pour les fractions S100 des échantillons hépatiques et branchiaux une dilution de 1/100 et de 1/200 était réalisée respectivement. Nous avons aussi testé l'efficacité du signal suivant l'utilisation de l'eau UHQ (ultra haute qualité) ou du tampon Tris-HCl (100 mM, pH 7.8) pour les dilutions (**Figure 49**). Il s'est avéré que les résultats étaient meilleurs en utilisant l'eau distillée. Le mélange des réactifs avec les échantillons dilués ou avec les protéines standards a été déposé dans les puits d'une microplaque suivant les instructions du fournisseur. Ces analyses ont été réalisées en triplicat, la microplaque était agitée 30 secondes puis parafilmée et incubée 2h à 37°C. À l'issue de cette incubation, la plaque doit être refroidie jusqu'à température ambiante puis introduite dans le lecteur du spectrophotomètre (SOFTmax® Pro) pour mesurer les absorbances (**Figure 50**). Enfin, l'équation de la droite « absorbance= f (concentrations protéiques) » a été déterminée à partir des résultats obtenus sur la gamme de

BSA. La concentration protéique de chacun des échantillons a alors été déduite en tenant compte du facteur de dilution initial.

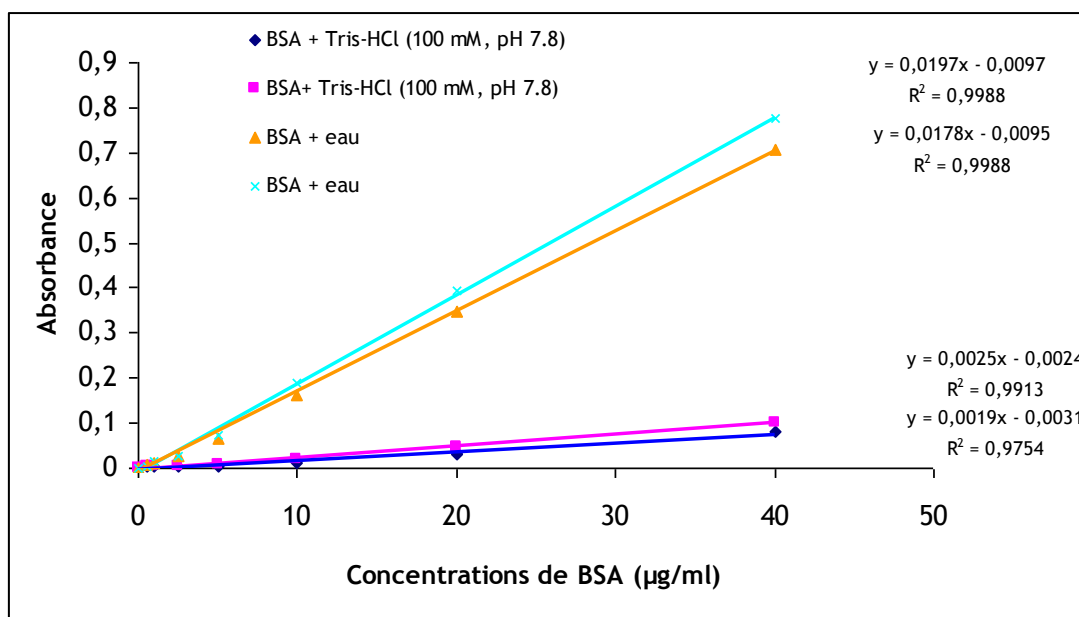


Figure 49 : Différentes gammes d'étalon pour le dosage des protéines totales. Note : deux solutions mères de BSA ont été testées dans deux solvants : l'eau distillée et le tampon Tris-HCl (100 mM, pH 7.8).

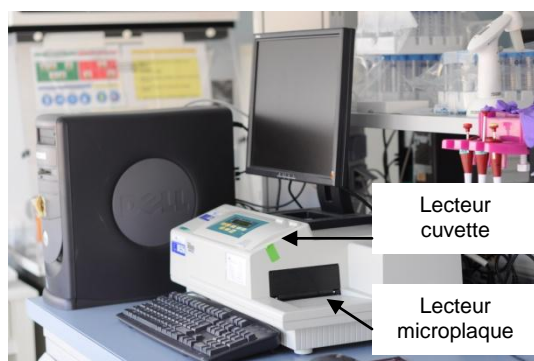


Figure 50 : Spectrophotomètre (SOFTmax® PRO)(source: J.M.B/IRSN/LRE).

4.2.3. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

Le dosage de l'activité de la SOD a été fait à l'aide du kit «19160 SOD determination Kit» (Fluka ® Analytical). Rappelons que cette enzyme catalyse la dismutation de l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en une molécule d'oxygène (O_2). Ce kit permet le dosage de la SOD grâce au sel de tétrazolium WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tétrazolium, monosodium). En présence de l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), ce sel produit un colorant très soluble dans l'eau, le WST-1 formazan (**Figure 51**). La Xanthine oxydase (XO) est ajoutée au milieu réactionnel afin de générer les

anions superoxyde. Ainsi, la présence de la SOD dans le milieu réactionnel va diminuer la concentration des anions superoxyde et en conséquent la quantité du WST1-formazan va diminuer. De la sorte, la présence de SOD va inhiber la réaction. Le pourcentage d'inhibition peut être quantifié par la mesure de la décroissance de la coloration à 450 nm. Il faut cependant réaliser une gamme d'étalonnage avec des concentrations connues de SOD. Une mise au point du dosage a dû être réalisée avant l'analyse des fractions S₁₀₀ (**Figure 52**). En effet, la courbe de % d'inhibition en fonction des concentrations de SOD dans le milieu semble être linéaire entre 10 et 70% d'inhibition. Nous avons donc dilué les échantillons avec de l'eau distillée de façon à cibler 40 à 60% d'inhibition. Il s'est avéré qu'une dilution 1/5 était suffisante dans la fraction S₁₀₀ de tous les tissus. Le mélange des produits avec les échantillons, avec les concentrations de SOD de référence ou avec les blancs a été effectué suivant les recommandations du fournisseur puis ajouté dans les puits d'une microplaque. Cette dernière était ensuite parafilmée et incubée 20 min à 37°C puis placée dans le lecteur microplaque du spectrophotomètre (SOFTmax® PRO). Suite à la lecture des absorbances faite à 25°C, le calcul des % d'inhibition était effectué suivant les recommandations du fournisseur. Ensuite, l'activité de la SOD dans les échantillons a été calculée grâce à la déduction de la droite de calibration « % d'inhibition= f (concentrations SOD (Unité/ml)) » puis multipliée par le facteur de dilution et normalisée par rapport à la concentration totale en protéine de la fraction S₁₀₀ correspondante pour que à la fin les activités soient exprimées en U/mg de Protéines totales.

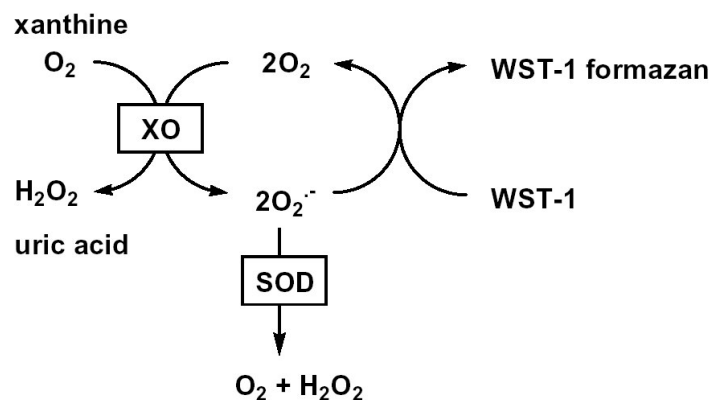


Figure 51 : Principe du dosage de la SOD.

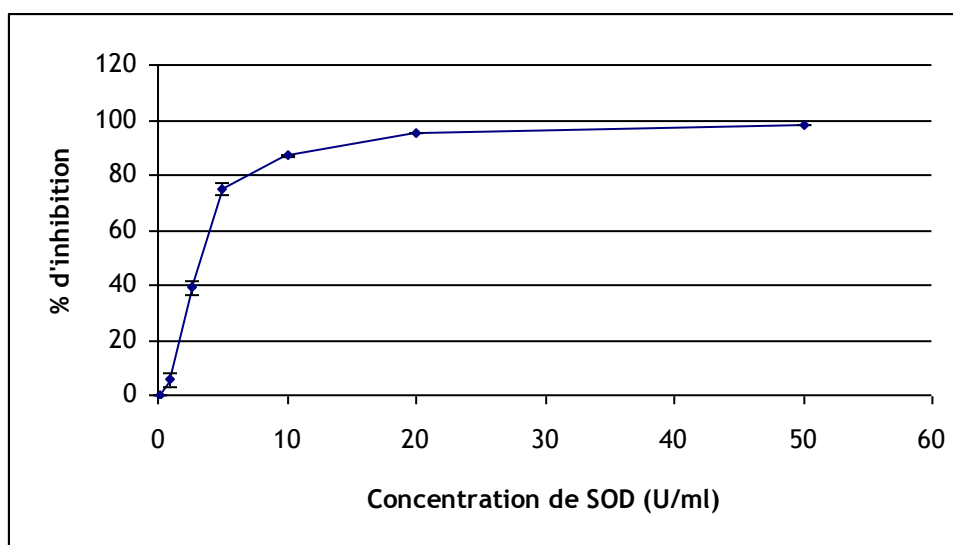


Figure 52 : Pourcentage d'inhibition de la réaction colorimétrique par la présence de différentes concentrations de SOD (U/ml) (n=3 par concentration).

4.2.4. Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

La catalase a été dosée dans la fraction S₁₀₀ des branchies et de l'hépatopancréas par la méthode spectrophotométrique utilisée par Elia et al. (2006 ; 2007). Il s'agit de mesurer la chute de l'absorbance liée à la disparition du peroxyde d'hydrogène, le substrat de l'enzyme (CAT + H₂O₂ → 2H₂O + O₂). En effet, l'activité d'une enzyme est évaluée par la quantité de substrat transformé ou de produit formé par unité de temps et dans les conditions de fonctionnement optimales de l'enzyme (température, de pH,...). Ainsi, le test a été réalisé dans un tampon sodium-phosphate (100 mM, pH 7) avec 12 mM de H₂O₂. L'absorbance du mélange réactionnel (échantillon/enzymes ou blanc + tampon + substrat) a été suivie à 240 nm pendant une minute (dans une cuve: V_{total}= 1 ml) suite à l'ajout du substrat et ceci à une température constante de 25°C. La concentration du substrat utilisée a été suffisamment élevée pour saturer tous les sites actifs des enzymes. En effet, différentes concentrations connues de CAT ont été testées au préalable avec 12 mM de H₂O₂(**Figure 53**). Cette expérience a été nécessaire pour la mise au point de la dilution à appliquer aux fractions S₁₀₀ des échantillons. Il s'est avéré qu'il fallait ajouter 20 et 40 µl de la fraction S₁₀₀ de l'hépatopancréas et des branchies respectivement au volume total qui correspond à 1 ml (dilution 1/50 et 1/25 respectivement) afin d'être proche de 3 U/ml. Finalement, la loi de Beer-Lambert a été appliquée pour le calcul de l'activité de la CAT. Rappelons que cette loi établit une proportionnalité entre la concentration d'une entité chimique en solution, l'absorbance de celle-ci et la longueur du trajet parcouru par la lumière dans la solution :

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} l c$$

Où :

- A_{λ} est l'absorbance ou la densité optique (sans unité) de la solution pour une longueur d'onde λ ;
- c (en $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$) est la concentration de l'espèce absorbante ;
- l (en m) est la longueur du trajet optique ;
- ε_{λ} (en $\text{mol}^{-1}\cdot\text{m}^2$) est le coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante en solution. Il rend compte de la capacité de cette espèce à absorber la lumière, à la longueur d'onde λ .

Dans le cas de ce dosage, le coefficient d'extinction molaire est de $0.04 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. L'activité de la CAT a été ainsi calculée grâce à cette formule $((\Delta A_{\text{échantillon}} - \Delta A_{\text{blancs}}) / \varepsilon l)$ puis multipliée par le facteur de dilution et enfin normalisée par rapport à la concentration des protéines totales dans la fraction S_{100} correspondante et en conséquent exprimée en μmoles de H_2O_2 consommées par minute et par mg de protéines totales ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg Prot}$).

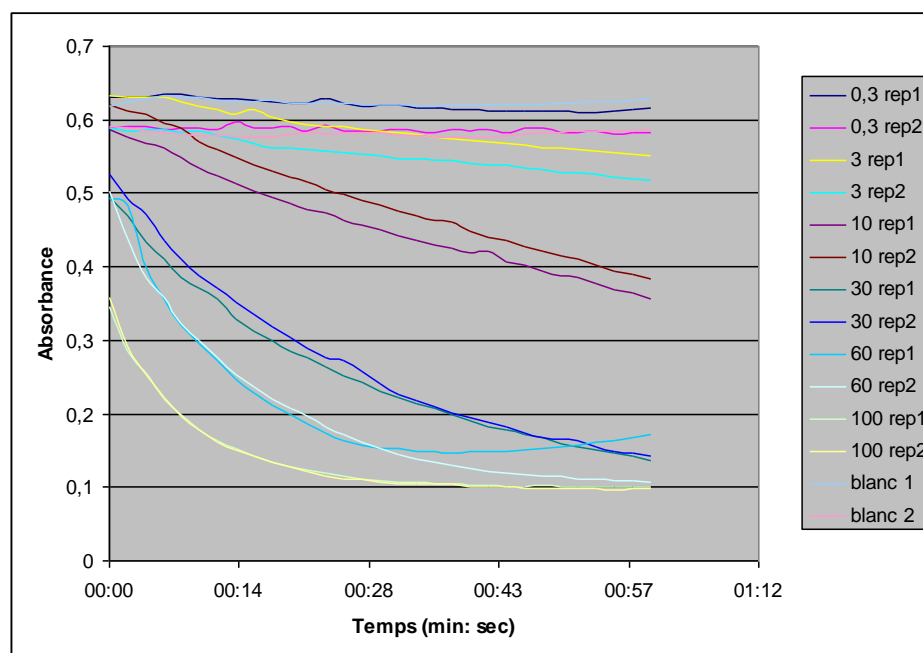
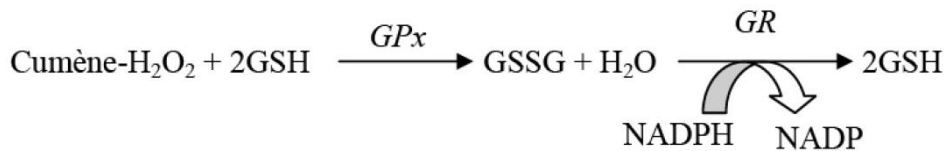


Figure 53 : Absorbances de différentes concentrations de catalase allant de 0 (blancs) à 100 U/ml en fonction du temps.

4.2.5. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPX)

La technique de dosage de la GPX retenue dans le cadre de ce travail est fondée sur celle utilisée par Elia et al. (2006, 2007). L'activité de cette enzyme est déterminée *via* la formation du glutathion oxydé (GSSG) à partir du glutathion réduit (GSH). Le système nécessite la présence d'un oxydant (cumène-H₂O₂) et de la glutathion réductase (GR) qui réduit le GSSG en oxydant le NADPH en NADP comme suit :



La mesure consiste donc à suivre par spectrophotométrie la disparition du NADPH à 340 nm à 25°C dans un mélange réactionnel formé par l'ajout: du tampon sodium-phosphate (100 mM, pH 7.5) contenant de l'EDTA (1 mM), du GSH (2mM), du NADPH (0.12 mM), la GR (1Unité/ml), du DL-dithiothreitol (1 mM) afin de stabiliser les enzymes contenant des groupements sulphydryles, de l'hydroperoxyde de cumène (0.8 mM) et d'un volume de l'échantillon ou du tampon pour les blancs qui complètent le volume total (1 ml). Une mise au point du dosage de la GPX a été réalisée au préalable afin de déterminer la bonne dilution des échantillons. Cette mise au point consistait à détecter une décroissance de l'absorbance significativement différente de celle des blancs en testant différentes dilutions. Il s'est avéré qu'une dilution de 1/12.5 était nécessaire pour les fractions S₁₀₀ (**Figure 54**). Dans le cas de ce dosage, le coefficient d'extinction molaire est de 6.22 mM⁻¹. cm⁻¹. L'activité de la GPX a été ainsi calculée en appliquant la loi de Beer-Lambert (($\Delta A_{\text{échantillon}} - \Delta_{\text{blancs}}$) / ϵl) puis multipliée par le facteur de dilution et enfin normalisée par rapport à la concentration des protéines totales dans la fraction S₁₀₀ correspondante et en conséquent exprimée en μmoles de NADPH consommées par minute et par mg de protéines totales (nmoles/min/mg Prot).

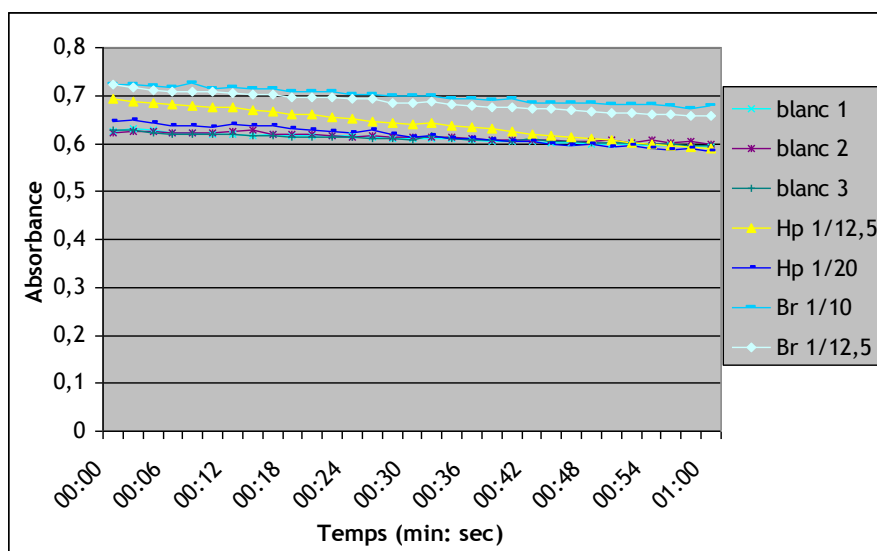
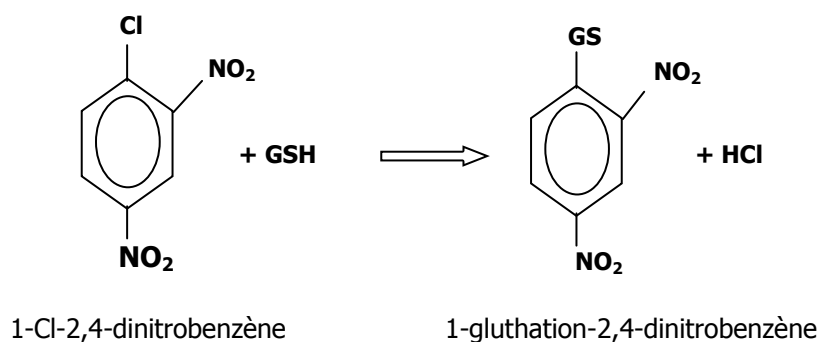


Figure 54 : Mise au point du dosage de la GPX : suivi de l'absorbance de blancs et des fractions S100 des hépatopancréas (Hp) et des branchies (Br) en fonction du temps.

4.2.6. Dosage de l'activité de la glutathion S transférase (GST)

L'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase a été mesurée selon la méthode utilisée par Elia et al. (2006, 2007). L'activité de cette enzyme est déterminée *via* la formation du 1-gluthation-2,4-dinitrobenzène qui sert de chromophore à la longueur d'onde de 340 nm (à 25°C) à partir du 1-Cl-2,4-dinitrobenzène (CDNB) comme il suit :



Le mélange de réaction contenait ($V_{\text{total}} = 1\text{ml}$): du tampon sodium-phosphate (100mM, pH 6.5), du CDNB (1mM), du glutathion réduit (GSH) (1mM) et un volume d'échantillon ou de tampon pour les blancs. Une mise au point du dosage de la GST a été réalisé au préalable afin de déterminer la bonne dilution des échantillons. Cette mise au point consistait à détecter une augmentation de l'absorbance significativement différente de celle des blancs en testant différentes dilutions. Il s'est avéré qu'une dilution de 1/100 était au moins nécessaire pour les fractions S_{100} des hépatopancréas et des branchies (**Figure 55**). Dans le cas de ce dosage, le coefficient d'extinction molaire est de $9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. L'activité de la GST a été ainsi

calculée en appliquant la loi de Beer-Lambert ($(\Delta A_{\text{échantillon}} - \Delta A_{\text{blancs}}) / \epsilon l$) puis multipliée par le facteur de dilution et enfin normalisée par rapport à la concentration des protéines totales dans la fraction S₁₀₀ correspondante et en conséquent exprimée en μmoles de 1-gluthation-2,4-dinitrobenzène formées par minute et par mg de protéines totales ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg Prot.}$).

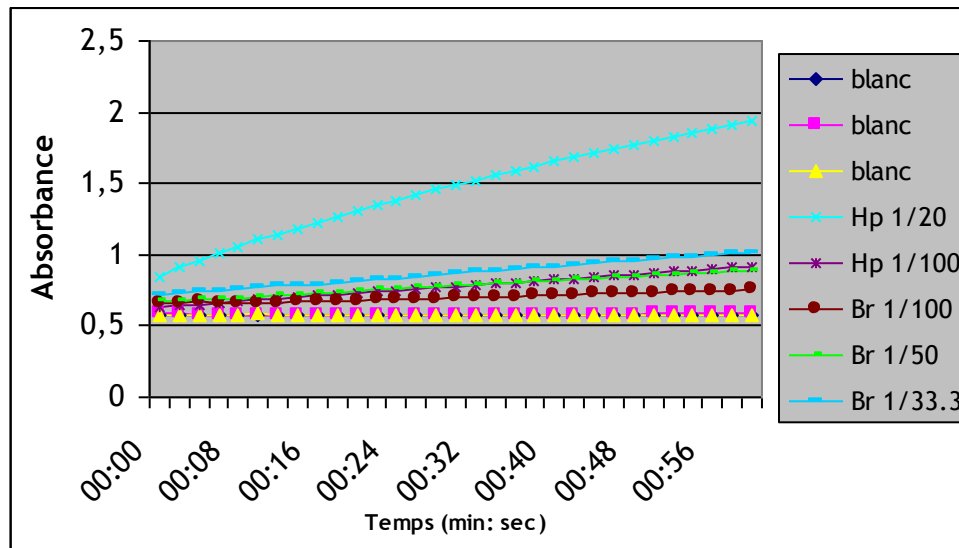


Figure 55 : Mise au point du dosage de la GST: suivi de l'absorbance des blancs et des fractions S100 des hépatopancréas (Hp) et des branchies (Br) en fonction du temps.

4.3. Expression des gènes

La définition d'amorces permettant d'amplifier des gènes par PCR quantitative est nécessaire pour l'étude de leur expression. Toutefois, le génome de *P. clarkii* n'est pas complètement séquencé et la séquence des gènes *mt* et *atp6* chez cette espèce n'a pas été identifiée auparavant. Une recherche et un séquençage des régions codantes de ces deux gènes ont donc dû être effectués.

4.3.1. Recherche et séquençage des régions codantes d'intérêt

La recherche des séquences des régions codantes d'intérêt a été effectuée par bioinformatique. Les séquences connues des gènes *mt* et *atp6* appartenant à d'autres espèces ont été rapatriées à partir de la banque de données ("GenBank" via pubmed-NCBI) puis alignées à l'aide du logiciel Custalw (Infobiogen). Sur la base de cet alignement, les régions les plus conservées ont été retenues pour la création de séquences consensus, c'est-à-dire celles qui ont les plus fortes probabilités d'être retrouvées identiques chez *P. clarkii*. Des

couples d'amorces ont alors été déterminées dans ces régions conservées et synthétisées (Sigma-proligo®).

La première étape pour séquencer les gènes consistait à extraire les ARN totaux (cf. 4.3.1.1) des tissus et de les rétro-transcrire en ADNc (ADN simple brin) (cf. 4.3.1.2). Une amplification de ces derniers par PCR classique (cf. 4.3.1.3) était ensuite réalisée, suivie d'une étape de vérification de la taille des fragments amplifiés en effectuant une électrophorèse en gel d'agarose (cf. 4.3.1.4) avec les produits-PCR. Cette étape permettait de comparer la taille de ces fragments à celle attendue de la région relativement conservée du gène d'intérêt. Les fragments présentant la taille attendue étaient alors purifiés (cf. 4.3.1.5) puis clonés (cf. 4.3.1.6) et enfin séquencés par l'entreprise Millegen biotechnologies.

4.3.1.1. Extraction des ARN totaux

Afin d'éviter toute contamination de l'échantillon par des ribonucléases (RNase) lors de l'extraction des ARN, le port de gants était obligatoire et l'eau utilisée pour la préparation des réactifs devait être auparavant traitée contre les RNase. Ainsi, du diéthylpyrocarbonate (DEPC) 0,1% (v/v) était ajouté à l'eau, le mélange était gardé pendant 12h à 37°C, puis autoclavé. De même, la paillasse devait être décontaminée (RNase away, Molecular BioProducts) et l'ensemble du matériel utilisé (tubes, potters...) lors de l'extraction des ARN devait être certifié « RNase free » par le fabricant ou décontaminé puis autoclavé.

Les ARN de l'écrevisse ont été extraits à l'aide de kit « Absolutely RNA RT-PCR miniprep kit » (Agilent) selon les recommandations du fournisseur (**Figure 56**). Un broyage de 20 à 40 mg de tissu a été effectué à l'aide d'un potter en polypropylène dans 600 µL de tampon de lyse contenant du thiocyanate de guanidine auquel était ajouté 4,2 µL de β-mercaptoéthanol pour inhiber les endonucléases dans les tissus. Cette étape a été suivie d'une élimination des principaux débris cellulaires. Pour cela, le broyat a été déposé sur une colonne de préfiltration et centrifugé 5 min à 14 100 g à température ambiante. Une étape d'élimination des protéines et des lipides des filtrats a ensuite été effectuée. Ainsi, du phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25:24:1) a été additionné au filtrat (à volume égal), puis agité à l'aide d'un vortex de paillasse et centrifugé pendant 10 min à 14 100g. La phase aqueuse contenant les ARN était prélevée puis additionnée à un volume égal d'éthanol 75%, le mélange était vortexé puis déposé sur une colonne d'affinité qui ne retient que les acides nucléiques (ADN et ARN). Cette étape était suivie d'une centrifugation des colonnes pendant 60 sec à 14 100 g puis d'une élimination du filtrat. Une série de lavages était ensuite effectuée grâce à des solutions fournies par le Kit. Le premier lavage se faisait par ajout de 600 µL d'une solution

faiblement concentrée en sels, suivi d'une centrifugation de 60 sec à 14 100g. Les ADN fixés à la colonne étaient dégradés par incubation avec 55 μL de solution de DNase I (Tampon d'activité + 5 unités de DNase I) pendant 15 min à 37°C. Les colonnes subissaient ensuite deux lavages, un premier avec 600 μL d'une solution fortement chargée en sels pour éliminer la DNase et les fragments d'ADN, le second avec 300 μL de tampon faiblement chargés en sels. Entre chaque lavage, une centrifugation de 60 sec à 14 100g était appliquée. La colonne était ensuite séchée par une centrifugation de 2 min puis transférée dans un tube neuf et incubée 2 min à température ambiante avec 30 μL de tampon d'éluion. Enfin, les ARNs purifiés étaient récupérés par centrifugation (60 sec, 14 100 g) puis rétro-transcrits. Notons que ces derniers pouvaient être stockés à -80°C si la rétro-transcription n'était pas effectuée immédiatement.

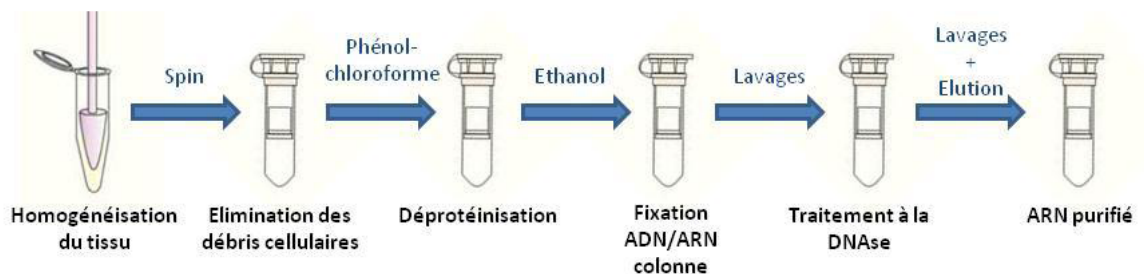


Figure 56 : Extraction des ARN totaux (source: Absolutely RNA RT-PCR miniprep kit).

4.3.1.2. Rétro-transcription

L'ARN a été rétro-transcrit en ADNc à l'aide du kit «Stratascript first strand synthesis system » (Agilent). Le mélange réactionnel était constitué de 2 μL de tampon d'activité 10X, additionné d'1 μL de dNTP (100 mM), de 14 μL d'ARN totaux et des amorces (1 μL oligodT : 0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ et 1 μL hexaprimers : 0.1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) (**Figure 57**). L'ensemble était incubé 5 min à 65°C dans un thermocycleur (Mastercycler, Eppendorf) afin de linéariser les ARN puis refroidi progressivement jusqu'à 42°C ce qui permet aux amorces de se fixer sur les ARN. Enfin, 0.5 μL de RNase block (40 U. μL^{-1}) et 1 μL de Reverse-transcriptase (RT) étaient ajoutés puis les tubes étaient incubés 1 heure à 42°C pour permettre la rétro-transcription. Les ADNc obtenus étaient conservés à -20°C jusqu'aux étapes de PCR.

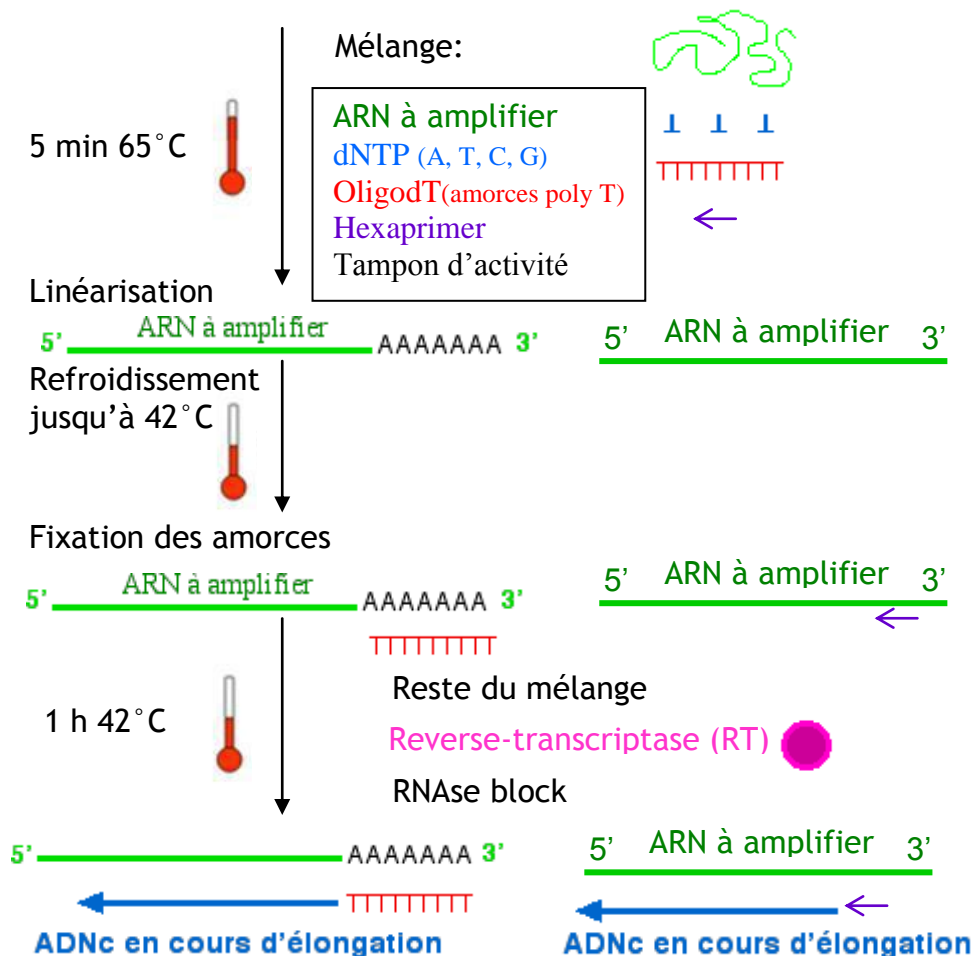


Figure 57 : Schéma simplifié de la rétro-transcription(source: S.AL.K/IRSN/CNRS).

4.3.1.3. PCR classique

Le mélange réactionnel permettant d'effectuer une PCR classique est constitué de 2 μL d'ADNc, 0.5 μL de chaque amorce à 100 μM , 1 μL de dNTP à 10 mM, 3 μL de MgCl_2 à 25 mM (cofacteur de la *Taq* polymérase), 5 μL de tampon d'activité 10X, 37.8 μL d'eau et 0.2 μL de *Taq* polymérase à 5 u. μL^{-1} (Promega). Cette dernière permet de synthétiser de façon fidèle un brin complémentaire à partir d'une matrice ADN présente dans l'échantillon amplifiant ainsi l'ADN. L'ensemble a été placé dans un thermocycleur (Mastercycler, Eppendorf) qui réalise plusieurs cycles de PCR. Chaque cycle comportait 3 étapes successives:

- A. La dénaturation de l'ADN : séparation des deux brins complémentaires par une élévation de la température à 95°C pendant 30 secondes à 1 minute.
- B. L'hybridation : fixation des amorces au niveau des régions spécifiques, encadrant le segment à amplifier. La durée de cette étape est de 30 sec et la température est définie au cas par cas car elle dépend du T_m (température de fusion) du couple d'amorces utilisées (comprise généralement entre 42 et 65°C).

C. L'élongation : synthèse du brin complémentaire par la *Taq* polymérase pendant 1 minute à 72°C (**Figure 58**).

Ce cycle est répété entre 30 et 50 fois, et en fin de réaction une étape de 10 min à 72°C permet à l'enzyme de finaliser les élongations des brins d'ADNc.

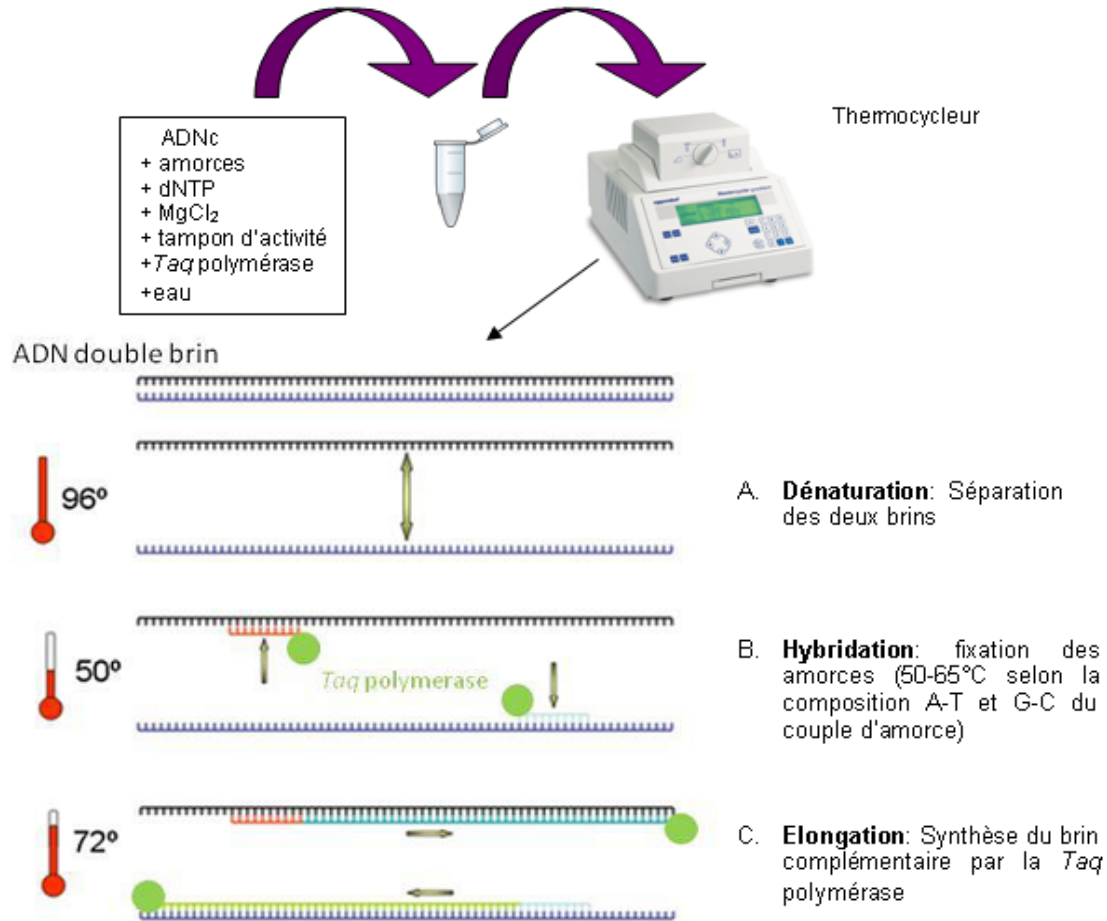


Figure 58 : Principe d'un cycle de PCR classique(source: S.AL.K/IRSN/CNRS).

4.3.1.4. Electrophorèse

La taille des amplifiats de PCR est vérifiée sur gel d'agarose 1 % (p/v). Ce dernier a été réalisé par dissolution d'une poudre d'agarose dans du tampon TAE 1X (Tris base à 40 mM + acide acétique à 5.7 % + Na₂EDTA.2H₂O à 2 mM) par chauffage aux micro-ondes. 2 µL de bromure d'éthidium (10 mg.mL⁻¹, agent intercalant de l'ADN) ont été ensuite introduits à ce mélange. Une fois solidifié, le gel a été plongé dans une cuve électrophorétique contenant un bain de TAE 1X. 20 µL d'amplifiat de PCR mélangés à 5 µL de tampon de charge ont été déposés dans un puits. Un champ électrique de 100 volts a alors été appliqué pendant 20 à 40 minutes, puis le gel a été transféré sous une lampe à UV. Sous cette lumière, le BET fluoresce et permet de révéler les différents fragments d'ADN (**Figure 59**).

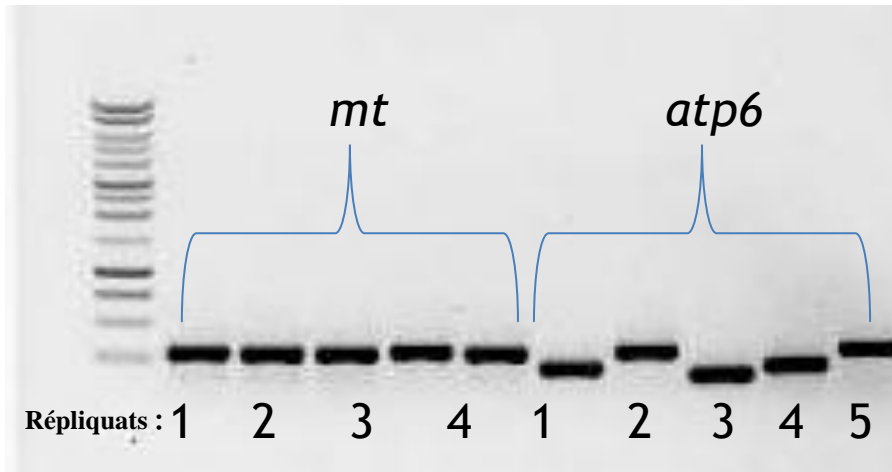


Figure 59 : Gel d'agarose renfermant les ADN d'intérêt.

4.3.1.5. Purification des fragments d'intérêt

La purification des fragments d'intérêt s'est faite à partir de l'amplifiat de PCR à l'aide du kit « QIAquick PCR amplification extraction kit » (Qiagen), selon les recommandations du fournisseur. Cinq volumes de tampon PB ont été ajoutés sur l'amplifiat PCR, puis l'ensemble a été déposé sur une colonne d'affinité retenant les acides nucléiques puis centrifugé 60 secondes à 14 100 g. Le filtrat obtenu a été jeté et un lavage a été effectué. Ce dernier consistait à ajouter 750 μ L de tampon PE suivi d'1 minute de centrifugation à 14 100 g. Cette étape était suivie d'un séchage de la colonne qui est réalisée grâce à une centrifugation (60 sec à 14 100 g) après s'être débarrassé du filtrat. Suite à cette étape, la colonne était transférée dans un nouveau tube de 1,5 mL et 30 μ L de tampon d'éluion (tampon EB) étaient déposés. Enfin, après 2 min d'incubation de la colonne avec le tampon EB à température ambiante, les fragments étaient récupérés par centrifugation (60 sec à 14 100 g) (**Figure 60**).



Figure 60 : Purification des fragments de gènes d'intérêts (source: QIAquick PCR amplification extraction Kit).

4.3.1.6. Clonage et transformation bactérienne

Le principe du clonage bactérien est d'isoler un fragment d'ADN en l'insérant dans un vecteur (ex : plasmide) capable de se multiplier dans les bactéries. L'insertion dans le vecteur est réalisée à l'aide d'enzymes de restriction qui permettent la linéarisation du vecteur (**Figure 61**).

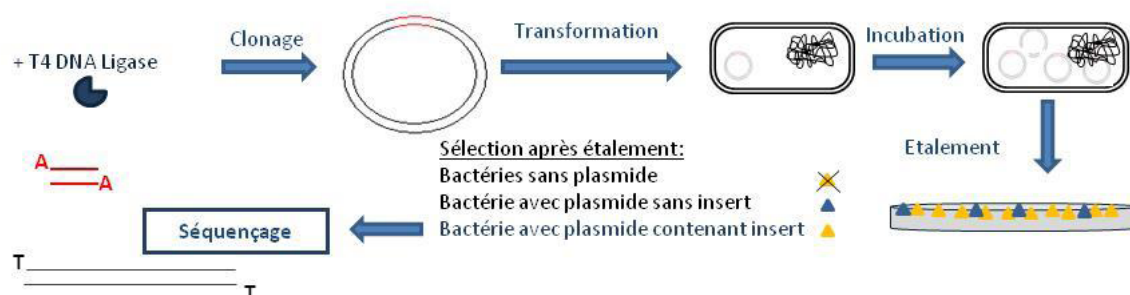


Figure 61 : Clonage et transformation bactérienne (Paul-Pont, 2010).

a. Insertion des fragments dans le vecteur

Le plasmide pGEMT, "pGEM®-T easy vector systems"(Promega®) a la capacité d'attribuer aux bactéries transformées la résistance à l'ampicilline (antibiotique) grâce à la présence du gène *Ampr*. Le pGEMT initialement linéaire, présente à chaque extrémité une base azotée « T » libre, complémentaire à la base azotée « A » libre ajoutée à chaque extrémité 3' du fragment amplifié par la *Taq* polymérase pendant la réaction de PCR. Les liaisons phosphodiester entre le fragment à cloner, appelés insert, et le vecteur sont créés à l'aide d'une enzyme particulière, la T4 DNA ligase issue du bactériophage T4. Le mélange réactionnel était constitué d'1 μL de plasmide ($50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 3 μL de fragment purifié, 1 μL de ligase ($3 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) et 5 μL de tampon 2X. L'ensemble était laissé 1 h à température ambiante puis une nuit à 4°C . Le mélange de ligation obtenu contenait à la fois des plasmides ayant intégré le fragment d'intérêt avec succès ainsi que des plasmides vides sans insert.

b. Transformation des bactéries

La transformation bactérienne consiste à mettre le mélange de ligation en présence de bactéries de façon à ce que le vecteur avec éventuellement l'insert pénètre dans la bactérie pour s'y multiplier. Les bactéries *Escherichia coli* thermo-compétentes « JM 109 competent cells, high efficiency », Promega® sont capables d'incorporer des vecteurs par choc thermique. Ces bactéries préalablement stockées à -80°C étaient lentement décongelées sur glace. 50 μL de bactéries étaient ajoutés à 2 μL du mélange de ligation. L'ensemble était gardé dans la glace pendant 20 min, puis soumis à un choc thermique en l'incubant 45 s à

42°C. Le mélange était replacé immédiatement après dans la glace pendant 2 min, puis 950 µL de milieu de culture liquide LB (milieu LB, Luria Bertani) étaient ajoutés à l'ensemble. Cette étape était suivie d'une incubation du mélange 1 h à 37°C. Ceci permettait aux bactéries d'exprimer le plasmide et ainsi acquérir la résistance à l'ampicilline. Finalement, 200 µL de cette suspension bactérienne étaient étalés sur milieu LB solide contenant de l'ampicilline (LB-Amp - 100 µg.mL⁻¹). Sur ce milieu solide, seules les bactéries ayant incorporé et exprimé le pGEMT parviennent à croître et former une colonie.

Les bactéries peuvent ne pas avoir reçu de vecteurs après transformation. Il faut donc pouvoir distinguer les bactéries ayant incorporé les vecteurs de celles qui n'ont pas réussi. Cette distinction, appelée sélection, a été obtenue à l'aide de gènes particuliers apportés par le vecteur. En effet, le site d'insertion de l'insert est situé à l'intérieur du gène de la β-galactosidase. L'insertion coupe donc ce gène qui ne fonctionnera plus. Il est donc possible de distinguer les vecteurs qui ont inséré un fragment d'ADN de ceux qui n'ont rien inséré mais se sont re-circularisés à l'aide de la ligase, simplement en testant le fonctionnement de la β-galactosidase. Ceci a été réalisé en additionnant au milieu de culture des bactéries un substrat de l'enzyme (Xgal - 20 µg.mL⁻¹) qui, lorsque celle-ci fonctionne, est transformé en un produit qui colore les colonies bactériennes en bleu. Ainsi les colonies ayant incorporé un plasmide vide étaient colorées en bleue, contrairement à celles ayant incorporé un plasmide avec insert qui restaient blanchâtres.

Après une nuit d'incubation à 37°C, 10 colonies blanchâtres au minimum étaient isolément repiquées dans 10 tubes remplis avec 3 mL de milieu LB-Amp liquide, puis incubées une nuit à 37°C sous agitation. La vérification de la présence de l'insert dans le plasmide incorporé par les bactéries sélectionnées a été fait par une étape de PCR à l'aide d'amorces universelles présentes sur le plasmide (T7 et Sp6) puis révélation sur gel d'électrophorèse en fonction de la taille attendue.

Une fois les colonies contenant le plasmide avec l'insert d'intérêt repérées, 1 mL de la suspension bactérienne correspondante était fixé dans 100 µL de glycérol puis envoyé à une entreprise privée chargée du séquençage du fragment d'intérêt (MillGen).

4.3.2. PCR quantitative en temps réel

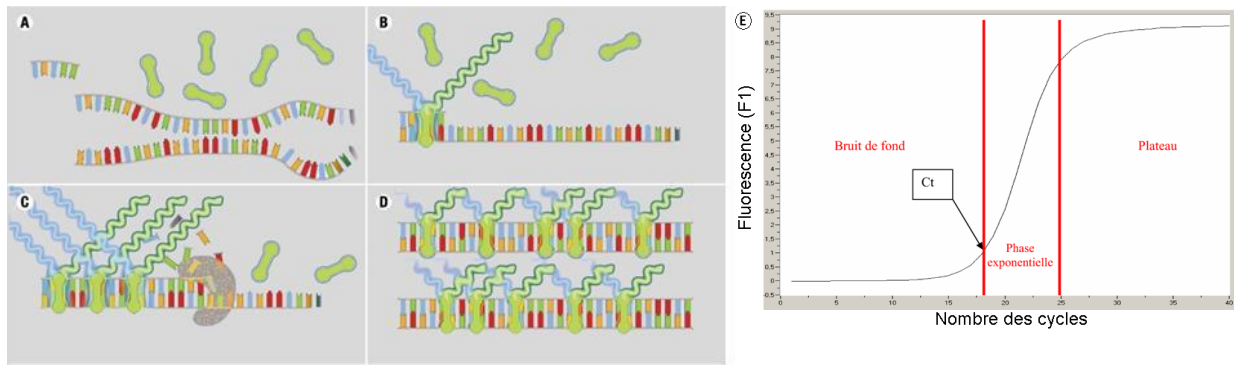
La PCR quantitative permet la détection et la quantification des produits amplifiés en temps réel en cours de réaction (**Figure 62**) grâce à l'utilisation du SYBR Green I. Ce dernier est un fluorochrome qui possède la propriété de s'intercaler entre les bases d'une séquence nucléotidique double brin et de fluorescer dans cette condition (λ 530 nm). L'intensité de la

lumière émise par ce fluorochrome est directement proportionnelle au nombre de copies du fragment amplifié. Durant cette étude, les PCR quantitatives ont été réalisées à l'aide du LightCycler (Roche Molecular Biochemicals). Ce thermocycleur est équipé d'un spectrophotomètre qui mesure la fluorescence émise par chaque échantillon à l'issue de chaque étape d'élongation. Les amorces complémentaires à la région étudiée ont été définies à l'aide du logiciel LightCycler Probe design (version 1.0, Roche) après qu'une partie de la séquence nucléotidique du gène ait été connue. Le mélange réactionnel réalisé dans des capillaires en verre, était formé d'1 μL de tampon 1b activé (tampon d'activité + SYBR Green + *Taq* polymérase + dNTPs), 3,2 μL de MgCl_2 à 25 mM, 2 μL d'amorces (sens et anti-sens) à 3 μM , 1 μL d'ADNc et 12,8 μL d'eau ultra-pure.

Le programme thermique commençait par une étape préalable d'activation de l'enzyme de 10 min à 95°C, suivie de la répétition de 50 cycles d'amplification (95 °C, 5 s ; 60 °C, 5 s et 72 °C, 20 s). En fin de réaction, la spécificité de la PCR était analysée par réalisation d'une courbe de fusion. En effet, chaque produit d'amplification était caractérisé par une température de fusion (T_m) qui dépend de sa composition en bases G et C et qui lui est donc propre. La courbe de fusion était obtenue par le suivi de la fluorescence du SYBR Green I durant le chauffage progressif allant de 60 à 95 °C. Les T_m étaient déterminées par analyse de la perte de la fluorescence lorsque les deux brins se séparent.

En plus des gènes étudiés, un contrôle endogène était systématiquement amplifié. Dans notre cas, le gène de référence choisi était le gène *18S*. Pour chaque échantillon analysé, le nombre de copies d'ADNc du gène d'intérêt a d'abord été normalisé par rapport au nombre de copies d'ADNc du *18S* avant d'être utilisé pour comparer l'expression des gènes d'intérêt chez les individus. Notons que nous avons aussi testé l'expression du gène codant pour l'actine, cependant l'expression du gène *18S* s'est révélé être plus stable.

Les facteurs d'induction et de répression des gènes ont été déterminés par la méthode $2^{-\Delta\text{Ct}}$ décrite par Livak et Schmittgen (2001) où ΔCt est la différence entre le cycle de sortie (Ct) du gène d'intérêt et le cycle de sortie du gène de référence. Notons que le Ct est obtenu à partir de la courbe de fluorescence en fonction du nombre des cycles. C'est le point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond et apparaît en début de la phase exponentielle. Enfin, pour chaque gène étudié, la valeur moyenne de l'expression du gène déterminée chez les individus contaminés a été comparée avec celle observée chez les témoins pour ce même gène.



- A. Dénaturation:** Séparation des 2 brins par augmentation de la température (96°C). Le SYBR Green en solution émet peu de fluorescence.
- B. Hybridation:** Fixation des amorces et intercalation du SYBR Green entre les 2 brins d'ADN. Légère émission de fluorescence.
- C. Elongation:** Synthèse du brin complémentaire par la *taq* polymérase avec incorporation progressive du SYBR Green augmentant ainsi la fluorescence. Le signal de fluorescence est mesuré par le thermocycleur à la fin de chaque phase d'élongation.
- D. Cycle après cycle:** Augmentation du signal de fluorescence à chaque cycle en relation avec l'augmentation d'ADNc synthétisé.
- E. Evolution de la fluorescence en fonction du nombre de cycle de PCR**



Figure 62 :Principe général de la PCR quantitative en temps réel (d'après Paul-Pont, 2010).

Chapitre III

Etude de l'impact du cadmium sur la survie, l'histologie, les mitochondries et les antioxydants chez P. clarkii.

Mitochondrial gene expression, antioxidant responses, and histopathology after cadmium exposure.

Simone Al Kaddissi^{1;2}, Alexia Legeay², Antonia Concetta Elia³, Patrice Gonzalez², Magali Floriani¹, Isabelle Cavalie¹, Jean-Charles Massabuau², Rodolphe Gilbin¹ and Olivier Simon¹.

¹Laboratory of Radioecology and Ecotoxicology (LRE), Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN), Bd 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-Lez-Durance, France.

²Laboratory of Aquatic Ecotoxicology (EA), University of Bordeaux 1/UMR CNRS 5805, Dr Peyneau square, 33120 Arcachon, France.

³Ecotoxicology Laboratory, Department of Cellular and Environmental Biology, University of Perugia, 06123 Perugia, Italy.

Abstract

The present study is the first that focuses on the elucidation of cadmium effects on the transcription of mitochondrial genes of *Procambarus clarkii* after acute (0.05, 0.5, and 5 mg Cd/L; 4-10 days) and chronic exposures (10 µg/L; 30-60 days). Transcriptional responses of *cox1*, *atp6* and *12S* using quantitative real time RT-PCR were assessed in gills and hepatopancreas. Additionally, the expression levels of genes involved in detoxification and/or oxidative stress responses (*mt*, *sod(Mn)*) and enzymatic activities of antioxidants (SOD, CAT, GPX, GST) were analysed. The histopathological effects in hepatopancreas of crayfish were evaluated by light microscopy. Relationships between endpoints at different levels of biological organisation and Cd bioaccumulation were discussed. Results show that molecular responses can vary depending on the intensity and duration of the chemical stress applied to the organisms and that the study of *mt* gene expression levels seemed to be the best tool to assess Cd intoxication.

Keywords: Cadmium, gene expression levels, histology, metallothionein, mitochondria, oxidative stress, crayfish, molecular responses, biomarker, enzymatic activities.

1. Introduction

Cadmium (Cd) is present naturally in rivers and lakes at concentrations inferior to 0.1 µg/L and is believed to be one of the most abundant and ubiquitously distributed toxins in the aquatic system (Novelli et al., 2000; Pinot et al., 2000). This heavy metal is principally obtained as a by-product in zinc refining (Pinot et al., 2000) and is also found in phosphate fertilizers (Cupit et al., 2002). It is mainly used in industrial production of batteries, plastic, alloys, and synthetic materials (Thornton, 1992). Cd is released to the aquatic environment from both anthropogenic sources, such as industrial and urban effluents, agricultural runoffs, and natural sources, such as rocks and soils (Choi et al., 2007). In France some streams suffer from anthropogenic Cd contamination, for example the Riou Mort stream can show a mean annual concentration of 22 µg/L of Cd (Morin et al., 2007).

Major programs of freshwater safeguard have studied the deleterious impacts of Cd at the ecosystem, community or population levels of organization (Brooks et al., 2004; Issartel et al., 2010; Morin et al., 2007). However, the molecular mechanism responsible for toxic effects of Cd is far from being completely understood (Amara et al., 2009; Casalino et al., 2002). A number of mechanisms of Cd toxicity have been suggested, including ionic and molecular mimicry (Bridges and Zalups, 2005), interference with cell adhesion and signalling (Thompson et al., 2005), inhibition of energy metabolism (Cannino et al., 2009; Muller, 1986; Tang and Shaikh, 2001), oxidative stress (Gonzalez et al., 2006; Jia et al., 2010; Stohs et al., 2001; Wang and Wang, 2009; Wang et al., 2010), apoptosis (Risso-De Faverney et al., 2004), genotoxicity (Vandegheuchte et al., 2009) and cell-cycle disturbance (Yang et al., 2004). The severity of these effects seemed to be dependent on the resistance of the biological model considered and influenced by the conditions of exposure (duration and concentration) to the contaminant.

These responses to Cd were observed in various organisms but studies conducted on crustaceans are scarce. *Procambarus clarkii* was used in this study as a model to analyse Cd effects on crayfish health because this species is the most cosmopolitan crayfish around the world and is able to tolerate extreme and polluted environments (Gherardi, 2006). Moreover, *P. clarkii* has been used as indicator of metal pollution in numerous studies of aquatic environments and is known to be suitable for toxicology and risk assessment studies since it tends to accumulate metals such as Cd in its tissues (Anderson et al., 1997; Alcorlo et al., 2006; Sánchez López et al., 2004; Suárez-Serrano et al., 2010). Many biomarkers had been suggested to assess Cd contamination in the environment. The responses of stress proteins such as metallothioneins (MT) and antioxidant enzymes are the most commonly used markers

of Cd intoxication in crustaceans (Amiard et al., 2006, Downs et al., 2001, Lei et al., 2011, Ma et al., 2008, Martín-Díaz et al., 2006, Wu and Chen, 2005). However, to our knowledge no study had focused on the elucidation of Cd effects on the transcription of mitochondrial genes, genes involved in oxidative stress responses and detoxification of the crayfish *P. clarkii*. These genes expression levels could provide detailed information about Cd mechanisms of toxicity in this species. In fact, transcriptomics provide a holistic overview of the molecular changes underlying biological processes affected by a toxicant without biases to anticipated pathways (Poynton et al., 2008). Discovery of perturbed pathways, whether these be directly related to the mode of action of the pollutant or downstream secondary stress responses, help to provide toxicity testing strategies toward relevant end points. Additionally, omic tools (such as gene expression levels) can potentially help screen for biomarkers of toxicity in ecotoxicological studies. However, linkage must be made between molecular responses and adverse outcomes on individuals (Poynton et al., 2011). The present study focused on the elucidation of the effects that Cd exerts on crayfish mitochondria after acute (0.05, 0.5, and 5 mg Cd/L for 10 days) and chronic exposures (10 µg/L for 60 days). Mitochondria are key intracellular targets for Cd due to their ability to accumulate this substance and because of the sensitivity of mitochondrial enzymes to Cd induced damage (Cannino et al., 2009; Liu et al., 2009; Pulido and Parrish, 2003; Valko et al., 2005). Because of the central role of mitochondria in critical cellular processes such as bioenergetics, redox signalling and cell death, Cd-induced mitochondrial damage could have long ranging consequences for cellular function, energy homeostasis and whole-organism performance and survival (Kurochkin et al., 2010). Herein, the molecular impact of Cd on the mitochondria was investigated in gills and hepatopancreas of *P. clarkii*. Consequently, transcriptional responses of few mitochondrial genes (*cox1*, *atp6* and *12S*) using quantitative real time RT-PCR were assessed as biomarkers of Cd toxicity. We also evaluated whether there was a response to oxidative stress and an attempt of detoxification to better understand the mechanisms of action of Cd. Therefore, expression levels of genes involved in oxidative stress responses and detoxification (*sod(Mn)* and *mt*) were analysed together with enzymatic activities of antioxidants such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione-S-transferase (GST). As genes of *P. clarkii* encoding for these antioxidants are not sequenced, the investigation of oxidative stress induction had to be done by following the enzymatic activities. Histopathological effects in hepatopancreas of crayfish were evaluated by light microscopy to investigate whether the structural integrity of cells was challenged. The survival rates of crayfish after the different types of exposures were

also assessed. Relationships between endpoints were further discussed in the attempt of linking the effects on different levels of biological organisation between each others. The Cd bioaccumulation levels were also examined in both organs and correlated to the biological responses.

2. Materials and methods

2.1. Biological model and acclimatization

Adults intermoult males *P. clarkii* were collected from the Viguerat swamp of Camargue in the south of France and were acclimatized three weeks to experimental conditions. They were maintained under a 12/12h light/dark photoperiod in synthetic water at $17 \pm 1^\circ\text{C}$ (water composition: $\text{Ca}^{2+} = 1640$; $\text{Mg}^{2+} = 500$; $\text{Na}^{2+} = 870$; $\text{K}^{+} = 80$; $\text{Cl}^{-} = 4100$; $\text{SO}_4^{2-} = 509$; $\text{NO}_3^{-} = 76.5$; $\text{HCO}_3^{-} = 281$ all in $\mu\text{mol/L}$; $\text{pH} 6.6 \pm 0.3$). Freshwater ionic constitution was chosen to maintain low levels of nitrates and to assure an absence of any non essential trace metal in water. This ionic composition also meets crayfish physiological needs (Al Kaddissi et al., 2011, 2012). The use of synthetic water was essential to maintain constant and similar concentrations of ions throughout the experiments and in all conditions of exposure.

2.2. General experimental protocol for acute exposure

The ASTM standard guide lines for conducting acute toxicity tests on macroinvertebrates were respected (ASTM E729, 1996). Thus, male intermoult crayfish ($27.2 \pm 5\text{g}$; $9 \pm 0.5\text{ cm}$ from cephalothorax to telson; $n=50$) were starved 48 h before the beginning of the experiment. In each treatment tank a group of ten crayfish was submerged in 6 L of test solution (three times the height of the test organisms, following ASTM E729-96 recommendations). Groups were exposed to 0 (control), 0.05 ($0.44\mu\text{M}$), 0.5 ($4.45\mu\text{M}$), and 5 mg Cd/L ($44.5\mu\text{M}$) (from CdCl_2 , stock solution, 1g/L). Ionic concentrations of the medium (i.e. Cl⁻) were adapted for each condition of exposure to remain constant after Cd addition. Every single specimen was kept in an individual chamber (cylinder made from plastic netting: 1cm mesh, 11cm diameter) to avoid cannibalism. Crayfish's mortality was checked regularly. Half of the water column was renewed manually on a daily basis in order to maintain stable water composition and contamination levels. Cd water concentrations were measured before and after the renewal and adjusted to assure mean values significantly close to nominal concentrations (**Table 12**, see below for metal quantification). The temperature was maintained at $17.2 \pm 0.4^\circ\text{C}$ and the pH was monitored daily ($\text{pH}: 7.01 \pm 0.24$). The concentrations of the major ions in water (NO_3^{-} , NO_2^{-} , Cl^{-} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) were checked by an

Ion Chromatography System (ICS-3000) during the experiment and were significantly identical to the desired concentrations already mentioned above.

Table 12: Nominal and measured Cd ($\mu\text{g/L}$) concentrations in water throughout the acute (n=20) and chronic (n= 60) experiments. Cd bioaccumulation ($\mu\text{g/g DW}$, mean \pm SEM, n= 4 to 5 in each treatment condition) in gills and in hepatopancreas of the crayfish *P. clarkii* after 4, 10, 30 and 60 days exposure to Cd (10 to 5000 $\mu\text{g/L}$).

	Nominal Cd concentrations in water ($\mu\text{g/L}$)	Measured Cd concentrations in water ($\mu\text{g/L}$)	Cd bioaccumulation in gills ($\mu\text{g/g DW}$)		Cd bioaccumulation in hepatopancreas ($\mu\text{g/g DW}$)	
			T4	T10	T4	T10
Acute exposure	0	0	0.20 \pm 0.02 (n=5)	0.57 \pm 0.12 (n=5)	0.70 \pm 0.12 a (n=5)	0.80 \pm 0.21 c (n=5)
	50	43 \pm 2	23.80 \pm 9.80 (n=5)	12.13 \pm 1.77 (n=4)	1.78 \pm 0.44 ab (n=5)	2.26 \pm 0.58 c (n=4)
	500	523 \pm 13	107.76 \pm 23 (n=5)	89.76 \pm 21.69 (n=5)	4.55 \pm 1.60 b (n=5)	15.11 \pm 2.89 * (n=5)
	5000	5 190 \pm 680	348.57 \pm 75 (n=4)	460.87 \pm 234 (n=4)	53.67 \pm 10.8 (n=4)	199.30 \pm 60 * (n=4)
Chronic exposure	0	0	T30 0 \pm 0 (n=5)	T60 0.06 \pm 0.06 (n=5)	T30 1.28 \pm 0.21 (n=5)	T60 1.95 \pm 0.23 (n=5)
	10	10.34 \pm 0.48	4.42 \pm 0.97 (n=5)	2.88 \pm 1.28 (n=5)	12.53 \pm 5.28 (n=5)	23.54 \pm 6.58 (n=5)

(a,b,c,) Means of each sampling time designated with the same letters are not significantly different ($P > 0.05$).

(*) Significant difference between the bioaccumulation at day 4 (T4) and day 10 (T10) ($P < 0.05$).

2.3. General experimental protocol for chronic exposure

Male intermoult crayfish ($22 \pm 0.9\text{g}$; $9 \pm 0.1\text{cm}$ from cephalothorax to telson; n=30) were fed every two days around 0.1g/individual of commercial trout pellets (tested basal Cd concentration in pellets= $0.28 \mu\text{g Cd/g} \pm 0.04$). Groups of ten crayfish of the same sex were exposed to 0 (control) and 10 $\mu\text{g Cd/L}$ for 60 days. Twenty five percent of the water column was renewed daily by a continuous flow-through technique. A large volume of each test solution (0 and 10 $\mu\text{g/L}$) was prepared once a week, solutions flowed through the respective tanks containing crayfish constantly. Cd concentrations in the water column was measured once daily and adjusted if necessary to assure a constant contamination pressure. Crayfish were also isolated in chambers (cylinder made from plastic netting: 1cm mesh, 11cm diameter) to avoid death by cannibalism. Temperature was maintained at $17^\circ\text{C} \pm 0.07$, pH was monitored every day (pH: 6.2 ± 0.05) and ionic concentrations were verified twice a week by

ICS-3000 (NO_3^- , NO_2^- , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} concentrations were stable and equal to the desired levels already mentioned).

2.4. Tissues sampling and preparation

At days 4 (T4), and 10 (T10) of the acute exposure and at days 30 (T30) and 60 (T60) of the chronic experiment, four to five living crayfish were randomly sampled and sacrificed. For all sampling time and all exposure conditions, the hepatopancreas and the gills were collected from each individual and divided into two parts. One part was divided in several aliquots and then conserved at -80°C for further bioaccumulation, gene expression and enzymatic activity analyses. The second part was directly prepared for microscopic analyses.

2.5. Metal quantification

Water samples from each tank were acidified by nitric acid (3.1 mM of HNO_3) prior to metal quantification. Hepatopancreas and gills were first dried at 45°C over two days, digested in 3ml of HNO_3 (15.5 M) for 90 min at 95°C and then left to dry for 60 min at 105°C . Afterwards, 2ml of H_2O_2 (30%) were added to complete the digestion and were then dried again for 20 min at 105°C . Samples were finally dissolved in acidified water (0.2% of HNO_3 15.5M) before analysis. Samples were measured for Cd by atomic absorption spectrophotometry using a graphite furnace (4110 ZL; Perkin-Elmer; detection limit: 0.4 $\mu\text{g/L}$). The analytical method was validated by analyzing standard biological reference materials (TORT-2: $26.7 \pm 0.6 \mu\text{g Cd/g}$, Lobster hepatopancreas; DOLT-2: $20.8 \pm 0.6 \mu\text{g Cd/g}$, Dogfish liver; NCR/CRNC, Ottawa, Canada).

2.6. Total RNA extraction, reverse transcription of RNAs and Real-time quantitative PCR

Total RNA were extracted from 20 to 40 mg of tissue using the “Absolutely RNA Miniprep kit” (Agilent), according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from total RNA using the Stratascript First-Strand Synthesis System (Agilent) according to the manufacturer's instructions. The cDNA mixture was conserved at -20°C until needed. Real-time PCR reactions were performed in a Light Cycler (Roche) following the manufacturer's instructions using the DNA intercalating dye SybrGreen I. The amplification program consisted of one cycle at 95°C for 10 min and 50 amplification cycles at 95°C for 5s, 60°C for 5s, and 72°C for 20s. Specific primer pairs used to determine target genes expression levels are listed in **table 13**. PCR specificity was determined for each reaction from the

dissociation curve of the PCR product. This dissociation curve was obtained by following the SybrGreen fluorescence level during a gradual heating from 60 to 95 °C. Relative quantification of each gene expression level was normalized according to the *18S* gene expression, a housekeeping gene. Relative expression of a gene was generated using the $2^{-\Delta CT}$ method as described by Livak and Schmittgen (2001) where ΔCT represents the difference between the cycle threshold of specific gene and the cycle threshold of the *18S*. Therefore, the Expression's factor (EF) of each gene in comparison with control corresponds to the following equation: $EF=2^{-\Delta CT}(\text{Treatment})/2^{-\Delta CT}(\text{Control})$.

Table 13: Gene names, accession numbers, specific primer pairs used in the quantitative PCR analysis of the six studied genes of *P. clarkii* and their function.

Gene	Primers (5'-3')	Function and accession number
<i>cox1</i> : Cytochrome C oxydase subunit 1 (complex IV).	AATGGGATACCTCGACGTTATTCA (a) GCAGGAGGATAAGAATGCTGT (b)	Encoding for an enzyme in the inner membrane of mitochondrion that helps establish a transmembrane gradient of protons. AY701195.1
<i>atp6</i> : ATP syntase subunit 6 (complex V).	GGCAGCAAATATAAATTGCTGG (a) TTGCAACGGCAGATTCTAATAT (b)	Encoding for an enzyme in the inner membrane of mitochondrion that uses the gradient of protons created by other complexes to synthesize ATP. GU220369.1
<i>12S</i> : Ribosomal RNA 12 S.	ACTAGAATATTAGGAGTTATGTTCTT(a) GCTGCACCTTGATCTAATATAC (b)	Indicator of the amount of mitochondria in cells. EF012280.1
<i>Sod(Mn)</i> : Mitochondrial Mn-Superoxyde dismutase.	GCCACCACTAAAATACGAGTA (a) CCATTGAACTTTATAGCTGGTA (b)	Encoding for an enzyme involved in the fight against oxidative stress. EU254488.3
<i>mt</i> : Metallothionein.	CGAGGGCGGGTGCAAGACT (a) CTTGGAGCAGGTCTTGGCAC (b)	Encoding for MT protein involved in detoxifying Cd and in the protection against reactive oxygen species. GU220368.1
<i>18s</i> : 18S ribosomal RNA.	GCAATAACAGGTCTGTGATGCC (a) AGGGACGTAATCAGCGCAA(b)	House keeping gene. X90672.1

^(a) Forward primer. ^(b) Reverse primer.

2.7. Enzymatic activities analysis

Enzymatic activities were determined in the cellular cytosolic fractions of tissues sampled from the chronic exposure experiment to help understand the implication of cellular stress on the functioning of mitochondria. Thus gills and hepatopancreas of each individual were homogenized respectively in a 1:10 and 1:20 weight: volume (W/V) proportion in ice cold Tris-HCl (100mM, pH 7.8) buffer containing 100 μ M phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 0.008 aprotinin U/ml and 0.1mg/ml of bacitracin. An aliquot of each homogenate was centrifuged at 15000g for 30 min at 4°C, supernatants were further centrifuged at 100000g for 1h at 4°C. SOD was determined spectrophotometrically using the “19160 SOD determination kit” (Fulka) according to the manufacturer's instructions. The absorbance was

read at 450 nm using a plate reader. SOD activity was expressed as U/mg prot. CAT activity was measured by following the decrease in absorbance (for 1 min) at 240 nm due to H₂O₂ consumption ($\epsilon = 0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The assay was carried out in Na-phosphate buffer (100mM, pH 7) and 12mM H₂O₂. GPX activity using cumene hydroperoxide as a substrate was determined and the oxidation of NaDPH was followed for 1 min at 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The assay condition was: 100mM Na-phosphate buffer with pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.12 mM NaDPH, 2 mM GSH, 1 mM DTT, 0.8 mM cumene hydroperoxide, and 1U of glutathione reductase. GST activity was measured with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate. The assay of the activity with CDNB measured the formation of the conjugate with GSH during 1 min at 340 nm ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The assay condition was: 100 mM Na-phosphate buffer with pH 6.5, 1 mM GSH and 1 mM CDNB. Protein concentration was determined using "Micro BCATM Protein Assay Kit" (Thermo scientific) according to the manufacturer's instructions. The absorbance was read at 562 nm using a plate reader. Biochemical analysis was performed with SOFTmax PRO spectrophotometer at constant temperature of 25°C.

2.8. Histological methods

Fresh tissues were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 48 h at 4 °C (Al Kaddissi et al., 2011), then washed 3 times for 5 min with 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.4), and then post-fixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h. Samples were subsequently dehydrated with successive baths of ethanol and propylene oxide and finally embedded in Epon 812 (TAAB). Embedded samples were cut in semi-thin sections of 200 to 500 nm and stained with aqueous blue toluidine. Sections were observed under a light microscope (Leica, DM 750) and images were taken and saved with a Leica camera ICC50 and a LAS EZ software.

2.9. Statistical analysis

Results are given as mean \pm the standard error of the mean (SEM). All analyses were done using the R language and environment for statistical computing (R Development Core Team, 2009). For all statistical results, a probability of $P < 0.05$ was considered significant. Survival rate was presented using Kaplan Meier's estimator (Kaplan, 1983). This method estimates the fraction of living organisms for a certain amount of time after treatment and takes into account "censored" data (i.e. losses of crayfish by sampling at T4 before the final outcome is observed at T10). The significant effects of factors (i.e. time and metals concentrations in

water) on bioaccumulation or on enzymatic activities were performed using analysis of variance (ANOVA), after checking assumptions of normality and variance homogeneity of residuals. Normality assumption was visually checked using quantile-quantile plot (QQplot) of standardized residuals versus normal quantiles. Variance homogeneity assumption was checked on residuals using standardized residuals versus fitted plot (Faraway, 2002). When the assumptions were not satisfied, a logarithmic data transformation was applied. If the assumptions were still not satisfied the Kruskal-Wallis non-parametric test was used. The relationships between individual metal concentration in organs and gene expression levels or enzymatic activities or Cd concentration in water were investigated using the non-parametric Spearman rank correlation test due to the non-linearity of the data ($R = \text{spearman's correlation coefficient}$).

3. Results

3.1. Survival rate

In the acute exposure experiment no mortality was recorded in the control group (0 mg/L). During the ten days period of contamination no mortality was observed among crayfish exposed to 0.5 mg/L of Cd, and only 20% and 33.3% mortality were detected in groups contaminated to 0.05 and 5 mg/L of Cd respectively. No mortality was observed among crayfish in the chronic exposure experiment after 60 days of exposure to 0 and 10 $\mu\text{g/L}$ of Cd.

3.2. Cd bioaccumulation in crayfish organs

Cd measured in gills and hepatopancreas are shown in **table 12** and expressed in dry weight of the tissues (DW).

In the acute exposure experiment, Cd bioaccumulation in tissues were found to be highly correlated with the increasing Cd concentrations in water (gills: $R = 0.94$, $P < 2.2 \cdot 10^{-16}$; hepatopancreas: $R = 0.87$, $P = 2.8 \cdot 10^{-13}$). In this experiment, Cd accumulation was not time dependent ($P = 0.073$) in gills, yet there was a significant increase in Cd concentrations in the hepatopancreas for crayfish exposed from 0.5 to 5 mg/L of Cd ($p < 0.05$) at T4 and T10. Gills accumulated more Cd than hepatopancreas both at T4 and T10 (T4: $P = 4.06 \cdot 10^{-8}$; T10: $P = 0.0053$). In the chronic exposure experiment, Cd bioaccumulation in tissues of exposed crayfish was significantly different from that of controls (gills: $P = 3.1 \cdot 10^{-6}$; hepatopancreas: $P = 1.3 \cdot 10^{-3}$) at T30 and T60. The metal accumulation was not time dependent in any organ ($P > 0.05$). Moreover, Cd concentrations in tissues were highly correlated with waterborne Cd

concentrations (gills: $R=0.91$, $P < 3.9 \cdot 10^{-8}$; hepatopancreas: $R= 0.76$, $P= 9.1 \cdot 10^{-5}$). However, in this experiment, hepatopancreas accumulated more Cd than gills at both times ($P < 0.05$).

In both experiments, accumulation levels in hepatopancreas do not seem to have reached a steady state, because concentrations in this organ were tending to increase over time even though statistically this was not significant in the chronic exposure experiment.

3.3. Gene expression levels and enzymatic activities

The expression of mitochondrial genes of tissues exposed to Cd seemed to be affected at T4 and T10 in the acute exposure experiment (**Table 14**). Mainly the results for both organs showed that *cox1* gene expression level decreased significantly with increasing Cd concentrations especially at T10. The *atp6* gene was highly up-regulated at all sampling times (ex: in gills, T4, 5 mg/L: +103 folds). The *mt* gene expression level increased with time and with increasing Cd concentrations (ex: in gills, T10, 5mg/L: +39 folds, in hepatopancreas, T10, 5mg/L: +11 folds). The *12S* gene expression level in gills decreased significantly at T4, but no difference was noted between contaminated crayfish and controls at T10. No decrease in the amount of mitochondria was observed in the hepatopancreas since *12S* was mostly up-regulated at both times. The *sod(Mn)* gene in gills was only up-regulated 2 fold at T10 when exposed to 0.05 mg/L of Cd, while in the hepatopancreas, *sod(Mn)* was significantly repressed in most conditions of Cd exposure at both sampling times.

Table 14: Expression factors (EF) of the five genes studied in *P. clarkii* compared to the basal level of controls (n= 4 to 5 in each treatment condition).

Organs	Cd treatment condition (mg/L)	<i>cox1</i>		<i>atp6</i>		<i>12s</i>		<i>sod(Mn)</i>		<i>mt</i>	
		T4	T10	T4	T10	T4	T10	T4	T10	T4	T10
Gills	0.05	2	2	14	2	/	/	/	2	/	25
	0.5	-2,5	-3	5	26	-9	/	/	/	/	8
	5	/	-3	103	2,5	-6	/	/	/	5	39
Hepatopancreas	0.05	-2	-6	8	/	/	/	-12	-5	/	/
	0.5	/	-3,5	80	18	3,5	2	/	-3,5	2	3
	5	-9	-2	183	13	3	2	-5,5	-3	14,5	11
Organs	Cd treatment condition (µg/L)	<i>cox1</i>		<i>atp6</i>		<i>12s</i>		<i>sod(Mn)</i>		<i>mt</i>	
		T30	T60	T30	T60	T30	T60	T30	T60	T30	T60
Gills	10	/	/	-2	3	-3	/	/	-3	5	9.5
Hepatopancreas	10	/	-2	-10	2	/	7	/	-4	3	2

^(/) Equal to control. ⁽⁻⁾ Down-regulated. ⁽⁺⁾ Up-regulated. Only $EF \geq 2$ or $EF \leq -2$ are considered statistically significant.

In the chronic exposure experiment *cox1* gene was repressed only about 2 fold in the hepatopancreas at the end of the experiment. The *atp6* gene was repressed in both organs at T30 then up-regulated at T60. The amount of mitochondria decreased significantly in the gills at T30 (*I2S*: -3 folds). The *I2S* gene expression level in these organs was not significantly different from that of controls at T60, indicating an increase in the amount of mitochondria with time until it reached a normal status. In the hepatopancreas an over-expression of the *I2S* gene was noted with time (/ at T30, +7 folds at T60). In contrast, *sod(Mn)* gene expression level decreased at T60 in all the studied tissues, while *mt* gene was over-expressed in all organs at T30 and T60.

Enzymatic activities were evaluated only in organs sampled from the chronic exposure experiment (**Figure 63**). No significant changes in activities of SOD, CAT nor GPX were recorded in presence of low concentrations of Cd even after 60 days of exposure. However, a decrease in GST activity was evidenced at the end of the experiment in the gills of crayfish ($P= 0.052$). Contaminated gills presented a 42.4% decrease in GST activity compared to controls.

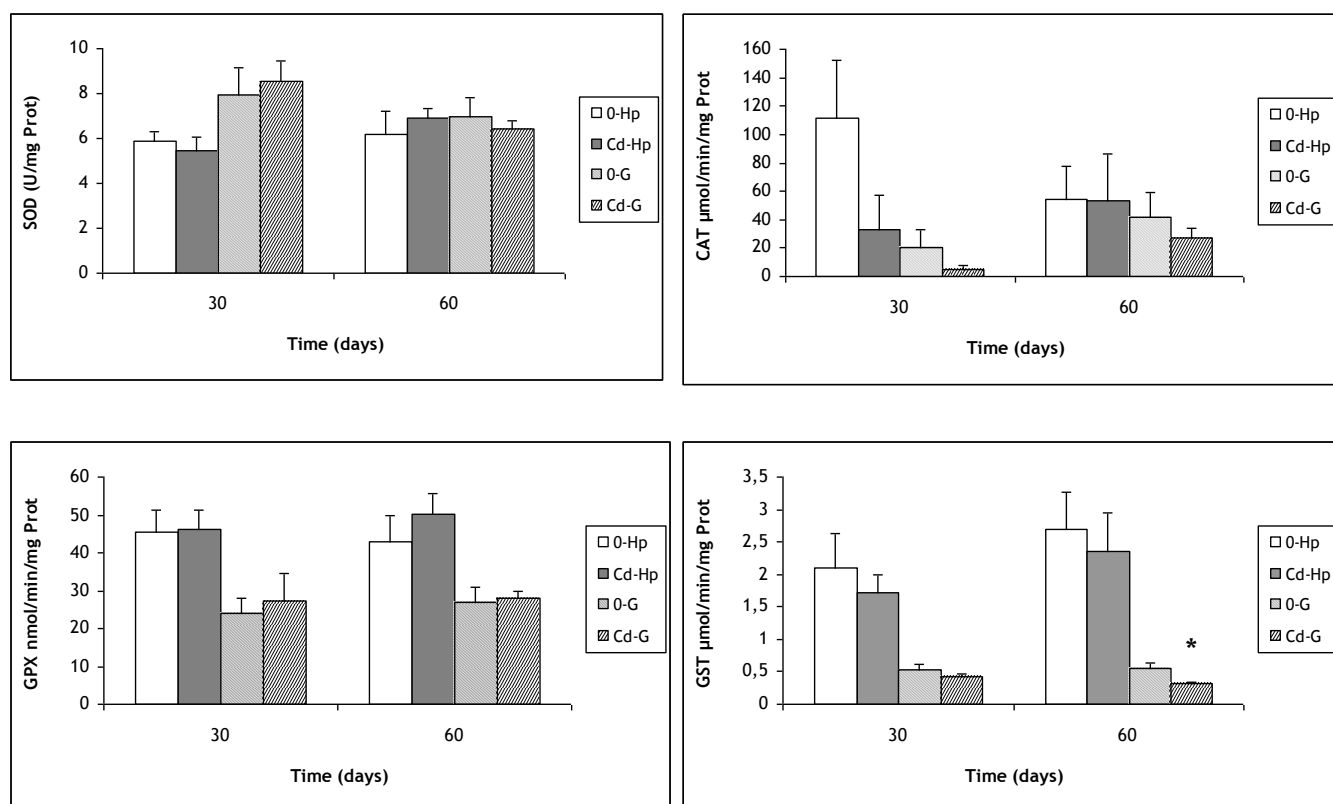


Figure 63: Antioxidants activities (SOD, CAT, GPX, and GST) (mean ± SEM, n=5) in gills and hepatopancreas of crayfish *P. clarkii* exposed 30 and 60 days to 0 and 10 µg/L of Cd. (*) statistical significant differences between contaminated and control crayfish at a given sampling time.

3.4. Biological responses and bioaccumulation

A correlation between molecular responses (gene expression levels or enzymatic activity) and Cd bioaccumulation was assessed without taking into account possible variations in responses over time. Thus for every sampling time, Cd bioaccumulation in the organ of interest of each individual was associated with genes expression levels or enzymatic activities evaluated in the same organ. The *cox1* gene expression was negatively correlated with Cd concentrations in gills and hepatopancreas of crayfish after acute exposure to Cd (in gills: $R = -0.53$, $P = 2.3 \cdot 10^{-3}$; in hepatopancreas: $R = -0.45$, $P = 0.018$). In the highly contaminated organs, *mt* and *atp6* gene expression levels increased significantly with increasing Cd bioaccumulation (*mt*-gills: $R = 0.4$, $P = 0.04$; *mt*-hepatopancreas: $R = 0.65$, $P = 3 \cdot 10^{-4}$; *atp6*-gills: $R = 0.52$, $P = 2.5 \cdot 10^{-3}$; *atp6*-hepatopancreas: $R = 0.7$, $P = 8.35 \cdot 10^{-5}$). In the chronic exposure experiment, the down-regulation of *sod(Mn)* was significantly correlated to Cd bioaccumulation in gills ($R = -0.58$, $P = 0.037$), while a positive correlation was only observed for *mt* gene in both organs (*mt*-gills: $R = 0.67$, $P = 0.013$; *mt*-hepatopancreas: $R = 0.46$, $P = 0.049$). CAT activity seemed to decrease in presence of low concentrations of Cd in hepatopancreas of crayfish ($R = -0.45$, $P = 0.053$). Negative correlation was observed between low levels of Cd concentrations and GST activities in both organs but was only significant in gills (GST-gills: $R = -0.54$, $P = 0.032$; GST-hepatopancreas: $R = -0.33$, $P = 0.17$).

3.5. Histological alterations

Damages to tissue structures were discerned in the hepatopancreas after ten days of Cd exposure to 0.05, 0.5 and 5 mg/L of Cd (**Figure 64**). Epithelium of several tubules showed an overall presence of numerous pathologically altered cells with cytoplasmic vacuoles. Cell walls were disintegrated and epithelial organization of cells was lost. Cell shrinkage, thinning of the epithelium and lumen dilatation were observed at the highest levels of Cd contamination. Histological pathologies were less marked in hepatopancreatic tubules of crayfish exposed 60 days to 10 μg Cd/L. Vacuolisation appeared in some contaminated tubules at the end of the chronic exposure experiment. However, this phenomenon was confined to individual tubules and did not affect the entire digestive gland.

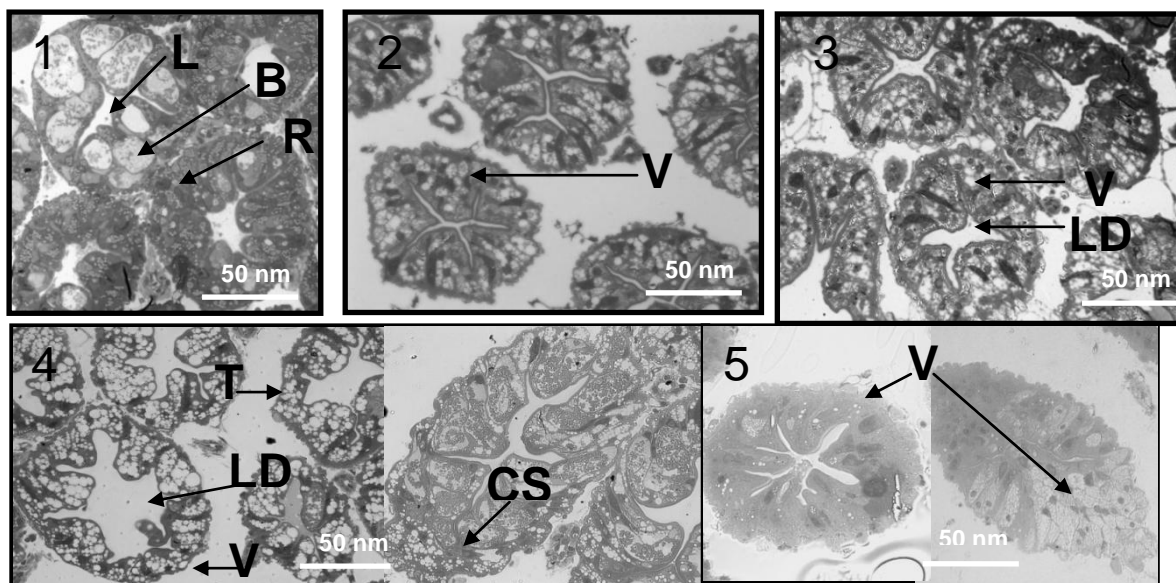


Figure 64: Histopathological alterations in *P. clarkii* hepatopancreas tubules after 10 days of acute exposure to Cd: (1) 0 mg/L; (2) 0.05 mg/L; (3) 0.5 mg/L (4) 5 mg/L; and 60 days of chronic Cd exposure: (5) 10 µg/L. (R) absorptive cells. (B) secretory cells. (L) Lumen. The pathologies observed were: (V) Vacuolization; (T) thinning of the epithelium; (LD) lumen dilatation; (CS) cellular shrinkage. Magnification x 40.

4. Discussion

4.1. Effects on survival rate

Crayfish mortality showed that *Procambarus clarkii* was highly resistant to Cd. Results did not allow a calculation of a ten days LC₅₀: this value seems to be higher than 5 mg/L in our experimental conditions. Del Ramo et al.(1987) reported a very high Cd 96h LC₅₀ value for this species (15 -20 g) which was equal to 58.5 mg/L (with 95% confidence intervals: 41.8- 81.9 mg/L) at 20°C. It should be noted that they conducted a static test so their Cd LC₅₀ was based on the initial amount of Cd added to the water, hence after 96 hours the concentrations may have been less than those indicated. Recently, Wigginton and Birge (2007) stated that the 96h Cd LC₅₀ of adult *P. clarkii* (18.5 g at 25°C) is equal to 2.66 mg/L (with 95% confidence intervals: 1.57- 4.44 mg/L). A direct comparison of the toxicity value obtained between studies in literature is complicated by differences in the water chemistry (hardness, alkalinity, pH, temperature, and concentrations of other major ions) that affect Cd toxicity (Garcia-Santos et al., 2006). However, Wigginton and Birge (2007) demonstrated in the same study that *P. clarkii* was more resistant to Cd exposure when compared with other crayfish species (*Orconectes sp. and Procambarus sp.*). It is well documented that different species have variable degrees of tolerance to Cd (USEPA, 2001; WHO, 1992). For example,

the 96h LC₅₀ value of Cd for the freshwater fish *Tilapia Oreochromis niloticus* is equal to 24.66 mg/L while the 96h LC₅₀ for *Oncorhynchus mykiss* and *Salmo trutta* are in the low µg/L range (< 2.8 and 1.6 µg/L respectively) (Cusimano et al., 1986; Spehar and Carlson, 1984;). When compared to these last two species *P. clarkii* seems to be highly tolerant to Cd.

4.2. Accumulation

Cd bioaccumulation in organs was dose-dependent in all the experiments given that metal concentrations in tissues were highly correlated with those in water. Crayfish were able to bioconcentrate rapidly the contaminant in their tissues (high accumulation factor (AF): [Cd] in organ/[Cd] in water at T4: e.g. AF gills-5 mg Cd/L= 65). In the acute exposure experiment, metal concentrations in gills were higher than those in the hepatopancreas. This result is in concordance with that reported by Diaz-Mayans et al., (1986) that showed Cd uptake from solution results in a higher bioaccumulation in gills than in the hepatopancreas of *P. clarkii*. Our measured concentrations are in the range of those reported by these authors. They found that Cd levels in gills of *P. clarkii* were about 12.76 ± 5.26 and 37.35 ± 10.56 µg/g DW when exposed four days to 32 and 100 µg/L of Cd respectively; Whereas 0.72 ± 0.46 µg/g DW and 2.41 ± 1.74 µg/g were found in the hepatopancreas. In contrast, in the chronic exposure experiment the hepatopancreas accumulated more Cd than the gills. All abiotic parameters were identical in both experiments except for Cd concentrations in water and the slight changes in pH values. It is well established that the effect of pH on Cd speciation in water is negligible (Zirino and Yamamoto, 1972)so the difference between bioaccumulation levels in organs in both experiments is not linked to the pH but rather to the levels of Cd contamination. In addition, Cd speciation in our synthetic water was simulated at different pH values using the geochemical speciation software J-CHESS (Java Chemical Equilibrium with Species and Surfaces, Van der lee, 1998). Results demonstrated that the concentration of the different species of Cd did not vary between the pH 4 and 8 (results not shown here). Cd bioaccumulation in gills after high levels of waterborne metal exposure, results in both adsorption and internalization of the metal. The adsorption rate on the cuticle of gills depends on the concentration level of Cd in water. The gill seems to be temporary target organ of Cd accumulation when exposed to low concentrations of waterborne Cd, after which the metal is transferred to the hepatopancreas. Indeed, the hepatopancreas has a well defined role in storage, metabolism and detoxification of a number of metals (Alcorlo et al., 2006; Kouba et al., 2010; Lyon and Simkiss, 1984; Muriana et al., 1993). Moreover, Meyer et al. (1991) and Simon (2000) reported that freshwater crayfish *Astacus astacus* bioaccumulated more Cd in

hepatopancreas than in gills after chronic exposure to Cd (2 µg/L- 10 weeks and 10 µg/L- 30 days respectively). Both of our experiments showed that the strategy of Cd internalization and Cd transfer capacity to other organs (hepatopancreas) depends strongly on the exposure levels.

4.3. Molecular responses

4.3.1. Mechanisms of toxicity in acute exposure

At high concentrations in tissues, Cd had a considerable effect on *cox1* gene expression levels which seemed to be significantly repressed in gills with increasing Cd bioaccumulation in the organs ($R = -0.5$; $P = 0.002$). Such a decrease in *cox1* gene expression level was first described in the liver of carp experimentally exposed to low concentrations of a mixture of waterborne and dietary Cd (Reynders et al., 2006). Pierron et al (2009) also observed a down regulation of the gene *cox1* in the wild yellow perch (*Perca flavescens*) when exposed to environmental concentrations of Cd. This gene seemed to be tightly modulated by Cd accumulation. Moreover, cytochrome c oxidase activity was determined in gills and digestive glands of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and showed a significant decrease in presence of high levels of Cd (50µM-400µM Cd) (Ivanina et al., 2008). Authors also reported inhibition of the complex I, II and III in the same Cd contaminated oysters. Other studies have also shown an inhibition of the electron transport chain reaction in different animal models (Cannino et al., 2009; Kurochkin et al., 2010; Miccadei and Floridi, 1993; Wang et al., 2004). *atp6* gene was highly up-regulated in gills in the acute exposure experiment and was dose-dependent ($R = 0.52$; $P = 2.5 \cdot 10^{-3}$). Mitochondria could have tried to produce more ATP synthase to create enough ATP for maintaining cell functions and compensate for the impairment of the complex IV. However, Dorta et al. (2003) showed a depression of ATP levels in rat liver mitochondria incubated with 5 µM CdCl₂ after dissipation of the transmembrane electrical potential. High Cd exposure (20-200 µM/L Cd) of isolated oyster haemocytes also caused a significant depletion in intracellular ATP levels that was dose-dependent, indicating a severe disturbance of energy metabolism (Sokolova et al., 2004). A recent study showed that an exposure to 12.5 µM Cd strongly inhibited the substrate oxidation subsystem and stimulated the proton conductance across the inner mitochondrial membrane showing a leak of protons from the periplasmic space to the matrix of oyster mitochondria (Kurochkin et al., 2010). Indeed, a proton leak involves a dissipation of membrane potential without ATP production (Kurochkin et al., 2010). Authors were also surprised to see that Cd did not affect the phosphorylation subsystem proving a negligible

effect on ATP synthase. By incorporating all these findings, another explanation to the increase in *atp6* gene expression level could be linked to a change in the classic mitochondrial metabolism. A severe decrease of the proton gradient due to the inhibition of mitochondrial complexes leads to a decrease in the mitochondrial inner membrane potential which stimulates the functioning of ATPase in an unusual manner (Nevière, 2008). In this case, the complex V can reverse itself and hydrolyse ATP to pump protons back to the periplasmic space (Nevière, 2008; Wang and Oster, 1998). For this reason we can hypothesise that mitochondria were trying to produce enough ATPase to compensate for the decrease in the electrochemical gradient. *12s* gene expression levels was down-regulated at T4 but was not different from the control at T10 demonstrating that cells increased the numbers of mitochondria to balance those who are not functioning correctly. As expected, the *mt* gene was over-expressed with the increasing Cd concentrations (R=0.4, P=0.04). Indeed metallothioneins (MT) are characterized by an important proportion of cysteinyl residues, which serve as ligands for Cd chelation (Amiard et al., 2006; Baudrimont et al., 1999; Martin-Diaz et al., 2006). the *mt* gene was more expressed at T10 than T4 in all exposure conditions. This could be linked to the natural presence of a sufficient concentration of MT proteins at the beginning of the exposure. In hepatopancreas sampled from the acute exposure experiment, the mechanisms of toxicity of Cd at the molecular level were the same as in the gills. The gene expression level of *sod(Mn)* was significantly down-regulated in this organ. Numerous investigations have shown that Cd can indirectly promote oxidative stress in cells (Shi et al., 2005; Wang et al., 2004). This metal can bind to antioxidants or to their substrate. Consequently impairment of the defence mechanism against Reactive Oxygen Species (ROS) leads to an increase in ROS concentrations (Cao et al., 2010). Cd is also capable of displacing zinc (Zn) from endogenous MT (Dallinger et al. 1997). Therefore, in mitochondria Cd can bind to MT and displace Zn which increases the concentrations of free zinc ions, which in turn can induce respiratory block, mitochondrial permeability transition pore opening, cytochrome C release, and generation of ROS (Bossy-Wetzel et al., 2004). It is also well established that the expression level of *sod* increases when ROS production increases. However a recent report has shown that the cytosolic *sod(Cu/Zn)* was repressed in the yellow perch *Perca flavescens* exposed to environmental concentrations of Cd (Pierron et al., 2009). The authors hypothesized that the metallothioneins produced to sequester Cd, could have also scavenged ROS efficiently; since MT is known for its capacity to trap (ROS) (Fang et al., 2010; Viarengo et al., 2000). In fact, reports have demonstrated that *mt* gene expression levels are up-regulated not only by metal exposures but also by ROS generation (Fang et al., 2010;

Viarengo et al., 2000). Moreover, authors hypothesized that Cd accumulation could cause an overall decrease in mitochondrial metabolism which leads to a decrease in ROS production (Pierron et al., 2009). Such explication is consistent with our results. Moreover the decrease of *sod(Mn)* gene expression level was highly correlated with the decrease in *cox1* gene expression level (R= 0.4 ; P= 0.001).

4.3.2. Mechanisms of toxicity in chronic exposure

In the chronic exposure experiment, the *mt* gene was over-expressed in all organs at all times, and the expression levels were significantly correlated to the bioaccumulation of Cd. Increase in expression levels of this gene was higher in gills than in hepatopancreas despite of the lower concentrations of Cd in gills. Without a doubt, tissues directly involved in metal uptake, storage and excretion have high capacity to synthesise MT. In some crustaceans, basal MT concentrations are considerably higher in hepatopancreas than in gills (Amiard et al., 2006). Therefore, this could explain the reason why *mt* gene was less over-expressed in hepatopancreas of crayfish. At T30, Cd accumulation was low thus the metal did not show a significant impact on the complex IV in the gills. It is well known that Cd itself is unable to directly generate ROS (Jomova and Valko, 2011; Watjen and Beyersmann, 2004) and that in absence of any contamination mitochondria are the main source of ROS in the cell (Wang et al., 2004). CAT, SOD, GPX and GST did not show any statistical significant difference in activities between contaminated crayfish and controls. Therefore, Cd did not seem to generate oxidative stress in gills at T30. The decrease in the amount of mitochondria and *atp6* gene repression in gills, surely lead to a decrease in ROS production. This is confirmed by the result of *sod(Mn)* gene expression levels which were not altered in presence of Cd at T30. In gills of the eel *Anguilla anguilla* Cd caused a decrease in *atp6-8* gene expression levels when exposed 14 days to 10 µg/L of Cd (Pierron et al., 2007). Authors demonstrated that Cd under normoxia mimics the effect of hypoxia on eels. In fact, as in hypoxia, Cd led to a repression of genes encoding for proteins involved in the respiratory chain and in the defence against oxidative stress. At T60 the impact of Cd on mitochondria in gills was also not flagrant: *cox1* gene expression levels were not altered and the amount of mitochondria was no longer different from control. The *atp6* gene was slightly up-regulated probably to produce enough ATP for cellular needs. ROS generation did not seem to be excessive since the antioxidant defence system was not altered. The activity of SOD, CAT and GPX did not change, and the *sod(Mn)* gene was even repressed. This could be due to the effectiveness of the detoxification mechanisms. MT seemed to have trapped ROS and Cd efficiently (*mt*: 9.5 folds up-

regulated). Moreover depletion in GST activity was observed: inhibition of this enzyme occurs either *via* direct action of Cd on the enzyme or *via* a depletion of its substrate (GSH) (Cao et al., 2010), either way this demonstrates that Cd was trapped. Salazar-Medina et al. (2010) determined that Cd binds in GSH-binding site of GST in the shrimp *Litopenaeus vannamei* by coordination with Asp and Gln residues. In the hepatopancreas at T30, effects on mitochondria were only illustrated by the repression of *atp6*. This gene regulation raises the possibility that ATP synthase could be modulated indirectly by Cd. Its repression could be an adaptive response for preventing excessive ROS build-up under stress conditions. It should be drawn to attention that Cd bioaccumulation in hepatopancreas at T30 was of the same order as that reported in hepatopancreas exposed to 0.5 mg/L at T10. However transcriptional responses were different showing that the mechanisms of Cd toxicity are more complex than imagined. Additionally, kinetics should be taken into account in choosing biomarkers of Cd toxicity since the responses are different depending upon the type (acute/chronic) and the time of exposure (short/long term). It is possible that with a chronic exposure crayfish can acclimate and have time to put into place effective mechanisms of detoxification. Impacts on mitochondria were more obvious at T60, *cox1* was repressed followed by a decrease of *sod(Mn)* indicating a ROS depletion in mitochondria. The *12S* gene was up-regulated demonstrating once again a cellular strategy to combat Cd stress which consists of increasing the number of mitochondria to compensate for those that were not functioning correctly. It should be highlighted that at T60 Cd concentrations in hepatopancreas were elevated and comparable to concentrations found in hepatopancreas exposed to 0.5 mg/L at T10 and to 5 mg/L at T4. The studied genes followed the same pattern as seen in the acute exposure experiment. Therefore *atp6* up-regulation could be explained by the same hypothesis already mentioned above. Activities of antioxidants were found not to be significantly altered which are in concordance with gene expression levels results. However, a tendency of GST (R= -0.33, P= 0.17) and CAT (R= -0.45, P= 0.053) activity to decrease with increasing Cd concentrations in hepatopancreas was observed. In fact, Almar et al. (1987) showed that waterborne CdCl₂ concentrations higher than 100 µg/l affects GSH content and decreases GST activity (after 96 hr) in midgut gland of the crayfish *P. clarkii*. Casalino et al. (2002) reported a reduction of CAT activity in kidney and liver of rats after acute exposure. Cao et al. (2010) also demonstrated that a high waterborne Cd concentration (48 µg/L) decreases CAT activity in Japanese flounder larvae. Such a decrease in CAT activity is related generally to an interaction between Cd and the catalytic subunit of the enzyme (Wrońska-Nofer et al., 1999). Cd could also cause a Fe deficiency in organisms which might explain the decrease in the

enzyme activity, since CAT has Fe as an essential element in its active centre (Jurczuk et al., 2004).

4.3.3. Histopathology

Histopathological damages seemed to be dose dependent. This could be seen particularly in soft-tissues of crayfish in the acute exposure experiment, since increasing vacuolisation was observed with the increasing Cd bioaccumulation. Moreover, epithelial arrangement seemed to disintegrate with the increasing doses of Cd in hepatopancreas. It should be noted that histopathological lesions in the chronic exposure experiment were less severe than those observed in tissues sampled from the acute exposure experiment. The structural changes observed in this study were also reported by Martin-Diaz et al (2006) in gills and hepatopancreas of *P. clarkii* after 21 days of exposure to 10 and 30 µg/L of Cd. Histological observations of Cd contaminated hepatopancreas of crayfish *Astacus astacus* (2µg/L for 10 weeks) showed similar damages in tubules such as enlarged cells, vacuolization, loss of epithelial organisation and cell disintegration (Meyer et al., 1991). The first morphological signs of programmed cell death in midgut epithelium cells are alterations in the cytoplasm connected with shrinkage of the cells (Rost-Roszkowska et al., 2010). In this study cells shrinkage was observed in highly contaminated tubules. These histopathological alterations could be linked to the mitochondrial damages caused by Cd (Li et al., 2000; Pal et al., 2011). In effect, Cd can bind strongly to the sulfhydryl groups of mitochondrial membrane proteins thereby inducing mitochondrial permeability transition (MPT) as well as disrupting other mitochondrial functions (Robertson and Orrenius, 2000). The MPT is believed to reflect the opening of a proteinaceous permeability transition pore (PTP) on the inner mitochondrial membrane. Opening of this pore causes a decrease in mitochondrial membrane potential (MMP) and the release of apoptogenic proteins, such as cytochrome c and apoptosis inducing factor, from the mitochondrial inner membrane space into the cytoplasm, thereby triggering the apoptotic cascade (Liu et al., 2011). MMP collapse is a critical step that occurs in cells undergoing apoptosis, regardless of the inductive signal (Huettenbrenner et al., 2003). The expression levels of *atp6* and *cox1* genes in highly contaminated crayfish showed a dysfunction of the mitochondrial chain reaction. By integrating the transcriptional responses and the histological alterations, the hypothesis of Cd causing a “reverse functioning” of ATP synthase is most probable since a decrease in MMP could explain such responses.

5. Conclusions

Cd induced high levels of bioaccumulation, mitochondrial dysfunction, and caused histopathological alterations. In the long term, this may have important consequences for sustainability of crayfish populations in Cd-polluted environments. This study also demonstrated that the molecular responses can vary depending on the intensity (10 µg/L- 5 mg/L) and duration (10-60 days) of the chemical stress applied to the organisms. The expression levels of *cox1*, *mt* and *atp6* genes seemed to be good biomarkers of acute Cd contamination in gills as well as in hepatopancreas. The expression of these genes was highly correlated with the high Cd concentrations in tissues. Between all the studied genes, *mt* was the only gene that had the same pattern of expression in both organs in chronic exposure. The study of *mt* gene expression levels remain the best tool to assess Cd intoxication, since this gene was over-expressed in all organs whatever the type of exposure was or the duration. However, a multi-biomarker approach should be used when assessing Cd toxicity to better understand the mechanisms of action of this metal. Further experiments are needed to complete the understanding of the mechanisms of Cd toxicity and to elucidate the impact on mitochondria. It would be useful to sequence genes of *P. clarkii* implicated in the apoptosis mechanism and encoding for some subunits of the complex I, II, and III of the mitochondrial chain reaction. The measurement of the mitochondrial membrane potential, ATP levels, and the concentration of the cytochrome c would bring more information to clarify the mechanism by which Cd induces toxicity. It could also be interesting to sequence genes that participate in oxidative stress responses and test the sensitivity between variations in gene expression levels and enzymatic activities of antioxidants in order to choose the best tool for the evaluation of Cd toxicity.

Acknowledgments

Authors would like to thank N. Gauthier for providing the crayfish, B. Geffroy for his assistance in dissecting *P. clarkii*, G. Bucher for J-CHESS simulations, S. Pierrisnard for ionic chromatography measurements, and C. Della-Vedova for helping in statistical analysis. This study was supported by the ENVIRHOM research program funded by the institute of Radioprotection and Nuclear Safety and the CNRS.

References

- Alcorlo, P., Otero, M., Crehuet, M., Baltanás, A., Montes, C., 2006. The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiamar (SW, Spain). *Sci. Total Environ.* 366, 380-390.
- Al Kaddissi, S., Legeay, A., Elia, C., Gonzalez, P., Camilleri, V., Gilbin, R., Simon, O., 2012. Effects of uranium on crayfish *Procambarus clarkii* mitochondria and antioxidants responses after chronic exposure: what have we learned?. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 218-224
- Al Kaddissi, S., Legeay, A., Gonzalez, P., Floriani, M., Camilleri, V., Gilbin, R., Simon, O., 2011. Effects of uranium uptake on transcriptional responses, histological structures and survival rate of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (7): 1800-1807.
- Almar, M.M., Diaz-Mayans, J., Romero, F.J., 1987. Glutathione content and GSH S-transferase activity in midgut gland of *Procambarus clarkii*. Sex differences, the effect of fasting, and their implications in cadmium toxicity. *Comp. Biochem. Physiol. C* 87, 433-435.
- Amara S, Garrel C, Favier A, Rhouma KB, Sakly M, Abdelmelek H. 2009. Effect of static magnetic field and/or cadmium in the antioxidant enzymes activity in rat heart and skeletal muscle. *Gen. Physiol. Biophys.* 28(4):414-419.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160-202.
- Anderson, M.B., Reddy, P., Preslan, J.E., Fingerman, M., Bollinger, J., Jolibois, L., Maheshwarudu, G., George, W.J., 1997. Metal Accumulation in Crayfish, *Procambarus clarkii*, Exposed to a Petroleum-Contaminated Bayou in Louisiana. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37, 267-272.
- ASTM E729. 1996. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. www.astm.org. (Reapproved 2007), 22 p.
- Baudrimont M, Andrès S, Metivaud J, Lapaquellerie Y, Ribeyre F, Maillet N, Latouche C, Boudou A. 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 18(11):2472-2477.

- Bossy-Wetzel, E., Talantova, M.V., Lee, W.D., Schölzke, M.N., Harrop, A., Mathews, E., Götz, T., Han, J., Ellisman, M.H., Perkins, G.A., Lipton, S.A., 2004. Crosstalk between Nitric Oxide and Zinc Pathways to Neuronal Cell Death Involving Mitochondrial Dysfunction and p38-Activated K⁺ Channels. *Neuron* 41, 351-365.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K., 2005. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 274-308.
- Brooks, B.W., Stanley, J.K., White, J.C., Turner, P.K., Wu, K.B., La Point, T.W., 2004. Laboratory and field responses to cadmium: An experimental study in effluent-dominated stream mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1057-1064.
- Cannino, G., Ferruggia, E., Luparello, C., Rinaldi, A.M., 2009. Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion* 9, 377-384.
- Cao, L., Huang, W., Liu, J., Yin, X., Dou, S., 2010. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 151, 386-392.
- Casalino, E., Calzaretto, G., Sblano, C., Landriscina, C., 2002. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicol.* 179, 37-50.
- Choi CY, An KW, Nelson ER, Habibi HR. 2007. Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 145(4):595-600.
- Cupit, M., Larsson, O., de Meeûs, C., Eduljee, G.H., Hutton, M., 2002. Assessment and management of risks arising from exposure to cadmium in fertilisers -- II. *Sci. Total Environ.* 291, 189-206.
- Cusimano, R, F., Brakke, D, F., Chapman, G, A., 1986. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43, 1497-1503.
- Dallinger R, Egg M, Köck G, Hofer R. 1997. The role of metallothionein in cadmium accumulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from high alpine lakes. *Aquat. Toxicol.* 38(1-3):47-66.
- Del Ramo, J., Diaz-Mayans, J., Torreblanca, A., Nunez, A., 1987. Effects of temperature on the acute toxicity of heavy metals (Cr, Cd, and Hg) to the freshwater crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 736-741.

- Diaz-Mayans, J., Hernandez, F., Medina, J., 1986. Cadmium accumulation in the crayfish, *Procambarus clarkii*, using graphite furnace atomic absorption spectroscopy. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 722-729.
- Dorta, D.J., Leite, S., DeMarco, K.C., Prado, I.M.R., Rodrigues, T., Mingatto, F.E., Uyemura, S.A., Santos, A.C., Curti, C., 2003. A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *J. Inorg. Biochem.* 97, 251-257.
- Downs CA, Fauth JE, Woodley CM. 2001. Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: A molecular biomarker system. *Mar. Biotechnol.* 3(4):380-397.
- Fang, Y., Yang, H., Wang, T., Liu, B., Zhao, H., Chen, M., 2010. Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam *Macra veneriformis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 151, 325-333.
- Faraway, J., 2002. Practical Regression and Anova using R [online]. <http://cran.r-project.org/doc/contrib/Faraway-PRA.pdf>. [accessed 2009].
- Garcia-Santos, S., FontaÃ-nhas-Fernandes, A., Wilson, J.M., 2006. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: Assessment of some ionoregulatory parameters. *Environ. Toxicol.* 21, 33-46.
- Gherardi, F., 2006. Crayfish invading Europe: the case study of *Procambarus clarkii*. *Mar. Freshwater Behav. Physiol.* 39, 175-191.
- Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 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.
- Huettenbrenner, S., Maier, S., Leisser, C., Polgar, D., Strasser, S., Grusch, M., Krupitza, G., 2003. The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. *Mutat. Res.- Rev. Mutat.* 543, 235-249.
- Issartel, J., Boulo, V., Wallon, S., Geffard, O., Charmantier, G., 2010. Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Chemosphere* 81, 701-710.
- Ivanina, A.V., Habinck, E., Sokolova, I.M., 2008. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica Gmelin* (Bivalvia: Ostreidae). *Comp. Biochem. Physiol. C* 148, 72-79.
- Jia, X., Zhang, H., Liu, X., 2010. Low levels of cadmium exposure induce DNA damage and oxidative stress in the liver of Oujiang colored common carp *Cyprinus carpio var. color*. *Fish Physiol. Biochem.* 1-7.

- Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicol.* 283, 65-87.
- Jurczuk, M., Brzóška, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Gałazyn-Sidorczuk, M., Kulikowska-Karpińska, E., 2004. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem. Toxicol.* 42, 429-438.
- Kaplan, E.L., 1983. in a retrospective on the seminal paper in "This week's citation classic". *Curr. Contents* 24.
- Kouba, A., Buřič, M., Kozák, P., 2010. Bioaccumulation and effects of heavy metals in crayfish: A review. *Water, Air, Soil Pollut.* 211, 5-16.
- Kurochkin, I.O., Etkorn, M., Buchwalter, D., Leamy, L., Sokolova, I.M., 2010. Top-down control analysis of the cadmium effects on molluscan mitochondria and the mechanisms of cadmium-induced mitochondrial dysfunction. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300, R21-R31.
- Li, M., Kondo, T., Zhao, Q.L., Li, F.J., Tanabe, K., Arai, Y., Zhou, Z.C., Kasuya, M., 2000. Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca^{2+} -calpain and caspase-mitochondria dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 39702-39709.
- Lei W, Wang L, Liu D, Xu T, Luo J. 2011. Histopathological and biochemical alternations of the heart induced by acute cadmium exposure in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. *Chemosphere*.
- Liu, J., Qu, W., Kadiiska, M.B., 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 209-214.
- Liu, T., He, W., Yan, C., Qi, Y., Zhang, Y., 2011. Roles of reactive oxygen species and mitochondria in cadmium-induced injury of liver cells. *Toxicol. Ind. Health* 27, 249-256.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- Δ CT method. *Methods* 25., 402-408.
- Lyon, R., Simkiss, K., 1984. The ultrastructure and metal-containing inclusions of mature cell types in the hepatopancreas of a crayfish. *Tissue Cell* 16, 805-817.
- Ma W, Wang L, He Y, Yan Y. 2008. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanense* during acute exposure to waterborne cadmium. *Environ. Toxicol.* 23(3):393-400.
- Martin-Diaz, M.L., Tuberty, S.R., McKenney Jr, C.L., Blasco, J., Sarasquete, C., DelValls, T.A., 2006. The use of bioaccumulation, biomarkers and histopathology diseases in

- shape *Procambarus clarkii* to establish bioavailability of Cd and Zn after a mining spill. *Environ. Monit. Assess.* 116, 169-184.
- Meyer, W., Kretschmer, M., Hoffmann, A., Harisch, G., 1991. Biochemical and histochemical observations on effects of low-level heavy metal load (lead, cadmium) in different organ systems of the freshwater crayfish, *Astacus astacus* L. (Crustacea: Decapoda). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21, 137-156.
- Miccadei, S., Floridi, A., 1993. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport by cadmium. *Chem. Biol. Interact.* 89, 159-167.
- Morin, S., Vivas-Nogues, M., Thi, T.D., Boudou, A., Coste, M., Delmas, F., 2007. Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Fund. Appl. Limnol.* 168, 179-187.
- Muller, L., 1986. Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: Mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Toxicol.* 40, 285-295.
- Muriana, F.J.G., Ruiz-Gutierrez, V., Gallardo-Guerrero, M.L., Minguéz-Mosquera, M.I., 1993. A study of the lipids and carotenoprotein in the prawn, *Penaeus japonicus*. *J. Biochem.* 114, 223-229.
- Nevière, R., 2008. Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Réanimation* 17, 185-191.
- Novelli Filho, J.L.V.B., Novelli, E.L.B., Manzano, M.A., Lopes, A.M., Cataneo, A.C., Barbosa, L.L., Ribas, B.O. 2000. Effect of α -tocopherol on superoxide radical and toxicity of cadmium exposure. *Int. J. Environ. Health Res.* 10(2):125-134.
- Pal, S., Pal, P.B., Das, J., Sil, P.C., 2011. Involvement of both intrinsic and extrinsic pathways in hepatoprotection of arjunolic acid against cadmium induced acute damage in vitro. *Toxicol.* 283, 129-139.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Bourdineaud, J.P., Elie, P., Massabuau, J.C., 2007. Common pattern of gene expression in response to hypoxia or cadmium in the gills of the European glass eel (*Anguilla anguilla*). *Environ. Sci. Technol.* 41, 3005-3011.
- Pierron, F., Bourret, V., St-Cyr, J., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2009. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). *Ecotoxicol.* 18, 620-631.
- Pinot, F., Kreps, S.E., Bachelet, M., Hainaut, P., Bakonyi, M., Polla, B.S., 2000. Cadmium in the environment: Sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. *Rev. Environ. Health* 15, 299-323.

- Poynton, H.C., Taylor, N.S., Hicks, J., Colson, K., Chan, S., Clark, C., Scanlan, L., Loguinov, A.V., Vulpe, C., Viant, M.R. 2011. Metabolomics of microliter hemolymph samples enables an improved understanding of the combined metabolic and transcriptional responses of *Daphnia magna* to cadmium. *Environ. Sci. Technol.* 45(8):3710-3717.
- Poynton, H.C., Wintz, H., Vulpe, C.D. 2008. Progress in ecotoxicogenomics for environmental monitoring, mode of action, and toxicant identification. *Adv. Exp. Biol.* p 21-73,322-323.
- Pulido, M.D., Parrish, A.R., 2003. Metal-induced apoptosis: Mechanisms. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 533, 227-241.
- R Development Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>.
- Reynders, H., van der Ven, K., Moens, L.N., van Remortel, P., De Coen, W.M., Blust, R., 2006. Patterns of gene expression in carp liver after exposure to a mixture of waterborne and dietary cadmium using a custom-made microarray. *Aquat. Toxicol.* 80, 180-193.
- Risso-De Faverney, C., Orsini, N., De Sousa, G., Rahmani, R., 2004. Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: Involvement of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 69, 247-258.
- Robertson, J.D., Orrenius, S., 2000. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 609-627.
- Rost-Roszkowska, M.M., Poprawa, I., Chachulska-Zymeka, A., 2010. Apoptosis and autophagy in the midgut epithelium of *Acheta domesticus* (Insecta, Orthoptera, Gryllidae). *Zoolog. Sci.* 27, 740-745.
- Salazar-Medina, A.J., Garcia-Rico, L., Garcia-Orozco, K.D., Valenzuela-Soto, E., Contreras-Vergara, C.A., Arreola, R., Arvizu-Flores, A., Sotelo-Mundo, R.R., 2010. Inhibition by Cu²⁺ and Cd²⁺ of a Mu-class glutathione S-transferase from shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 24, 218-222.
- Sánchez López, F.J., Gil García, M.D., Martínez Vidal, J.L., Aguilera, P.A., Garrido Frenich, A., 2004. Assessment of Metal Contamination in Doñana National Park (Spain) using Crayfish (*Procambarus Clarkii*). *Environ. Monit. Assess.* 93, 17-29.
- Shi, H., Sui, Y., Wang, X., Luo, Y., Ji, L., 2005. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 140, 115-121.

- Simon, O., 2000. Etude des voies de contamination -directe et trophique- des organismes aquatiques continentaux par les métaux -mercure, cadmium, zinc-. Approches expérimentales au laboratoire et in situ. Université Bordeaux 1 N°2244., 171 p.
- Sokolova, I.M., Evans, S., Hughes, F.M., 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *J. Exp. Biol.* 207, 3369-3380.
- Spehar, R.L., Carlson, A.R., 1984. Derivation of site-specific water quality criteria for cadmium and the St. Louis River Basin, Duluth, Minnesota. *Environ. Toxicol. Chem.* 3, 651-665.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., 2001. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20, 77-88.
- Suárez-Serrano, A., Alcaraz, C., Ibáñez, C., Trobajo, R., Barata, C., 2010. *Procambarus clarkii* as a bioindicator of heavy metal pollution sources in the lower Ebro River and Delta. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 280-286.
- Tang, W., Shaikh, Z.A., 2001. Renal cortical mitochondrial dysfunction upon cadmium metallothionein administration to sprague-dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health A* 63, 221-235.
- Thompson, J., Hipwell, E., Hui, V.L., Bannigan, J., 2005. Effects of cadmium on cell death and cell proliferation in chick embryos. *Reprod. Toxicol.* 20, 539-548.
- Thornton, I., 1992. Sources and pathways of cadmium in the environment. *IARC Sci. Publ.* 149-162.
- USEPA., 2001. Update of ambient water quality criteria for cadmium. United States Environmental Protection Agency (USEPA). EPA-822-R-01-001.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161-1208.
- Vandegheuchte, M.B., Kyndt, T., Vanholme, B., Haegeman, A., Gheysen, G., Janssen, C.R., 2009. Occurrence of DNA methylation in *Daphnia magna* and influence of multigeneration Cd exposure. *Environ. Int.* 35, 700-706.
- Van der Lee J. 1998. Thermodynamic and mathematical concepts of CHESS. GIG-Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau, France.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* 46, 407-417.
- Wang, H., Oster, G., 1998. Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature* 396, 279-282.

- Wang, L., Li, J., Li, J., Liu, Z., 2010. Effects of Lead and/or Cadmium on the Oxidative Damage of Rat Kidney Cortex Mitochondria. *Biological trace element research*. Humana Press Incorporated, pp. 69-78.
- Wang, M.-H., Wang, G.-Z., 2009. Biochemical Response of the Copepod *Tigriopus japonicus mori* Experimentally Exposed to Cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 707-717.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S.S., Rao, K.M.K., 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biol. Med.* 36, 1434-1443.
- Watjen, W., Beyersmann, D., 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: Influence of oxidative stress. *Biometals* 17, 65-78.
- WHO., 1992. Cadmium—Environmental aspects. Environmental Health Criteria No.135. World Health Organisation (WHO), The International Program on Chemical Safety (IPCS). Geneva.
- Wigginton, A.J., Birge, W.J., 2007. Toxicity of cadmium to six species in two genera of crayfish and the effect of cadmium on molting success. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 548-554.
- Wrońska-Nofer, T., Wisniewska-Knypl, J., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., 1999. Prooxidative and genotoxic effect of transition metals (cadmium, nickel, chromium, and vanadium) in mice. *Trace Elem. Electrolytes* 16, 87-92.
- Wu JP, Chen HC. 2005. Metallothionein induction and heavy metal accumulation in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to cadmium and zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 140(3-4):383-394.
- Yang, P.M., Chiu, S.J., Lin, K.A., Lin, L.Y., 2004. Effect of cadmium on cell cycle progression in chinese hamster ovary cells. *Chem. Biol. Interact.* 149, 125-136.
- Zirino, A., Yamamoto, S., 1972. A pH-dependent model for the chemical speciation of copper, zinc, cadmium, and lead in seawater. *Limnol. Oceanogr.* 17(5):661-671.

Chapitre IV

Etude de l'impact de l'uranium sur la survie, l'histologie, les mitochondries et les antioxydants chez P. clarkii.

Chapitre IV-A

Effet de la bioaccumulation de l'uranium sur les réponses transcriptomiques, les structures histologiques et la survie chez P. clarkii.

Effects of uranium uptake on transcriptional responses, histological structures and survival rate of the crayfish *Procambarus clarkii*.

Simone Al Kaddissi^{1;2}, Alexia Legeay², Patrice Gonzalez², Magali Floriani¹, Virginie Camilleri¹, Rodolphe Gilbin¹, and Olivier Simon¹.

¹Laboratory of Radioecology and Ecotoxicology (LRE), Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN), Bd 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-Lez-Durance, France.

²Laboratory of Geochemistry and Ecotoxicology of Metals in Aquatic Systems (GEMA), University of Bordeaux/UMR CNRS 5805, Dr Peyneau square, 33120 Arcachon, France.

Abstract

This work aims to investigate the accumulation levels and effects (transcriptional responses, histopathology, survival rate) associated with a wide range of dissolved uranium (U) concentrations (0, 0.03, 0.6, 4 and 8 mg/L of U) on adult male crayfish *Procambarus clarkii* during 4 (T4) and 10 (T10) days of exposure. The follow-up of the crayfish mortality showed that *Procambarus clarkii* was highly resistant to U. Increasing waterborne U concentrations led to increasing bioaccumulation in key crayfish organs and increasing histological damage. U distribution in tissues was also evaluated using transmission electron microscopy and showed the presence of a detoxified form of U in the gill's epithelium in shape of flakes. Expression levels of mitochondrial genes (*cox1*, *atp6* and *12S* gene) and genes involved in oxidative stress (*sod(Mn)* and *mt*) were examined together with the housekeeping gene *18S*. *atp6* and *mt* genes of *P. clarkii* were cloned and sequenced before analysis. Significant correlations were observed between U bioaccumulation and the down-regulation of both *cox1* and *sod(Mn)* genes. This work provides a first U toxicogenomic and histopathological pattern for *P. clarkii*, identifies U biomarkers and associates gene expression endpoints to accumulation levels. It also provides new insights into the mechanisms involved in U stress.

Keywords: Uranium, crayfish, mitochondria, metallothionein, gene expression.

1. Introduction

Uranium's (U) distribution in ecosystems is currently increasing due to anthropogenic activities such as mining, milling, agricultural use (e.g. phosphate fertilizers), industrial activities linked to nuclear fuel production, and laboratory research activities (ASTDR, 1999; Colle et al., 2001; WHO, 2001). U concentrations in natural waters generally varies from below 12 ng/L up to 2 mg/L (Betcher et al., 1988) and may reach an excess of 10 to 20 mg/L in extremely polluted aquatic systems (Ragnarsdottir and Charlet, 2000). It is therefore essential to understand the potential impact of U on ecosystem components so that measures can be taken to protect the environment.

Procambarus clarkii is the most cosmopolitan crayfish around the world, is able to tolerate extreme and polluted environments, and has been used as an indicator of metal pollution in numerous studies of aquatic environments (Gherardi, 2006). Crayfish tend to accumulate metals (Alcorlo et al., 2006; Anderson et al., 1997; Sánchez López et al., 2004; Suárez-Serrano et al., 2010) such as U in their tissues (Chassard-Bouchaud, 1982; Simon and Garnier-Laplace, 2005). In addition, *P. clarkii* meets other criteria which made it suitable for toxicology and risk assessment studies for many decades. For example, it is relatively static, easily captured and adults provide sufficient tissue for individual analyses. Furthermore, its central position in aquatic food webs makes this species a potential vector of contaminants to higher trophic levels (Gherardi, 2006). It is also important to note that, in some countries, *P. clarkii* is a species of great commercial interest (Sánchez López et al., 2004).

U toxicity has not been extensively studied in non-human biota, especially in aquatic invertebrates such as crayfish. In order to address this deficiency, the proposed approach in this study is to evaluate the impacts of uranium on *P. clarkii*. The No Observed Effect Concentration (NOEC) data for aquatic species such as algae, micro-crustaceans, hydra and fish range from 18 to 810 µg U/L (Hogan et al., 2010). However information regarding the concentration of U required to cause an impact on crayfish is scarce. Thus, this ongoing research involves the investigation of the effects associated with a wide range of dissolved U concentrations extending from environmental relevant concentrations to dose rates found in extremely polluted sites (0.03 to 8 mg/L) on adult male crayfish *Procambarus clarkii* during 10 days of exposure. Contaminants exert their toxicity at all levels of biological organization ranging from molecular levels to ecosystems (Perceval et al., 2006). Consequently, transcriptional responses using quantitative real-time RT-PCR, histopathological effects, survival rate, bioaccumulation levels, and metal distribution using transmission electron

microscopy coupled with energy dispersive X-ray (TEM-EDX) were assessed as U endpoints. The investigation of U toxicity was conducted on gills and hepatopancreas of crayfish. Indeed, gills are the first biological barriers to suffer from heavy metal intoxication via a water exposure (Meyer et al., 1991; Niyogi and Wood, 2004) and hepatopancreas has a well-defined role in the storage, metabolism and detoxification of a number of metals (Alcorlo et al., 2006; Lyon and Simkiss, 1984; Muriana et al., 1993). Pollutants could impair mitochondrial function (Cannino et al., 2009; Garceau et al., 2010; Lerebours et al., 2010; Pourahmad et al., 2006; Risso-De Faverney et al., 2004) which could lead to disease, ranging from subtle alterations in cell function to cell death and from minor to major disability, or to death (Duchen, 2004a; Duchen, 2004b). Therefore, the expression level of the *cox1* gene encoding for the cytochrome c oxidase subunit 1 (complex IV) was examined in both organs. This enzyme is involved in the mitochondrial respiratory chain and helps to establish a transmembrane gradient of protons. The *atp6* gene encoding for ATP synthase subunit 6 (complex V) was cloned and sequenced before analyzing its expression in organs. This enzyme uses the gradient of protons created by the other complexes to synthesize ATP (Wang and Oster, 1998). The expression level of the mitochondrial gene *12S*, encoding for the ribosomal RNA 12S was used as an indicator of the number of mitochondria in cells (Renault et al., 2008). Moreover, examination of *sod(Mn)* gene expression level encoding for mitochondrial superoxide dismutase, an enzyme involved in the fight against oxidative stress (Wang et al., 2004) was conducted. The expression levels of *mt* gene were also determined after cloning and sequencing. This gene encodes for the protein metallothionein which is known to be involved in detoxifying excess intracellular metals (Amiard et al., 2006; Baudrimont et al., 1999) and in the protection of cells against Reactive Oxygen Species (ROS) (Amiard et al., 2006; Viarengo et al., 2000). The objectives of this study were to comprehend the mechanisms of U toxicity, identify sensitive biomarkers of U exposure and clarify the relationships between U accumulation and endpoints at different levels of biological organisation.

2. Materials and methods

2.1. General experimental protocol

The crayfish used in this study were all adult intermoult males ($27.2 \pm 5\text{g}$; $9 \pm 0.5\text{ cm}$ from cephalothorax to telson; $n=50$). Organisms were caught on the same day from the Vigueirat swamp in Camargue, south of France (GPS coordinates: $43^{\circ}31.863'\text{N}$ - $4^{\circ}45.417'\text{E}$). They were acclimatized to the experimental conditions for one month (12/12h light/dark photoperiod, and in $17 \pm 1^{\circ}\text{C}$ synthetic water composed of: $\text{Ca}^{2+} = 1640$; $\text{Mg}^{2+} = 500$; $\text{Na}^{2+} = 870$; $\text{K}^{+} = 80$; $\text{Cl}^{-} = 4100$; $\text{SO}_4^{2-} = 509$; $\text{NO}_3^{-} = 76.5$; and $\text{HCO}_3^{-} = 281$ all in $\mu\text{mol/L}$; pH 6.7 ± 0.2). Freshwater ionic constitution was based on the composition of artificial medium used by Zeman et al. (2008) for the microcrustacean *Daphnia magna*. The synthetic water was modified to meet the physiological needs of crayfish. The chosen pH value and the voluntary lack of phosphate ensured high levels of U bioavailability. During the acclimatization period, crayfish were fed every 48 h on a diet of corn and mussels and then starved for 48h before the beginning of the experiment, in order to avoid fecal matter and uneaten food to bind to U and therefore decrease metal bioavailability. During the experiment, animals were exposed for 10 days to a wide range of U concentrations: 0 (controls), 0.03, 0.6, 4 and 8 mg/L of U (from DU stock solution: $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1g/L). The ionic concentrations of the medium (mainly NO_3^{-}) were adjusted for each condition of exposure to remain constant after U addition. U speciation in contaminated waters was simulated using the geochemical speciation software J-CHESS (Java Chemical Equilibrium with Species and Surfaces, Van der Lee, 1998). Groups of 10 crayfish were placed in each treatment tank with 6L of test solution and so were submerged to 3 times their height following ASTM E729-96 recommendations. Half of the water column was renewed manually each day in order to maintain stable water composition and contamination levels. The concentrations of U in water were measured before and after renewal and adjusted to assure mean values significantly close to nominal contamination levels (**Table 15**). The ASTM standard guide lines for conducting acute toxicity tests on macroinvertebrates were respected (ASTM E729, 1996). Thus, the temperature was maintained at $17.2 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$. Several abiotic parameters were monitored daily throughout the exposure, including dissolved oxygen ($73.6 \pm 12.4\%$ O₂), pH (7.01 ± 0.24), conductivity ($602.4 \pm 25.9\mu\text{S}$), and water concentration of ions (NO_3^{-} , NO_2^{-} , Cl^{-} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} by ICS-3000; Ion Chromatography System). The ionic concentrations did not differ significantly from the optimum concentrations mentioned above. Each crayfish was kept in an individual chamber (cylinder made from plastic netting (1 cm mesh, 11 cm diameter) to avoid cannibalism. Crayfish mortality was regularly checked each day.

Table 15: Nominal and measured U (mg/L) concentrations in water throughout the experiment (n=20). U bioaccumulations ($\mu\text{g/g DW}$, mean \pm SEM, n= 4 to 5 in each treatment condition) in gills and in hepatopancreas of the crayfish *Procambarus clarkii* after 4 and 10 days exposure to U (0.03 to 8 mg/L).

Nominal U concentrations in water (mg/L)	Measured U concentrations in water (mg/L)	U bioaccumulation in gills ($\mu\text{g/g DW}$)		U bioaccumulation in hepatopancreas ($\mu\text{g/g DW}$)	
		T4	T10	T4	T10
0	0	0.30 ± 0.15 (n=5)	0.56 ± 0.10 (n=5)	0.29 ± 0.05 (n=5)	0.15 ± 0.01 (n=5) d
0.03	0.033 ± 0.003	152.87 ± 27.7 (n=4)	129.96 ± 9.00 (n=4)	2.84 ± 0.60 (n=4) a	1.15 ± 0.60 (n=4) d *
0.6	0.630 ± 0.060	603.90 ± 94.00 (n=4)	570.94 ± 107.40 (n=5)	6.73 ± 2.00 (n=4) ab	10.48 ± 2.80 (n=5) e
4	3.95 ± 0.14	3950.50 ± 770.00 (n=5) a	8483.49 ± 2250.00 (n=5) b	21.43 ± 9.30 (n=5) bc	14.13 ± 4.00 (n=5) ef
8	8.34 ± 2.5	8005.30 ± 2370.00 (n=4) a	12345.74 ± 5403.00 (n=5) b	30.39 ± 14.00 (n=4) c	78.78 ± 31.20 (n=5) f *

(a,b,c,d,e,f) Means of each sampling time designated with the same letters are not significantly different ($P > 0.05$).

(*) Significant difference between the bioaccumulation at day 4 (T4) and day 10 (T10) ($P < 0.05$).

2.2. Tissues sampling and preparation

At days 4 (T4) and 10 (T10), 4 to 5 live crayfish were sampled from each tank and sacrificed (Table 15). The hepatopancreas and gills were collected from each individual and divided into 3 parts. Two parts were stored at -80°C for further bioaccumulation and genetic analyses. The third part was directly prepared for microscopic analyses.

2.3. Metals quantification

Water samples from each tank were acidified using nitric acid (3.1 mM of HNO_3) prior to analysis of metal content using inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES Optima 4300DV, PerkinElmer, Wellesley/USA; detection limit: $10\mu\text{g/L} \pm 10\%$).

Hepatopancreas and gill samples were first dried at 45°C for 2 days, then digested in 3ml of HNO_3 (15.5 M) for 90 min at 95°C , and then left to dry for 60 min at 105°C . 2ml of H_2O_2 (33%) were added afterwards to complete the digestion and left to dry again for 20 min at 105°C . Samples were finally dissolved in acidified water (3.1 mM of HNO_3) before analysis. Samples were analyzed for the highest U concentrations using ICP-AES and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS Agilent 7500 Cs; quantification limit: $10\text{ ng/L} \pm 7\%$) for the lowest concentrations. Some samples were analyzed using both ICP-AES and ICP-MS techniques to confirm that there were no significant differences between both analytical methods.

2.4. Histochemical and histological methods

Fresh tissues were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 48 h at 4 °C (Lerebours et al., 2010), then washed 3 times for 5 min with 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.4), and then post-fixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h. Samples were subsequently dehydrated with successive baths of ethanol and propylene oxide, and finally embedded in Epon 812 (TAAB). Samples were cut in semi-thin sections of 200 to 500 nm for light microscopy analysis. Semi-thin sections stained with aqueous blue toluidine were observed under a light microscope (Leica, DM 750) and images were saved using a Leica camera ICC50 and LAS EZ software. Ultra-thin sections of 80 and 140 nm were performed for Transmission Electron Microscope (TEM) observation and Energy Dispersive X-ray (EDX) detection respectively. All sections were obtained using an ultramicrotome (UCT, Leica). Ultra-thin sections were mounted on copper grids and observed with a Scanning Transmission Electron Microscope (TEM/STEM, Tecnai G2 Biotwin, FEI company), equipped with a CCD camera (Megaview III, Eloise). Several different subcellular structures were analyzed using the EDX analyzer equipped with a Super Ultra Thin Window (SUTW) model sapphire (EDAX), using an accelerating voltage of 100 KeV, in order to investigate the accumulation of U in the different structures. The electron probe was then focused on specific spots and spectra were recorded after 30 s of analysis. For each replicate organ, at least 30 micrographs of local detailed structures were taken.

2.5. Genetic analyses

2.5.1. Total RNA extraction and reverse transcription of RNAs

Total RNA were extracted from 20 to 40 mg of tissue using the “Absolutely RNA Miniprep kit” (Agilent), according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from total RNA (3µg) using the Stratascript First-Strand Synthesis System (Agilent) according to the manufacturer's instructions. The cDNA mixture was stored at -20 °C until needed.

2.5.2. Cloning and sequencing of *mt* and *atp6* genes

To obtain a partial coding sequence for metallothionein and ATP synthase subunit 6, primers were deduced from alignment of corresponding sequences available in libraries from different phylogenetically related species (preferentially crustaceans) using Clustalw software (**Table 16**). These primers deduced from conserved sequences, were then used on cDNA in

PCR experiments (50 amplification cycles at 95°C for 1 min, 48°C for 1 min and 72 °C for 1 min). PCR products were cloned into pGEM-T-easy Vector System (Promega) with T4 DNA ligase. Competent Cells (Promega) were transformed with 3 µl of the ligation mixture. Positive transformants were selected on ampicillin-containing medium (Luria Broth: 5 g/L of yeast extract, 10 g/L of bactotryptone, 10 g/L of NaCl supplemented with 100 µg/mL ampicillin) and recombinant vectors were then purified and sequenced. Partial genes sequences were determined by Millegen Biotechnologies (La-bège, France) and were validated by comparing their similarity to other genes in GeneBank using Blastp and Blastn software (National Center of Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA). *mt* was registered in GenBank under the accession number GU220368.1 and *atp6* under GU220369.1.

Table 16: Gene names, primers deduced from alignment of corresponding sequences from different species and their accession numbers.

Gene	Primers (5'-3')	Accession number
ATP syntase subunit 6 (<i>atp6</i>)	CGATTGGCAGCAAATATAATTGC (a) ATGATTGCAACGGCAGATTCTA (b)	<i>Cherax destructor</i> AY383557 <i>Pseudocarcinus gigas</i> NC006891 <i>Cherax setosus</i> AY153876 <i>Panaeus notialis</i> X84350 <i>Euphausia superba</i> AB084378
Metallothionein (<i>mt</i>)	GAGTGTGCCGAGGGCGGGTG (a) GCAGGGCTTGGAGCAGGTCTTG (b)	<i>Portunus pelagicus</i> AY057395 <i>Homarus americanus</i> AJ401298 <i>Pacifastacus leniusculus</i> AF199482

^(a) Forward primer. ^(b) Reverse primer.

2.5.3. Real-time quantitative PCR

Real-time PCR reactions were performed in a Light Cycler (Roche) following the manufacturer's instructions using the DNA intercalating dye SybrGreen I. The amplification program consisted of one cycle at 95 °C for 10 min followed by 50 amplification cycles at 95°C for 5 s, 60°C for 5 s, and 72°C for 20 s. Specific primer pairs used to determine target gene expression levels are listed in **table 17**. PCR specificity was determined for each reaction from the dissociation curve of the PCR product. This dissociation curve was obtained by following the SybrGreen fluorescence level during a gradual heating from 60 to 95 °C. Relative quantification of each gene expression level was normalized according to the expression of the housekeeping gene *18S* gene. Relative expression of a gene was calculated using the $2^{-\Delta CT}$ method as described by Livak and Schmittgen (2001) where ΔCT represents the difference between the cycle threshold of a specific gene and the cycle threshold of the *18S* gene. Therefore, the Expression factor (EF) of each gene compared with control corresponds to the following equation: $EF = 2^{-\Delta CT}(\text{Treatment}) / 2^{-\Delta CT}(\text{Control})$.

Table 17: Gene names, accession numbers and specific primers pairs used in the quantitative PCR analysis of the 6 studied genes of *P. clarkii*.

Gene	Primers (5'-3')	Accession number
Cytochrome C oxydase subunit 1 (<i>cox1</i>)	AATGGGATACCTCGACGTTATTCA (a) GCAGGAGGATAAGAATGCTGT (b)	AY701195.1
ATP syntase subunit 6 (<i>atp6</i>)	GGCAGCAAATATAATTGCTGG (a) TTGCAACGGCAGATTCTAATAT (b)	GU220369.1
Ribosomal RNA 12 S (12s)	ACTAGAATATTAGGAGTTATGTTCTT(a) GCTGCACCTTGATCTAATATAC (b)	EF012280.1
Manganese Superoxyde dismutase <i>Sod(Mn)</i>	GCCACCACTAAAATACGAGTA (a) CCATTGAACTTTATAGCTGGTA (b)	EU254488.3
Metallothionein (<i>mt</i>)	CGAGGGCGGGTGCAAGACT (a) CTTGAGCAGGTCTTGGCAC (b)	GU220368.1
18S ribosomal RNA(<i>18s</i>)	GCAATAACAGGTCTGTGATGCC (a) AGGGACGTAATCAGCGCAA(b)	X90672.1

^(a) Forward primer. ^(b) Reverse primer.

2.6. Statistical analysis

Results are given as means \pm the standard error of the mean (SEM). All analyses were done using the R language and environment for statistical computing (R Development Core Team, 2009). For all statistical results, a probability of $P < 0.05$ was considered significant. Survival rate was calculated using Kaplan Meier's estimator (Kaplan, 1983). This method estimates the fraction of living organisms for a certain period of time after treatment and takes into account "censored" data (i.e. crayfish lost due to sampling at T4 before the final outcome was observed at T10). To determine whether there is or not a significant effect of contaminant concentrations on survival rates, a regression using Weibull distribution was performed. The significant effects of factors such as time and metal concentrations in water on bioaccumulation were analysed using analysis of covariance (ANCOVA), after checking assumptions of normality and variance homogeneity of residuals. The assumption of normality was checked visually using a quantile-quantile plot (QQplot) of standardized residuals versus normal quantiles. The assumption of variance homogeneity was checked on residuals using standardized residuals versus a fitted plot (Faraway, 2002). When the assumptions were not satisfied, a logarithmic data transformation was applied. If significant effects were detected, Tuckey's multiple comparison test was used to determine whether means between pairs of samples were significantly different from one another. The relationships between metal concentration in organs, and gene expression levels of each individual were investigated using the non-parametric Spearman rank correlation test due to the non-linearity of the data.

3. Results

3.1. Survival rate

No mortality was recorded in the control group (0 mg/L). Increasing U concentrations had no significant effect on crayfish survival ($P= 0.0794$) (**Figure 65**). 100% survived exposure to 4 mg/L of U at T10 whereas 80% survived exposure to 0.03 mg/L of U. After 10 days of exposure to 0.6 and 8 mg/L of U, only 10% of the crayfish died.

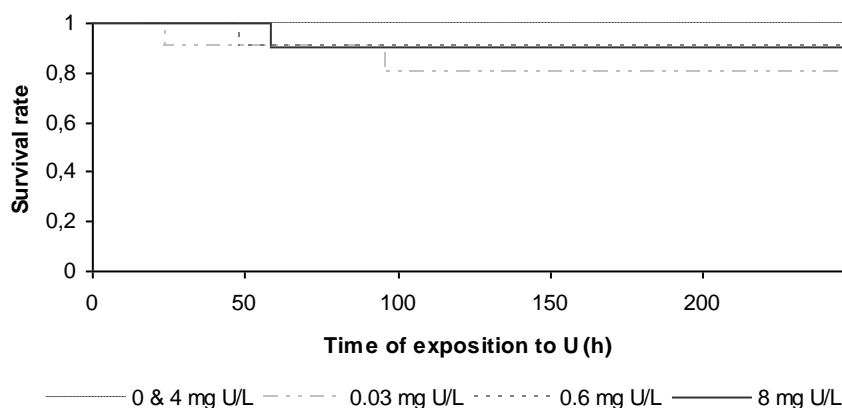


Figure 65 : Kaplan-Meier's presentation of the survival rate of *Procambarus clarkii* exposed to U during 240 h of exposure

3.2. U bioaccumulation in crayfish organs

The results of U accumulation in the gills and hepatopancreas at T4 and T10 are shown in **table 15** and expressed in dry weight (DW). Within the control group, U levels were less than 0.6 $\mu\text{g/g}$ DW. As U concentrations in water rose, accumulation of the metal in the gills rose from 100 to 12000 $\mu\text{g/g}$, and accumulation of U in the hepatopancreas ranged from 1 to 80 $\mu\text{g/g}$. A high correlation was found between U bioaccumulation in organs and the concentrations of U in the test water (gills: Spearman coefficient $R= 0.94$, $P< 2.2 \cdot 10^{-16}$; hepatopancreas: Spearman coefficient $R= 0.88$, $P= 3.47 \cdot 10^{-15}$). At each time tested U concentrations in gills were significantly different when compared between each other ($P< 0.05$), except between the concentrations in gills exposed to 4 and 8 mg/L of U ($P= 0.2$ at T4 and $P= 0.92$ at T10). A dose dependency of U bioaccumulation was also observed in the hepatopancreas. U accumulation was not significantly time dependent ($P= 0.069$) in gills, yet there was a significant difference between U concentrations in the hepatopancreas of crayfish exposed to 0.03 and 8 mg/L of U ($P< 0.05$) at T4 and T10. Concentrations of U were considerably higher in gills than in hepatopancreas at T4 as well as at T10 (T4: $P= 4.9 \cdot 10^{-13}$; T10: $P= 1.5 \cdot 10^{-6}$).

3.3. U localization and histological alterations

Histological localization of U using TEM-EDX showed flake shaped residues of U, co-localized with phosphorus in the gill epithelium after 10 days of exposure (**Figure 66**). Distinct alterations of the tissue structure could be discerned best in the hepatopancreas after 10 days of contamination (**Figure 67**). The epithelium of several tubules showed numerous pathologically altered cells with cytoplasmic vacuoles. Epithelial organization of cells was lost because cell walls were disintegrated. Degenerated tubules were also observed at high levels of U contamination. However, this phenomenon was confined to individual tubules and did not affect the entire digestive gland, so some intact glandular epithelium was present even at high concentrations of exposure.

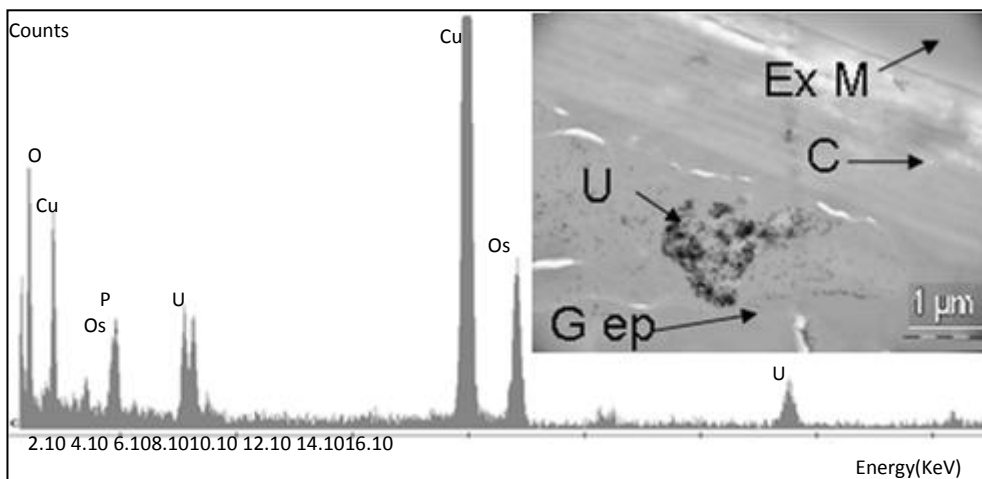


Figure 66: Transmission electron micrographs coupled with energy dispersive X-ray results of *P. clarkii* gills exposed for 10 days to 4 mg/L of U. Elements detected in matrix: O: oxygen, Os: osmium and Cu: copper. Elements detected in gills epithelium: U: uranium and P: phosphorus. (Ex M) extra-cellular matrix, (C) cuticle, (G ep) gill epithelium.

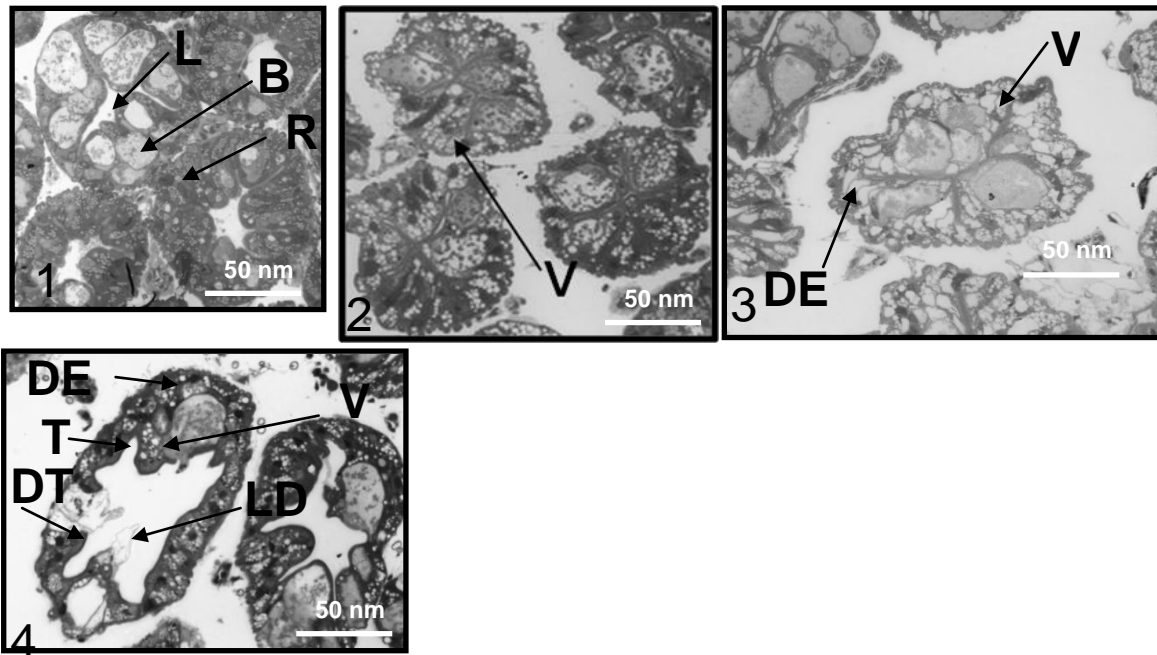


Figure 67: Histopathological alterations in *P. clarkii* hepatopancreas tubules after 10 days of exposure to dissolved heavy metals: (1) control; (2) 0.6 mg/L U; (3) 4 mg/L U; (4) 8 mg/L U. (R) absorptive cells. (B) secretory cells. (L) lumen. The pathologies observed were: (V) vacuolization; (T) thinning of the epithelium; (LD) lumen dilatation; (DE) disorganized epithelium; (DT) degenerated tubule. Magnification x 40.

3.4. Gene expression levels

In contaminated gills, the *cox1* gene was repressed tardily in the three highest U conditions (Table 18). The *atp6* gene was over-expressed at T4 at the two lowest U exposure levels, and at T10 when exposed to 8 mg/L of U. The expression levels of the *I2S*, *mt* and *sod(Mn)* genes decreased at T4 and then increased at T10.

Contaminated hepatopancreas showed the most pronounced changes at the lowest U concentration tested. Indeed, at 0.03 mg/L the expression levels of *atp6*, *I2S* and *mt* were increased at T4 but returned to basal level at T10. In contrast, *cox1* and *sod(Mn)* remained unchanged at T4 and were repressed at T10. No significant variations were observed for most of the genes in the hepatopancreas when exposed to 0.6 mg/L, except for the *atp6* gene at T10. At 4 mg/L an over-expression was observed at T4 for *cox1* and *I2S*, while reduced expression levels appeared at T10 for the *I2S* and the *sod(Mn)* genes. At the highest U exposure level, only *cox1* and *sod(Mn)* were repressed at T4, as well as *I2S* at T10.

Table 18: Expression's factors (EF) of the 5 genes studied in *P. clarkii* compared to the basal level of controls (n= 4 to 5 in each treatment condition).

Organs	U treatment condition (mg/L)	<i>cox1</i>		<i>atp6</i>		<i>12s</i>		<i>sod(Mn)</i>		<i>mt</i>	
		T4	T10	T4	T10	T4	T10	T4	T10	T4	T10
Gills	0.03	/	/	55	/	-2	/	-3	/	-3	3
	0.6	/	-3	3	/	-7	/	-2	2,5	-5	17
	4	/	-2	/	/	-7	/	/	6	-4	32
	8	-3	-2	/	3	-10	-2,5	/	/	-6	5
Hepatopancreas	0.03	/	-7,5	64	/	2	/	/	-5	2	/
	0.6	/	/	/	10	/	/	/	/	/	/
	4	2	/	/	/	2	-2,5	/	-3	/	/
	8	-5	/	/	/	/	-3,5	-2	/	/	/

^(/) Equal to control. ⁽⁻⁾ Down-regulated. ⁽⁺⁾ Up-regulated. Only $EF \geq 2$ or $EF \leq -2$ are considered statistically significant.

3.5. Gene expressions vs bioaccumulation

A correlation between gene expression levels and metal bioaccumulation were assessed without taking into account any possible variations in molecular responses which might depend on the type of organs and the period of exposure (**Figure 68**). Thus, for every sampling time, the bioaccumulation of U in each organ of each individual was associated with the genes expression levels which pertaining in that same organ. In both studied organs the *cox1* gene expression level was negatively correlated with U concentration in organs (Spearman coefficient $R = -0.48$, $P = 1.2 \cdot 10^{-5}$). Moreover, the down-regulation of *sod(Mn)* appeared to be highly correlated with U bioaccumulation in gills and hepatopancreas (Spearman coefficient $R = -0.3$, $P = 0.021$).

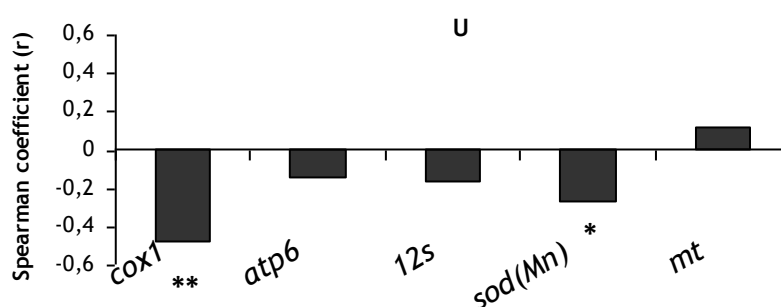


Figure 68: Spearman correlation coefficients (r) between U concentrations in organs and gene expression levels of the 5 genes studied (n= 4 to 5 in each treatment condition). (*) $P < 0.05$. () $P < 0.005$.**

4. Discussion

4.1. Effects on survival rate

The follow-up of the crayfish mortality showed that *Procambarus clarkii* was highly resistant to U toxicity since no significant mortality was observed even at the highest concentrations of exposure. The 10 days U LC₅₀ in our experimental conditions (pH 7) is probably higher than 8 mg U/L and confirms the resistance capacity of this species to the tested metal. Few ecotoxicological data concerning the effects of U on aquatic invertebrates are available in the literature, and to our knowledge the U LC₅₀ values of crustaceans are limited to those of micro-organisms (Poston et al. 1984; Kuhne et al. 2002; Sheppard et al. 2005; Zeman et al. 2008). Some laboratory studies have shown that the toxicity of U decreases as pH, conductivity and alkalinity of the water increases (Markich et al. 2000; Poston et al. 1984; Zeman et al. 2008). Zeman et al. (2008) confirmed that the 48h-LC₅₀ of *Daphnia magna* varied from 0.390 ± 0.040 mg/L at pH 7 to 7.8 ± 3.2 mg/L at pH 8. The U 48-hr LC₅₀ of this same species in Columbia River water (with high levels of organic matter) was 6 mg /L at pH 7.9- 8. Acute toxicity diminished by a factor of 7.5 as mean water hardness and alkalinity values increased (Poston et al. 1984). The bioavailability and toxicity of uranium are closely linked to its chemical speciation in solution. Metal uptake and toxicity normally vary as a function of the concentration of the free-metal ion in solution (Niyogi and Wood, 2004). The influence of pH is twofold: on one hand, increasing pH results in enhanced complexation of the uranyl ion by hydroxides and carbonates, hence reducing its bioavailability; on the other hand, the decrease in competing protons can increase uranyl bioavailability (Fortin et al. 2007). These considerations led us to conduct our experiments in synthetic water, which provides a compromise between the conditions necessary for healthy crayfish physiology and good U bioavailability. The capacity of crayfish to tolerate exposure to high levels of U could allow the use of this species as a bioindicator of a large range of contamination levels.

4.2. Accumulation

Elevated concentrations of U in organs were observed despite the low mortality rate. It is difficult to understand how high levels of U can be tolerated by crayfish without increased mortality without knowing how toxic metals are distributed at the sub-cellular level in their tissues (Perceval et al., 2006). Our TEM observations led to the detection of piles of flake shaped U inside the gill epithelium. This form of U was mainly co-localized with phosphorus which is insoluble and non-toxic. U detoxification mechanisms have been described by

Chassard-Bouchaud (1982) in the crayfish *Pontastacus leptodactylus* and in the bivalve *Corbicula fluminea* by Simon et al. (2011). These authors found that U was stored in spherocrystals and in lysosomes as a complex with phosphates. Granules containing heavy metals have been found in epithelial cells of invertebrates. These granules may contain either calcium or heavy metals such as zinc, copper or iron, complexed with sulfur or phosphorus (Ahearn et al., 2004). Identical results have been observed in *Astacus astacus* after direct exposure to aluminum (Fjeld et al., 1988). Subsequent cellular exocytotic events may extrude these concretions from the cell as part of an excretory mechanism (Ahearn et al., 2004; Marigómez et al., 2002). However, in the case of radionuclides, high levels of U (an alpha emitter) even in precipitated forms could have radiotoxic effects. U bioaccumulation in organs was dose-dependant since U concentrations in tissues were highly correlated with those in water (Spearman coefficient $R= 0.9$ in gills; $R= 0.8$ in hepatopancreas; $P< 0.05$). There was a tendency for metal bioaccumulation to increase with time both organs. Crayfish were able to rapidly bioconcentrate the contaminant in their tissues (high BCF: e.g. BCF gills-8 mg U/L~832). Nevertheless, metal concentrations in the gills were higher than those in the hepatopancreas. Moreover, the bioaccumulation tended to stabilize after exposure to 4 mg/L of U. The gills are in direct contact with the medium which normally results in both adsorption and internalization of toxic metals. Adsorption of U on the cuticle could explain the high accumulation levels, even though the MET and EDX analyses did not show such a mechanism. High metal concentrations in water increase the occurrence of interactions between U and conveyors located in the gills epithelium, so it is possible that a high metal adsorption occurred and could have saturated the sites of entrance of the metal resulting in a stabilization of the bioaccumulation.

4.3. Histopathological effects

The histological observations revealed information about U effects on another level of biological organisation and helped better understand the toxicological profile of U. The extent of the histopathological damage was in line with the bioaccumulation of U determined in the soft tissues and appeared to be dose-dependent, as evidenced by the increasing vacuolization and the tendency of the epithelium to disintegrate, and the tubules to degenerate. U exposure induces a variety of histological impairments in fish (Barillet et al., 2010; Cooley and Klaverkamp, 2000). The whitefish *Coregonus clupeaformis* showed significantly altered hepatocyte morphometrics, hepatocyte necrosis and alterations of bile ductile epithelium when fed U-contaminated diet (Cooley and Klaverkamp, 2000). Vacuolization in hepatic cells

of the juvenile northern pike *Esox lucius* resulting from contamination with U have also been reported (Kelly and Janz, 2009). Even though U concentrations in our experiment did not lead to significant mortality of crayfish, severe histological damages were observed and could be used as biomarkers of U contamination.

4.4. Molecular responses

The study of gene expression levels helps understanding uranium's mechanisms of toxicity and then enables the determination of good biomarkers of contamination. The molecular responses suggested that mitochondria were affected by the presence of U in both organs. Gene expression levels were less altered in hepatopancreas than in gills, this could be due to the lower levels of U in the hepatopancreas. U had a considerable effect on the cytochrome c oxidase (complex IV) since a significant relationship was observed between U concentrations and *cox1* gene repression (**Figure 68**). The correlation between U concentrations in organs and *sod(Mn)* gene repression was also dose-dependent. Moreover, the down-regulation of *cox1* gene was significantly correlated with *sod(Mn)* (Spearman coefficient $R= 0.6$; $P< 0.001$). It is well known that in the absence of any contamination, mitochondria are the main source of ROS in the cell (Wang et al., 2004). Thus we can hypothesize that with the impairment of the mitochondrial metabolism, ROS levels decreased which led to the repression of *sod(Mn)* gene. Recent experiments on zebrafish *Danio rerio* have shown that the presence of extremely low concentrations of U in the organs could also result in an impact on the expression of genes involved in resisting oxidative stress and in mitochondrial metabolism (Lerebours et al., 2010; Lerebours et al., 2009). Over-expression of the *atp6* gene could be explained by two different mechanisms. The first possible explanation is that mitochondria produced more ATP synthase to create enough ATP to maintain cell viability and compensate for the impairment of the complex IV. However in the literature it is more common to find that the gene expression of *atp* and *cox* follows the same pattern. For example, in the eel *Anguilla Anguilla* Cd caused a decrease in both *cox1* and *atp6-8* genes expression levels when exposed for 14 days to 2 and 10 $\mu\text{g/L}$ of Cd (Pierron et al., 2007). At high levels of exposure to U, a second explanation for the increase of the expression levels of *atp6* gene could be linked to a change in the classic mitochondrial metabolism. It is known that in some pathological conditions, the complex V can show a "reverse" mechanism. When the complex IV is inhibited, the proton transfer from the mitochondrial matrix to the periplasmic space decreases. A severe decrease of the proton gradient leads to a decrease of the mitochondrial inner membrane potential which stimulates the functioning of ATPase in an

unusual manner. In this case, the complex V can reverse itself and hydrolyse ATP to pump protons back to the periplasmic space (Nevière, 2008; Wang and Oster, 1998). We can therefore hypothesise that the mitochondria produced enough ATPase to compensate for the decrease of the electrochemical gradient. Expression levels of the *I2s* gene indicated that cells were struggling against the toxicity of U by increasing the numbers of mitochondria to make up for those which were not functioning correctly. Metallothioneins are characterized by an important proportion of cysteinyl residues, which serve as ligands for metal chelation (Amiard et al., 2006; Martín-Díaz et al., 2006) but can also trap reactive oxygen species (ROS) (Fang et al., 2010; Viarengo et al., 2000). The *mt* gene was more expressed at T10 than T4 in all exposure conditions. This could be linked to the natural presence of a sufficient concentration of MT proteins at the beginning of the exposure. In the presence of large quantities of MT (ex T10), cells could increase the numbers of their mitochondria since this protein can efficiently trap the ROS. Consequently cells could reduce their effort in producing ATP synthase (*atp6* less up-regulated at T10). The significant up-regulation of the *mt* gene in the gills at T10 demonstrates that U can generate an important oxidative stress when the organs present high U accumulations. These results agree with previous studies that have shown oxidative stress in fish after exposure to waterborne U (Barillet et al., 2007; Barillet et al., 2011). Information on MT response in the presence of U is scarce. Cooley and Klaverkamp (2000) found no increase of MT concentration in the liver of U contaminated fish except for the highest trophic exposure (10 mg U/g) at day 10. A recent study showed that in the presence of MTs the percentage of nematode *Caenorhabditis elegans* mortality, decreased when exposed to different concentrations of depleted U (Jiang et al., 2009). However, the exact mechanism by which MTs afford nematodes protection to U exposure remains unclear.

5. Conclusions

Mitochondria appear to be cellular targets for U. The impact on these organelles was evident from the alteration of mitochondrial gene expression levels. Impairment of the mitochondrial metabolism was accompanied by alterations in the expression levels of genes involved in responses to oxidative stress and was followed by histological damage. The study of gene expression levels could be a promising tool for evaluating stress due to U exposure. *Procambarus clarkii* bioaccumulated U rapidly and was highly resistant to the contamination. It could therefore be a good candidate for use as a bioindicator of U pollution and in ecological risk assessments. Evaluation of U concentrations in sub-cellular fractions is also necessary to accurately highlight the distribution of U inside the cell. Further research is also

needed to better understand the impairment of the mitochondrial chain reaction. Measurements of ATP levels, oxygen consumption, ROS production in the cells, and evaluation of enzyme activities involved in oxidative stress responses could clarify the effect of U on ATPsynthase.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr F. Coppin for J-CHESS simulations, N. Gauthier for providing the crayfish, B. Geffroy for his assistance in dissecting *P. clarkii*, S. Pierrisnard for ionic chromatography measurements, I. Cavalie for her help in U measurements, C. Della-Vedova for helping in statistical analysis and R. Al kaddissi for his proofreading support. This study was supported by the ENVIRHOM research program funded by the institute of Radioprotection and Nuclear Safety and co-financed by the CNRS.

References

- Ahearn, G.A., Mandal, P.K., Mandal ,A., 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans. A review. *J Comp Physiol B: Biochem Syst Environ Physiol.* 174, 439-452.
- Alcorlo, P., Otero, M., Crehuet, M., Baltanás, A., Montes, C., 2006. The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiamar (SW, Spain). *Sci Total Environ.* 366, 380-390.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol.* 76, 160-202.
- Anderson, M.B., Reddy, P., Preslan, J.E., Fingerman, M., Bollinger, J., Jolibois, L., Maheshwarudu, G., George, W.J., 1997. Metal Accumulation in Crayfish, *Procambarus clarkii*, Exposed to a Petroleum-Contaminated Bayou in Louisiana. *Ecotoxicol Environ Saf.* 37, 267-272.
- ASTDR, 1999. Toxicological profile for uranium. public health service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ASTM E729, 1996. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. Available at: <http://www.astm.org> (Reapproved 2007), 22 p.

- 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.
- Barillet, S., Adam-Guillermin, C., Palluel, O., Porcher, J.M., Devaux, A., 2011. Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environ Pollut.* 159, 495-502.
- Barillet, S., Larno, V., Floriani, M., Devaux, A., Adam-Guillermin, C., 2010. Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure. *Aquat Toxicol.* 100, 295-302.
- Baudrimont, M., Andréas, S., Metivaud, J., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. *Environ Toxicol Chem.* 18, 2472-2477.
- Betcher, R.N., Gascoyne, M., Brown, D., 1988. Uranium in groundwaters of southeastern Manitoba, Canada. *Can J Earth Sci.* 25, 2089-2103.
- Cannino, G., Ferruggia, E., Luparello, C., Rinaldi, A.M., 2009. Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion.* 9, 377-384.
- Chassard-Bouchaud, C., 1982. Uranium concentration by crustacea: A structural, ultrastructural and microanalytical study by secondary ion emission and electron probe X ray microanalysis. *C R Séances Acad Sci III.* 294, 919-924.
- Colle, C., Garnier-Laplace, J., Roussel-Debet, S., Adam, C., Baudin, J.P., 2001. Comportement de l'uranium dans l'environnement. Metivier, H. (Ed.), *L'uranium de l'environnement à l'homme.* EDP Sci., Les Ulis., 187-211.
- Cooley, H.M., Klaverkamp, J.F., 2000. Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat Toxicol.* 48, 477-494.
- Duchen, M.R., 2004a Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med.* 25, 365-451.
- Duchen, M.R., 2004b. Roles of Mitochondria in Health and Disease. *Diabetes.* 53, S96-S102
- Fang, Y., Yang, H., Wang, T., Liu, B., Zhao, H., Chen, M., 2010. Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam *Macrta veneriformis*. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol.* 151, 325-333.
- Faraway, J., 2002. Practical Regression and Anova using R [online]. available at: <http://cran.r-project.org/doc/contrib/Faraway-PRA.pdf> [accessed 2009].

- Fjeld, E., Hessen, D.O., Roos, N., Taugbøl, T., 1988. Changes in gill ultrastructure and haemolymph chloride concentrations in the crayfish, *Astacus astacus*, exposed to de-acidified aluminium-rich water. *Aquacult.* 72, 139-150.
- Fortin, C., Denison, F.H., Garnier-Laplace, J., 2007. Metal-phytoplankton interactions: Modeling the effect of competing ions (H^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+}) on uranium uptake. *Environ Toxicol Chem.* 26, 242-248.
- Garceau, N., Pichaud, N., Couture, P., 2010. Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquat Toxicol.* 98, 107-112.
- Gherardi, F., 2006. Crayfish invading Europe: the case study of *Procambarus clarkii*. *Mar Freshw Behav Phy.* 39, 175-191.
- Hogan, A.C., Van Dam, R.A., Houston, M.A., Harford, A.J., Nou, S., 2010. Uranium exposure to the tropical duckweed *Lemna aequinoctialis* and Pulmonate snail *Amerianna cumingi*: Fate and toxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 204-215.
- Jiang, G.C.T., Hughes, S., Sturzenbaum, S.R., Evje, L., Syversen, T., Aschner, M., 2009. *Caenorhabditis elegans* metallothioneins protect against toxicity induced by depleted uranium. *Toxicol Sci.* 111, 345-354.
- Kaplan, E.L., 1983. In a retrospective on the seminal paper in "This week's citation classic". *Current Contents.* 24.
- Kelly, J.M., Janz, D.M., 2009. Assessment of oxidative stress and histopathology in juvenile northern pike (*Esox lucius*) inhabiting lakes downstream of a uranium mill. *Aquat Toxicol.* 92, 240-249.
- Kuhne, W.W., Caldwell, C.A., Gould, W.R., Fresquez, P.R., Finger, S., 2002. Effects of depleted uranium on the health and survival of *Ceriodaphnia dubia* and *Hyaella azteca*. *Environ Toxicol Chem.* 21, 2198-2203.
- Lerebours, A., Adam-Guillermin, C., Brèthes, D., Frelon, S., Floriani, M., Camilleri, V., Garnier-Laplace, J., Bourdineaud, J.P., 2010. Mitochondrial energetic metabolism perturbations in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium. *Aquat Toxicol.* 100, 66-74.
- Lerebours, A., Gonzalez, P., Adam, C., Camilleri, V., Bourdineaud, J.P., Garnier-Laplace, J., 2009. Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles, and gills of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant waterborne uranium concentrations. *Environ Toxicol Chem.* 28, 1271-1278.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta CT}$ method. *Methods.* 25, 402-408.

- Lyon, R., Simkiss, K., 1984. The ultrastructure and metal-containing inclusions of mature cell types in the hepatopancreas of a crayfish. *Tissue Cell*. 16, 805-817.
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc Res Techniq*. 56, 358-392.
- Markich, S.J., Brown, P.L., Jeffree, R.A., Lim, R.P., 2000. Valve movement responses of *Velesunio angasi* (Bivalvia: Hyriidae) to manganese and uranium: An exception to the free ion activity model. *Aquat Toxicol*. 51, 155-175.
- Martín-Díaz, M.L., Tuberty, S.R., McKenney, Jr C.L., Blasco, J., Sarasquete, C., DelValls, T.A., 2006. The use of bioaccumulation, biomarkers and histopathology diseases in shape *Procambarus clarkii* to establish bioavailability of Cd and Zn after a mining spill. *Environ Monit Assess*. 116, 169-184.
- Meyer, W., Kretschmer, M., Hoffmann, A., Harisch, G., 1991. Biochemical and histochemical observations on effects of low-level heavy metal load (lead, cadmium) in different organ systems of the freshwater crayfish, *Astacus astacus* L. (Crustacea: Decapoda). *Ecotoxicol Environ Saf*. 21, 137-156.
- Muriana, F.J.G., Ruiz-Gutierrez, V., Gallardo-Guerrero, M.L., Minguez-Mosquera, M.I., 1993. A study of the lipids and carotenoprotein in the prawn, *Penaeus japonicus*. *J Biochem*. 114, 223-229.
- Nevière, R., 2008. Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Réanimation*. 17, 185-191.
- Niyogi, S., Wood, C.M., 2004. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environ Sci Technol* 38: 6177-6192.
- Perceval, O., Couillard, Y., Pinel-Alloul, B., Campbell, P.G.C., 2006. Linking changes in subcellular cadmium distribution to growth and mortality rates in transplanted freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*). *Aquat Toxicol*. 79, 87-98.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Bourdineaud, J.P., Elie, P., Massabuau, J.C., 2007. Common pattern of gene expression in response to hypoxia or cadmium in the gills of the European glass eel (*Anguilla anguilla*). *Environ Sci Technol*. 41, 3005-3011.
- Poston, T.M., Hanf, R.W., Simmons, M.A., 1984. Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. *Water, Air, Soil Pollut*. 22, 289-298.
- Pourahmad, J., Ghashang, M., Etehadi, H.A., Ghalandari, R., 2006. A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity. *Environ Toxicol*. 21, 349-354.

- R Development Core Team, 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Ragnarsdottir, K.V., Charlet, L., 2000. Uranium behavior in natural environments. Environmental mineralogy: Microbial interactions, anthropogenic influences. Contaminated land and waste management. Mineral society of Great Britain & Ireland ed., 333-377.
- Renault, S., Baudrimont, M., Mermer-Dudons, N., Gonzalez, P., Mornet, S., Brisson, A., 2008. Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: A phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). Gold Bull. 41, 116-126.
- Risso-De Faverney, C., Orsini, N., De Sousa, G., Rahmani, R., 2004. Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: Involvement of oxidative stress. Aquat Toxicol. 69, 247-258.
- Sánchez López, F.J., Gil García, M.D., Martínez Vidal, J.L., Aguilera, P.A., Garrido Frenich, A., 2004. Assessment of Metal Contamination in Doñana National Park (Spain) using Crayfish (*Procambarus Clarkii*). Environ Monit Assess. 93, 17-29.
- Sheppard, S.C., Sheppard, M.I., Gallerand, M.O., Sanipelli, B., 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. J Environ Radioact. 79, 55-83.
- Simon, O., Floriani, M., Cavalie, I., Camilleri, V., Adam, C., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., 2011. Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages in the chronically exposed bivalve *Corbicula fluminea*. J. Environ. Radioact 102 (8), 766-773.
- Simon, O., Garnier-Laplace, J., 2005. Laboratory and field assessment of uranium trophic transfer efficiency in the crayfish *Orconectes limosus* fed the bivalve *C. fluminea*. Aquat Toxicol. 74, 372-383.
- Suárez-Serrano, A., Alcaraz, C., Ibáñez, C., Trobajo, R., Barata, C., 2010. *Procambarus clarkii* as a bioindicator of heavy metal pollution sources in the lower Ebro River and Delta. Ecotoxicol Environ Saf. 73, 280-286.
- Van der Lee, J., 1998. Thermodynamic and mathematical concepts of CHESS. GIG-Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau, France.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. Cell Mol Biol. 46, 407-417.

- Wang, H., Oster, G., 1998. Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature* 396: 279-282.
- Wang Y, Fang J, Leonard S.S, Rao K.M.K (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 36, 1434-1443.
- WHO, 2001. Depleted uranium, sources, exposure and health effects. World Health Organisation.
- Zeman, F.A., Gilbin, R., Alonzo, F., Lecomte-Pradines, C., Garnier-Laplace, J., Aliaume, C., 2008. Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol.* 86, 370-378.

Chapitre IV-B

*Effets de l'uranium sur les réponses
moléculaires chez l'écrevisse P. clarkii
après une exposition chronique :
Les enseignements à tirer.*

Effects of uranium on crayfish *Procambarus clarkii* mitochondria and antioxidant responses after chronic exposure: what have we learned?

Simone Al Kaddissi^{1,2}, Alexia Legeay², Antonia Concetta Elia³, Patrice Gonzalez², Virginie Camilleri¹, Rodolphe Gilbin¹, and Olivier Simon¹.

¹Laboratory of Radioecology and Ecotoxicology (LRE), Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN), Bd 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-Lez-Durance, France.

²Laboratory of Aquatic Ecotoxicology, University Bordeaux 1/UMR CNRS 5805, Dr Peyneau square, 33120 Arcachon, France.

³Ecotoxicology Laboratory, Department of Cellular and Environmental Biology, University of Perugia, 06123 Perugia, Italy.

Abstract

We examined the impacts of Uranium (U) on mitochondria and on the response of antioxidants in the gills and the hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii* after long-term exposure (30 and 60 days) to an environmentally relevant concentration (30 µg U/L). The expression of mitochondrial genes (*12s*, *atp6*, and *cox1*), as well as the genes involved in oxidative stress responses (*sod(Mn)* and *mt*) were evaluated. The activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPX, and GST) were also studied. U accumulation in organs induced changes in gene expression. The evolution of these transcriptional responses and differences between gene expression levels at high and low doses of exposure were also discussed. This study demonstrated that, after long-term exposure, U caused a decrease in antioxidant activities and induced oxidative stress. A possible ROS-mediated U cytotoxic mechanism is proposed. Expression levels of the investigated genes can possibly be used as a tool to evaluate U toxicity and seem to be more sensitive than the enzymatic activities. However a multiple biomarker approach is recommended as the perturbed pathways and the mode of action of this pollutant are not completely understood.

Keywords: uranium, mitochondria, oxidative stress, gene expression levels, antioxidants, biomarkers

1. Introduction

Uranium (U) is a ubiquitous environmental trace metal, often found in water supplies as a non-essential inorganic component (Bleise et al. 2003). Concentrations in freshwater ecosystems are highly variable and range from 0.01 µg/L to over 12.4 mg/L, depending on the geological background (Salonen 1994; WHO 2001). U may occur in different oxidation states, the major forms being U(VI) in oxic water, and U(IV) in anoxic water (Markich 2002). In addition to its natural occurrence and distribution in the environment, U has also several civilian and military applications that could cause its dispersion and increase its abundance in environmental compartments (Bleise et al. 2003). These anthropogenic activities include the use of phosphate fertilizers, various mining activities, and the industrial processing of U — including the use of depleted U— for the manufacture of nuclear fuel and other products (ATSDR 1999). Depleted U (DU) is artificially obtained as a by-product of the U enrichment process and is about 60% less radioactive than natural U, which is considered a weakly radioactive element. Depleted U, however, retains all the chemical properties of natural U (WHO 2001). Thus, effects from exposure of biota to either natural U or DU are usually attributed to their chemical toxicity (ASTDR 1999). Nevertheless, the mechanisms by which this metal induces its toxicity have not been sufficiently investigated (Pourahmad et al. 2006; Barillet et al. 2007; Al Kaddissi et al. 2011). A greater knowledge of interactions between U and living organisms is needed in order to select pertinent biomarkers that could be used in ecological risk assessments. Certain studies have shown that this radioelement is able to chemically activate oxygen species in the course of redox reactions via the redox chemistry of transition metals (Miller et al. 2002; Yazzie et al. 2003). Moreover, Jones et al. (2003) stated that since U is an alpha-emitting radioactive element (WHO 2001; Taulan et al. 2004) it can enhance the production of free radicals via the ionization phenomenon induced by alpha particle emissions. High quantities of free oxygen species (generated within cells) sometimes exceed the cell's protective controllability, resulting in damage to cell proteins, nucleic acids and lipids (Labrot et al. 1996; Barillet et al. 2007; Lourenço et al. 2010). In a previous study, carried out in our laboratory, we demonstrated that U alters the expression of some mitochondrial genes (*atp6*, *cox1*, *12S*) and genes involved in oxidative stress responses (*sod(Mn)*, *mt*) in *Procambarus clarkii* after short-term exposure (4 and 10 days) to 30 µg/L (Al Kaddissi et al. 2011). We supposed that this radioelement can generate oxidative stress. Further experiments were, however, required to improve our understanding of the effects of U on *P. clarkii* and to choose potential markers of U toxicity. Thus evaluation of the responses of the selected biomarkers after long term exposure was needed. It was also necessary to

investigate the responses of the classic major indicators of oxidative stress such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione S-transferase (GST). Since the genes of *P. clarkii* that encode for these antioxidants have not been sequenced, the investigation of oxidative stress induction had to be done by following the enzymatic activities. It is established that *P. clarkii* is a cosmopolitan species (Gherardi 2006), relatively static, easily captured, bioaccumulates U (Al Kaddissi et al., 2011) and adults provide sufficient tissue for individual analyses. The use of this species as a biological model is therefore of great interest. In our current work the expression levels of mitochondrial genes (*12s*, *atp6*, and *cox1*) and genes involved in oxidative stress responses (*sod(Mn)* and *mt*) were evaluated and the enzymatic activities of antioxidants (SOD, CAT, GPX, and GST) were studied after 30 and 60 days exposure to 30 µg U/L. The concentration of U that we selected is within the range commonly found close to drill wells (Kurttio et al. 2006) and mining sites (e.g. 20 µg/L) (Simon and Garnier-Laplace 2005). It is also double the World Health Organisation provisional drinking water guideline (15 µg/L) (WHO 2004) but equal to the recommended levels of the USEPA promulgated in 2000 (EPA, 2000). Gills and hepatopancreas were collected after various periods of exposure to assess the different biological parameters and U bioaccumulation levels were studied in parallel. Comparisons between gene expression levels after short-term (4 and 10 days) (Al Kaddissi et al. 2011) and long-term exposures, and after high and low levels of contamination, were conducted. This approach helps identify possible changes in the mechanisms of action of U over time, and helps gather information to choose appropriate biomarkers of U contamination. The opportunity was also taken to link the antioxidant responses to the mitochondrial dysfunction.

2. Materials and methods

2.1. General experimental protocol

Adults inter-moult *Procambarus clarkii* males were used in this study (23.55 ± 1 g fresh weight; 8.96 ± 0.11 cm from cephalothorax to telson; n=30). These were obtained from the Vigueirat swamp of Camargue, France (GPS coordinates: 43°31.863'N- 4°45.417'E).

Crayfish were acclimatized to experimental conditions for 3 weeks under a 12/12h light/dark photoperiod at $17 \pm 1^\circ\text{C}$ while submerged in synthetic water equilibrated by means of air bubbling (water composition: $\text{Ca}^{2+} = 1640$; $\text{Mg}^{2+} = 500$; $\text{Na}^{2+} = 870$; $\text{K}^+ = 80$; $\text{Cl}^- = 4100$; $\text{SO}_4^{2-} = 509$; $\text{NO}_3^- = 76.5$; $\text{HCO}_3^- = 281$ all in µmol/L; pH 6.6 ± 0.3). The artificial water composition, the pH value (6.5), and the voluntary lack of phosphate were chosen as a compromise to ensure abiotic conditions that satisfied the physiological needs of crayfish (Al

Kaddissi et al. 2011) and to optimise U bioavailability (Fortin et al. 2007; Fortin et al. 2004). Speciation of 30 µg/L of U in the synthetic water at pH 6.5 was simulated using the geochemical speciation software J-CHESS (Java Chemical Equilibrium with Species and Surfaces, Van der Lee, 1998). Based on this simulation 0.7% of UO_2^{2+} and 4.6% of UO_2OH^+ were present in the medium. These forms of U are known to be the most bioavailable species to aquatic organisms (Markich 2002, Fortin et al. 2004, 2007). The dominant species under these conditions were $(\text{UO}_2)_2\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$ (42 %) and $\text{UO}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (25.7 %), which can be accumulated by organisms (Denison 2004). Commercial trout pellets were fed to crayfish, at dosages of 0.1 g/individual, every 2 days. Nourishment continued during exposure conditions. During the acclimation and experimentation phases, animals were kept at a maximum density of 3 crayfish/L. Groups of 10 crayfish were exposed to 0 (control) and 30 µg U/L for 60 days. The stock solution of U used to contaminate water was prepared from depleted uranyl nitrate $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, France) and acidified with nitric acid (0.016 M). 25% of the water column was renewed daily by a continuous flow-through technique. A large volume of each test solution (0 and 30 µg/L) was prepared once a week and maintained at a constant flow through the respective tanks containing crayfish. U concentration in the water column was measured once daily and adjusted, if necessary, to ensure constant contamination pressure. Temperature and pH were monitored daily, whereas NO_3^- , NO_2^- , Cl^- , SO_4^{2-} and PO_4^{3-} concentrations were verified twice a week by ICS-3000, Ion Chromatography System. Crayfish were isolated in individual chambers (plastic netting: 1 cm mesh, 11 cm diameter) to avoid cannibalism. Five crayfish were sampled from each tank at Day 30 (T30) and Day 60 (T60). The hepatopancreas and gills of each individual were collected, split into three parts, and stored at -80°C for further bioaccumulation, gene expression and enzymatic activities analyses.

2.2. Uranium quantification

Water samples were acidified by nitric acid (3.1 mM of HNO_3) prior to metal quantification by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES Optima 4300DV, PerkinElmer, Wellesley/USA; detection limit: 10 µg/L ± 10%). Organs were dried at 45°C for 2 days and, then digestion was performed in a DigiBLOC 3000 digestion system (SCP Science, Champlain, NY, USA). Thereafter, 3 mL of 15.5 M nitric acid was added to each organ and was heated for 90 min at 95 °C after which samples were evaporated in a second heating cycle (60 min, 105 °C). The digestion process was then completed by the addition of 2 mL H_2O_2 (33%) followed by evaporation (20 min, 105 °C).

Samples were dissolved in acidified water (3.1 mM of HNO₃) prior to analysis. ICP-AES was used to determine the highest U concentrations and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS Agilent 7500 Cs; detection limit: 10 ng/L ± 7%) to determine the lowest concentrations. Combined tests, using ICP-AES and ICP-MS techniques, were also run to validate the assumption that there was no significant difference between results from these two analytical methods.

2.3. Total RNA extraction, reverse transcription of RNAs and Real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from gills (20–40 g samples) or hepatopancreas (n=5 for each experimental condition and sampling time) using the “Absolutely RNA Miniprep” kit (Agilent). First-strand cDNA was synthesized from total RNA using the Stratascript First-Strand Synthesis System (Agilent). First-strand cDNA was synthesized from total RNA using the AffinityScript™ Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit (Stratagene). In each of the above three tests, the techniques were carried out according to the manufacturer's instructions. The cDNA mixture was stored at –20 °C, until required. The accession numbers of the studied genes and their function are listed in **table 19**. For each gene, specific primer pairs were determined using the LightCycler probe design software (Ver 1.0; Roche). The amplification of cDNA was monitored, using the DNA intercalating dye SyberGreen I (Roche). Real-time PCR reactions were performed in a Light Cycler (Roche). The amplification program consisted of 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. This dissociation curve was obtained by following the SyberGreen I fluorescence level during a gradual heating from 60 to 95 °C. For each amplification, a single peak was observed for all the primer-pairs used, indicating the amplification of a single product. The amplified cDNAs in the first set of experiment were analyzed by electrophoresis to verify that amplified fragments were of the expected molecular weight. Results validated the PCR primers specificity. Primer efficiencies were determined for each quantitative PCR run by a dilution series. Efficiency was always between 90 and 102%, as classically expected. Relative quantification of each gene expression level was normalized according to the *18S* gene expression, a housekeeping gene. *18S* gene was chosen as the reference gene because of its stability over time and treatment in the experiment. Relative expression of a gene was generated using the $2^{-\Delta CT}$ method as described by Livak and Schmittgen (2001) where ΔCT represents the difference between the cycle threshold of a specific gene and the cycle threshold of the 18S. The comparison of the expression's factor

(EF) of each gene with the control therefore corresponded to the following equation: $EF=2^{-\Delta CT}$
 $\Delta CT(\text{Treatment})/2^{-\Delta CT}(\text{Control})$.

Table 19: Genes, accession numbers, specific primers pairs used in the quantitative PCR analysis of the 6 studied genes of *P. clarkii* and their function.

Gene	Primers (5'-3')	Function and accession number
<i>cox1</i> : Cytochrome C oxydase subunit 1 (complex IV).	AATGGGATACCTCGACGTTATTCA (a) GCAGGAGGATAAGAATGCTGT (b)	Encoding for an enzyme in the inner membrane of mitochondrion that helps establish a transmembrane gradient of protons. AY701195.1
<i>atp6</i> : ATP syntase subunit 6 (complex V).	GGCAGCAAATATAATTGCTGG (a) TTGCAACGGCAGATTCTAATAT (b)	Encoding for an enzyme in the inner membrane of mitochondrion that uses the gradient of protons created by other complexes to synthesize ATP. GU220369.1
<i>12S</i> : Ribosomal RNA 12 S.	ACTAGAATATTAGGAGTTATGTTCTT(a) GCTGCACCTTGATCTAATATAC (b)	Indicator of the amount of mitochondria in cells. EF012280.1
<i>Sod(Mn)</i> : Mitochondrial Mn-Superoxyde dismutase.	GCCACCACTAAAATACGAGTA (a) CCATTGAACTTTATAGCTGGTA (b)	Encoding for an enzyme involved in the fight against oxidative stress. EU254488.3
<i>mt</i> : Metallothionein.	CGAGGGCGGGTGCAAGACT (a) CTTGGAGCAGGTCTTGGCAC (b)	Encoding for MT protein involved in detoxifying Cd and in the protection against reactive oxygen species. GU220368.1
<i>18s</i> : 18S ribosomal RNA.	GCAATAACAGGTCTGTGATGCC (a) AGGGACGTAATCAGCGCAA(b)	House keeping gene. X90672.1

^(a) Forward primer. ^(b) Reverse primer.

2.4. Enzyme activity

Enzyme activity was determined in cellular cytosolic fractions of tissues to assess possible links between cellular oxidative stress and the dysfunction of mitochondria in the presence of U. The gills and hepatopancreas of each individual were thus respectively homogenized, in 1:10 and 1:20 weight: volume (W/V) proportions, in ice cold Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7.8) containing 100 μ M phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 0.008 aprotinin U/ml and 0.1 mg/ml of bacitracin. An aliquot of each homogenate was centrifuged at 15000g for 30 min at 4°C; supernatants were further centrifuged at 100000g for 1 h at 4°C. All biochemical analyses were performed with a SOFTmax PRO spectrophotometer at a constant temperature of 25°C. Total protein content of gills and hepatopancreas (S100 fractions) were determined using the “Micro BCATM Protein Assay Kit” (Thermo scientific) according to the manufacturer's instructions. Absorbance was read at 562 nm using a plate reader. CAT activity was measured by following the decrease in absorbance at 240 nm due to H₂O₂ consumption ($\epsilon= 0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The assay took place in a Na-phosphate buffer (100 mM, pH 7) and 12 mM H₂O₂. Superoxide dismutase SOD was determined spectrophotometrically

using the “19160 SOD determination kit” (Fulka) according to the manufacturer's instructions. Absorbance was read at 450 nm using a plate reader. SOD activity was expressed as U/mg protein (Prot). GPX activity towards cumene hydroperoxide as a substrate was determined and oxidation of NaDPH was followed at 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The assay condition was as follows: 100 mM Na-phosphate buffer with pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.12 mM NaDPH, 2 mM GSH, 1 mM DTT, 0.8 mM cumene hydroperoxide, and 1U of glutathione reductase. GST activity was measured using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as a substrate and the formation of the conjugate with GSH was followed at 340 nm ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The assay condition was as follows: 100 mM Na-phosphate buffer (pH 6.5), 1 mM GSH and 1 mM CDNB.

2.5. Statistical analysis

Results are given as means \pm the standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using the R language and environment for statistical computing (R Development Core Team, 2009). The significant effects of certain factors (such as time and metal concentration in water) on bioaccumulation or on enzyme activity were estimated using analysis of variance (ANOVA) when normality and variance homogeneity assumptions were satisfied. The normality assumption was checked using a quantile-quantile plot (QQplot) of standardized residuals versus normal quantiles. The variance homogeneity assumption was checked on residuals using standardized residuals versus fitted plot (Faraway, 2002). When the assumptions were not satisfied, a logarithmic data transformation was applied. If the assumptions were still not satisfied, Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA was used. To assess the link between U concentrations in water and in organs, the correlation coefficient (R) was calculated using Spearman rank correlation test. The same test was also applied to compare gene expression levels after short and long periods of exposure. Transcriptional responses in contaminated organs in the previous study (Al Kaddissi et al. 2011) and in the current study were correlated with varying exposure periods (4, 10, 30, and 60 days). A probability of $P < 0.05$ was considered significant for all statistical results.

3. Results

3.1. Experimental conditions

Mortality was not observed during acclimation and metal exposure periods. Physicochemical parameters such as temperature ($16.84^{\circ}\text{C} \pm 0.06$), pH ($\text{pH} = 6.24 \pm 0.04$) and concentrations of major anions (which were significantly identical to desired concentrations) remained stable. The measured U concentration in water was equal to $28 \pm 0.8 \mu\text{g U/L}$ ($n=60$) and thus not significantly different ($P > 0.05$) from the nominal concentration ($30 \mu\text{g/L}$).

3.2. Uranium bioaccumulation

The Uranium concentrations in water were strongly correlated to tissue concentrations in organs (gills: $R=0.87$, $P= 7 \cdot 10^{-6}$; hepatopancreas: $R=0.87$, $P=3.9 \cdot 10^{-7}$). Concentrations of U in organs of the control crayfish were extremely low and did not exceed $0.13 \mu\text{g/g}$ of dry weight (DW) (**Table 20**). A significant difference was discerned between U concentrations in contaminated organs and control animals ($P_{\text{gills}} = 1.43 \cdot 10^{-5}$; $P_{\text{hepatopancreas}} = 4.71 \cdot 10^{-6}$). Bioaccumulation in these organs in exposed crayfish did not, however, differ significantly over time. U accumulation levels were eight and four times higher in gills than in the hepatopancreas at T30 and T60, respectively.

Table 20: U bioaccumulation ($\mu\text{g /g}$ dry weight (DW), mean \pm SEM, $n= 5$ in each treatment condition) in gills and in hepatopancreas of the crayfish *Procambarus clarkii* exposed 30 (T30) and 60 days (T60) to 0 (control) and $30 \mu\text{g/L}$ of U.

Nominal U concentrations in water ($\mu\text{g/L}$)	U bioaccumulation in gills ($\mu\text{g/g DW}$)		U bioaccumulation in hepatopancreas ($\mu\text{g/g DW}$)	
	T30	T60	T30	T60
0	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01
30	165.70 ± 22.15	155.35 ± 30.89	20.11 ± 6.99	39.91 ± 8.07

3.3. Gene expression levels after long term exposure

Transcriptional responses after long term exposure are presented in **table 21**. In gills, the genetic analysis indicated a decrease in the number of mitochondria at T30 and T60 as *12S* gene expression levels decreased. A change in the functioning of the mitochondrial chain reaction was observed by following gene expression levels of both *atp6* and *cox1* genes. The expression of the mitochondrial gene *atp6* was altered in the presence of U as this gene was highly down-regulated at T30 (- 88-fold) and then up-regulated at T60 (8-fold). Gene expression of *cox1* was only up-regulated at the end of the experiment in gills of contaminated

crayfish. Expression levels of the *sod(Mn)* gene seemed to increase with time: this gene was repressed 3-fold at T30 but was up-regulated 4-fold at T60. The *mt* gene was repressed in the gills of crayfish exposed to U during both experimental periods.

Expression levels of the *I2S* gene in the hepatopancreas decreased about 3.5-fold at T30, then increased 2.5-fold up at T60. Moreover, the *atp6* gene was only 3-fold up-regulated at T60, while the *cox1* and *sod(Mn)* genes were up-regulated in this organ at both times. No differences were noted between the expression of the *mt* gene in contaminated hepatopancreas and controls at T30. Nevertheless, this gene was 2-fold up-regulated at T60.

Table 21: Expression's factors (EF) of the 5 studied genes in gills and hepatopancreas of *P. clarkii* compared to the basal level of controls (n= 5 in each treatment condition) at day 30 (T30) and 60 (T60).

Organs	<i>I2s</i>		<i>atp6</i>		<i>cox1</i>		<i>sod(Mn)</i>		<i>Mt</i>	
	T30	T60	T30	T60	T30	T60	T30	T60	T30	T60
Gills	-4.5	-2	-88	8	/	2	-3	4	-2	-3.4
Hepatopancreas	-3.5	2.5	/	3	4	3	3	3	/	2

⁽⁰⁾ Equal to control. ⁽⁻⁾ Down-regulated. ⁽⁺⁾ Up-regulated. Only $EF \geq 2$ or $EF \leq -2$ are considered statistically significant.

3.4. Enzyme activity

No significant statistical variation in the activity of either SOD or CAT was discerned in contaminated organs when compared to controls (**Figure 69**). A tendency of these enzymes to deplete can however, be observed in exposed gills at T60. Crayfish exposed to U exhibited a significant depletion ($30 \pm 3.4\%$) in GPX activity in gills at T60, when compared to the control. A significant decrease in GST activity was also discerned in organs at the end of the experiment at levels of about $46 \pm 3.76\%$ and $48.6 \pm 14.33\%$ in the gills and hepatopancreas, respectively.

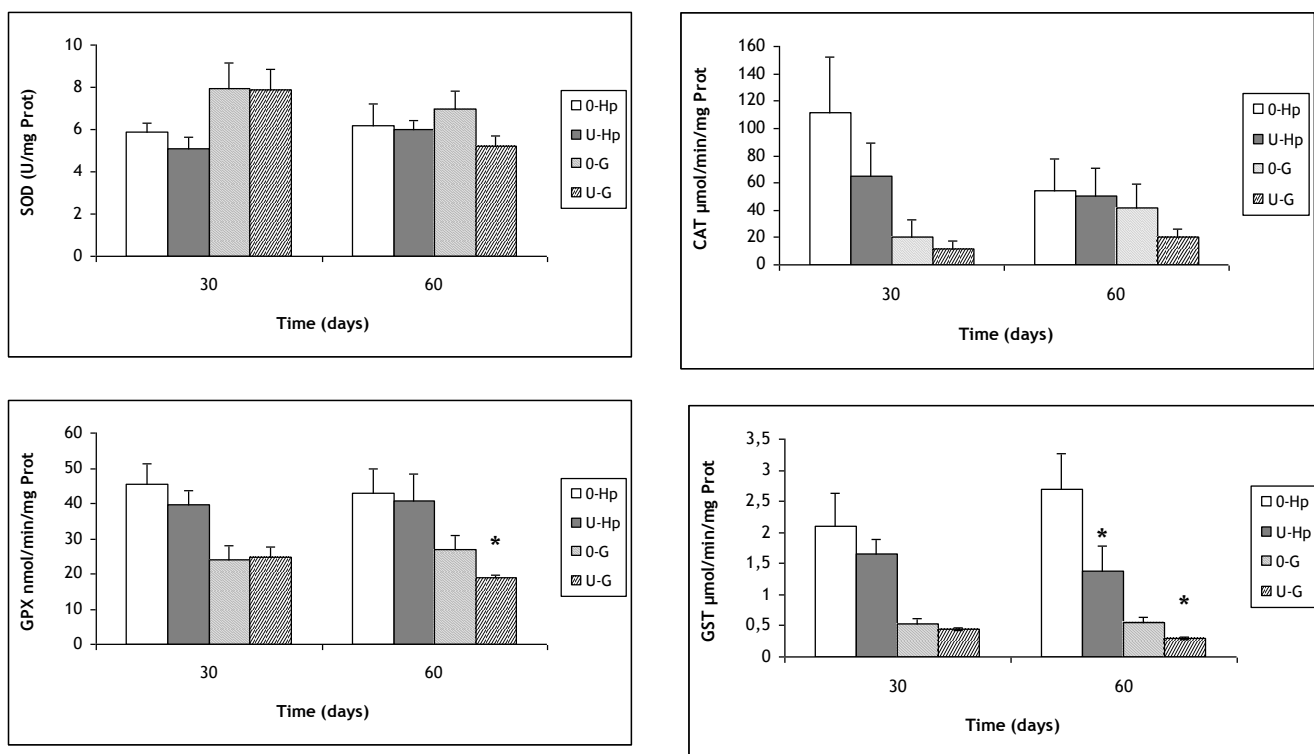


Figure 69: Enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD) (U/mg Prot, mean \pm SEM, n= 5 in each treatment condition), catalase (CAT) ($\mu\text{mol} / \text{min}/\text{mg}$ Prot, mean \pm SEM, n= 5 in each treatment condition), glutathione peroxidase (GPX) (nmol /min/mg Prot), and glutathione S transferase (GST) ($\mu\text{mol} / \text{min}/\text{mg}$ Prot, mean \pm SEM, n= 5 in each treatment condition) in gills and in hepatopancreas of the crayfish *Procambarus clarkii* exposed 30 and 60 days to 0 (control) and 30 $\mu\text{g}/\text{L}$ of U. The symbol (*) indicates significant statistical differences between control and treated samples ($P < 0.05$). (0-Hp) control hepatopancreas. (U-Hp) contaminated hepatopancreas. (0-G) control gills. (U-G) contaminated gills.

4. Discussion

4.1. Bioaccumulation

Significant concentrations of U in the gills (accumulation factor up to 6) and the hepatopancreas of crayfish were observed at T30 and T60, despite the low level of U contamination in water. Al Kaddissi et al. (2011) recorded that bioaccumulation levels of U in gills of *P. clarkii* were equal to $152.87 \pm 27.7 \mu\text{g U/g DW}$ at T4 and to $129.96 \pm 9 \mu\text{g U/g DW}$ at T10 after exposition to 30 $\mu\text{g U/L}$ via a direct route. Equivalent results were obtained for concentration levels in the same organ at T30 and T60. U bioaccumulation in gills thus seemed to rapidly reach an equilibrium state. As expected, gills accumulated more U than hepatopancreas at T30 and T60. Such results were also observed in an earlier study when Al Kaddissi et al. (2011) noted that the bioaccumulation of U in gills was around 50 to 100 times

greater (at T4 and T10, respectively) than that recorded in the hepatopancreas of *P. clarkii*. Contamination of the crayfish *Orconectes limosus* to U via a trophic route led to significant accumulation of the metal in the hepatopancreas (up to 20 µg/g fw), which was up to 20 times higher than that recorded in gills (Simon and Garnier-Laplace 2005). Thus the type of exposure (direct/trophic) influences the distribution of U in organs. U concentrations in the hepatopancreas at T30 (20.11 ± 6.98 µg U/g DW) and T60 (39.91 ± 8.06 µg U/g DW) were elevated but no statistically significant difference between values was noted. These U concentrations were much higher than those reported in the hepatopancreas at T4 (2.84 ± 0.6 µg U/g DW) and T10 (1.15 ± 0.6 µg U/g DW) (Al Kaddissi et al., 2011). It thus seems that there is a significant effect of time on the bioaccumulation of U in the hepatopancreas, when comparing the concentration levels in the organ after short- and long- term exposure.

4.2. Transcriptional responses after long-term exposure to U

The repression of *12S* gene in gills at T30 and T60 indicates a decrease in the number of these organelles in U-contaminated cells. Such effects, relating to U toxicity, was also observed in gills of *P. clarkii* exposed to high U concentrations (0.6, 4 and 8 mg/L) after 4 days of contamination, when the *12S* gene was noted to have been down-regulated by 7- to 10-fold (Al Kaddissi et al., 2011). Some heavy metals are known to induce structural damage to mitochondria, resulting in a destruction of cristae and the outer or inner mitochondrial membranes (Triebkorn and Köhler 1996; Lei et al. 2011). Structural damage induced by U could have thus led to a decline in the number of mitochondria in contaminated organs. Gough (1931) described that mitochondria in renal epithelium of U-contaminated rabbits had formed small granules or were replaced by large spherical bodies that were scattered in the cytoplasm. The *cox1* gene was only 2-fold up-regulated at T60 in gills. Likewise, this gene expression levels in gills of *Danio rerio* exposed to 23 ± 6 µg/L of U for 28 days, did not vary significantly when compared to control fish (Lerebours et al. 2009). Conversely, the *cox 1* gene was reported to be down-regulated (2 to 3-fold) in gills of *P. clarkii* presenting high levels of U bioaccumulation (Al Kaddissi et al., 2011). The expression of this gene thus appears to be modulated by the level of U concentration in tissues. Lerebours et al. (2010) stated that the intensity of gene response may not correlate positively with toxicant concentrations and that different gene expression patterns are expected for different concentrations of exposure. This statement is in concordance with our findings in terms of comparing the gene response of *cox1* after acute exposure to that of chronic exposure to U, which indicates that a modification in the metabolism might occur in organs presenting

different levels of contamination. The over-expression of *cox1* in the present study also coincided with an increase in expression of the *atp6* gene in gills at the end of the experiment. The up-regulation of these two genes indicates an increase in mitochondrial metabolism. This could be a cellular strategy to compensate for the decrease in the number of functional mitochondria by increasing ATP production, so as to provide enough energy for cellular needs. It was also noted that gene expression levels of *sod(Mn)* correlated with those of *cox1* at T30 and T60 (in gills: R= 0.4; in hepatopancreas: R=0.5; P=0,05). In our previous work, we observed a significant correlation between these two genes expressions (R=0.6, P<0.001) in organs of crayfish exposed to 0.03, 0.6, 4 and 8 mg/L of U for 10 days (Al Kaddissi et al. 2011). The results of these two studies confirmed that when mitochondrial metabolism increases in the presence of U, the endogenous ROS production increases and, consequently, the mitochondrial antioxidant defense mechanism is induced. On the contrary, when the mitochondrial metabolism decreases, the over-expression of genes encoding for antioxidants does not seem necessary. This cellular response to U toxicity was also observed in the hepatopancreas at T30 and T60. The *cox1* and *sod(Mn)* genes were also reported to be up-regulated, by 5- and 11-fold-respectively, in the liver of *Danio rerio* exposed to 23 ± 6 $\mu\text{g/L}$ of U during 28 days (Lerebours et al. 2009). Another interesting response, involving *12S* gene expression, was observed in the contaminated hepatopancreas. In effect, the amount of mitochondria decreased significantly at T30 and then increased at T60, accompanied by an increase in mitochondrial metabolism (*atp6* and *cox1* up-regulated) in this organ at the end of the experiment. This indicates that cells are able to adopt various compensatory mechanisms in response to toxicity, including an increase in the amount of mitochondria. The expression of the *mt* gene was repressed at T30 and T60 in gills whereas it was 2-fold over-expressed in the hepatopancreas at T60. The response of metallothionein protein (MT) to U contamination is not well understood. An *in vitro* study by Michon et al. (2010) demonstrated that U can bind to MT, while a study by Cooley and Klaverkamp (2000) demonstrated that, in living organisms such as fish, no increase of MT was observed in contaminated livers, except in animals that had been subjected to the highest trophic exposure (10 mg U/g- at day 10). An increase in *mt* gene expression in highly contaminated gills of *P. clarkii* was reported after 10 days of direct exposure to U (0.6-8 mg/L). No such increase was noted in the hepatopancreas of the same animal, which presented low levels of U bioaccumulation (Al Kaddissi et al. 2011). Moreover, MT is known to bind ROS efficiently (Viarengo et al. 2000; Fang et al. 2010) which leads to the assumption that this protein participates in the antioxidant defense system particularly in highly contaminated tissues. In the current study, we hypothesized that

the basal pool of MT in gills was sufficient and did not necessitate an over-expression of the corresponding gene with the actual concentration levels. In the hepatopancreas, the over-expression of the *mt* gene could be linked to oxidative stress. The increase of the amount of mitochondria (*12S* up-regulated), the augmentation of mitochondrial metabolism (*atp6* and *cox1* up-regulated), the induction of mitochondrial antioxidant defenses (*sod(Mn)* up-regulated), and the depletion of cytosolic antioxidants, all indicated an increase in ROS levels in the organs at T60.

4.3. Evolution of transcriptional responses over time and their use as biomarkers

Expression of mitochondrial genes in gills and the hepatopancreas revealed a dysfunction in the energetic process after short-term (4 and 10 days) (Al Kaddissi et al, 2011) and long-term exposure periods (at T30 and T60) to 30 µg/L of U. Overall the *12S* gene was down-regulated over time in both organs (gills: $R=-0.45$, $P=0.052$; hepatopancreas: $R=-0.51$, $P=0.03$). This gene seems to be a sensitive biomarker of U contamination in gills since it was down-regulated soon after exposure (2-fold down-regulated at T4) (Al Kaddissi et al, 2011) and was also repressed after a long period of exposure (at T30 and T60). It should be noted, however, that (at T4 and T60) the *12S* gene was occasionally over-expressed in the hepatopancreas. Nonetheless, the expression levels of *atp6* gene fluctuated over time in both organs and did not follow a specific pattern, even though levels of U concentrations in the gills were identical at the different sampling times (at T4, T10, T30 and T60). Thus, this gene response seems to be modulated by the energetic demands of the tissue and not directly by U concentrations. The *cox1* and *sod(Mn)* gene expression levels tended to increase with time in both tissues (ex: hepatopancreas: $R=0.42$, $R=0.6$ respectively, $P<0.05$). These genes could thus be used as biomarkers of a long-term exposure to environmentally-relevant concentrations of U, which would be useful in monitoring programs. The *mt* gene, on the other hand, was generally repressed in gills ($R=-0.67$, $P=0.009$) but very little is known of the impact of U on MT. Consequently, the use of this response alone as a biomarker of U contamination is not sufficiently substantiated. Contrary to results obtained in gills, *mt* gene expression tended to increase in the hepatopancreas with time ($R=0.45$, $P=0.067$). It therefore appears that *mt* gene expression varies in different organs, which possibly relates to the kinetics of U exchange in different cellular compartments.

4.4. Oxidative stress responses after long-term exposure to U

In the cytosolic fraction of contaminated organs, ROS levels were more likely to increase with time, given that the activity of antioxidants had a tendency to decrease. There is indeed evidence to indicate that oxidative stress, induced by metals in a biological system, can be attributed to alterations in the antioxidant defense system (Jemai et al. 2007). For example, it is known that cadmium indirectly induces oxidative stress by decreasing levels of antioxidants, which lead to an increase in levels of free radicals (Ercal et al. 2001; Watjen and Beyersmann 2004; Newairy et al. 2007; Cao et al. 2010; Jomova and Valko 2011). GPX activity decreased significantly in contaminated gills of *P. clarkii* compared to that measured at T60 in the control. An *in vitro* study (Labrot et al. 1996) indicated that such enzyme activity decreased significantly in fish (*Brachydanio rerio*) that were in contact with 500 mg/L of U. These authors hypothesized that inactivation of enzymes could be a consequence of metals binding to the protein chain backbone. Recent research in U toxicology revealed that this metal can bind directly to some proteins, such as metallothioneins, ferritin, transferrin and albumin (Michon et al. 2010). To the best of our knowledge, no studies have been undertaken to examine the possibility of U binding to enzymes involved in the antioxidant defense system. A study by Blum and Fridovich (1985) demonstrated that superoxide radicals O_2^- and hydroperoxides can deactivate GPX by converting its reduced form to the oxidized form, and that the presence of SOD prevents this inactivation. SOD catalyzes the conversion of reactive superoxide anions (O_2^-) to produce hydrogen peroxide (H_2O_2) (Ruas et al. 2008; Aschner and Jiang 2009), which is subsequently dealt with by CAT (Kono and Fridovich 1982; Michiels et al. 1994) and GPX activities (Michiels et al. 1994; Arthur 2000). A decrease in SOD and CAT activities in contaminated tissues can thus increase the levels of O_2^- and hydroperoxides, which in turn could cause an oxidative alteration of GPX, resulting in its loss of function. In the current study, the activities of SOD and CAT tended to decline with time, particularly in contaminated gills, which might contribute to a decrease in GPX activity. In addition, various studies showed that U causes a depletion of glutathione content in contaminated tissues (Pourahmad et al. 2006; Barillet et al. 2007; Periyakaruppan et al. 2007; Aschner and Jiang 2009; Yapar et al. 2010; Pourahmad et al. 2011; Viehweger et al. in press). Thus non-protein thiol plays an important role in ROS scavenging, since it is a substrate for the removal of H_2O_2 by GPX. Consequently, a decrease in GSH content in tissues could lead to a decrease of GPX activity. GSH can also be conjugated to other proteins that are catalyzed by GST. GST transfers GSH groups to proteins to target for cellular export and subsequent metabolism and detoxification (Dringen 2000; Dickinson and Forman 2002;

Hayes et al. 2005). Accordingly a decrease in GSH levels could explain a decrease in GST activity, observed in both of the contaminated organs of crayfish at T60. It is also possible that a decrease in antioxidant activity stems from the down regulation of the corresponding genes (Lerebours et al. 2009; Barillet et al. 2011).

4.5. Linking cellular oxidative stress to the dysfunction of mitochondria

A recent *in vitro* experiment in contaminated plant cells demonstrated a reduction, of about 33%, of U(VI) to U(IV) in the presence of GSH (Viehweger et al. in press). Pourahmad et al. (2006) also stated that the reductive activation of U(VI) by GSH to U(V) and finally U(IV) provides enough redox cycling to generate considerable amounts of ROS ($O_2^{\cdot-}$). Such results could explain the depletion of antioxidant activities observed in this study, since oxidation of enzymes renders them inactive (Davies 2005). Pourahmad et al. (2006) also reported that U(VI) (50 μ M) oxidized 85% of the GSH in rat hepatocytes, which resulted in the formation of oxidized glutathione (GSSG) and thus decreased the GSH content in cells. These findings reinforce the hypothesis that a depletion of GSH, as a substrate of GPX and GST, may have occurred in the current study, thus causing a decrease in the activity of these compounds. The reduction of antioxidant activities in the present study demonstrated that U generates oxidative stress, which is undoubtedly accompanied by an increase in ROS levels. It is well established that mitochondria are the primary source of ROS and the target of excessive ROS generation (Lei et al. 2011; Simon et al. 2000). It is also known that an exogenous source of ROS can cause oxidation of mitochondrial compounds, accompanied by direct local membrane perturbation (Zamzami et al. 1995). Pourahmad et al. (2006) found evidence for a collapse in mitochondrial membrane potential (MMP) of rat hepatocytes in the presence of U, which results in severe ATP depletion and mitochondrial permeability transition pore opening (MPT). The authors believe that mitochondrial damage is caused by ROS formation and that the collapse of MMP and MPT pore opening is the result of oxidation of thiol groups in the MPT pore region of the mitochondrial outer membrane and consequent conformational alteration. This suggestion is consistent with our results and could explain alterations in transcriptional responses in contaminated organs, particularly in gills at T60. An increase in *cox1* gene expression levels could be a response to remediate a possible decrease of the mitochondrial membrane potential. Moreover, the up-regulation of the *atp6* gene could be a strategy to compensate for a decrease in ATP levels, which is a consequence of mitochondrial damage caused by ROS, whereas the down-regulation of the *12S* gene indicates a loss of mitochondria, which could be the result of oxidative damage.

5. Conclusions and perspectives

In summary, U induces changes in mitochondrial gene expression levels and in the expression of genes involved in the antioxidant defense mechanism. Nonetheless, some transcriptional responses may differ between acute (Al Kaddissi et al. 2011) and chronic contamination, indicating that the mechanisms of U toxicity are different at low and high exposure concentrations. Moreover, when crayfish *P. clarkii* are exposed to environmentally-relevant concentrations of U, the expression of the studied genes may differ over time, indicating that responses are also time dependent. The *12S*, *cox1*, and *sod(Mn)* genes seem to be sensitive biomarkers of U contamination. Nevertheless, a multi-biomarker approach is recommended for the evaluation of U toxicity because the mechanisms of action of this metal are not completely understood. This study also demonstrated that U induces oxidative stress and a loss of antioxidant response. A possible ROS-mediated U cytotoxic mechanism was also proposed. Moreover, it seems that the study of transcriptional responses is a more sensitive tool than the follow up of antioxidant activities for assessing U toxicity in crayfish. Further research is needed to better comprehend cytotoxic mechanisms associated with the presence of U. The measurement of glutathione (total, reduced and oxidized fractions) and the reduced form of U(IV) in tissues, as well as their correlation to enzymatic effects and ROS levels, could be of interest. The sequencing of cytosolic *sod(Cu)*, *cat*, *gpx*, and *gst* is also needed in order to study their expression in contaminated tissues and to link possible alterations to enzymatic activities. This approach will partly help to elucidate the origin of the inhibition of the studied enzymes. We recommend *in vitro* assays, to ascertain whether U can bind directly to SOD, CAT, GPX and GST.

Acknowledgments

The authors would like to thank N. Gauthier for providing the crayfish, S. Pierrisnard for ionic chromatography measurements, I. Cavalie for her help in U measurements, C. Della-Vedova for helping in statistical analysis, B. Geffroy for his scientific support, and R. Al Kaddissi for English corrections. This study was supported by the ENVIRHOM research program, funded by the institute of Radioprotection and Nuclear Safety. The CNRS co-financed this work.

References

- Al Kaddissi, S., Legeay, A., Gonzalez, P., Floriani, M., Camilleri, V., Gilbin, R., Simon, O., 2011. Effects of uranium uptake on transcriptional responses, histological structures and survival rate of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (7): 1800-1807
- Arthur, J.R., 2000. The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 57(13-14):1825-1835.
- Aschner, M., Jiang, GCT., 2009. Toxicity studies on depleted uranium in primary rat cortical neurons and in *caenorhabditis elegans*: What have we learned? *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 12(7): 525-539.
- Barillet, S., Adam-Guillermin, C., Palluel, O., Porcher, J.M., Devaux, A., 2011. Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environ. Poll.* 159: 495-502.
- 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(3): 497-505.
- Bleise, A., Danesi, PR., Burkart, W., 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J. Environ. Radioact.* 64(2-3): 93-112.
- Blum, J., Fridovich, I., 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 240(2): 500-508.
- Cao, L., Huang, W., Liu, J., Yin, X., Dou, S., 2010. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 151(3): 386-392.
- Cooley, H.M., Klaverkamp, JF., 2000. Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat. Toxicol.* 48(4): 477-494.
- Davies, M.J., 2005. The oxidative environment and protein damage. *B. B. A. - Proteins Proteom.* 1703(2): 93-109.
- Denison, F., 2004. Uranium(VI) speciation: modeling, uncertainty and relevance to bioavailability models- Application to uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve, Université de Provence Aix- Marseille I, 338p.
- Dickinson, D.A., Forman, H.J., 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 64(5-6): 1019-1026.
- Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 62(6):649-671.

- EPA (US Environmental Protection Agency). 2000. National Primary Drinking Water Regulations; Radionuclides. Final Rule. Federal Register. 76708–76753.:7 December 2000.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1(6): 529-539.
- Fang ,Y., Yang, H., Wang, T., Liu, B., Zhao, H., Chen, M., 2010. Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam *Macra veneriformis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 151(3): 325-333.
- Fortin, C., Denison, FH., Garnier-Laplace, J., 2007. Metal-phytoplankton interactions: Modeling the effect of competing ions (H^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+}) on uranium uptake. *Environ. Toxicol. Chem* 26(2): 242-248.
- Fortin, C., Dutel, L., Garnier-Laplace, J., 2004. Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Environ. Toxicol. Chem* 23(4): 974-981.
- Gherardi, F., 2006. Crayfish invading Europe: the case study of *Procambarus clarkii*. *Mar. Freshw. Behav. Phy.* 39(3): 175-191.
- Gough, J., 1931. Mitochondrial changes in experimental oxalate and uranium nephritis. *J. Pathol. Bacteriol.* 34(4): 423-428.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.:* 51-88.
- Jemai, H., Messaoudi, I., Chaouch, A., Kerkeni, A., 2007. Protective effect of zinc supplementation on blood antioxidant defense system in rats exposed to cadmium. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 21(4): 269-273.
- Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicol.* 283(2-3): 65-87.
- Jones, D., Domotor, S., Higley, K., Kocher, D., Bilyard, G., 2003. Principles and issues in radiological ecological risk assessment. *J. Environ. Radioact.* 66(1-2): 19-39.
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257(10): 5751-5754.
- Kurttio, P., Harmoinen, A., Saha, H., Salonen, L., Karpas, Z., Komulainen, H., Auvinen, A., 2006. Kidney Toxicity of Ingested Uranium From Drinking Water. *Am. J. Kidney Dis.* 47(6): 972-982.

- Labrot, F., Ribera, D., Saint Denis, M., Narbonne, JF., 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: Lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers* 1(1): 21-28.
- Lei, W., Wang, L., Liu, D., Xu, T., Luo, J., 2011. Histopathological and biochemical alternations of the heart induced by acute cadmium exposure in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. *Chemosphere* 84 (5): 689-694.
- Lerebours, A., Bourdineaud, JP., Van Der Ven, K., Vandebrouck, T., Gonzalez, P., Camilleri, V., Floriani, M., Garnier-Laplace, J., Adam-Guillermin, C., 2010. Sublethal effects of waterborne uranium exposures on the zebrafish brain: Transcriptional responses and alterations of the olfactory bulb ultrastructure. *Environ. Sci. Technol.* 44(4): 1438-1443.
- Lerebours, A., Gonzalez, P., Adam, C., Camilleri, V., Bourdineaud, JP., Garnier-Laplace, J., 2009. Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles, and gills of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant waterborne uranium concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 28(6): 1271-1278.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- Δ CT method. *Methods* 25., 402–408.
- Lourenço, J., Castro, BB., MacHado, R., Nunes, B., Mendo, S., Gonçalves, F., Pereira, R., 2010. Genetic, biochemical, and individual responses of the teleost fish *Carassius auratus* to uranium. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 58(4): 1023-1031.
- Markich, S.J., 2002. Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *Sci. World J.* 2: 707-729.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J., 1994. Importance of se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.* 17(3): 235-248.
- Michon, J., Frelon, S., Garnier, C., Coppin, F., 2010. Determinations of uranium(VI) binding properties with some metalloproteins (transferrin, albumin, metallothionein and ferritin) by fluorescence quenching. *J. Fluoresc.* 20(2): 581-590.
- Miller, A.C., Stewart, M., Brooks, K., Shi, L., Page, N., 2002. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: Absence of significant alpha particle decay. *J. Inorg. Biochem.* 91(1): 246-252.

- Newairy, A.A., El-Sharaky, A.S., Badreldeen, M.M., Eweda, S.M., Sheweita S.A., 2007. The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. *Toxicol.* 242(1-3): 23-30.
- Periyakaruppan, A., Kumar, F., Sarkar, S., Sharma, C.S., Ramesh, G.T., 2007. Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells. *Arch. Toxicol.* 81(6): 389-395.
- Pourahmad, J., Ghashang, M., Ettehadi, HA., Ghalandari, R., 2006. A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity. *Environ. Toxicol.* 21(4): 349-354.
- Pourahmad, J., Shaki, F., Tanbakosazan, F., Ghalandari, R., Hossein Ali, E., Dahaghin, E., 2011. Protective effects of fungal β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan against oxidative stress cytotoxicity induced by depleted uranium in isolated rat hepatocytes. *Hum. Exp. Toxicol.* 30(3): 173-181.
- Ruas, C.B.G., Carvalho, C.d.S., De Araujo, H.S., Espíndola, E.L.G., Fernandes M.N., 2008. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71(1): 86-93.
- Salonen, L., 1994. ²³⁸U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock. In: *Future groundwater resources at risk*. Publ. no. 222 : 71-84.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5(5): 415-418.
- Simon, O., Garnier-Laplace, J., 2005. Laboratory and field assessment of uranium trophic transfer efficiency in the crayfish *Orconectes limosus* fed the bivalve *C. fluminea*. *Aquat. Toxicol.* 74(4): 372-383.
- 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(16): 1628-1635.
- Triebkorn, R., Köhler, H-R., 1996. The impact of heavy metals on the grey garden slug, *Deroceras reticulatum* (Müller): Metal storage, cellular effects and semi-quantitative evaluation of metal toxicity. *Environ. Poll.* 93(3):327-343.
- Van der Lee, J., 1998. *Thermodynamic and Mathematical Concepts of CHESS*. GIG- Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau, France.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* 46(2): 407-417.

- Viehweger, K., Geipel, G., Bernhard, G., in press. Impact of uranium (U) on the cellular glutathione pool and resultant consequences for the redox status of U. *BioMetals*: 1-8.
- Watjen, W., Beyersmann, D., 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: Influence of oxidative stress. *BioMetals* 17(1): 65-78.
- WHO, 2001. Depleted uranium, sources, exposure and health effects. World Health Organisation (Geneva).
- WHO, 2004. Guidelines for Drinking-Water Quality, third ed. World Health Organisation (Geneva).
- Yapar, K., Çavuşoglu, K., Oruç, E., Yalçın, E., 2010. Protective role of Ginkgo biloba against hepatotoxicity and nephrotoxicity in uranium-treated mice. *J. Med. Food* 13(1): 179-188.
- Yazzie, M., Gamble, S.L., Civitello, E.R., Stearns, D.M., 2003. Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chem. Res. Toxicol.* 16(4): 524-530.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., Kroemer, G., 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 182(2): 367-377.

Chapitre IV-C

Les antioxydants et les réponses transcriptomiques sont-ils des biomarqueurs pertinents pour discriminer la chimio et la radiotoxicité de l'uranium chez P. clarkii ?

Are anti-oxidant and transcriptional responses useful for discriminating between chemo- and radiotoxicity of uranium in crayfish *P. clarkii*?

Simone Al Kaddissi^{1,2}, Sandrine Frelon¹, Antonia-Concetta Elia³, Alexia Legeay², Patrice Gonzalez², Frédéric Coppin¹, Daniel Orjollet¹, Virginie Camilleri¹, Karine Beaugelin-Seiller⁴, Rodolphe Gilbin¹, and Olivier Simon¹.

¹Laboratory of Radioecology and Ecotoxicology (LRE), Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN), Bd 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-Lez-Durance, France.

²Laboratory of Aquatic Ecotoxicology, University Bordeaux1/UMR CNRS 5805, Dr Peyneau square, 33120 Arcachon, France.

³Ecotoxicology Laboratory, Department of Cellular and Environmental Biology, University of Perugia, 06123 Perugia, Italy.

⁴Laboratory of Environmental Modelling (LME), Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN), Bd 159, BP 3, 13115 Saint-Paul-Lez-Durance, France.

Abstract

The main objectives of this study were to evaluate uranium (U) toxicity in the crayfish *Procambarus clarkii* at a low dose of exposure and to discriminate between the chemotoxicity and radiotoxicity of U. We conducted two sets of experiments using either 30 µg/L of depleted uranium (DU) or ^{233}U , which differ from each other only in their specific activity (DU = $1.7 \times 10^4 \text{ Bq.g}^{-1}$, ^{233}U = $3.57 \times 10^8 \text{ Bq.g}^{-1}$). The endpoints were oxidative stress responses and mitochondrial functioning in the gills and hepatopancreas, which were measured in terms of enzyme activities and gene expression levels. U accumulation levels were measured in different organs (gills, hepatopancreas, stomach, intestine, green gland, muscles, and carapace), and internal dose rates in the hepatopancreas were compared after DU and ^{233}U exposures. Significant U accumulation occurred in the organs of *P. clarkii*, and mitochondrial damage and antioxidant responses were detected. Despite the huge difference (21,000x) in the specific activities of DU and ^{233}U , few significant differences in biological responses were detected in *P. clarkii* exposed to these two pollutants. This finding indicates that the radiotoxicity was low compared to the chemotoxicity under our exposure conditions. Finally, genes expression levels were more sensitive markers of U toxicity than enzyme activities.

Keywords: uranium, chemotoxicity, radiotoxicity, mitochondria, antioxidants.

1. Introduction:

Uranium (U) is a naturally occurring radioactive element found in various chemical forms in soils, rocks, and water supplies (WHO, 2001; Bleise et al., 2003). Natural U consists of a mixture of three radioactive isotopes that are identified by their mass numbers: ^{238}U (99.27% by mass), ^{235}U (0.72%), and ^{234}U (0.0055%) (Aigueperse et al., 2001). Isotopes of U possess the same chemical properties but have different radioactivity (Delacroix et al., 2004). ^{234}U contributes 49.5% of the total radioactivity of natural U because of its high specific activity ($2.3 \times 10^8 \text{Bq.g}^{-1}$), whereas ^{238}U ($1.24 \times 10^4 \text{Bq.g}^{-1}$) contributes 48.2% despite its high abundance. The remaining 2.3% is attributed to the activity of ^{235}U ($8 \times 10^4 \text{Bq.g}^{-1}$) (Bleise et al., 2003). U is used primarily in nuclear power plants; most reactors require U in which the ^{235}U content is enriched from 0.72% to about 3%. The U remaining after removal of the enriched fraction is referred to as depleted uranium (DU) (^{235}U content: 0.2–0.3%), and it is less radioactive than natural U (Aigueperse et al., 2001; WHO, 2001). DU may also result from the reprocessing of spent nuclear reactor fuel; under these conditions another uranium isotope, ^{236}U , may be present (WHO, 2001). Moreover, industrial processes can produce other isotopes of U such as ^{232}U and ^{233}U , which are much more radioactive than natural U.

Although the occurrence of U in the environment is increasing due to anthropogenic activities (WHO, 2001; Giovanetti et al., 2010), the ecotoxic profile of this metal has not been studied extensively for non-human biota, particularly for aquatic invertebrates. The toxic action of U in organisms potentially originates from both its chemical and radiological properties, the latter depending on the specific activity of the U isotopes and their associated energy radiation (Bourrachot et al., 2008; Darolles et al., 2010; Giovanetti et al., 2010). However, information about distinguishing between the hazardous effects of U chemotoxicity and U radiotoxicity on aquatic organisms is scarce (Barillet et al., 2007; Bourrachot et al., 2008; Alves et al., 2009). Identification of the effects and the mechanisms of action of a pollutant's toxicity are best done using a multi-biomarker approach at different biological levels of organization (Adams and Greeley, 2000; Viarengo et al., 2007; Faria et al., 2010). For example, gene expression profiling can accurately assess and predict toxicity of metals to aquatic organisms (Neumann and Galvez, 2002). As U impairs mitochondrial function (Pourahmad et al., 2006; Lerebours et al., 2010; Al Kaddissi et al., 2011, 2012), the expression levels of *cox1*, *atp6*, and *12S* are good candidates for use as biomarkers. U also can generate oxidative stress (Miller et al., 2002; Barillet et al., 2007; Darolles et al., 2010; Lerebours et al., 2010; Al Kaddissi et al., 2011, 2012), so the study of the expression levels of *sod(Mn)* and *mt* genes and evaluation of enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD),

catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione S-transferase activities (GST) likely are pertinent endpoints for determining the toxicity of U.

The main aim of this study was to identify the contribution of chemotoxicity and radiotoxicity to the effects of U on mitochondria and the oxidative balance using transcriptional responses (*mt*, *sod(Mn)*, *cox1*, *atp6*, *12S*) and enzymatic activity as endpoints (SOD, CAT, GPx, GST). We also evaluated the sensitivity of the biomarkers by comparing the impacts of a low contamination level on the different biological levels of organization. Indeed, it is crucial to select sensitive biomarkers which could be suitable for ecological risk assessments. We selected the crayfish *Procambarus clarkii* as a biological model because this species is widespread (Gherardi, 2006), accumulates U, and is an integrator of its effects (Al Kaddissi et al., 2011, 2012). In addition, *P. clarkii* has been used as an indicator of metal toxicity in environmental studies for decades (Alcorlo et al., 2006; Gherardi, 2006; Suárez-Serrano et al., 2010).

In this study, crayfish were exposed for 10 days to two different types of U (DU and ^{233}U) at the same concentration ($30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). These two types of U differ from each other only in their specific activity and thus in their radiotoxicity. The U concentration in the water was close to environmental values measured near U mining sites (Colle et al., 2001; Simon and Garnier-Laplace, 2005) and was twice as high as the value recommended by the World Health Organization for drinking water (WHO, 2004). U accumulation was evaluated in different organs (gills, hepatopancreas (HP), stomach, intestine, green gland, muscle, and carapace), whereas biological effects of the different isotopes were evaluated only in the gills and the HP because these organs are known to accumulate metals efficiently (Simon and Garnier-Laplace, 2005; Alcorlo et al., 2006; Kouba et al., 2010; Suárez-Serrano et al., 2010; Al Kaddissi et al., 2011, 2012) and they provide sufficient amount of tissue for conducting various analyses on the same organ. In parallel, to evaluate the radiotoxicity of both DU and ^{233}U , internal dose rates in the HP were calculated using EDEN-2.2 software.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

All crayfish used in this study were adult premoult males (25.16 ± 0.95 g fresh weight, 9.07 ± 0.08 cm length; $n = 50$). Organisms were caught *in situ* from the Vigueirat Swamp of Camargue in the south of France. They were acclimatized to laboratory conditions for 1 month before being used in the experiments: 12/12 h light/dark photoperiod; $17 \pm 1^\circ\text{C}$ synthetic water composed of $\text{Ca}^{2+} = 1640$, $\text{Mg}^{2+} = 500$, $\text{Na}^{2+} = 870$, $\text{K}^{+} = 80$, $\text{Cl}^{-} = 4100$, SO_4^{2-}

=509, NO_3^- =76.5, HCO_3^- = 281 (all in $\mu\text{mol.L}^{-1}$); pH 6.5 (Al Kaddissi et al., 2011, 2012). The chosen pH value and the voluntary absence of phosphate maintained high levels of U bioavailability (Fortin et al., 2004, 2007). During the acclimatization period, crayfish were fed every 48 h with a diet of corn and mussels. The specimens were starved for 48 h before beginning the experiment to avoid the formation of metal-feces complexes and to maintain constant U bioavailability. During the test, three groups of 10 crayfish were exposed for 10 days to waterborne U: 0 (controls); 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of DU (from depleted uranyl nitrate stock solution 1 g.L^{-1} 0.016M HNO_3 ; DU isotopic composition: 99.65% ^{238}U , 0.33% ^{235}U , 0.0019% ^{234}U , 0.011% ^{236}U , total activity = $1.7 \times 10^4 \text{ Bq.g}^{-1}$); or 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of ^{233}U (uranyl nitrate, specific activity = $3.57 \times 10^8 \text{ Bq.g}^{-1}$, stock solution, 1.3 g.L^{-1} , 4M HNO_3 , IRMM, Belgium). The pH value was maintained constant over the experiment. As the two stock solutions of U (DU and ^{233}U) had significantly different HNO_3 concentrations, the exposure media were adjusted so that they all had identical pH, NO_3^- , and Na^+ concentrations. Each specimen was kept in an individual chamber (a cylinder made from plastic netting, 1 cm mesh, 11 cm diameter) to avoid cannibalism (no mortality was observed throughout the experiment). Half of the water column was renewed manually and daily in order to ensure the stability of both water composition and exposure levels. DU water concentrations were measured daily before and after the renewal and adjusted to keep mean values significantly close to the nominal contamination levels. The temperature was maintained at $17.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Several abiotic parameters were monitored on a daily basis throughout the experiment, including dissolved oxygen ($73.6 \pm 12.4 \% \text{ O}_2$), pH (6.51 ± 0.04), conductivity ($602.4 \pm 25.9 \mu\text{S}$), and water concentration of anions (NO_3^- , NO_2^- , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) using an Ion Chromatography System (ICS-3000). At days 4 (T4) and 10 (T10), five crayfish were sampled from each tank and sacrificed. For both sampling times and the three exposure conditions, HP, gills, stomach, intestine, green gland, muscle, and carapace were collected from each individual and stored at -80°C prior to the bioaccumulation analysis. Parts of the gills and HP were also stored at -80°C for enzymatic and genetic analyses.

2.2. U analyses

Water samples from each tank were acidified (0.31 M HNO_3) with nitric acid prior to metal quantification. Samples containing DU were analyzed by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES Optima 4300DV, PerkinElmer, Wellesley/USA; detection limit: $10 \mu\text{g.L}^{-1} \pm 10\%$). 1 ml of the acidified water contaminated with ^{233}U was added to 19 ml of a liquid scintillation cocktail (Instagel, Packard Instruments, Rungis,

France) and then analyzed by alpha liquid scintillation counting (alpha particle detection limit of 0.03 Bq per sample; Quantulus 1220, Wallac Oy, Turku, Finland). Crayfish organs had to be digested in order to determine the U concentrations in the samples. After 2 days at 45 °C, the organs were weighed and then digested in 3 ml of HNO₃ (15.5 M) for 90 min at 95 °C and then were left to dry for 60 min at 105 °C. Next, 2 ml of H₂O₂ (33%) were added to complete the digestion, and the preparation was left for 20 min at 105 °C to dry again. Samples were finally redissolved in acidified water (0.31 M HNO₃). Organs exposed to DU were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS Agilent 7500 Cx; quantification limit: 10 ng.L⁻¹ ± 7%). A liquid scintillation cocktail (Instagel, Packard Instruments, Rungis, France) was added to the tissues (1:19) sampled from ²³³U exposure condition and were analyzed with the same technique as the one used for analyzing water samples contaminated with ²³³U.

2.3. Enzyme activity determination

Enzyme activities were determined in the cellular cytosolic fractions of tissues. Gills and HP (200 mg) from each individual were homogenized, respectively, in a 1:10 and 1:20 weight: volume (W/V) proportion in ice cold Tris-HCl (100 mM, pH 7.8) buffer containing 100 µM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 0.008 aprotinin U.mL⁻¹, and 0.1 mg.mL⁻¹ bacitracin. An aliquot of each homogenate was centrifuged at 15,000 g for 30 min at 4 °C, and supernatants were then centrifuged at 100,000 g for 1 h at 4 °C. All biochemical analyses and absorbance readings were performed at a constant temperature of 25 °C using a spectrophotometer (Spectramax 384 Plus, Molecular Device) with SOFTmax PRO software. Protein concentration was determined using the Micro BCATM Protein Assay Kit (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions; absorbance was read at 562 nm. SOD was determined spectrophotometrically using the 19160 SOD Determination Kit (Fluka) according to the manufacturer's instructions; absorbance was read at 450 nm. SOD activity was expressed as U.mg⁻¹ prot. The enzyme assays for CAT, GPx, and GST were performed according to the method reported in Dörr et al. (2008). Briefly, CAT activity was measured by following the decrease in absorbance at 240 nm due to H₂O₂ consumption ($\epsilon = 0.04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). The assay was carried out in Na-phosphate buffer pH 7 and 12 mM H₂O₂. GPx activity using cumene hydroperoxide as the substrate was determined and the oxidation of NaDPH was followed at 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). The assay conditions were 100mM Na-phosphate buffer with pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.12 mM NaDPH, 2 mM GSH, 1 mM DTT, 0.8 mM cumene hydroperoxide, and 1Uglutathione reductase. GST activity was measured using 1-

chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as the substrate. This assay measured the formation of the conjugate with GSH at 340 nm ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The assay conditions were 100 mM Na-phosphate buffer with pH 6.5, 1 mM GSH, and 1 mM CDNB.

2.4. Gene expression level determination

Total RNA were extracted from 20–40 mg of tissue using the Absolutely RNA Miniprep Kit (Agilent), following the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from total RNA using the Stratascript First-Strand Synthesis System (Agilent) according to the manufacturer's instructions. The cDNA mixture was stored at -20°C until needed. Specific primer pairs used to determine target gene expression levels (*12S*, *atp6*, *cox1*, *sod*, *mt*) and the explanation of their functions are listed in Al Kaddissi et al. (2011, 2012). Real-time PCR reactions were performed in a Light Cycler (Roche) following the manufacturer's instructions using the DNA intercalating dye SYBRGreen I. The amplification program consisted of 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. PCR specificity was determined for each reaction from the dissociation curve of the PCR product. This dissociation curve was obtained by following the SYBRGreen fluorescence level during a gradual heating from 60 to 95°C . Relative quantification of each gene expression level was normalized according to the expression of the housekeeping gene *18S*. Relative expression of a gene was calculated using the $2^{-\Delta\text{CT}}$ method as described by Livak and Schmittgen (2001), where ΔCT represents the difference between the cycle threshold of the specific gene of interest and the cycle threshold of the *18S* gene. Therefore, the expression factor (EF) of each gene in comparison with the control corresponds to the following equation: $\text{EF} = 2^{-\Delta\text{CT}(\text{Treatment})} / 2^{-\Delta\text{CT}(\text{Control})}$.

2.5. Dose rate calculation for the hepatopancreas

Taking into account all exposure pathways, a total absorbed dose rate of an organ is estimated by summing the internal and external dose rates. U concentrations in HP were converted into internal dose rates using Dose Conversion Coefficients (DCCs, Gy/unit of time per Bq/unit of volume or mass) calculated using EDEN 2.2 software (Beaugelin-Seiller et al., 2004) (**Table 22**). The external dose rate of the crayfish HP was found to be negligible (DCC value $< 10^{-10}$). Input data depend on the shapes and the elementary compositions of the biological target. They also depend on the composition of the exposure media and the radioactive source (defined as a combination of radionuclides). HP were thus assumed to be ellipsoids (4 cm long, 0.65 cm high, and 2 cm wide) composed of hydrogen, carbon, oxygen,

and nitrogen, which contribute 10.2, 9.5, 77, and 2.3% of the total mass, respectively. The shape of the gills is complex and thus it is not possible to calculate the radiological dose rate in such complex organs using EDEN 2.2 software. The radioactive source was determined according to the U contents in the organ measured by ICP-MS or liquid scintillation, and the presence of U decay products was modeled using Nuclides 2000 software (Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany). The U distribution was considered homogenous in the organ. Internal dose rates were then assessed according to three different scenarios:

- (i) Only U isotopes were accumulated in the HP,
- (ii) U isotopes were accumulated in the HP along with the daughters of the U isotopes, which were initially present in the water before being transferred to the organ (transfer factors of 110 for thorium (Th) and 10 for protactinium (Pa) (Hosseini et al., 2008) were used to assess the activities of daughters),
- (iii) Same as (ii) + decay products accumulated in HP after 10 days of decay, corresponding to the 10 days exposure duration.

For scenarios (ii) and (iii), all radionuclides were assumed to have entered the organ the first day of exposure and to have the same biokinetic (same uptake and elimination) rates and the same biological targets as U.

Table 22: Isotopic lists of uranium (^{233}U , ^{234}U , ^{235}U , ^{236}U and ^{238}U), their related daughters selected for the source composition (obtained by Nuclides 2000) and corresponding DCC values (Gy/d)/[Bq/g] of U accumulated in Hepatopancreas after 10 days of exposure obtained by EDEN 2 software (Elementary Dose Evaluation for Natural Environment, developed by IRSN).

92 U233	90 Th229	88 Ra225	89 Ac225	87 Fr221	85 At217	86 Rn217	84 Po213	83 Bi213	82 Pb209	81 Tl209
1.33E-07	1.37E-07	2.53E-09	1.59E-07	1.74E-07	1.93E-07	2.11E-07	2.28E-07	4.89E-09	1.22E-08	1.19E-08
92 U234	90 Th230	88 Ra226	92 U235	90 Th231	91 Pa231	89 Ac227	90 Th227			
1.31E-07	1.29E-07	1.31E-07	1.22E-07	2.66E-09	1.38E-07	2.17E-09	1.64E-07			
92 U236	90 Th232	88 Ra228	92 U238	90 Th234	91 Pa234m	92 U234	91 Pa234			
1.24E-07	1.11E-07	4.57E-10	1.16E-07	1.27E-09	1.26E-08	1.31E-07	1.29E-07			

2.6. Statistical analyses

One-way or two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare variables among controls and treatments. If significant differences were found ($p < 0.05$), these data were then reanalyzed to determine if significant differences existed between (i) exposed and control conditions and (ii) between ^{233}U and DU exposures. If the data were not normally distributed, log transformation was conducted; if normality still was not achieved, a non-parametric test (Kruskal-Wallis) was used to compare the data. Results were presented as mean \pm SEM (standard error of the mean).

3. Results

3.1. U in water, in organs, and related dose rates

The average U concentrations measured daily were close to the nominal concentrations ($28 \pm 15 \mu\text{g DU.L}^{-1}$ and $35 \pm 17 \mu\text{g }^{233}\text{U.L}^{-1}$). No significant difference was observed between the average concentrations of DU and ^{233}U in water (Kruskal-Wallis test, $p = 0.2887$, $n = 84$). As expected, preliminary experiments showed that the DU and ^{233}U adsorption on experimental units (tanks) were identical in terms of kinetics and loss in our experimental conditions. Average ionic concentrations of the synthetic water were not significantly different from the required concentrations mentioned above. Thus, the exposure conditions favored U bioavailability.

U accumulated in tissues of crayfish with the following tendencies: gills \gg stomach $>$ intestine $>$ HP $>$ carapace $>$ green gland $>$ muscle (**Figure 70**). Results showed a significant accumulation of both DU and ^{233}U in the organs. A significant effect of time on bioaccumulation was observed in gills, HP, intestine, and carapace (ANOVA, $p < 0.05$). Accumulation in the gills was rapid and very high (DU, T10, $400 \mu\text{g.g}^{-1}$ dw), whereas accumulation in muscle was low (DU, T10, $0.7 \mu\text{g.g}^{-1}$ dw) but still significantly higher than in the control (25x) and not time dependent. No significant effect of exposure conditions (DU versus ^{233}U) was observed, except for the carapace, where accumulation was higher after DU exposure at T4.

In HP, the total internal dose rate (scenario (iii)) due to ^{233}U ($12900 \mu\text{Gy.h}^{-1}$) was significantly higher (15000x) than that due to DU ($0.86 \mu\text{Gy.h}^{-1}$). The three proposed scenarios led to quasi-identical internal dose rates. The U isotopes accumulated in the HP contributed 99.9997% and 95.9% of the total internal dose of the organ sampled from ^{233}U and DU exposure conditions, respectively. In addition, for DU the contribution of ^{238}U and ^{234}U represented 70% and 27.3% of the total internal dose rate, respectively. Thus, the internal

dose rate mainly originated from the U isotopes rather from their related daughters. For instance, the contribution of the Th isotopes to total internal dose was only 2.1%.

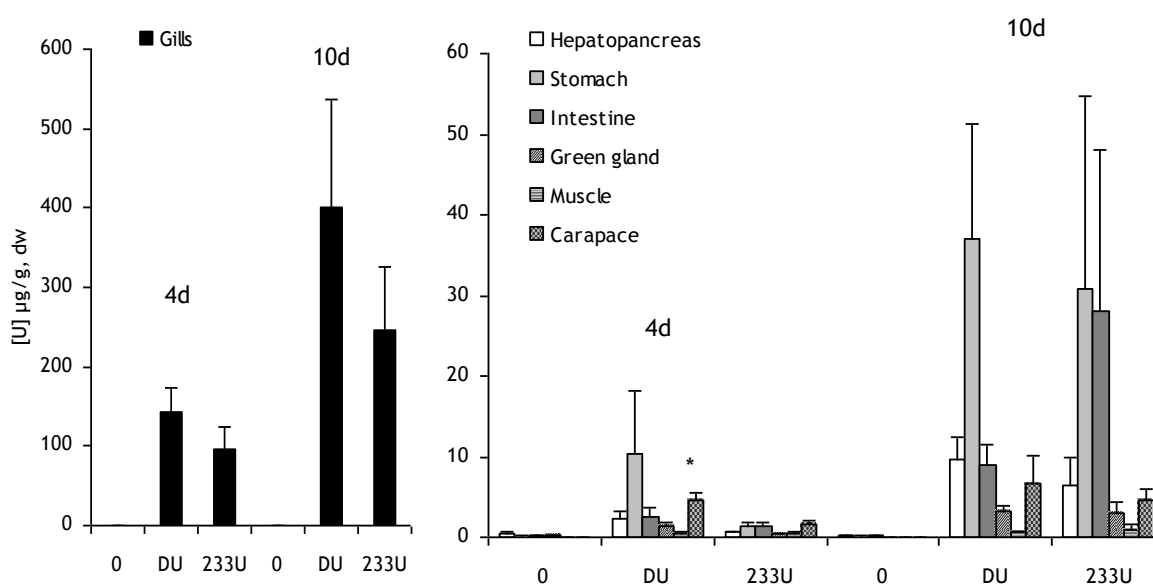


Figure 70: Concentrations ($\mu\text{g/g dW}$, mean \pm SEM, $n=5$) of depleted uranium (DU) and enriched uranium (^{233}U) in: gills (on the left), hepatopancreas, stomach, intestine, green glands, muscles and carapace (on the right) of the crayfish *P. clarkii* exposed 4 (4d) to 10 (10d) days to 0 (control) and 30 $\mu\text{g/L}$ of the metals. (*) indicates significant differences between DU and ^{233}U treated samples.

3.2. Effects on enzyme activities and gene expression levels

Figure 71 shows the enzyme activities (CAT, GPX, GST, and SOD) over time in gills and HP of control and DU- and ^{233}U -exposed crayfish. In HP, no statistically significant difference for any enzyme activity was detected between control and either U exposure condition ($p > 0.05$). A significant decrease in CAT activity was observed at T4 in gills of crayfish exposed to both types of U when compared to controls. The GST activity increased at T10 in this same organ, but only in the presence of ^{233}U . No statistically significant differences were recorded for GPx and SOD in the same organ.

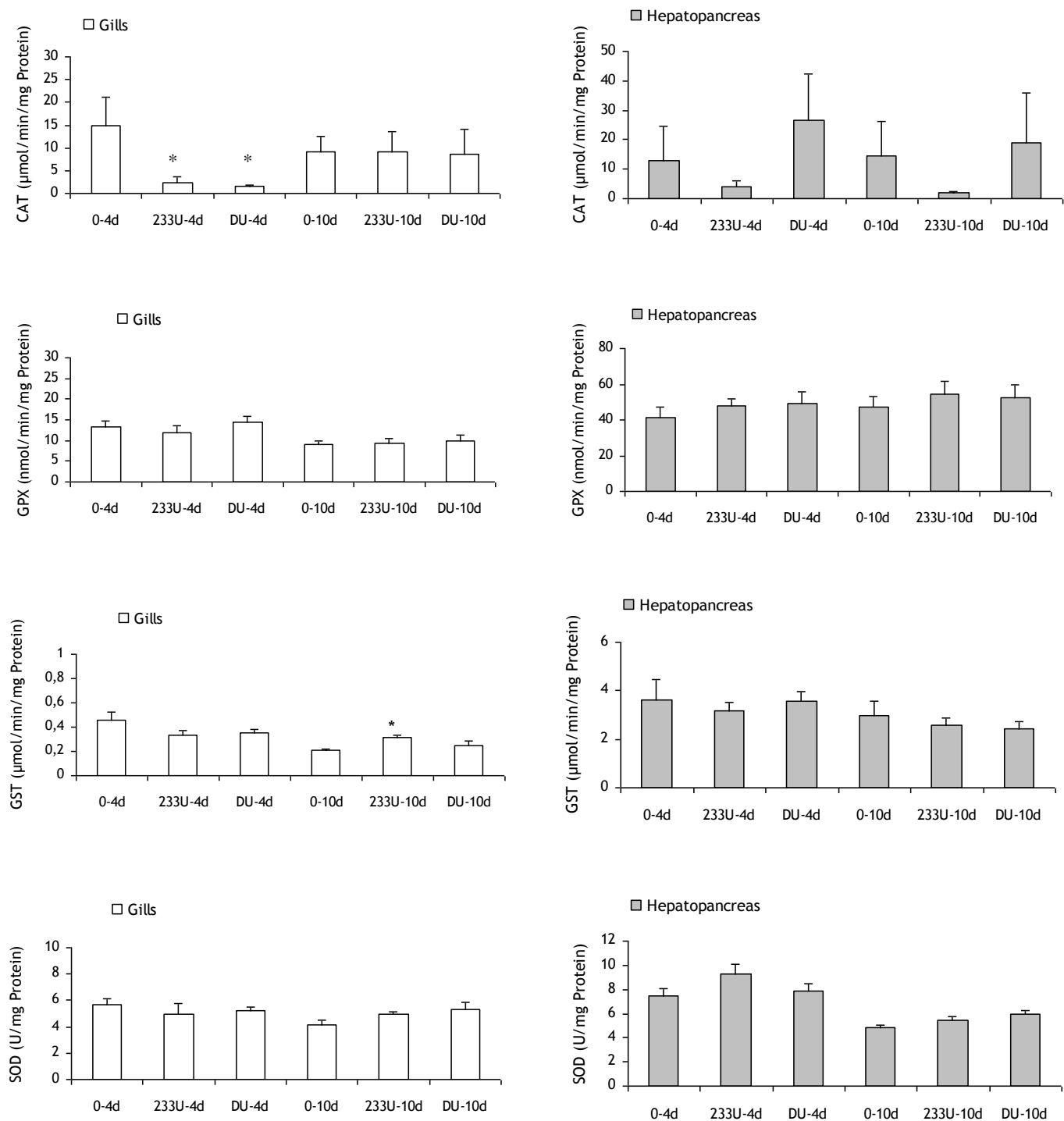


Figure 71: Enzymatic activities of catalase (CAT) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$, mean \pm SEM, n=5), glutathione peroxidase (GPX) ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg Prot}$, mean \pm SEM, n=5), glutathione S transferase (GST) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$, mean \pm SEM, n=5) and superoxide dismutase (SOD) (U/mg Prot, mean \pm SEM, n=5) in the hepatopancreas and gills of crayfish *P. clarkii* exposed 4 (4d) and 10 (10d) days to 0 (control) and 30 $\mu\text{g}/\text{L}$ of depleted uranium (DU) or enriched uranium (^{233}U). (*) indicates significant differences between control and treated samples ($P < 0.05$).

In contrast, U exposure had a significant effect on the expression levels of the five genes studied (**Table 23**). Expression of the *atp6* gene varied greatly (e.g. from -36x to +17x in gills) over time in both gills and HP; it was repressed or not different from the control at T4 and then overexpressed at T10. The same pattern was observed for the *mt* gene. Expression levels of the *12S* gene decreased at T4 and then increased again at T10 in both organs (from -5x to 3x). In contrast, the *cox1* gene was repressed in gills at all times and only down-regulated in the HP at T4 in the ²³³U treatment condition. The *sod(Mn)* gene was only weakly repressed at T4. Finally, compared to DU exposure, exposure to ²³³U had a greater effect (from 1.7x to 12) on *atp6* gene expression, except in the HP at T10.

Table 23: Expression factors (EF) of the 5 genes studied in *P. clarkii* compared to the basal level of controls (n=5)

organs	time (days)	Isotopes	<i>12S</i>	<i>atp6</i>	<i>Cox1</i>	<i>Sod(Mn)</i>	<i>mt</i>
Gills	4	²³³ U	-2	-36	-2,5	-2	/
		DU	-2	-3	-2	-2	/
	10	²³³ U	3	17	-2	/	4
		DU	2	10	-6	/	4
Hepatopancreas	4	²³³ U	-5	-6	/	-2	-4
		DU	-3	/	-2	/	-2
	10	²³³ U	2,5	17	/	/	2
		DU	/	17	/	/	4

(/): Equal to control, (-): down-regulated, (+): up-regulated. Only $EF \geq 2$ or $EF \leq -2$ are considered statistically significant.

4. Discussion

4.1. Accumulation of U

As previously observed in different species of crayfish (*P. clarkii*, *Orconectes limosus*), in the bivalve *Corbicula fluminea* and the fish *Danio rerio* (Simon and Garnier-Laplace, 2005; Barillet et al., 2007; Al Kaddissi et al., 2011, 2012), U accumulation varies among individuals. This variability could be linked to differences in ventilation and respiration rates, which affect the uptake of waterborne metals. In this study, U accumulation was highest in the gills, which confirms that they are the main target organs in crayfish after direct exposure. In contrast to what has been reported for fish (Barillet et al., 2007), crayfish gills exhibited a strong ability to retain the metal (Kouba et al., 2010; Kurun et al., 2010). The high levels of U accumulation observed in the gills, stomach, intestine, and carapace are probably due in part to U adsorption on the cuticle and the mucus of these organs. This could

also explain the high individual variation of U accumulation in gills. Electron micrographs coupled with EDX-probe analysis showed a high U burden on the gill cuticle of *Orconectes limosus* after exposure to a high level ($500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) of waterborne U (results not shown). The fact that all organs accumulated U after waterborne exposure illustrates the capacity for U transfer in *P. clarkii*. Indeed, contamination of the muscles was detected, even if the accumulated levels of U were low. As various predators feed on crayfish, including humans, further experiments should be conducted to assess the potential for trophic transfer of U.

The potential additional radiotoxic effect of ^{233}U did not lead to a significant difference in accumulation levels in organs, except for the carapace at T4. No explanation for this result was obvious, which illustrates the need for further tests to determine the relative U adsorption and absorption burdens. Such a study would also help explain the relationship between bioaccumulation levels and effects. No difference was observed between the bioaccumulation levels in the prolarval stage of *D. rerio* after DU and ^{233}U exposures (Bourrachot et al., 2008). However, in a study of adult *D. rerio* exposed to low radiological levels, a significant difference was detected in the accumulation of DU and ^{233}U due to the radiotoxic effect on gill epithelium after 3 days of exposure; the effect later disappeared after 10 and 20 days (Barillet et al., 2007).

4.2. Dose rate in the hepatopancreas

The DU exposure led to a total dose rate in HP that was close to $1 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ as observed by Barillet et al. (2007) in the whole fish *Danio rerio* after 20 days of DU exposure ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). This value is lower than the radiological benchmark which was reported to be equal to $10 \mu\text{Gy h}^{-1}$ at the ecosystem level (Garnier-Laplace et al., 2006). Note that the biomarkers used in the current study were able to show effects of U exposure at dose rates lower than the benchmark value. The internal dose rate calculated after ^{233}U exposure was much higher ($1.5 \cdot 10^4 \times$) than that calculated after DU exposure. Moreover, the total internal dose rate seemed to be mainly the result of the contribution of U isotopes, as the contribution of uranium's daughters was low. Transfer factors (TF) of daughters are required for precise assessment of their internal dose rates in organs. However, information on these TF in the literature is scarce. For example, no information on Th transfer was available for crustaceans in Hosseini et al.'s (2008) review. Therefore, more data on accumulation of daughters and evaluation of their TF in crayfish are needed to refine calculations of dose rates. Moreover, the metal distribution in organs and at the subcellular level is not homogeneous (Simon et al., 2011), yet the dose rate calculation assumes a homogenous distribution. Dose rates calculated in cellular

fractions could provide better information to link exposure to its effects. One possible approach to making accurate measurements would be to adapt small-scale dosimetry used in nuclear medicine to calculate the dose rate in heterogeneous distribution conditions (Hofmann et al., 2007).

4.3. Effect on enzyme activities

CAT is an important enzyme involved in the antioxidant defense system, and its activity is generally stimulated by metals (Vlahogianni et al., 2007; Faria et al. 2010). However, other studies demonstrated that metals can inhibit this enzyme. In fact, in vivo studies revealed a decrease in CAT activity in the presence of U in the mollusk *Corbicula sp.*, the earthworm *Eisenia fetida*, and the fish *Brachydanio rerio* (Labrot et al. 1996). In addition, Barillet et al. (2007; 2011) showed a significant decrease in CAT activity in *D. rerio* exposed to environmental concentrations of DU. In *Oreochromis niloticus*, CAT activity varied depending on the tissue, the nature, and accumulation levels of the considered metals (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) (Alti et al., 2006). Therefore, CAT activity seems to be either induced or inhibited by metals depending on the dose, the metal species, and/or the route of exposure. Herein, the activity of CAT in the gills of *P. clarkii* decreased (x3) after 4 days of U exposure. No effect of U isotopic composition on the activity of this enzyme was observed (**Figure 71**). The reduction of CAT activity could indicate a decrease in the expression levels of the CAT gene (Barillet et al., 2007). Moreover, a decrease in antioxidant activities could stem from an oxidative alteration of the enzymes (Davies 2005). Another possible explanation for the inhibition of this enzyme's activity could be due to a direct binding of U to the enzyme resulting in its loss of function. To our knowledge, no data concerning the interaction between U and CAT are available in the literature, although the complexation capacities of U on metalloproteins (albumin, metallothionein, ferritin) have been reported (Michon et al., 2010). In this study, the effect of U on CAT activity was higher in the gills than in the HP, which is in agreement with the accumulation levels of U in these organs. Moreover, the detoxification system of the gills is not as robust as that of the liver, which suggests that the HP has better regulation of reactive oxygen species (ROS) (Alti et al., 2006; Borkovic et al., 2008; Pandey et al., 2008). U exposure seems to have led to transitory oxidative stress in *P. clarkii*. Other defense mechanisms not measured in this study could have been induced by U exposure and contributed to managing the oxidative stress. For example, efficient antioxidants such as glutathione, glutathione reductase, or ascorbate could have prevented ROS from causing oxidative cellular damage (Eyckmans et al., 2011). A significant increase in GST activity was

observed in the gills after ^{233}U exposure at T10. GST is an enzyme that belongs to the most important phase II biotransformation system (Doyen et al., 2008), and it also contributes to resistance against products of oxidative stress (Hayes and Pulford, 1995; Elia et al., 2003; Solé et al., 2004). H_2O_2 and metal exposure have been shown to induce GST in plant, mammalian cells (Hayes and Pulford, 1995) and in fish (Elia et al., 2003, Solé et al., 2004). Moreover, this enzyme protects cells from extremely toxic end products of lipid peroxidation (e.g., HNE4) (Valko and al., 2006). Thus, at T10, the oxidative stress seemed to have increased, which led to the increase in GST activity.

4.4. Effect on gene expression levels

The expression of the mitochondrial genes *12S*, *cox1*, and *atp6* was altered in the presence of both types of U, thereby confirming that mitochondria were affected by U exposure. The over-expression or repression of most of the genes were not as pronounced ($-6x$ to $4x$ compared to the control) as for the *atp6* gene. It should be noted that the crayfish used in this study were in the premoult stage. Moulting requires high amounts of energy, which could explain the high variations in the *atp6* gene expression levels as this gene encodes for the mitochondrial ATP synthase, which in turn is responsible for ATP synthesis (Wang and Oster, 1998). Muhlia-Almazan et al. (2008) demonstrated that *atp6* gene expression in *Litopenaeus vannamei* varied at different moult stages and concluded that *atp6* mRNA levels are influenced by confounding factors such as environmental and physiological changes. The results of the current study show that despite natural physiological variation, the *atp6* gene responded to U exposure. The *mt* gene expression was initially repressed at T4 and then stimulated by the end of the experiment. This gene encodes for metallothionein (MT), a metal binding protein, which is capable of scavenging ROS (Amiard et al, 2006; Pandey et al., 2008). It is possible that at T4, a high basal level of MT protein in the gills could have compensated the U effect, but by day 10 the level was not sufficient and thus *mt* transcription was required. Finally, *sod(Mn)* gene expression levels did not reflect an increase in endogenous ROS production in the mitochondria, as this gene encodes for mitochondrial superoxide dismutase, an enzyme involved in the fight against oxidative stress (Wang et al., 2004; Gonzalez et al., 2006).

4.5. Linking effects to radio or chemotoxicity

Decreased CAT activity highlighted the effects of U exposure on *P. clarkii*; it indicated the presence of early oxidative stress in the gills. This stress likely was due to the chemotoxicity of U because no significant difference was observed between DU and ^{233}U exposures. However, GST activity increased significantly only in the gills of crayfish exposed to ^{233}U , thus this increase can be linked to the radiotoxicity of U. Gene expression levels did not allow to distinguish a specific mechanism linked to ^{233}U toxicity, as all genes exhibited the same expression pattern in the presence of both types of U. Darolles et al. (2010) did not observe a great difference between the genotoxic effect of depleted U and enriched U. However, in our study, greater alterations in *atp6* gene expression levels were observed in organs contaminated with ^{233}U than with DU. The radiotoxicity of ^{233}U could have amplified the effect in this case. Even if DU and ^{233}U exposure led to different dose rates in the HP, it is important to note that most of the biological effects were not correlated to the radiological dose in this organ. In assessing the chemical and radiobiological risks of U exposure, Mathews et al. (2008) demonstrated that the environmental risk of uranium's chemical toxicity, expressed by the chemical benchmark of $3.2 \mu\text{g.L}^{-1}$, generally outweighs its radiological toxicity ($10 \mu\text{Gy.h}^{-1}$).

5. Conclusions

Three endpoints (U accumulation, enzyme activity, and gene expression levels) were tested for their usefulness as markers of U exposure and its effects. Results of U concentrations in the different studied organs identified the gills as the main target organ for U bioaccumulation. The enzymatic activities of only CAT and GST were modified after U exposure when compared to the control. Indeed, GPx and SOD were not sensitive markers for early evaluation of U toxicity in *P. clarkii*. The CAT and GST responses indicated that U exposure caused early generation of oxidative stress. The expression levels of the studied genes were strongly modified by U exposure and confirmed that damage occurs in the mitochondria. Thus, this endpoint (i.e., gene expression) exhibits better sensitivity to U contamination than the enzymatic responses. Finally, the tested endpoints showed that the adverse effects of U were due mainly to its chemotoxicity rather than to its radiotoxicity.

Acknowledgments

The authors thank N. Gauthier for providing the crayfish and R. Al Kaddissi for proofreading the manuscript. This work was supported by the EnvirHom-eco research program funded by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety and co-financed by the CNRS.

References

- Adams, S.M., Greeley, M.S., 2000. Ecotoxicological indicators of water quality: using a multi-response indicator to assess the health of aquatic ecosystem. *Water, Air, Soil pollut.*, 123: 103-115.
- Aigueperse, J., Bouvier, C., Chambrette, V., et al., 2001. Etat des connaissances sur les risques potentiels associés à l'uranium appauvri utilisé dans les armes. Fontenay aux Roses, Institut de Protection et de Sûreté Nucléaire, 25.
- Al Kaddissi, S., Legeay, A., Gonzalez, P., Floriani, M., Camilleri, V., Gilbin, R., Simon, O., 2011. Effects of uranium uptake on transcriptional responses, histological structures and survival rate of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74(7):1800-1807.
- Al Kaddissi, S., Legeay, A., Elia, C., Gonzalez, P., Camilleri, V., Gilbin, R., Simon, O., 2012. Effects of uranium on crayfish *Procambarus clarkii* mitochondria and antioxidants responses after chronic exposure: what have we learned?. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* In press Doi: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78:218-224.
- Alcorlo, P., Otero, M., Crehuet, M., Baltanás, A., Montes, C., 2006. The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiamar (SW, Spain). *Sci. Total Environ.* 366: 380-390.
- Alti, G., Alptekin, O., Tkel, S., Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 143: 218-224.
- Alves, L.C., Borgmann, U., Dixon, D.G., 2009. Kinetics of uranium in soft water and the effect of body size, bioaccumulation and toxicity to *Hyaella azteca*. *Environ. Pollut.* 157: 2239-2247.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76: 160-202.

- 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. Technol. Chem.* 26: 497-505.
- Barillet, S., Adam-Guillermin, C., Palluel, O., Porcher, J.M., Devaux, A., 2011. Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environ. Pollut.* 159, 495-502.
- Beaugelin-Seiller, K., Jasserand, F., Garnier-Laplace, J., Gariel, J.C., 2004. EDEN: Software to calculate the dose rate of energy for the non-human biota, due to the presence of radionuclides in the environment. *Environ. Studies* 11: 87-96.
- Bleise, A., Danesi, P.R., Burkart, W., 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *Journal of Environmental Radioactivity* 64, 93-112.
- Borkovic, S.S., Pavlovic, S.Z., Kovacevic, T.B., Štajn, A.S., Petrovic, V.M., Saicic, Z.S., 2008. Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny cheek crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 147, 122-128.
- Bourrachot, S., Simon, O., Gilbin, R., 2008. The effects of waterborne uranium on the hatching success, development and survival of early life stages of Zebrafish *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.* 90 (1): 29-36.
- Colle, C., Garnier-Laplace J., Rousel-Debet, S., Adam, C., Baudin, J.P., 2001. Comportement de l'uranium dans l'environnement. In Metivier, H (Ed.), *L'uranium de l'environnement à l'homme*. EDP SCi, Les Ulis, pp 187-211.
- Darolles, C., Broggio, D., Feugier, A., Frelon, S., Dublineau, I., De Meo, M., Petitot, F., 2010. Different genotoxic profiles between depleted and enriched uranium. *Toxicol. Lett.* 192: 337-348.
- Davies, M.J., 2005. The oxidative environment and protein damage. *B.B.A. - Proteins. Proteom.* 1703, 93-109.
- Delacroix, D., Guerre, J.P., Leblanc, P., 2004. Manuel pour la manipulation de substances radioactives dans les laboratoires de faible à moyenne activité 4th ed. Radioprotection. *Revue de la société Française de radioprotection.* 39, 270 p.
- Dörr, A.J.M., Pacini, N., Abete, M.C., Prearo, M., Elia, A.C., 2008. Effect of a selenium-enriched diet on antioxidant response in adult crayfish (*Procambarus clarkii*). *Chemosphere* 73: 1090-1095.

- Doyen, P., Biggot, A., Vasseur, P., Rodius, F., 2008. Molecular cloning and expression study of pi-class glutathione S-transferase (pi-GST) and selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) transcripts in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 147: 69-77.
- Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Dörr, A.J.M., Mantilacci, L., 2003. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55: 162–167.
- Eyckmans, M., Celis, N., Horemans, N., Blust, R., De Boeck, G., 2011. Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in the three freshwater species. *Aquat. Toxicol.* 103: 112-120.
- Faria, M., Huertas, D., Soto, D.X., Grimalt, J.O., Catalan, J., Riva, M.C., Barata, C., 2010. Contamination accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain). *Chemosphere* 78: 232-240.
- Fortin, C., Denison, F.H., Garnier-Laplace, J., 2007. Metal-phytoplankton interactions: modelling the effect of competing ions (H⁺, Ca²⁺, and Mg²⁺) on uranium uptake. *Environ. Toxicol. Chem.* 26: 242-248.
- Fortin, C., Dutel, L., Garnier-Laplace, J., 2004. Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(4):974-981.
- Garnier-Laplace, J., Della-Vedova, C., Gilbin, R., Copplestone, D., Hingston, J., Ciffroy, P., 2006. First derivation of predicted-no-effect values for freshwater and terrestrial ecosystems exposed to radioactive substances. *Sci. Technol.* 40: 6498-6505.
- Gherardi, F., 2006. Crayfish invading Europe: the case study of *Procambarus clarkii*. *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology* 39, 175-191.
- Giovanetti, A., Fesenkob, S., Cozzellac, M.L., Asenciod, L.D., Sansone, U., 2010. Bioaccumulation and biological effects in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to natural and depleted uranium. *J. Environ. Radioact.* 101: 509-516.
- Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 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.

- Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1995. The Glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30: 445-600.
- Hofmann, W., Kakir, H., Pihet, P., 2007. Internal microdosimetry of inhaled radon progeny in bronchial airways: advantages and limitations. *Radiat. Prot. Dosim.* 127: 40-45.
- Hosseini, A., Thorrying, H., Brown, J.E., Saxen, R., Ilus, E., 2008. Transfer of radionuclides in aquatic ecosystem-default concentration ratios for aquatic biota in the Erica tool. *J. Environ. Radioact.* 99: 1408-1429.
- Kouba, A., Buric, M., Kozak, P., 2010. Bioaccumulation and effects of heavy metals in crayfish: a review. *Water Air Soil Pollut.* 211: 5-16.
- Kurun, A., Balkis, N., Erkam, M., Balkis, H., Aksu, Ersan, M.S., 2010. Total metal levels in crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823), and surface sediments in lake Terkos, Turkey. *Environ. Monit. Assess.* 169: 385-395.
- Labrot, F., Ribera, D., Saint Denis, M., Narbonne, J.F., 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: Lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers* 1, 21-28.
- Lerebours, A., Adam-Guillermin, C., Brèthes, D., Frelon, S., Floriani, M., Camilleri, V., Garnier-Laplace, J., Bourdineaud, J.P., 2010. Mitochondrial energetic metabolism perturbations in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium. *Aquat. Toxicol.* 100: 66-74.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- Δ CT method. *Methods* 25., 402-408.
- Mathews T, Beaugelin-Seiller K, Garnier-Laplace, Gilbin R, Adam C, Della-Vedo C. 2008. A probabilistic assessment of the chemical and radiological risks of chronic exposure to uranium in freshwater ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* 43: 6684-6690.
- Michon, J., Frelon, S., Garnier, C., Coppin, F., 2010. Determinations of uranium (IV) binding properties with some metalloproteins (transferrin, albumin, metallothionein and ferritin) by fluorescence quenching. *J. Fluores* 20: 581-590.
- Miller, A.C., Stewart, M., Brooks, K., Shi, L., Page, N., 2002. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: Absence of significant alpha particle decay. *J. Inorg. Biochem.* 91: 246-252.
- Muhlia-Almazan, A., Martinez-Cruz, O., Navarrete del Toro, M., Garcia-Carreno, F., Arreola, R., Sotelo-Mundo, R., Yepliz-Plascencia, G., 2008. Nuclear and mitochondrial

- subunits from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* F₀F₁ ATP-synthase complex: cDNA sequence, molecular modelling, and mRNA quantification of *atp9* and *atp6*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40:359-369.
- Neumann, N.F., Galvez, F., 2002. DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? *Biotechnol. Adv.* 20: 319-419.
- Pandey, S., Parvez, S., Ahamd Ansari, R., Ali, M., Kaur, M., Hayat, F., Ahmad, F., Raisuddin, S., 2008. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Chem. Biol. Interact.* 174: 183-192.
- Pourahmad, J., Ghashang, M., Ettehadi, H.A., Ghalandari, R., 2006. A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity. *Environ. Toxicol.* 21, 349-354.
- Simon, O., Floriani, M., Camilleri, V., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., 2011. Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages in the chronically exposed bivalve *Corbicula fluminea*. *J. Environ. Radioact.* 102(8): 766-773.
- Simon, O., Garnier-Laplace, J., 2005. Laboratory and field assessment of uranium trophic transfer efficiency in the crayfish *Orconectes limosus* fed the bivalve *C. fluminea*. *Aquat. Toxicol.* 74: 372-383.
- Solé, M., Potrykus, J., Fernandez-Dias, C., Blasco, J., 2004. Variations on stress defences and metallothionien levels in the Senegal sole, *Solea senegalensis*, during early larval stage. *Fish Physiol. Biochem.* 30: 57-66.
- Suárez-Serrano, A., Alcaraz, C., Ibáñez, C., Trobajo, R., Barata, C., 2010. *Procambarus clarkii* as a bioindicator of heavy metal pollution sources in the lower EbroRiver and Delta. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 : 280-286.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160(1):1-40.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms, *Comp. Biochem. Physiol. C* 146 : 281–300
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.J., Valavanidis, A., 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54: 1361-1371.

- Wang, H., Oster, G., 1998. Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature* 396: 279-282.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S.S., Rao, K.M.K., 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 1434-1443.
- WHO, 2001. Depleted uranium, sources, exposure and health effects. World Health Organisation.
- WHO, 2004. Guidelines for drinking-Water Quality, third ed. World Health Organisation (Geneva).

Chapitre V

Comparaison des effets de l'uranium et du cadmium chez P. clarkii.

How toxic is the depleted uranium to crayfish *Procambarus clarkii*? a comparative study to the uptake and biological effects of cadmium.

Simone Al Kaddissi^{1;2}, Alexia Legeay², Antonia Concetta Elia³, Patrice Gonzalez², Magali Floriani¹, Isabelle Cavalie¹, Virginie Camilleri¹, Sandrine Frelon¹, Rodolphe Gilbin¹, Jean-Charles Massabuau², and Olivier Simon¹.

¹Laboratory of Radioecology and Ecotoxicology (LRE), Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN), Bd 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-Lez-Durance, France.

²Laboratory of Geochemistry and Ecotoxicology of Metals in Aquatic Systems (GEMA), University of Bordeaux1/UMR CNRS 5805, Dr Peyneau square, 33120 Arcachon, France.

³Ecotoxicology Laboratory, Department of Cellular and Environmental Biology, University of Perugia, 06123 Perugia, Italy.

Abstract

Due to a lack of information on the assessment of uranium's (U) toxicity, our work aimed to compare the effects of U on the crayfish *Procambarus clarkii* with those of the well documented metal: cadmium (Cd). Impacts on different levels of biological organisation were assessed after an acute (40µM Cd or U; 4-10 days) and chronic (0.1 µM Cd or U; 30-60 days) exposures. The survival rates demonstrated the high tolerance of this species toward both metals and showed that Cd had a greater effect on the sustainability of crayfish. The concentration levels of Cd and U accumulated in the gills and the hepatopancreas were compared between both conditions. Distinctions in the adsorption capacities and the mobility of the contaminants were observed. Differences in the detoxification mechanisms of both metals using transmission electron microscopy (TEM-EDX) were also pointed out. In contrast, comparison between the histological structures of the contaminated hepatopancreas showed similar symptoms. Principal Component Analyses revealed different impacts of each metal on the oxidative balance and mitochondria using enzymatic activities and gene expression levels as endpoints. The observation that U seemed to generate more oxidative stress than Cd in our conditions of exposure is discussed.

Keywords: cadmium, uranium, survival rates, histology, antioxidants, mitochondria.

1. Introduction

Trace metals are ubiquitous. If their environmental concentration exceeds a certain threshold value, they will adversely affect living organisms. Considering their biological effects, this group is extremely heterogeneous. In fact some heavy metals such as cadmium (Cd) are toxic even in small quantities. Others such as uranium (U) have the distinctive feature of being radioactive (Ribera et al., 1996). Even though natural U is radiotoxic, it is believed that the major hazard rendered by this element results from its heavy metal toxicity rather from its radiological toxicity (Fisenne and Welford, 1986, Barillet et al., 2007). Depleted U (DU) is a low-level radioactive product which activity is about 60% lower than that of natural U (WHO, 2001). Hence, effects from exposure of biota to depleted or natural U are usually attributed to their chemical properties (ASTDR, 1999). Due to a lack of information on the assessment of uranium's toxicity, we choose to compare between studies previously carried out in our laboratory (Chapter III, IV-A, and IV-B) on the effects of Cd and U on the crayfish *Procambarus clarkii* after acute and chronic exposures. Indeed the goal of this work was to produce more reliable information on the toxicity of U by choosing a comparative ecotoxicological approach. This approach allows the collection of data on the different effects and detoxification strategies developed by this species and point out differences or similarities in molecular or cellular damage caused by Cd or U. In addition this comparative study also permits to distinguish which of the two metals is the most toxic to crayfish. It is known that U shares structural similarities with a number of different metals, primarily Cd and lead (Domingo, 1994; Bleise et al., 2003; Arfsten et al., 2005). Groups of adult male crayfish were exposed to 0 and 40 μ M of Cd or DU for 4 to 10 days (acute exposure) (Chapter III and IV-A) while others were exposed to 0 and 0.1 μ M of the studied metals for 30 to 60 days (chronic exposure) (Chapter III and IV-B). The impact of the metals on the survival rates of crayfish were reported in each study. In addition, gills and hepatopancreas were collected after varying exposure periods (T4, T10, T30 and T60) to assess the impacts of Cd and U on different biological endpoints and metal bioaccumulation. The distribution of the metals in the epithelium of organs collected from acute exposure experiments was evaluated as well (TEM-EDX). Possible effects on the histological structures of the hepatopancreas were also examined at T10 and T60 after acute and chronic contamination respectively. The expression levels of mitochondrial genes (*12s*, *atp6*, and *cox1*) and genes involved in oxidative stress responses (*sod(Mn)* and *mt*) were also studied in all experiments and finally the enzymatic activities of antioxidants (SOD, CAT, GPX, and GST) were reported after chronic exposure to U and Cd (T30 and T60). New results are also

presented in this study to complete the data necessary for the comparison of the effects of the metals on the different biological parameters of the crayfish.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

All studied crayfish were adult intermoult males of the same size and length and were all caught from the same swamp (Vigueirat swamp of Camargue, south of France; GPS coordinates: 43°31.863'N-4°45.417'E). The specimens weighed around 25 ± 2.75 g and were about 9 ± 0.3 cm long. All organisms were acclimatized 3 weeks to experimental conditions (12/12h light/dark photoperiod, in 17 ± 1 °C synthetic water (Al Kaddissi et al., 2011; 2012) at pH 6.7 ± 0.2). During the acute exposure tests, groups of 10 animals were exposed up to 10 days to 0 μ M Cd, 0 μ M U, 40 μ M Cd (from CdCl₂ stock solution, 0.01M HCl) or 40 μ M U (from DU stock solution UO₂(NO₃)₂, 6H₂O, 0.01M HCl) (n=40) while during the chronic exposure experiment, groups of 10 animals were exposed for a maximum of 60 days to 0 μ M Cd, 0 μ M U, 0.1 μ M Cd (from CdCl₂ stock solution, 0.016M HNO₃) or 0.1 μ M U (from DU stock solution UO₂(NO₃)₂, 6H₂O, 0.016M HNO₃) (n=40). It should be mentioned that for each type of exposure (acute/chronic) the contamination of crayfish to U and Cd were conducted simultaneously. This means that all the biological organisms were in the same physiological state (were of the same age (size/length), the same stage of the molting cycle, were caught on the same day from the same swamp, acclimatized simultaneously, were fed of the same diet or starved for the same period) and the abiotic conditions were similar between studies so only the type of the contaminant varied between conditions of exposure in both experiments. Consequently, the comparison between effects of the different metals on crayfish is reliable. All animals were kept at a density of ~3 crayfish/L and each individual was isolated in a chamber (cylinder made from plastic netting: 1 cm mesh, 11 cm diameter) to avoid death by cannibalism. Mortality of crayfish was checked on a daily basis. The water column was renewed daily in all experiments. 50% of the test solution was changed in the acute experiment while 25% was renewed in the chronic experiment to reduce the volume of waste water solutions at the end of the tests. Cd and U concentrations were measured at least once after renewal and adjusted to ensure mean values close to nominal contamination levels. In the acute exposure experiment, the measured mean concentrations of Cd and U in water were 46.17 ± 6.05 μ M and 35.04 ± 10.5 μ M respectively (n=20, mean \pm SEM). In the chronic exposure experiment, the mean measured concentration of Cd was $0.092 \pm 4.3 \cdot 10^{-3}$ μ M while that of U was of $0.12 \pm 4.36 \cdot 10^{-3}$ μ M (n=60, mean \pm SEM). The temperature was maintained

at 17.06 ± 0.23 °C and the pH was monitored throughout the exposures (pH acute: 7.01 ± 0.24 ; pH chronic: 6.22 ± 0.045). The concentrations of the major ions in water (NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , Cl^-) were checked by Ion Chromatography System (ICS-3000) during the experiments and were always identical to the desired concentrations ($\text{NO}_3^- = 76.5$, $\text{NO}_2^- < 5 \cdot 10^{-5}$, $\text{SO}_4^{2-} = 509$, $\text{Cl}^- = 4100$ μM). At days 4 (T4), 10 (T10), 30 (T30), and 60 (T60) 4-5 live crayfish were sampled and sacrificed from each exposure conditions. The hepatopancreas and gills were collected from each individual and divided into parts for further biochemical analyses. The parts designated for microscopic analyses were freshly prepared to this end, while others were stored at -80°C until needed.

2.2. Metal quantification

The organs of all the experiments were first dried for 2 days at 45°C and then digested in the same manner before analyses of the bioaccumulation (Chapter III, IV-A, and IV-B). Water and biological samples from all experiments were all acidified by nitric acid (3.1 mM) prior to metal quantification. Samples contaminated with U were analyzed for the highest U concentrations by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES Optima 4300DV, PerkinElmer, Wellesley/USA; detection limit: $10\mu\text{g U/L} \pm 10\%$) and by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS Agilent 7500 Cx; quantification limit: $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1} \pm 7\%$) for the lowest concentrations. Cd concentrations were measured by atomic absorption spectrophotometry using a graphite furnace (4110 ZL; Perkin-Elmer; detection limit: $0.4 \mu\text{g Cd/L}$).

2.3. Histochemical and histological methods

Fresh tissues were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 48 h at 4°C , then washed 3 times for 5 min with 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.4), and then post-fixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h (Chapter III and IV-A). Samples were subsequently dehydrated with successive baths of ethanol and propylene oxide, and finally embedded in Epon 812 (TAAB). Samples were cut in semi-thin sections of 200 to 500 nm for light microscopy analysis. These semi-thin sections were stained with aqueous blue toluidine then observed under a light microscope (Leica, DM 750) and images were saved using a Leica camera ICC50 and LAS EZ software. Ultra-thin sections of 80 and 140 nm were mounted on copper grids and observed with a Scanning Transmission Electron Microscope (TEM/STEM, Tecnai G2 Biotwin, FEI company), equipped with a CCD camera (Megaview III, Eloise). All sections were obtained using an ultramicrotome (UCT,

Leica). The localisation of Cd in the ultra-thin sections was conducted using the Energy Dispersive X-ray analyzer equipped with a Super Ultra Thin Window (SUTW) model sapphire (EDAX). The electron probe was then focused on specific spots and spectra were recorded after 30 s of analysis. For each replicate organ, at least 30 micrographs of local detailed structures were taken.

2.4. Genetic analysis

Total RNA were extracted from gills and hepatopancreas in all experiments and then cDNA were synthesized using always the same techniques (Chapter III, IV-A, and IV-B). Real-time PCR reactions (1 cycle: 10min at 95°C, then 50 cycles: 5s at 95°C, 5s at 60°C, and 20s at 72°C) using cDNA of samples from all exposure conditions of both experiments were performed in a Light Cycler (Roche) following the manufacturer's instructions using the DNA intercalating dye SybrGreen I. PCR specificity was determined for each reaction from the dissociation curve of the PCR product which was obtained by following the SybrGreen fluorescence level during a gradual heating from 60 to 95 °C. Relative expression of a gene was generated using the $2^{-\Delta CT}$ method as described by Livak and Schmittgen (2001) where ΔCT represents the difference between the cycle threshold of specific gene and the cycle threshold of the *18S* housekeeping gene (to normalize genes expression levels). Therefore, the Expression's factor (EF) of each gene in comparison with control corresponds to the following equation: $EF = 2^{-\Delta CT(\text{Treatment})} / 2^{-\Delta CT(\text{Control})}$.

2.5. Enzymatic activities analysis

Biochemical determinations have been described previously (Chapter III and IV-B). Hereafter we only provide a brief description. Enzymatic activities were determined in the cellular cytosolic fractions of tissues sampled from the chronic exposure experiment to determine cellular oxidative stress. After homogenisation of the tissues, activities of SOD were determined spectrophotometrically using "19160 SOD determination Kit" (Fulka) ($\lambda=450$ nm). CAT activities were measured by following the decrease in absorbance at 240 nm due to H₂O₂ consumption ($\epsilon= 0.04$ mM⁻¹ cm⁻¹). GPX activities were assessed by following the oxidation of NaDPH at 340 nm using cumene hydroperoxide as a substrate ($\epsilon= 6.22$ mM⁻¹ cm⁻¹). GST activity was measured with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate. This assay measured the formation of the conjugate with GSH at 340 nm ($\epsilon= 9.6$ mM⁻¹ cm⁻¹). Protein concentration was determined using "Micro BCATM Protein Assay Kit" (Thermo

scientific) ($\lambda=562$ nm). All biochemical analyses were performed with SOFTmax PRO spectrophotometer at a constant temperature of 25°C.

2.6. Statistical analysis

Results are given as mean \pm the standard error of the mean (SEM). All analyses were done using the R language and environment for statistical computing (R Development Core Team, 2009). For all statistical results, a probability of $P < 0.05$ was considered significant. Survival rate was presented using Kaplan Meier's estimator (Kaplan 1983). This method estimates the fraction of living organisms for a certain amount of time after treatment and takes into account "censored" data (i.e. losses of crayfish by sampling at T4 before the final outcome is observed at T10). The significant effects of factors (i.e. time and types of metals) on bioaccumulation were performed using analysis of variance (ANOVA), after checking assumptions of normality and variance homogeneity of residuals. When the assumptions were not satisfied, a logarithmic data transformation was applied. If the assumptions were still not satisfied the Kruskal-Wallis non-parametric test was used. In order to compare the effects of Cd and U on the various gene Expression Factors (EF) and on antioxidant activities in both organs and at different sampling times for each experiment, Principal Component analysis (PCA) were necessary to visualize such high-dimensionality and to simplify exploration of the results. PCAs were performed on a covariance matrix based on the EF and on a correlation matrix based on enzymes activities. The data were arranged in a matrix of n rows and m columns, in which n is the number of conditions (Organ-metals-time) and m the number of variables (genes or enzymes). When the expression levels of certain genes were not different significantly from control, the EF was indicated as equal to 1 in the ACP matrix. The number of principal components (PCs) selected for the presentation of the results was based on Kaiser's rule (Kaiser and Rice 1974). This criterion retains axes explaining 82% of the total inertia (variance), thus it was possible to restrict the PCA to the first two PCs.

3. Results

3.1. Survival rate

No mortality was recorded in control groups of both experiments. 33% of mortality was observed in groups of crayfish exposed 10 days to 40 μM of Cd, while only 10% of the crayfish died when exposed to the same concentration of U and period of time. Besides that 100% of the crayfish survived the chronic exposure to Cd and DU.

3.2. Bioaccumulation of DU and Cd

Cd and DU accumulations in organs in the acute experiment are shown in **figure 72**. Contaminated gills and hepatopancreas were significantly different from controls at T4 and T10 ($P < 0.05$). The bioaccumulation of U and Cd was time dependent only in the hepatopancreas ($P < 0.05$). Both metals were more concentrated in the gills rather in the hepatopancreas when exposed to high concentrations of the metals. Bioaccumulation of U in gills was about 23 (T4) to 27 (T10) times higher than the bioaccumulation of Cd in the same type of organ (T4: $P=0.018$; T10: $P=0.001$). In fact, in gills the Accumulation Factors (AF= metal concentration in organ ($\mu\text{g/g}$)/metal concentration in water ($\mu\text{g/ml}$)) of U at T4 (AF=942) and T10 (AF= 1480) were much higher than those of Cd at the same sampling times (T4: AF= 65; T10: AF= 89). No significant difference was noted between the concentrations of Cd and U in the hepatopancreas in the acute exposure experiment (T4: $P=0.24$; T10: $P=0.1$).

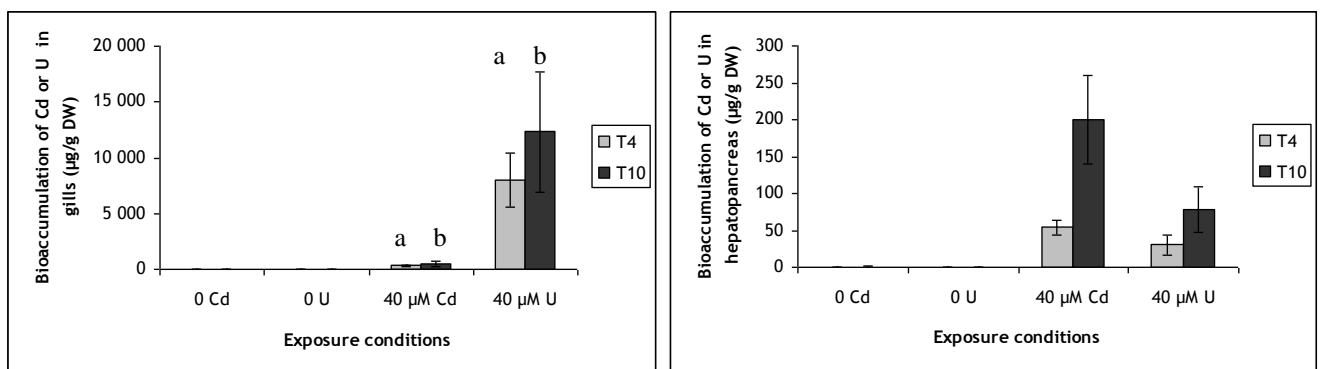


Figure 72: Concentrations of U and Cd in gills and hepatopancreas of crayfish *P. clarkii* exposed to 40 μM of Cd or U for 4 to 10 days ($\mu\text{g/g}$, mean \pm SEM, $n=4$ except for U contaminated organs at T10, where $n=5$). (a,b) concentrations designated with the same letters are significantly different from each other ($P < 0.05$).

Metal accumulation in organs in the chronic experiment is shown in **figure 73**. A significant difference was also observed between contaminated organs of crayfish exposed to $0.1\mu\text{M}$ of Cd or U and controls ($P < 0.05$). The accumulation of the metals was not time dependent in any organ ($P > 0.05$). Even at lower levels of exposure gills accumulated more U than Cd at T30 (38 times more, $P=0.00034$) and T60 (22 times more, $P=0.0013$). The AF of U in gills was up to 14 times higher than that of Cd (ex: $\text{AF}_{\text{U T30}} = 5918$; $\text{AF}_{\text{Cd T30}} = 427$). Moreover, U accumulation levels were higher in gills than in hepatopancreas whereas, the opposite was observed in the Cd exposure conditions. In fact, Cd concentrations in hepatopancreas were 3 times higher than Cd concentrations in gills at T30 and T60. No

significant differences were observed between the bioaccumulation levels of U and Cd in the hepatopancreas in the long term exposure experiment (T30: $P=0.412$; T60: $P=0.154$).

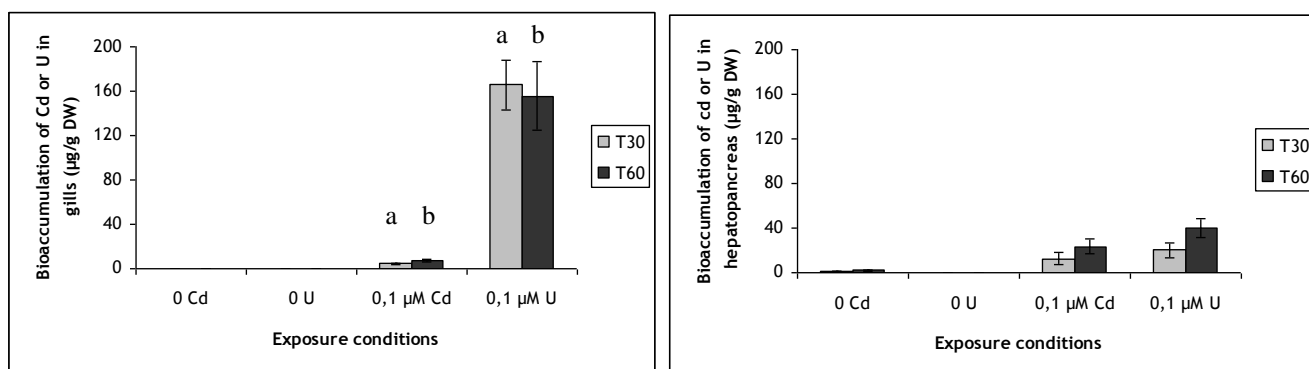


Figure 73: Concentrations of U and Cd in gills and hepatopancreas of crayfish *P. clarkii* exposed to 0.1µM of Cd or U for 30 to 60 days (µg/g, mean ± SEM, n=4 except for U contaminated organs at T10, where n=5). (a,b) concentrations designated with the same letters are significantly different from each other ($P < 0.05$).

3.3. Cd localisation and histological alterations by U

Cd was hard to localize by TEM-EDX, however flocculent forms of this contaminant were found in the epithelium and cuticle of gills exposed to 40µM at T10 (**Figure 74**). In the epithelium, Cd was co-localized mainly with phosphorus, chlorine, and calcium, and to a lesser extent with silicon, aluminium, magnesium, sulfur and chlorine. In the cuticle, the contaminant was chiefly associated to phosphorus and to a lesser extent to chlorine and the other elements already cited above.

A distinct impairment of tissue structure was discerned in the hepatopancreas after 60 days of contamination to 0.1µM of U (**Figure 75**). The epithelium of several tubules showed an overall presence of numerous pathologically altered cells with cytoplasmic vacuoles. A lumen dilatation and thinning of the epithelium were also observed, probably due to a loss of epithelial organization. However, this phenomenon was confined to individual tubules and did not affect the entire digestive gland, so some intact glandular epithelium was present even after a long period of contamination.

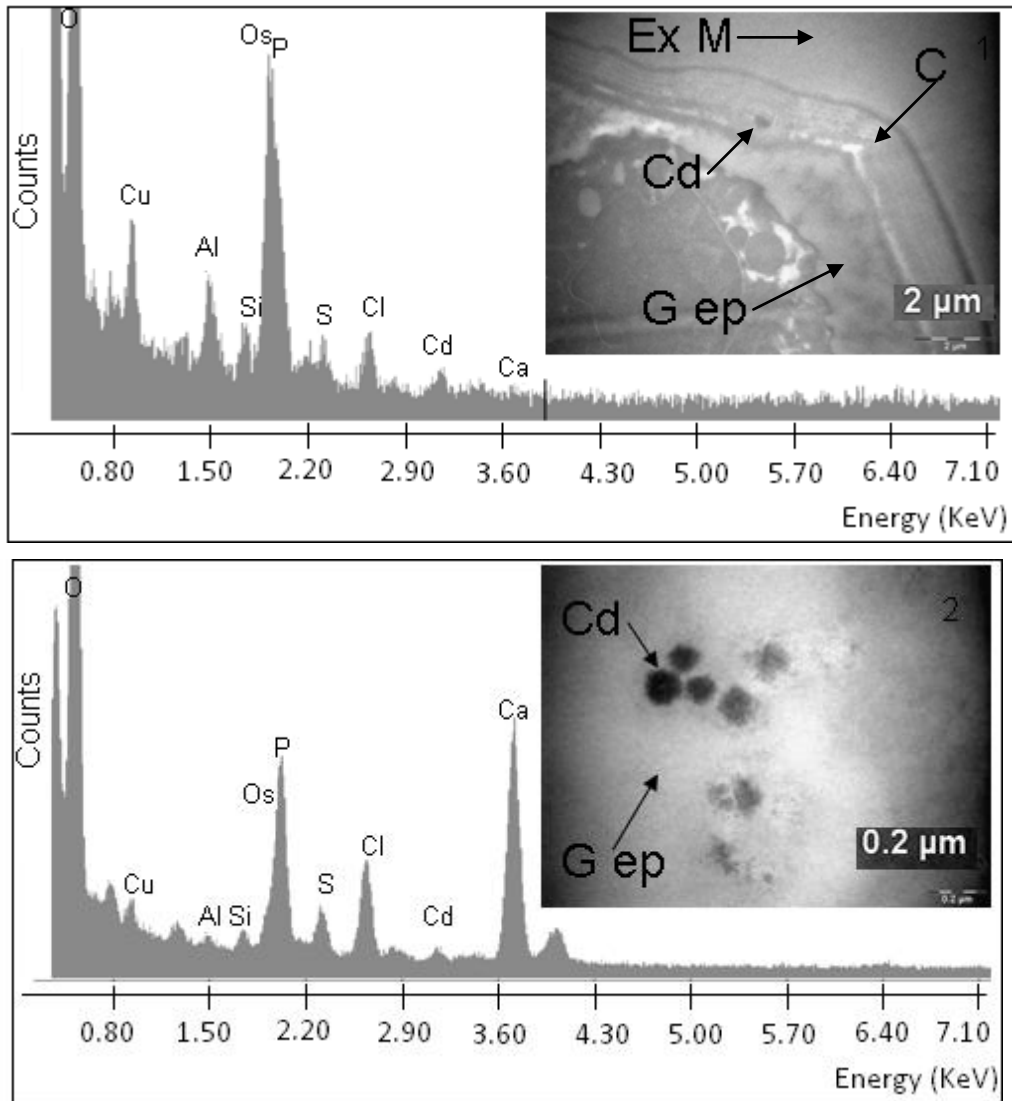


Figure 74: Transmission electron micrographs coupled with energy X-ray results of *P. clarkii* gills exposed for 10 days to 40 μM of Cd. Elements detected in matrix: O: oxygen, Os: osmium and Cu: copper. Elements detected in the cuticle: Cd: cadmium, Al: aluminium, Si: silicon, S: sulphur, Cl: chlorine, and Ca: calcium. (EX M) extra-cellular matrix, (C) cuticle, and (G ep) gill epithelium.

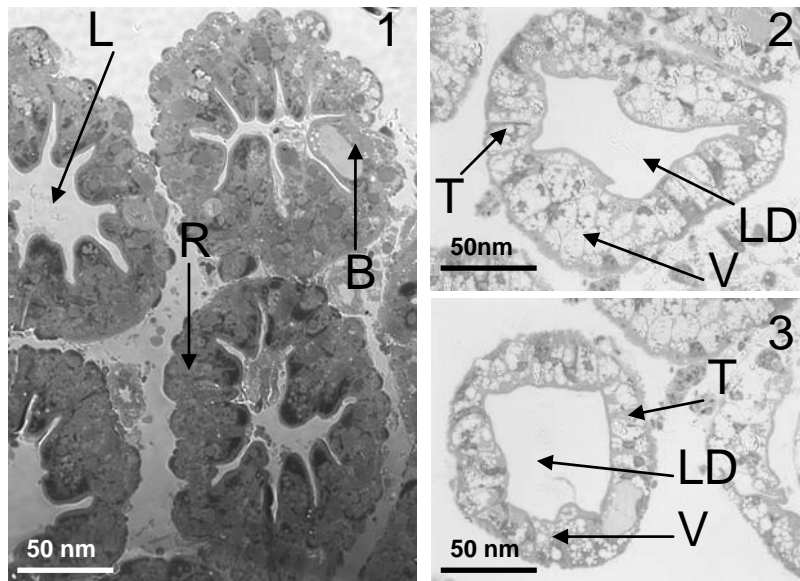


Figure 75: Histological alterations in *P. clarkii* hepatopancreas tubules after 60 days of exposure to dissolved U: (1) control, (2 and 3) 0.1 μ M U. (R) absorptive cells. (B) Secretory cells. (L) Lumen. The pathologies observed were: (T) Thinning, (V) Vacuolisation, and (LD) Lumen Dilatation.

3.4. Enzymatic responses in gills contaminated chronically

Results of PCA where the gills of crayfish contaminated 30 and 60 days to 0.1 μ M of Cd or U were characterized by antioxidant activities, are given in **figure 76**. Results concerning the hepatopancreas were not presented here because the enzymatic activities in the contaminated conditions for the most part were not significantly different from controls. The gills which had similar enzymatic activities tended to plot near one another forming distinctive groups. In this analysis the first PC (PC1) accounted for 51.79% of the variance in the enzymatic responses, while the other PC (PC2) accounted for 30.34%. The variables GPX (28.6%), GST (29.26%), and SOD (30.31%) participated the most in the construction of PC1, whereas CAT contributed 50.75% to the construction of PC2. Control groups at T30 and T60 were correlated the most to the variables CAT and GST while contaminated gills at T30 seemed negatively correlated to these two variables and positively correlated to GPX and SOD. The distribution of Cd-contaminated gills sampled at T60 was difficult to assess visually. However the coordinates of these individuals (given by the R program) were closest to the coordinates of CAT and GST. On the other hand U-contaminated organs at T60 seemed negatively correlated to all the variables.

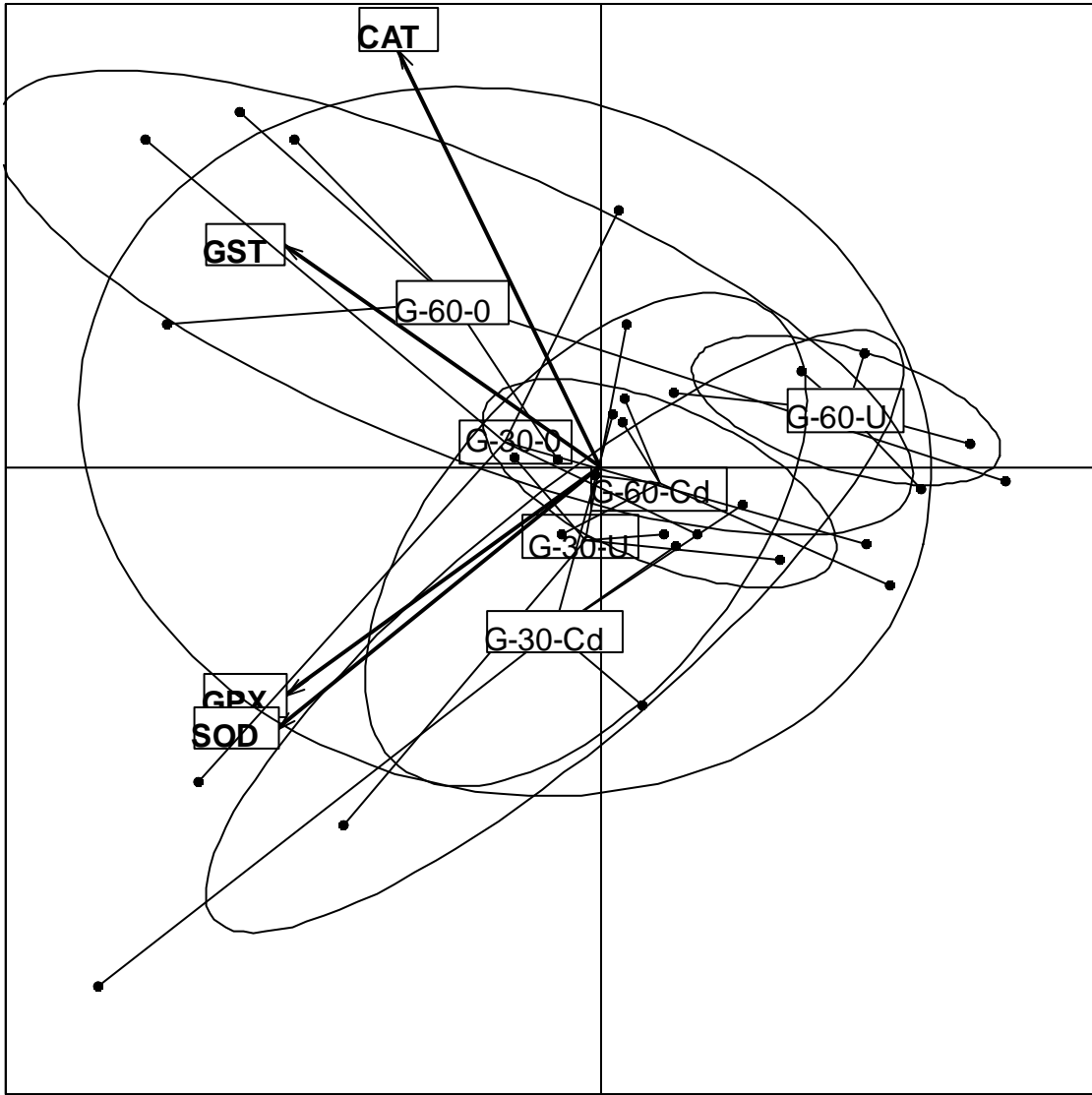


Figure 76: Principal components analysis (PCA) ordination of gills of crayfish *P. clarkii* exposed to 0.1 μM of U or Cd at T30 and T60 characterized by the activities of SOD (Superoxide dismutase: U/mg Prot), CAT (Catalase: $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Prot), GPX (Glutathione peroxidase: $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Prot), and GST (Glutathione S transferase: $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Prot). Note: arrows with dot heads represent replicate samples in each exposure condition.

3.5. Expression factors of the studied genes

PCA ordination of the contaminated organs at different sampling times characterized by the expression factors of *12s*, *atp6*, *cox1*, *sod(Mn)* and *mt* are reported in **figures 77** for the acute exposure experiment and in **figure 78** for the chronic exposure experiment. Both ordinations (Acute/chronic) successfully arranged hepatopancreas and gills according to transcriptional responses. Organs having similar gene expression levels tended to plot near one another forming clusters. In the acute exposure experiment the first PC (PC1) alone accounted for 95.53% of the variance of genes expressions in the organs, whereas the PC2 explained only 3.97% of the variance. The variable *atp6* contributed 99.82% to the construction of PC1 while *mt* contributed the most to the construction of the PC2 (95.93%) followed by *12S* (3.79%). The lengths of the arrows of the vectors (variables) are proportional to the contribution of the variables to the construction of the axes. Thus it is obvious that *cox1* and *sod(Mn)* present the least contribution to the arrangement of the axes (0.19% for PC2 and 0.05% for PC1 respectively). However, the coordinates of individuals representing DU exposure conditions were closest to the coordinates of the variables *cox1* and *sod(Mn)*. Cd contaminated organs that were sampled at T4 loaded highest on the first axis while the T10-Cd contaminated organs loaded the most on the second axis.

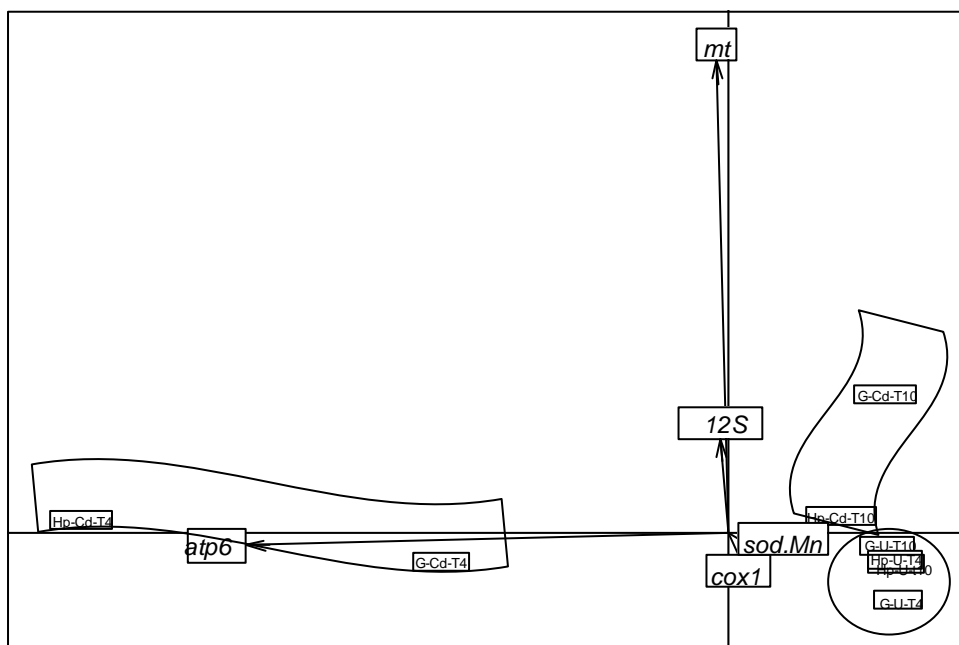


Figure 77: Principal components analysis (PCA) ordination of hepatopancreas and gills of crayfish *P. clarkii* exposed to 40 μ M of U or Cd at T4 and T10 using the expression factors of *12s*, *atp6*, *cox1*, *sod(Mn)* and *mt* compared to the basal level of controls (n=5). Note: clusters were manually added for better visualisation.

In the chronic exposure experiment the first PC (PC1) alone accounted for 96.45% of the variance of genes expressions in the organs. The first two components (PC1+PC2) explained together 98.67% of the variance; this means that the loss of information due to the projection of the plots was insignificant. Moreover, the variable *atp6* contributed to 99.26% of the inertia (variance) of the CP1 while the construction of the CP2 was attributed to *12S* (31.18%), *sod(Mn)* (30.87%), *mt* (30.16%) and *cox1* (7.67%). The coordinates of the plot representing Cd-contaminated gills sampled at T30 was strongly correlated to the variable *atp6* while the correlation of Cd-hepatopancreas at T30 with the variables was difficult to assess visually. However the coordinates of this last plot were obtained by R program and demonstrated that they were closest to the variables *mt*, *12s* and *atp6*. Cd-contaminated organs sampled at T60 were also closest to the variable *mt*, *12s* and also to *atp6*. The U-contaminated gills sampled at T30 were significantly negatively correlated to the variable *atp6* while all other U contaminated organs were correlated to the variables *atp6*, *cox1* and *sod(Mn)*.

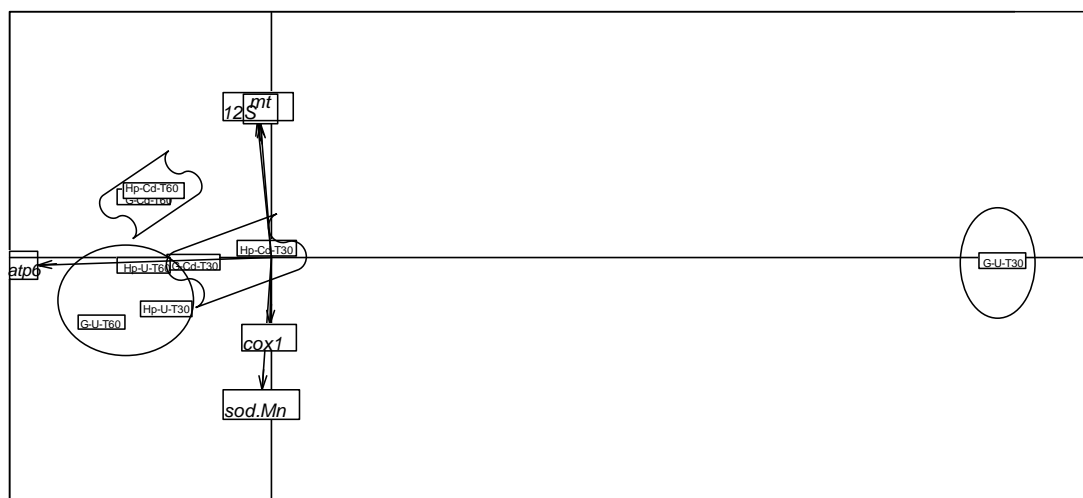


Figure 78: Principal components analysis (PCA) ordination of hepatopancreas and gills of crayfish *P. clarkii* exposed to 0.1 μ M of U or Cd at T30 and T60 characterized by the expression factors of *12s*, *atp6*, *cox1*, *sod(Mn)* and *mt* compared to the basal level of controls (n=5). Note: clusters were manually added for better visualisation.

4. Discussion

4.1. Comparison of the mortality rates

The survival rate of the crayfish *P. clarkii* was lower in groups contaminated to 40µM of Cd than in groups exposed to the same concentration of DU. Studies comparing the effects of DU and Cd on the survival rates of aquatic invertebrates are scarce. A study on the resistance of freshwater benthic macroinvertebrate *Tubifex tubifex* to U via an exposure to contaminated sediments showed that the LC₅₀-12 days for this species is equal to 2910 mgUg⁻¹ dry wt (Lagauzère et al., 2009). Authors compared the sensitivity of this worm to other heavy metals already reported in literature and stated that the toxicity of U to *T. tubifex* seemed lower than copper, Cd, and nickel (Milani et al., 2003). Martins et al. (2007) summarized in their review the Cd LC₅₀-48h values of the microcrustacean *Daphnia magna* found in literature. The lowest concentration reported was equal to 0.009 mg Cd.L⁻¹ (Lewis and Horning Ii, 1991) whereas the highest was of 0.065 mg Cd/L (Toussaint et al., 1995). On the other hand, the lowest U LC₅₀-48h for *Daphnia magna* reported by Zeeman et al. (2008) was equal to 0.39 mg U/L while the highest was of 7.8 mg U/L. These findings show that *Daphnia magna* seemed more tolerant to U toxicity than Cd. Moreover, the Cd LC₅₀-96h of the fish *Danio rerio* is around 2.2 mg Cd/L (Martins et al., 2007), where the U LC₅₀-96h for the same species is almost of the same range and equal to 3.05 mg U/L (Labrot et al., 1999). However, the different conditions under which the assays on the fish were performed (pH, water hardness, temperature...) make it difficult to draw any relevant comparison. Moreover, the crayfish mortality rates in the present study were low demonstrating the resistance capacities of *P. clarkii*. This crayfish also resisted long term exposure (60 days) to 0.1µM of Cd and U. Wigginton and Birge (2007) demonstrated in the same study that *P. clarkii* was more resistant to Cd exposure when compared with other crayfish species (*Orconectes sp.* and *Procambarus sp.*). In addition, this species tolerates high concentrations of metals of greatest toxicological significance such as lead (Pb) and mercury (Hg) (Del Ramo et al., 1987; Torreblanca et al., 1989; Naqvi and Howell, 1993). In fact *P. clarkii* has been used as a bioindicator of heavy metal toxicity in numerous field studies (Finerty et al. 1990; Sánchez López et al. 2004; Higuera et al. 2006; Hothem et al. 2007; Richert and Sneddon 2008; Faria et al. 2010; Moss et al. 2010; Suárez-Serrano et al. 2010). Therefore, the tolerance of this species toward U and Cd make these organisms good candidates to be used as alert systems in case of acute water contamination such as accidental spills, industrial wastewater discharge and accidental or intended water poisoning.

4.2. Comparison of the bioaccumulation and detoxification

This species seemed to be more tolerant to U despite of its high levels of concentrations in organs after the acute exposure. The crayfish bioaccumulated 23 to 27 times more U in the gills than Cd. A possible explanation could be differences in the detoxification mechanisms between both metals. The electron probe Xray microanalysis detected Cd in flocculent forms which were localized in the epithelium and cuticle of gills exposed to 40 μ M of Cd at T10. Deposits of Cd were observed by Tayal et al. (2000) in fish *Colisa fasciatus* cells, where they were visualized as dense clouds. They demonstrated that Cd in presence of Na₂S is converted into insoluble metal sulfides. In our experiment, Cd was co-localized mainly with phosphorus, chlorine and calcium. A similar description was reported in cells of *Azolla filiculoides* shoots. The analysis of Cd content in the shoot demonstrated the appearance of dark grains about 0.3 μ m, the Cd in these grains was accompanied by phosphorus and calcium (Sela et al., 1988). Indeed, heavy metal containing granules found in epithelial cells of invertebrates may contain either calcium or heavy metals such as zinc, copper, iron... complexed with sulfur or phosphorus (Ahearn et al., 2004). As a result of these complexation events with anions, the heavy-metal ion is removed from the cytoplasm by sequestration within a vacuolar membrane in an insoluble, detoxified form. Subsequent cellular exocytotic events may extrude the concretions from the cell followed by excretory mechanisms (Ahearn et al., 2004; Marigómez et al., 2002). Moreover, TEM analysis led to the detection of piles of flake shaped U inside the gills epithelium after 10 days of exposure to 40 μ M of DU (Chapter IV-A). This form of U was mainly co-localized with phosphorus which is insoluble and non-toxic. Similar results were also observed in the bivalve *Corbicula fluminea* (Simon et al., 2011). It should be noted that Cd was harder to localize by TEM than U, Cd could have strongly bound to organic ligands such as proteins (e.g. metallothioneins (MT)), lipids, and nucleic acids in which case, it may not have been complexed with sulfur or phosphorus and therefore remained histochemically invisible. Thus once the metals are absorbed, it is possible that Cd binds to organic ligands quicker than U. Another explanation to the higher levels of U detected in gills when compared to Cd could be related to differences in the adsorption capacities of the metals on the tissues. Choi et al. (2009) demonstrated that the adsorption capacity of Cd, U and Pb on starfish and bacterial cells followed the order: U(VI)>Pb>Cd. It seems that cells preferentially sorb U, followed by Pb, and exhibit the least preference for Cd. It was suggested that the mechanisms for metal uptake process are mainly both organism- and metal-dependent because of specific surface properties of the organisms, cell physiology, and solution chemistry. In the chronic experiment gills also accumulated more U than Cd possibly

for the same reasons stated above. Interestingly, when comparing the bioaccumulation levels between organs different results were obtained for the acute and chronic experiments in the case of Cd. In fact, Cd concentrations were lower in gills than in hepatopancreas when contaminated chronically, while the opposite was observed in the acute exposure conditions. This could be related to the differences in the adsorption rates on tissues of the different waterborne Cd concentrations (40 μ M vs 0.1 μ M) (Chapter III). In U exposure conditions, gills always bioaccumulated more U when compared to the hepatopancreas no matter the type of exposure (acute/chronic). These results also demonstrate that Cd and U have different transfer capacities to organs. Indeed, in the acute exposure experiment crayfish accumulated up to 263 times more U in gills than in hepatopancreas whereas this factor was maximum equal to 6 for Cd. This shows that Cd is more easily transferred to organs than U. This hypothesis is also verified in the chronic exposure experiment since the hepatopancreas bioaccumulated more Cd than gills and the contrary was observed for U. Examination of the storage and distribution of Cd and U in roots and shoots of the plant *Azolla filiculoides* showed that Cd relative content in the shoot was similar to its content in the root, hence its mobility was relatively high. Authors also showed that the absence of significant U quantities in the shoot despite of the relatively high content in the root suggest a lesser mobility of U than Cd from *Azolla* root (Sela et al., 1988). These findings are in concordance with our results. A tendency of increasing metal bioaccumulation with time was observed in organs sampled from the acute exposure experiment even though statistically it was only significant in hepatopancreas. Then again, the chronic Cd and U bioaccumulation in gills seemed to have reached a steady state at T30 and T60 on the opposite to the accumulation in the hepatopancreas. At last, crayfish were able to bioconcentrate rapidly both contaminants in their tissues after exposition to 40 μ M of the contaminants (high AF at T4: e.g. AFgills-40 μ M Cd~ 65 and AF gills-40 μ M U~ 942). *P. clarkii* was found to be also capable of concentrating U after 4 days in gills and hepatopancreas even after a low level of waterborne exposure (0.1 μ M U) (Chapter IV-A). Diaz-Mayans et al. (1986), also demonstrated that *P. clarkii* can bioaccumulate Cd in these tissues after 4 days when exposed to 0.1 μ M via a direct route of exposure. This capacity of the crayfish to bioaccumulate the studied metals early can be useful in field studies, caging experiments and biomonitoring programs.

4.3. Comparison of histopathological effects between Cd and U

A previous study has shown that U induces histological damages to the hepatopancreas of *P. clarkii* after 10 days of exposure to 40 μM of U (Chapter IV-A). In the present study we demonstrated that this metal provoked similar damage after a long term exposure (60 days) to a low concentration of waterborne U (0.1 μM). In fact, the symptoms were identical; both experiments had demonstrated that U causes vacuolisation, lumen dilatation and thinning of the epithelium of the hepatopancreas. However, in the U acute exposure experiment we have additionally examined a disorganisation of the epithelium and evidenced the presence of degenerated tubules. This shows that the extent of histopathological damage was in line with the bioaccumulation of U determined in the soft tissues in both experiments. The concentration of U recorded in the hepatopancreas after 10 days of exposure to 40 μM ($78.8 \pm 31.2 \mu\text{g U/ g DW}$) was higher than the concentration found after 60 days of exposure to 0.1 μM ($39.91 \pm 8.07 \mu\text{g U/ g DW}$). In a previous study, we have demonstrated that the epithelium of the hepatopancreas of *P. clarkii* showed vacuolisation after 60 days of exposure to 0.1 μM of Cd (Chapter III). This demonstrates that vacuolisation is a similar symptom of both Cd and U toxicity. Moreover, vacuolisation in hepatopancreatic cells of the green mussel *Perna viridis* exposed to various concentrations of copper and mercury were observed in various degrees (Pillai and Menon, 1998). Additionally, one of the prominent effects of platinum on the liver of the fish *Danio rerio* and on the hepatopancreas of the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* is increased vacuolisation in cells (Osterauer et al., 2010). Exposure of the crayfish *P. clarkii* to high levels of Cd concentrations also revealed structural damage in the hepatopancreas. For example, when exposed to 40 μM Cd for 10 days vacuolisation, lumen dilatation, thinning of the epithelium and cellular shrinkage were observed in this organ (Chapter III). It should be highlighted that these symptoms were identical to those observed in the hepatopancreas of *P. clarkii* exposed to 40 μM of DU. Moreover degenerated tubules were seen in these organs which indicates that DU can lead to cell death. In fact studies have already reported that U can induce apoptosis and necrosis in cells (Thiébaud et al. 2007; Periyakaruppan et al. 2009). It is also known that cellular shrinkage is the first sign of programmed cell death (Rost-Roszkowska et al., 2010), thus we suspect that 40 μM of Cd led to apoptosis of hepatopancreatic tubules of crayfish. In fact, it has already been confirmed that apoptosis is one of the hepatopancreas cell death pathways of the crab *Sinopotamon yangtsekiense* upon Cd administration (Li et al., 2010). Cd is also capable of provoking necrosis in cells, in effect histopathological examination showed tissue injuries consistent with inflammation and necrosis in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*

during Cd exposure (11 days at 20 and 50 µg/L) (Sheir and Handy, 2010). At this level of comparison it is difficult to draw conclusions on the classification of the cytotoxic effects of U and Cd because no statistical analyses were conducted to quantify these impacts. However, a comparative study between the cytotoxicity of U and other metals on the osteoblastic bone cells of rats was conducted and permitted to classify Cd, Zn, Se^{IV} and Cu as the most toxic and Ni, Se^{VI}, Mn and U as the least toxic. The toxicity of metals was determined from the quantification of cell viability by comparison to controls (Milgram et al., 2007).

4.4. Comparison of the antioxidant responses

The exposed gills of *P. clarkii* sampled after the chronic experiment were clearly separated into related clusters by PCA using the enzymatic responses of SOD, CAT, GPX and GST (**Figure 76**). The enzymatic responses in contaminated gills of *P. clarkii* were influenced by the time of exposure since the organs at T30 were separated from those at T60. The oxidative stress seemed more important at T60 than T30 since the distance between contaminated organs and control of the corresponding sampling time were more marked and elongated at T60 than T30. At T30 the contaminated gills (especially to U) were close to the corresponding control organs and formed a cluster demonstrating that the activities of the enzymes were not significantly different in these conditions. Nevertheless, Cd and U contaminated organs at T30 seemed negatively correlated to CAT and GST. This demonstrates that the activities of these enzymes were tending to decrease in presence of the contaminants. Two other distinctive clusters were also formed, the first contained the organs contaminated to U during 60 days and the second consisted of the contaminated gills with Cd at T60. This ordination of the plots demonstrated the differences between the effects of Cd and U on this level of biological organisation. The contaminated organs with Cd and U at T60 were oppositely detached from their corresponding control group and thus were all negatively correlated to CAT and GST. However, contaminated gills with U at T60 were more isolated from the control groups and from all the other conditions and were negatively correlated to all the enzymes. This result indicated that the enzymatic responses of all the studied antioxidants tended to decrease at the end of the experiment in presence of U. The decrease in antioxidants responses in presence of Cd or U could be linked to a decrease in substrates, expressions levels of the corresponding genes, oxidative alteration of the enzymes, and/or direct binding of the contaminants to the proteins (Chapter III and IV-B). In fact, Bem and Bou-Rabee (2004) stated that the chemical toxicity of uranium is similar to that for other heavy metals, e.g. cadmium or mercury and is due to its chemical affinity to proteins and formation of stable

complexes with biological ligands of low molecular mass. GPX ($P=0.0054$) and SOD ($P=0.037$) activities were significantly more depleted in U contaminated organs than in those exposed to Cd at T60. Therefore it seemed that the oxidative stress was more important in the U exposed organs which is in concordance with the bioaccumulation levels. Even though U concentration in gills was 22 times higher than that of Cd, the observed decrease in enzyme activities was low when compared to the Cd contaminated condition (GPX: $-33.15\% \pm 3.24$, GST: $-6.3\% \pm 6.5$, CAT: $-24\% \pm 20$, and SOD: $-18.6\% \pm 7.06$). It should be reminded that the bioaccumulation levels result from adsorption, internalisation of the metal, and the detoxification mechanisms. Thus it is possible that a part of U was precipitated in a detoxified form and/or adsorbed on the cuticle and remained biologically unavailable. Consequently it is not possible to indicate whether or not Cd is capable to generate more oxidative stress than U, nor to classify the toxicity of the metals at this level of biological organisation. Moreover, the mechanisms by which U and Cd generate oxidative stress are different which complicate the comparison between the toxicity of both metals. Indeed, it is well known that Cd promotes indirectly oxidative stress in cells (Wang et al. 2004; Shi et al. 2005) because it is a redox-inactive metal that cannot induce fenton-like reactions (Ercal et al., 2001). U on the other hand, is able to chemically activate oxygen species in the course of redox reactions via the redox chemistry of transition metals (Miller et al., 2002; Yazzie et al., 2003). Furthermore, U can enhance the production of free radicals via the ionization phenomenon induced by alpha particle emissions (Jones et al., 2003).

4.5. Comparison of the variations in transcriptional responses

It has already been proven that both Cd and U impact the mitochondria (Pulido and Parrish, 2003; Valko et al., 2005; Pourahmad et al., 2006; Cannino et al., 2009; Lerebours et al., 2009; Lerebours et al., 2010) (Chapter III, IV-A, and IV-B) and generate oxidative stress (Stohs et al. 2001; Gonzalez et al. 2006; Barillet et al. 2007; Jia et al. 2010; Wang et al. 2010; Barillet et al. 2011) (Chapter III and IV-B). In previous studies we evidenced alterations in the expression levels of mitochondrial genes (*cox1*, *atp6*, and *12S*) and genes involved in the oxidative stress responses (*sod(Mn)* and *mt*) in gills and hepatopancreas of *P. clarkii* exposed to $40\mu\text{M}$ or $0.1\mu\text{M}$ of either Cd or U. In the present study, we observed that the gills and hepatopancreas of crayfish sampled from the different conditions of exposure of the acute experiment (metals-time) were separated into groups by PCA using the expression factors of *cox1*, *atp6*, *12S*, *sod(Mn)*, and *mt*. All U contaminated organs constituted a tight cluster that was distinctive from the two other groups formed by Cd contaminated organs. In addition, the

organs sampled at T4 from the Cd exposure conditions were clearly separated from those sampled at T10. The expression levels of *atp6* in the studied organs conditioned the most this organisation. Indeed, the most variability in the expression factors was observed for the *atp6* gene. In fact, the Cd contaminated organs at T4 were associated the most to the variable *atp6* which discriminated this group from all others. Toxic metals can have two types of effects: (1) indirect, due to the additional metabolic cost of accumulating, transporting, storing, and excreting the contaminant; and (2) direct, on cellular membranes and/or specific biochemical pathways (Labrot et al., 1999). Without a doubt, the ATP synthase is responsible for both ATP synthesis and hydrolysis (Li and Neufeld, 2001), thus high variations in *atp6* gene expression levels are expected when cells are facing a stress caused by metals. Cells could produce more ATP for maintaining the viability of crayfish and provide additional energy to the defence mechanisms (e.g: transporting, storing, excreting, detoxification...), or in certain pathologies the ATP synthase can hydrolyse the ATP as a response to a mitochondrial stress in order to maintain the H⁺ gradient (Nevière, 2008; Wang and Oster, 1998). Either way, the solicitation of the ATP synthase was clearly elevated in contaminated organs. Moreover, Muhlia-Almazan et al., (2008) stated that the level of expression of this gene can change in response to environmental changes and to endogenous physiological conditions, which makes the expression of this gene predisposed to be highly altered. At T10 the Cd contaminated organs were associated the most to the vectors *mt* and *I2s* which means that the expression levels of these two genes distinguished the most this group from the others. In fact, *mt* gene was always up-regulated in Cd contaminated organs and was the most expressed in gills at T10 (gills: 39-fold; hepatopancreas: 11-fold) (Chapter III), while it was only over-expressed in gills contaminated to U at T10 (5-fold up) (Chapter IV-A). Indeed, Cd (Duncan et al., 2006) and U (Michon et al., 2010) can bind to MT. It is also known that the concentration of metals ions required for the induction of MT and the time required for response varies according to the metal (Freedman et al., 1993; Haq et al., 2003). The *mt* gene can also be up-regulated because of an increase in oxidative stress (Iszard et al., 1995; Andrews, 2000; Haq et al., 2003). The amount of mitochondria seemed to increase over time in presence of high levels of Cd (Chapter III), whereas *I2S* was down-regulated in U contaminated organs at the end of the experiment indicating a decrease in the number of the organelles (Chapter IV-A). This shows the difference in cellular response facing Cd or U stress. The variables *coxI* and *sod(Mn)* seemed to be most strongly associated with the group formed by the organs of crayfish exposed to U. This association demonstrates that all the U contaminated organs had similar expression levels of *coxI* and *sod(Mn)* genes. The hepatopancreas contaminated with

Cd and sampled at T10 were close to the U contaminated gills of the same sampling time. This distribution is due mostly to similar gene expression levels of *cox1* and *atp6* in both conditions. It should be mentioned that overall the *cox1* gene was repressed in all contaminated organs during the experiment whereas the *atp6* gene was mainly over-expressed (Chapter III and IV-A). It was obvious that both metals impaired the mitochondrial chain reaction, it also appeared that the pattern of expression of these two genes were similar when organs are exposed to high levels of Cd or U.

In the chronic exposure experiment, distinctive groups were also formed between Cd and U exposed organs (**Figure 78**). In fact, Cd contaminated gills and hepatopancreas sampled at T30 were separated from those sampled at T60, while U contaminated organs formed a distinct cluster except for gills sampled at T30 which were clearly separated from all others. The separation of the groups contaminated with Cd from those contaminated with U was especially due to the variations in the expression levels of the genes *atp6*, *mt*, and *12S* as it was observed in the acute exposure experiment. Cd contaminated organs sampled at T60 are better correlated to these variables than those sampled from the Cd exposure condition at T30, which demonstrates higher values in the expression factors of these genes at T60. The gills exposed to U and sampled at T30 showed the highest variation in the expression factor of the *atp6* gene since they were significantly negatively correlated to this variable. The other U contaminated organs seemed to have a similar pattern of gene expression especially for *atp6*, *cox1* and *sod(Mn)*. However a negative correlation to the variables *cox1* and *sod(Mn)* was observed for the Cd contaminated organs which demonstrates a difference in the pattern of these gene expressions in organs exposed to low levels of Cd or U. The current PCA results demonstrated that even though both studied metals impact the mitochondria and alter the expression of genes involved in oxidative stress responses the mechanisms by which they induces such toxicity seems different. Nevertheless, it is easier to classify metals according to their toxicity by comparing the effects on higher biological levels while a “Top-down” approach (population to molecular levels) has a more mechanistic value (Snape et al., 2004).

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr F. Coppin for J-CHESS simulations, N. Gauthier for providing the crayfish, B. Geffroy for his assistance in dissecting *P. clarkii*, S. Pierrisnard for ionic chromatography measurements, C. Della-Vedova and L. Février for helping in statistical analysis, and R. Al kaddissi for his proofreading support. This study was supported by the

ENVIRHOM research program funded by the institute of Radioprotection and Nuclear Safety and co-financed by the CNRS.

References

- Ahearn GA, Mandal PK, Mandal A. 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 174(6):439-452.
- Al kaddissi, S., Legeay, A., Elia, C., Gonzalez, P., Camilleri, V., Gilbin, R., Simon, O., 2012. Effects of uranium on crayfish *Procambarus clarkii* mitochondria and antioxidants responses after chronic exposure: what have we learned?. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78:218-224.
- Al Kaddissi, S., Legeay, A., Gonzalez, P., Floriani, M., Camilleri, V., Gilbin, R., Simon, O., 2011a. Effects of uranium uptake on transcriptional responses, histological structures and survival rate of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1800-1807.
- Andrews GK. 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology* 59(1):95-104.
- Arfsten DP, Bekkedal M, Wilfong ER, Rossi Iii J, Grasman KA, Healey LB, Rutkiewicz JM, Johnson EW, Thitoff AR, Jung AE and others. 2005. Study of the reproductive effects in rats surgically implanted with depleted uranium for up to 90 days. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 68(11-12):967-997.
- ASTDR. 1999. Toxicological profile for uranium. public health service. Agency for toxic substances and disease registry.(USA.).
- Barillet, S., Adam, C., Palluel, O., Devaux, A., 2007. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 497-505.
- Bleise A, Danesi PR, Burkart W. 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): A general overview. *Journal of Environmental Radioactivity* 64(2-3):93-112.
- Cannino G, Ferruggia E, Luparello C, Rinaldi AM. 2009. Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion* 9(6):377-384.
- Choi J, Lee JY, Yang JS. 2009. Biosorption of heavy metals and uranium by starfish and *Pseudomonas putida*. *Journal of Hazardous Materials* 161(1):157-162.
- Del Ramo J, Diaz-Mayans J, Torreblanca A, Nunez A. 1987. Effects of temperature on the acute toxicity of heavy metals (Cr, Cd, and Hg) to the freshwater crayfish,

- Procambarus clarkii* (Girard). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 38(5):736-741.
- Diaz-Mayans J, Hernandez F, Medina J. 1986. Cadmium accumulation in the crayfish, *Procambarus clarkii*, using graphite furnace atomic absorption spectroscopy. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 37(5):722-729.
- Domingo JL. 1994. Metal-induced developmental toxicity in mammals: A review. Journal of Toxicology and Environmental Health 42(2):123-141.
- Duncan KER, Ngu TT, Chan J, Salgado MT, Merrifield ME, Stillman MJ. 2006. Peptide folding, metal-binding mechanisms, and binding site structures in metallothioneins. Experimental Biology and Medicine 231(9):1488-1499.
- Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. Current topics in medicinal chemistry 1(6):529-539.
- Faria M, Huertas D, Soto DX, Grimalt JO, Catalan J, Riva MC, Barata C. 2010. Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain). Chemosphere 78(3):232-240.
- Finerty MW, Madden JD, Feagley SE, Grodner RM. 1990. Effect of environs and seasonality on metal residues in tissues of wild and pond-raised crayfish in Southern Louisiana. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 19(1):94-100.
- Fisenne IM, Welford GA. 1986. Natural U concentrations in soft tissues and bone of New York City residents. Health Physics 50(6):739-746.
- Freedman JH, Slice LW, Dixon D, Fire A, Rubin CS. 1993. The novel metallothionein genes of *Caenorhabditis elegans*. Structural organization and inducible, cell-specific expression. Journal of Biological Chemistry 268(4):2554-2564.
- Haq F, Mahoney M, Koropatnick J. 2003. Signaling events for metallothionein induction. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 533(1-2):211-226.
- Higuera P, Oyarzun R, Lillo J, Sánchez-Hernández JC, Molina JA, Esbri JM, Lorenzo S. 2006. The Almadén district (Spain): Anatomy of one of the world's largest Hg-contaminated sites. Science of the Total Environment 356(1-3):112-124.

- Hothem RL, Bergen DR, Bauer ML, Crayon JJ, Meckstroth AM. 2007. Mercury and trace elements in crayfish from northern California. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79(6):628-632.
- Iszard MB, Liu J, Klaassen CD. 1995. Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats. *Toxicology* 104(1-3):25-33.
- Jones D, Domotor S, Higley K, Kocher D, Bilyard G. 2003. Principles and issues in radiological ecological risk assessment. *Journal of Environmental Radioactivity* 66(1-2):19-39.
- Kaiser H, Rice J. 1974. Little jiffy mark IV. *Educational and Psychological Measurement*. 34:111-117.
- Kaplan EL. 1983. in a retrospective on the seminal paper in "This week's citation classic". . *Current Contents* 24(14).
- 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(2):167-178.
- Lagauzère S, Terrail R, Bonzom JM. 2009. Ecotoxicity of uranium to *Tubifex tubifex* worms (*Annelida, Clitellata, Tubificidae*) exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(2):527-537.
- Lerebours A, Adam-Guillermin C, Brèthes D, Frelon S, Floriani M, Camilleri V, Garnier-Laplace J, Bourdineaud JP. 2010. Mitochondrial energetic metabolism perturbations in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium. *Aquatic Toxicology* in press.
- Lerebours A, Gonzalez P, Adam C, Camilleri V, Bourdineaud JP, Garnier-Laplace J. 2009. 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* 28(6):1271-1278.
- Lewis PA, Horning Ii WB. 1991. Differences in acute toxicity test results of three reference toxicants on *Daphnia* at two temperatures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10(10):1351-1357.
- Li J, Yan B, Liu N, Wang Q, Wang L. 2010. Effects of cadmium on apoptosis of hepatopancreas cell in freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense*. *Huanjing Kexue Xuebao/Acta Scientiae Circumstantiae* 30(11):2277-2284.

- Li Z, Neufeld GJ. 2001. Isolation and characterization of mitochondrial F1-ATPase from crayfish (*Orconectes virilis*) gills. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 128(2):325-338.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- Δ CT method. *Methods* 25.:402-408.
- Marigómez I, Soto M, Cajaraville MP, Angulo E, Giamberini L. 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique* 56(5):358-392.
- Martins J, Oliva Teles L, Vasconcelos V. 2007. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International* 33(3):414-425.
- Michon J, Frelon S, Garnier C, Coppin F. 2010. Determinations of uranium(VI) binding properties with some metalloproteins (transferrin, albumin, metallothionein and ferritin) by fluorescence quenching. *Journal of Fluorescence* 20(2):581-590.
- Milani D, Reynoldson TB, Borgmann U, Kolasa J. 2003. The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(4):845-854.
- Milgram S, Carrière M, Thiebault C, Berger P, Khodja H, Gouget B. 2007. Cell-metal interactions: A comparison of natural uranium to other common metals in renal cells and bone osteoblasts. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 260(1):254-258.
- Miller AC, Stewart M, Brooks K, Shi L, Page N. 2002. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: Absence of significant alpha particle decay. *Journal of Inorganic Biochemistry* 91(1):246-252.
- Moss JC, Hardaway CJ, Richert JC, Sneddon J. 2010. Determination of cadmium copper, iron, nickel, lead and zinc in crawfish [*Procambrus clarkii*] by inductively coupled plasma optical emission spectrometry: a study over the 2009 season in Southwest Louisiana. *Microchemical Journal* 95(1):5-10.
- Muhlia-Almazan A, Martinez-Cruz O, Navarrete Del Toro MDLA, Garcia-Carreno F, Arreola R, Sotelo-Mundo R, Yepiz-Plascencia G. 2008. Nuclear and mitochondrial subunits from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* F0F1 ATP-synthase complex: CDNA sequence, molecular modeling, and mRNA quantification of *atp9* and *atp6*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40(4):359-369.

- Naqvi SM, Howell RD. 1993. Toxicity of cadmium and lead to juvenile red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, and effects on fecundity of adults. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 51(2):303-308.
- Nevière R. 2008. Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Physiopathologie mitochondriale et syndrome septique*. *Réanimation*. 17(3):185-191.
- Osterauer R, Köhler H-R, Triebkorn R. 2010. Histopathological alterations and induction of hsp70 in ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*) and zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to PtCl₂. *Aquatic Toxicology* 99(1):100-107.
- Periyakaruppan A, Sarkar S, Ravichandran P, Sadanandan B, Sharma CS, Ramesh V, Hall JC, Thomas R, Wilson BL, Ramesh GT. 2009. Uranium induces apoptosis in lung epithelial cells. *Archives of Toxicology* 83(6):595-600.
- Pillai S, Menon NR. 1998. Structural alterations accompanying acute and chronic toxicity of heavy metal exposure in hepatopancreas of green mussel *Perna viridis* (Class-Pelecypoda). *Indian Journal of Marine Sciences* 27(3-4):416-420.
- Pourahmad J, Ghashang M, Ettehadi HA, Ghalandari R. 2006. A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity. *Environmental Toxicology* 21(4):349-354.
- Pulido MD, Parrish AR. 2003. Metal-induced apoptosis: Mechanisms. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 533(1-2):227-241.
- Ribera D, Labrot F, Tisnerat G, Narbonne JF. 1996. Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 146:53-89.
- Richert JC, Sneddon J. 2008. Determination of heavy metals in crawfish (*Procambrus clarkii*) by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry: A study over the season in southwest Louisiana. *Analytical Letters* 41(17):3198-3209.
- Rost-Roszkowska MM, Poprawa I, Chachulska-Zymelka A. 2010. Apoptosis and autophagy in the midgut epithelium of *Acheta domesticus* (Insecta, Orthoptera, Gryllidae). *Zoological Science* 27(9):740-745.
- Sánchez López FJ, Gil García MD, Martínez Vidal JL, Aguilera PA, Garrido Frenich A. 2004. Assessment of Metal Contamination in Doñana National Park (Spain) using Crayfish (*Procamburus Clarkii*). *Environmental Monitoring and Assessment* 93(1):17-29.
- Sela M, Tel-Or E, Fritz E, Huttermann A. 1988. Localization and toxic effects of cadmium, copper, and uranium in *Azolla*. *PLANT PHYSIOL.* 88(1):30-36.

- Sheir SK, Handy RD. 2010. Tissue injury and cellular immune responses to cadmium chloride exposure in the common mussel *Mytilus edulis*: Modulation by lipopolysaccharide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 59(4):602-613.
- Shi H, Sui Y, Wang X, Luo Y, Ji L. 2005. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 140(1):115-121.
- Simon, O., Floriani, M., Cavalie, I., Camilleri, V., Adam, C., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., 2011. Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages in the chronically exposed bivalve *Corbicula fluminea*. *Journal of Environmental Radioactivity* 102, 766-773.
- Suárez-Serrano A, Alcaraz C, Ibáñez C, Trobajo R, Barata C. 2010. *Procambarus clarkii* as a bioindicator of heavy metal pollution sources in the lower Ebro River and Delta. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(3):280-286.
- Tayal AK, Kaur I, Mathur RP. 2000. Bioaccumulation and localization of exogenous cadmium in a teleost by electron microscopy (TEM) and its specific quantitation by electron probe X-ray microanalysis (EPMA). *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 8(3):475-482.
- Thiébaud C, Carrière M, Milgram S, Simon A, Avoscan L, Gouget B. 2007. Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicological Sciences* 98(2):479-487.
- Torreblanca A, Del Ramo J, Arnau JA, Diaz-Mayans J. 1989. Cadmium, mercury, and lead effects on gill tissue of freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *Biological Trace Element Research* 21:343-347.
- Valko M, Morris H, Cronin MTD. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12(10):1161-1208.
- Wang H, Oster G. 1998. Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature* 396(6708):279-282.
- Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KMK. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* 36(11):1434-1443.
- WHO. 2001. Depleted uranium, sources, exposure and health effects. World Health Organisation(Geneva).

- Wigginton AJ, Birge WJ. 2007. Toxicity of cadmium to six species in two genera of crayfish and the effect of cadmium on molting success. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(3):548-554.
- 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). *Chemical Research in Toxicology* 16(4):524-530.

Chapitre VI

Synthèse générale et perspectives.

1. Rappel du contexte, des objectifs et de la démarche expérimentale

Les états membres européens sont ou seront confrontés dans un avenir proche à la mise en place de nouvelles installations, à l'expansion ou au maintien des programmes du nucléaire incluant le démantèlement, la mise en œuvre de sites de stockage de déchets ou encore la gestion d'anciens sites miniers d'uranium après leur exploitation (cf. **figure 23**). A titre d'exemple, la France est actuellement en train de développer de nouvelles installations en Basse-Normandie (construction de l'EPR sur le site de Flamanville). La gestion du nucléaire civil renforce l'enjeu sociétal et scientifique de la radioprotection de l'environnement. Les connaissances disponibles dans la bibliographie concernant les études d'impact de l'U sur la composante biotique sont rares. Bien que quelques études mettent en évidence les capacités de ce métal à induire des changements au niveau de grandes fonctions biologiques (telles que la reproduction, la physiologie et le comportement), nous sommes encore loin d'avoir découvert l'ensemble des impacts induits et les mécanismes associés. Il est donc nécessaire d'acquérir de nouvelles données afin de pouvoir prédire l'impact de l'uranium dans l'environnement et de participer à la mise en place d'un système de radioprotection de l'environnement. Démarré en 2001 au sein de l'IRSN, le programme ENVIRHOM a pour objectifs de permettre une meilleure évaluation des risques liés à l'exposition des radionucléides à la fois sur l'environnement et sur la santé de l'homme. Ce programme a souligné l'insuffisance de données expérimentales dans un domaine spécifique de la radioprotection, celui de la contamination chronique à faible dose des organismes par les radionucléides et leur incorporation chez l'homme par ingestion. C'est dans ce contexte spécifique que s'inscrit la problématique de cette thèse dont les travaux avaient pour objectif d'appréhender les dysfonctionnements physiologiques induits par l'U sur l'écrevisse *P. clarkii*. Cette approche a été réalisée à travers le développement et l'utilisation de plusieurs marqueurs faisant appel à différents niveaux d'intégration biologique (moléculaire, protéique, cellulaire, individuel) et à différents champs disciplinaires. Ainsi, les processus de bioaccumulation et de détoxification métallique (MET-EDX et le suivi de l'expression du gène *mt*) ou encore, la modification de la balance oxydative (activité enzymatique de la GST, SOD, CAT, GPX, expression du gène *sod(Mn)*), l'impact sur les mitochondries (*atp6*, *cox1*, *12S*), l'histopathologie et la survie des individus ont été appréhendés. En effet, en l'absence d'études sur la toxicité de l'U chez l'écrevisse *P. clarkii* dans la bibliographie, le choix des paramètres biologiques est fondé sur les effets toxiques identifiés pour le Cd et ceux identifiés chez le poisson zèbre après exposition à l'U (Barillet et al. 2007; Barillet et al. 2010; Barillet et al. 2011; Bourrachot et al. 2008; Lerebours et al. 2009 ; Lerebours et al. 2010a; Lerebours

et al. 2010b). Cette démarche utilise *a priori* les connaissances acquises sur un métal fortement étudié, le Cd, et sur l'U, passées au crible des premiers résultats obtenus sur le modèle poisson. Cette démarche de « screening », présente plusieurs avantages en écotoxicologie. Elle permet de tester et de sélectionner des biomarqueurs utilisables *in fine* sur le terrain, de dégager un lien entre les différents niveaux de l'organisation biologique ou encore d'orienter la recherche afin d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de toxicité du métal. En plus, nous avons essayé de caractériser et de mieux comprendre la toxicité de l'U en la comparant à celle du Cd et de l'²³³U à des concentrations équivalentes. Nous allons tenter, au cours de cette synthèse générale, de dégager les résultats les plus marquants suite à l'exposition au Cd et à l'U et de mettre en évidence le niveau atteint pour chaque objectif (cf. Chapitre I-A).

2. Niveau atteint des objectifs

2.1. Le modèle biologique (cf. Chapitre I-A objectif ii)

La majorité des informations concernant les effets biologiques de l'U sur les organismes aquatiques a été acquise à partir d'expériences effectuées sur le poisson zèbre *Danio rerio* (Labrot et al. 1999; Barillet et al. 2007; Bourrachot et al. 2008; Lerebours et al. 2009; Barillet et al. 2010; Lerebours et al. 2010a; Lerebours et al. 2010b; Barillet et al. 2011; Gagnaire et al. 2011; Simon et al. 2011). Cet organisme modèle vit dans les régions tropicales et possède donc une répartition géographique limitée contrairement à *P. clarkii* (cf. **figure 1** et **2**). Ainsi, l'utilisation de cette espèce de poisson comme bioindicateur de contamination dans l'environnement apparaît restreinte. Il est donc évident que le développement des biomarqueurs utilisables dans des programmes de biosurveillance doit se focaliser sur des organismes sentinelles largement répandus dans l'environnement. Ces organismes sentinelles naturellement présents dans le milieu intègrent les modifications spatio-temporelles des stressés. Abondants dans le milieu récepteur, ils doivent être résistants à la contamination chronique (et accidentelle) mais aussi être capables de marquer la pollution. De plus, ce poisson de petite taille, n'est pas consommé par les populations humaines, contrairement à l'écrevisse. La distribution géographique actuelle, la vitesse d'expansion et les densités de populations atteintes de cette espèce invasive conduit à sa consommation (50 000 tonnes/an, Arignon, 2004) dans de nombreux endroits du globe. La contamination de *P. clarkii* peut alors constituer, dans certains cas, un risque sanitaire. Rappelons que la plupart des réponses

biologiques face à un contaminant dépendent de l'espèce considérée et de sa résistance (Ballestros et al., 2009). Il est donc évident que le développement de biomarqueurs utilisables dans des programmes de biosurveillance doit se faire sur des organismes sentinelles largement répandus dans l'environnement.

Notre travail a mis en évidence la forte capacité de résistance de l'écrevisse *P. clarkii* à l'U et au Cd. Ceci a été illustré par les faibles pourcentages de mortalité obtenus après les expositions à de fortes concentrations en métaux. En effet, suite à une contamination aiguë des écrevisses, nous n'avons observé respectivement que 10% et 30% de mortalité après exposition à 40 μM d'U ou de Cd, respectivement. Compte tenu de ces pourcentages, cette espèce paraît être plus résistante à l'U qu'au Cd. Ce point sera discuté plus en détail dans la suite de cette partie. De même, aucune mortalité des écrevisses n'a été observée après exposition chronique à de faibles doses de Cd (10 $\mu\text{g/L}$) et d'U (30 $\mu\text{g/L}$) et ceci même après 60 jours d'exposition au laboratoire. Cette espèce résiste donc à une large gamme de concentrations et de durées d'exposition. A cette caractéristique s'ajoute le fait qu'elle est capable de bioaccumuler les deux métaux étudiés. Les concentrations de Cd et d'U observées dans les organes étaient élevées et significativement différentes de celles des témoins (cf. Chapitre VI 2.2) dans toutes les conditions d'exposition (à tous les temps et toutes les concentrations). De plus, nous avons noté des effets moléculaires à fortes et faibles concentrations (0.1 μM de Cd et d'U) et sur des temps courts (4 et 10 jrs). Ces marqueurs mesurés chez l'écrevisse s'avèrent être sensibles. En effet, il est possible de suivre les réponses de biomarqueurs moléculaires chez l'écrevisse après une exposition à des concentrations environnementales rencontrées à proximité de zones faiblement et fortement impactées par les activités minières. En raison de l'ensemble de ces résultats, cette espèce semble être un bon organisme sentinelle pour le suivi de contamination dans l'environnement.

2.2. La bioaccumulation et la détoxification (cf. Chapitre I-A objectif i)

La quantification des deux métaux dans les différents tissus étudiés confirme les capacités d'accumulation de l'écrevisse. En effet, la bioaccumulation était rapide (dès 4 jours) et élevée (Facteur d'Accumulation élevé). Les concentrations accumulées en U dans les branchies étaient supérieures à celles du Cd suite à une contamination à des concentrations molaires équivalentes (40 μM). Malgré ces résultats, le taux de mortalité des écrevisses était moindre dans la condition d'exposition à l'U. En parallèle des propriétés physiques et chimiques de ces deux éléments responsables d'un effet direct sur les organismes, nous avons émis l'hypothèse que des différences dans les mécanismes de détoxification puissent être à l'origine de tels

résultats. Les observations de microlocalisation des métaux réalisées *via* le microscope à transmission électronique couplées aux analyses chimiques réalisées grâce à la sonde multi-élémentaire (EDX) ont révélé des différences entre les mécanismes de détoxification des deux métaux. Ces mécanismes, déterminant le pool toxique, peuvent être à l'origine de la résistance des écrevisses. Cette approche développée au LRE se consacre à l'identification d'amas subcellulaires denses aux électrons. Notons que ces granules insolubles (Metal Rich Granules) ne sont représentatives que d'une partie des mécanismes de détoxification mobilisables par la cellule ; la formation de complexes avec des molécules dédiées (exemple des MT) et la séquestration dans les lysosomes n'étant pas identifiées par cette technique (Viarengo et al., 1989). En effet, des précipités d'U en forme de paillettes ont été co-localisés avec du phosphore dans l'épithélium branchial, alors que le Cd a été localisé dans des formes « floconneuses » avec principalement du phosphore, du chlore et du calcium. Ces formes floconneuses semblent être des granules qui ressemblent à ceux retrouvés chez les crustacés durant les phénomènes de détoxification (Ahearn et al., 2004). En effet, les métaux sont normalement complexés avec du phosphore ou du soufre et piégés dans des vacuoles qui seront ensuite excrétées par les cellules (Chassard-Bouchaud, 1982; Fjeld et al., 1988; Marigómez et al., 2002; Ahearn et al., 2004; Simon et al., 2011). Quantitativement les formes floconneuses du Cd étaient plus difficiles à localiser que les granules insolubles d'U; ceci nous a amené à proposer comme hypothèse que le Cd internalisé dans la cellule n'était pas présent majoritairement sous cette forme mais était capable de se lier rapidement aux ligands organiques (ex : MT ou autres macromolécules), dans une forme toxique non détectée par cette technique. Malheureusement, la technique de microscopie employée seule ne permet pas la quantification des fractions détoxiquées. Elle doit s'accompagner d'une caractérisation chimique après séparation par centrifugations différentielles successives des différentes fractions subcellulaires (cytosol et ses sous fractions protéiques, organites cellulaires, granules insolubles, noyau, débris cellulaires (Wallace et Luoma, 2003)). Les moyens analytiques disponibles actuellement tels que l'ICP MS, permettent de mesurer de faibles quantités de métaux dans des fractions biologiques de plus en plus précises (mitochondrie, lysosomes, ...). La distribution à l'échelle subcellulaire dans ces différents compartiments permet *in fine* d'identifier la fraction toxique responsable des effets (voir la revue sur le zinc réalisée par Rainbow et Luoma, 2011). Le travail réalisé dans cette thèse confirme que les concentrations totales accumulées à l'échelle de l'organe ne renseignent pas sur les niveaux de toxicité rencontrés et nous amène à identifier les fractions toxiques à l'échelle subcellulaire, seules responsables des effets observés. De plus, Il faut aussi mentionner que les résultats de la

quantification des concentrations des métaux dans les tissus résultent à la fois de l'adsorption et de l'internalisation. En conséquence, les valeurs élevées de la bioaccumulation de l'U mesurées dans l'organe entier (ici les branchies) peuvent être aussi liées à des différences de capacités d'adsorption des deux métaux étudiés. Afin de mieux caractériser les impacts du Cd et de l'U, il faudra essayer d'établir un lien entre les effets et les fractions internalisées des métaux. Cette approche définie comme le Critical Body Residues (CBR) est une alternative dans l'établissement des relations dose/réponse. Elle identifie une valeur seuil d'accumulation au-delà de laquelle un effet toxique est attendu (Vijver et al., 2004). Cette approche intègre le concept de biodisponibilité et des différentes voies d'exposition rencontrées par les organismes. Elle bénéficie des développements récents distinguant au sein de cette valeur seuil, une fraction bioaccumulée dite active/toxique et une fraction non active.

La distribution des métaux dans les organes montre que le Cd et l'U ne possèdent pas les mêmes capacités de transfert des branchies vers l'hépatopancréas. En effet, l'efficacité des transferts peut être évaluée par la prise en compte de la gamme de variation des niveaux d'accumulation (**Tableau 24**).

Tableau 24 : Gamme de variation des concentrations accumulées dans la branchie et l'hépatopancréas (HP) après exposition aiguë au Cd et à l'U.

[Cd, U] µg/g, ps	Cadmium			Uranium		
	Min	Max	Max/Min	Min	Max	Max/Min
branchies	12.13	460	37	129	12346	95
hepatopancreas	1.78	200	112	1.11	78	70
HP/branchies	0.14	0.43		0.008	0.006	

La gamme d'accumulation dans les branchies est plus étendue après exposition à l'U qu'après exposition au Cd. Le ratio entre les niveaux accumulés dans l'hépatopancréas et dans la branchie montre une efficacité de transfert plus importante pour le Cd. Ce résultat est bien entendu à relativiser car il prend en compte uniquement les concentrations totales accumulées dans l'organe. Il faudra mesurer la contribution de l'adsorption pour évaluer les quantités réellement mobilisables.

Mentionnons qu'après une exposition par voie directe à une faible concentration d'U (30 µg/L), le radionucléide s'est accumulé dans divers organes (branchies, glandes vertes, estomac, hépatopancréas, intestin, muscles et carapace) dès 4 jours d'exposition, mettant ainsi

en évidence sa mobilité à l'intérieur de l'écrevisse. Les branchies, l'intestin, l'estomac et la carapace présentaient les plus forts niveaux d'accumulation probablement à cause de la contribution de l'adsorption de l'U sur la cuticule et le mucus des organes. L'ICP MS utilisé ici pour la mesure de l'U et la spectrophotométrie d'absorption (four) pour la mesure du Cd fournissent des limites de détection faibles, permettant de mesurer les niveaux d'accumulation dans les différents tissus des témoins et dans ceux obtenus après exposition aux deux métaux. La contribution de chaque organe, en particulier, ceux présentant une masse faible (glande verte) peut donc être réellement quantifiée.

La **figure 79** représente le ratio entre l'écart-type à la moyenne et la moyenne afin d'évaluer les variations inter-individuelles de la bioaccumulation de la branchie et de l'hépatopancréas. Pour l'uranium, l'augmentation de la variabilité inter-individuelle semble être liée à l'augmentation de la concentration d'exposition. Peu de données d'accumulation sont disponibles pour l'U. Toutefois, d'importantes variations ont été précédemment observées chez le modèle bivalve *Corbicula fluminea* et chez l'écrevisse *Orconectes limosus* (Simon et Garnier-Laplace, 2005; Simon et al., 2011). Chez le poisson *Danio rerio*, la variabilité inter-individuelle mesurée dans la branchie semble moins élevée, respectivement 12 et 18% après exposition à faible et forte concentrations (20 et 250 µg/L) (Bourrachot, 2009). Pour le Cd, l'interprétation de cette variabilité est plus complexe. Chez une espèce de poisson *Paralichthys alivaceus* (Seong-Gil et al., 2011), ce ratio calculé pour le Cd est plus faible que celui de l'U ; il diminue de 13 à 7 % pour la branchie et de 20% à 14% pour le foie après deux conditions d'exposition (50 et 100 µg/L). Les facteurs physiologiques sont les plus souvent à l'origine des variations des concentrations tissulaires des métaux d'un individu à l'autre en milieu contrôlé. Ces facteurs physiologiques (ventilation/respiration, animaux homéothermes ou hétérothermes, capacités de détoxification) peuvent fortement influencer les processus de bioaccumulation (Luoma et Rainbow, 2005). En conséquence, nous avons corrélé les réponses des biomarqueurs à la bioaccumulation à l'échelle de chaque individu afin de prendre en compte la plasticité interindividuelle (cf. chapitre VI 2.4).

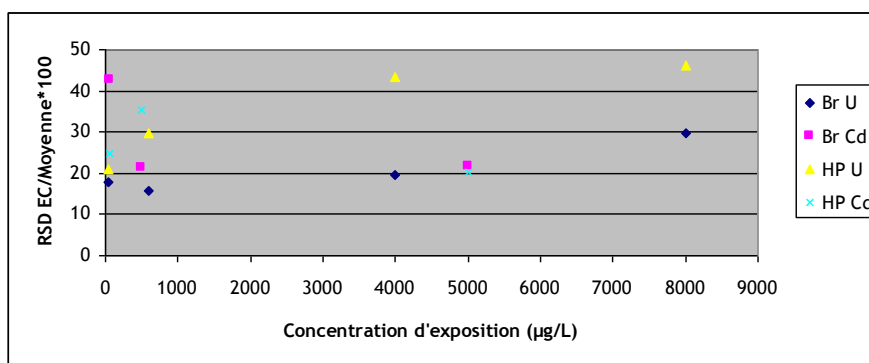


Figure 79 : Présentation du ratio (RSD) entre l'écart-type à la moyenne et la moyenne des concentrations de Cd ou d'U accumulées dans les branchies ou l'hépatopancréas (en pourcentage) en fonction des concentrations d'exposition. (Hp) hépatopancréas. (Br) branchies. (U) organe exposé à l'uranium. (Cd) organe exposé au Cd.

2.3. Les effets histopathologiques (cf. Chapitre I-A objectifs ii et iii)

Les symptômes histologiques observés dans les hépatopancréas présentant des concentrations de Cd et d'U équivalentes (absence de différence significative) suite à l'exposition à 0.1 µM (~ 10 µg/L Cd ; ~ 30 µg/L U) et 40 µM (~ 5000 µg/L Cd ; ~ 8000 µg/L U) des deux métaux, sont similaires. En effet, les observations microscopiques mettent en évidence la capacité des deux métaux à induire une désorganisation épithéliale, une dilatation du lumen et une vacuolisation. En cas de forte contamination (ex : 40 µM), le Cd et l'U peuvent aussi conduire à l'amincissement des parois épithéliales et la dégénérescence des tubules par apoptose et/ou nécrose. En effet, des études ont montré que l'U est capable d'induire une mort cellulaire (Periyakaruppan et al. 2009; Thiébault et al. 2007). Une nécrose des hépatocytes du poisson *Coregonus clupeaformis* a été observée suite à une contamination trophique de l'U (Cooley et Klaverkamp, 2000). Il a été également mis en évidence que le Cd induit une apoptose des glandes digestives chez le crabe *Sinopotamon yangtsekiense* (7.25 mg/L ; 96h) et leur nécrose chez la moule *Mytilus edulis* (20 et 50 µg/L ; 11 jours) (Li et al. 2010; Sheir et Handy 2010). Une vacuolisation des cellules hépatiques du poisson *Esox lucius* a été reportée comme symptôme de toxicité à l'U (Kelly et Janz, 2009). Ce symptôme semble être couramment observé suite à une exposition métallique (Pillai et Menon, 1998 ; Osterauer et al., 2010), voire même à une exposition aux HAPs et aux molécules organiques (Hagger et al., 2006). Chez la moule, Pillai et Menon (1998) montrent que le degré de vacuolisation des cellules hépatopancréatiques dépend des concentrations d'exposition au mercure et au cuivre. De la même façon, la sévérité des dommages histologiques et la fréquence de leur apparition se sont avérées être dose-dépendants dans nos études. En effet, le suivi des atteintes

histologiques au niveau de l'hépatopancréas après exposition à 30, 600, 4000 et 8000 µg/L d'U durant 10 jours a montré que la vacuolisation, la dégénérescence des tubules et la désintégration de l'épithélium augmentaient en fonction de la contamination. Notons que les tubules étaient encore intacts après 10 jours de contamination à 30 µg/L d'U. Cependant après 60 jours d'exposition à cette dernière concentration, les hépatopancréas présentaient des symptômes similaires à ceux observés à fortes concentrations d'exposition telle une vacuolisation, une dilatation du lumen et un amincissement de l'épithélium ce qui est en concordance avec les niveaux de bioaccumulation (la gamme de variation s'échelonnant entre 20 et 70 µg/g). Dans le cas du Cd, la vacuolisation et la désintégration des tubules étaient aussi dose-dépendante (de 50 µg/L à 5000µg/L) et l'exposition chronique de l'hépatopancréas à 10 µg/L pendant 60 jours conduit elle aussi à l'apparition du phénomène de vacuolisation. Ce symptôme a aussi été reporté par Martin-Diaz (2006) suite à l'exposition de *P. clarkii* à la même concentration d'exposition obtenue après 21 jours.

L'histopathologie est déjà utilisée comme marqueur de pollutions pouvant être intégré dans l'évaluation des effets de perturbations environnementales sur des populations de poissons (Schwaiger et al., 1997; Stentiford et al., 2003; Hagger et al., 2006; Pinto et al., 2010). Aussi, ce critère d'effet apparaîtrait comme un des indicateurs les plus fiables pour la mise en évidence de la détérioration de la santé des animaux aquatiques par des activités anthropogéniques (Stentiford et al., 2003). Ainsi, l'histopathologie appliquée à l'hépatopancréas de l'écrevisse pourra servir de biomarqueur sensible et aspécifique d'une pollution métallique.

2.4. Les effets moléculaires (cf. Chapitre I-A objectif ii et iii)

Les travaux réalisés durant cette thèse soulignent que les deux métaux altèrent l'expression de plusieurs gènes mitochondriaux (*12S*, *atp6* et *cox1*) et que le pattern d'expression de ces gènes est différent suivant les modalités d'exposition (aigüe *versus* chronique) indiquant des mécanismes d'action différents. Les résultats d'une étude de l'impact du Cd sur l'expression génique dans le foie de carpes confirment ces propos (Reynders et al. 2006). En effet, ces auteurs ont utilisé une puce à ADN pour déterminer des changements de l'expression de 643 gènes après expositions par voie directe (9-480 µg/L) et indirecte (9.5- 144 µg/g) simultanément. Leur étude montre que l'expression des gènes est très variable en présence du Cd. La variation du nombre de gènes affectés par le Cd et celle du profil de l'expression des gènes pris individuellement mettent en évidence la complexité de la

toxicité du Cd à faibles et fortes doses au niveau moléculaire. Une puce à ADN a aussi été réalisée pour évaluer la toxicité de l'U chez le poisson zèbre *Danio rerio* après 10 jours d'exposition à de faibles concentrations (15 et 100 µg/L) (Lerebours et al., 2010). Les résultats de cette étude ont révélé que les réponses géniques étaient inversement corrélées aux concentrations d'U testées : le nombre de gènes dont la réponse était altérée était plus important chez les poissons soumis à 15 µg/L qu'à 100 µg/L. Les auteurs ont conclu qu'à faibles doses d'exposition, différents profils de réponses géniques sont attendus. De plus, d'après Lerebours et al, 2010b, il ne faut pas toujours s'attendre à ce que l'intensité de la réponse génique augmente entre une exposition chronique et aigüe, mais c'est plutôt la nature qualitative de la réponse génique qui peut changer entre les deux modes d'expositions. Ainsi, le concept selon lequel plus les concentrations d'exposition sont fortes, plus l'intensité de la réponse des gènes doit être élevée est à nuancer lors d'exposition à faibles doses. Il faut plutôt admettre que la nature des réponses varie selon le type de stress appliqué (aigüe ou chronique).

Cependant, le dogme liant l'intensité de la réponse aux doses de toxiques (dose/réponse) reste vrai aux doses élevées. En effet, nous avons pu corréler les expressions des gènes avec les concentrations accumulées de Cd ou d'U dans les organes de *P. clarkii* suite à l'exposition à fortes doses (aigüe) (**Figure 80**). Lors de l'exposition chronique, ce type de corrélation n'était significatif que pour le gène *mt* dans le cas du Cd. Dans le cas de l'U, le gène *cox1* était surexprimé chez *P. clarkii* après une longue durée d'exposition à 30 µg/L, alors que ce même gène était réprimé après une courte durée d'exposition à fortes doses. Nous avons retenu au cours de ce travail de recherche que les altérations géniques acquièrent une meilleure significativité biologique en comparant les réponses dans leur ensemble. Effectivement, nous avons observé une augmentation de l'expression du gène *atp6* suite à une exposition aigüe (ex : T10j après exposition à 8 mg U/L) et chronique (T60j après exposition à 30 µg U/L). Néanmoins, lorsque nous comparons ensemble les réponses de l'expression de ces deux gènes, le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale semble être différent suivant les conditions d'exposition (aigüe et chronique). Dans le cas d'une forte contamination, la répression de *cox1* et la surexpression de *atp6* peuvent témoigner d'une inhibition du complexe IV et d'une augmentation de l'activité du complexe V (réponse de l'*atp6*). Dans certaines pathologies, un tel fonctionnement de la chaîne respiratoire peut témoigner d'une diminution du potentiel membranaire et de la mise en place de l'hydrolyse de l'ATP au niveau du complexe V (ATP synthase) au lieu de sa synthèse (Kurochkin et al., 2010 ; Nevière et al., 2008 ; Wang et Oster, 1998). Lors d'une faible contamination, la

surexpression des deux gènes peut témoigner d'une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale afin de produire assez d'énergie pour les besoins de la cellule (défense, détoxification...).

Ces résultats mettent en évidence la nécessité de mener une approche multi-marqueurs pour la compréhension des mécanismes d'action des métaux. L'étape de screening des mécanismes toxiques doit être complétée par une seconde étape, dirigée vers l'étude approfondie d'un mécanisme spécifique préalablement identifié. Cette seconde étape doit s'enrichir de l'approche multi-marqueurs pour appréhender la complexité (rétro-contrôle, mécanismes de compensation) de ces mécanismes.

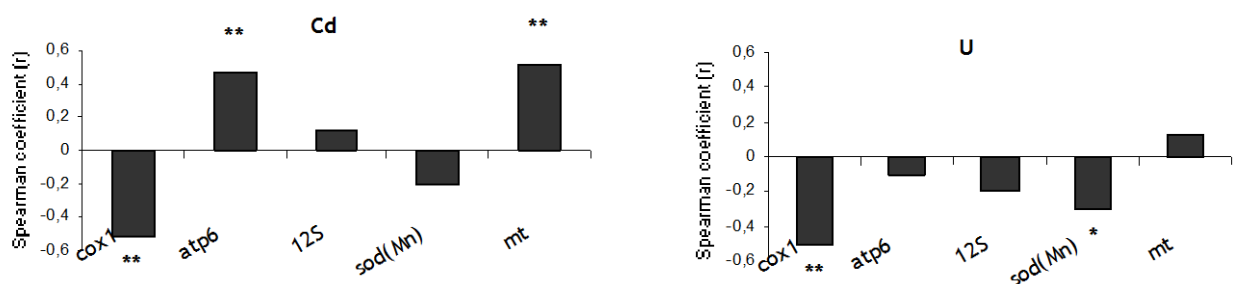


Figure 80 : Corrélation de Spearman (r) entre la bioaccumulation des métaux dans les branchies et l'hépatopancréas et l'expression des 5 gènes étudiés suite à l'exposition aigüe (0, 0.05, 0.5 et 5 mg Cd/L ; 0, 0.6, 4 et 8 mg U/L ; à 4 et 10 jours). (*) P < 0.05. () P < 0.005.**

Dans le cas du Cd, l'hépatopancréas exposé à 10 µg/L à T30 (contamination chronique) présentait une concentration tissulaire équivalente à celle retrouvée dans le même organe exposé à 0.5 mg/L à T10 (contamination aigüe). Cependant les expressions des gènes ne présentaient pas un même pattern (cf. Chapitre III). Ceci montre que le niveau mais aussi la cinétique d'exposition doivent être pris en compte dans l'interprétation de la réponse de ces marqueurs moléculaires. En effet, les organismes peuvent s'acclimater à une exposition chronique à faible dose en mettant en place des mécanismes de détoxification et de compensation efficaces. D'après Luoma et Rainbow (2005), la compréhension de la toxicité des métaux nécessite plus que la seule considération des concentrations totales accumulées dans les tissus. Ces auteurs conseillent de prendre en compte la dynamique biologique telle que les taux d'internalisation et d'excrétion des métaux pour expliquer les effets adverses. De plus, des variations de l'expression des gènes mitochondriaux et des gènes impliqués dans la réponse face au stress oxydant ont été observées au cours du temps (4,10, 30 et 60jrs) après exposition des écrevisses à une faible concentration d'U (30 µg/L) (**Figure 81**).

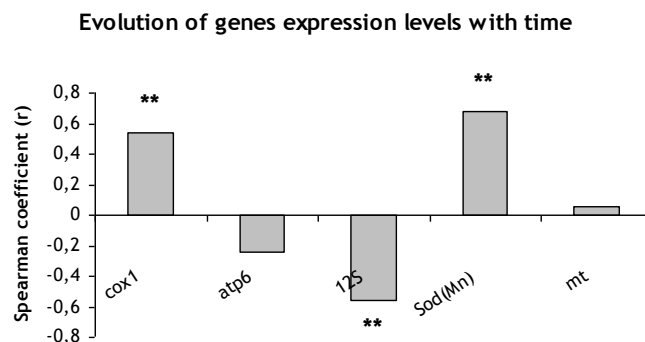


Figure 81 : Corrélation de l'expression des 5 gènes étudiés dans les branchies et les hépatopancreas contaminés en fonction du temps (4, 10, 30 et 60 jrs) suite à une exposition de 30 µg/L d'U. (*) P < 0.05. () P < 0.005.**

L'expression des gènes *cox1* et *sod(Mn)* dans l'hépatopancreas et les branchies contaminés à l'U est positivement corrélée avec les temps d'exposition contrairement au gène *12S*. Cette relation montre que l'expression de ces gènes dépend du temps. Notons que la corrélation de l'expression des gènes *mt* et *atp6* avec le temps n'est pas significative. En effet, l'expression du gène *mt* ne suit pas un pattern spécifique, sa surexpression ponctuelle est probablement liée au stress oxydant. Une forte fluctuation de l'expression du gène *atp6* a été observée au cours du temps (**Figure 82**).

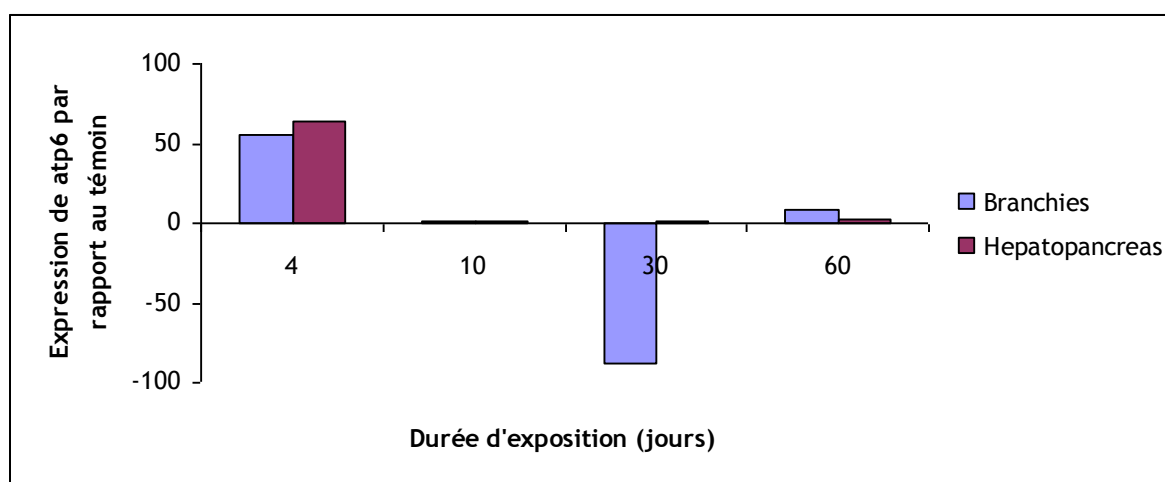


Figure 82 : Cinétique d'expression du gène *atp6* normalisée par rapport au témoin après exposition chronique (4 ; 10 ; 30 ; 60 jours) à faible dose d'U (30 µg/L).

Des pics séquentiels et ponctuels de transcription en relation avec la demande du métabolisme doivent être responsables de cette forte variabilité. Ainsi, l'expression ponctuelle de ce gène semble être modulée par les interactions entre les besoins énergétiques de la cellule

et l'U. Les métaux peuvent avoir un effet indirect sur la demande énergétique en relation avec les processus d'accumulation, de transport, de stockage et d'excrétion des contaminants (Labrot et al., 1999 ; Goertzen et al., 2011). Ils peuvent aussi avoir un effet direct en affectant des mécanismes biochimiques (ex : protéines membranaires des mitochondries et enzymes antioxydantes) (Labrot et al., 1999 ; Ivanina et al., 2008 ; Cannino et al., 2009 ; Kurochkin et al., 2010 ; Miccadei et Floridi, 1993 ; Wang et al., 2004 ; Wrońska-Nofer et al., 1999 ; Salazar-Medina et al., 2010). Ceci peut expliquer la grande variabilité de l'expression du gène de l'*atp6* dans le cas d'une contamination métallique. En effet, il se peut que les cellules produisent plus d'ATP pour assurer la viabilité cellulaire et fournir de l'énergie pour la mise en place des mécanismes de défense. Ce gène peut aussi être surexprimé comme réponse au dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Vu la sensibilité des gènes et la possibilité d'avoir différents patterns en relation avec des variations physiologiques (ex : *atp6*), des concentrations (aigüe et chronique) et des temps d'exposition, nous conseillons d'avoir une approche multi-gènes pour l'évaluation de la toxicité.

Toutefois, il faut mentionner que malgré la fluctuation des réponses géniques (**Figure 83**), ces biomarqueurs ont pu témoigner d'un stress métallique car les expressions étaient significativement différentes des témoins. Ainsi, l'utilisation de ces expressions peut aisément être utilisée comme marqueurs de toxicité de l'U. Effectivement, malgré des différences entre les réponses géniques des écrevisses à deux stades différents de mues (cf. Chapitre IV-A et IV-C) et exposées à 30 µg/L pendant 4 et 10 jours, cet outil a toujours réussi à mettre en évidence un effet de l'U (différences avec les témoins) même si les patterns ou les niveaux d'expression des gènes n'étaient pas semblables. Rappelons que la variation de l'expression du gène *atp6* était la plus remarquable parmi les gènes étudiés suite à la contamination à l'U des écrevisses en prémue. En effet, les crustacés peuvent avoir de grandes demandes énergétiques durant la mue, ce qui peut expliquer la grande variabilité de l'expression du gène *atp6*. De même, Muhlia-Almazan et al. (2008) ont démontré que l'expression de ce gène chez la crevette *Litopenaeus vannamei* variait en fonction des stades de mue.

Nous avons pu aussi observer qu'une corrélation positive existe entre l'expression des gènes *cox1* et *sod(Mn)*. En effet, une augmentation du métabolisme mitochondrial (*cox1* surexprimé) entraîne une augmentation des ERO endogènes entraînant une induction du système antioxydant (*sod(Mn)* surexprimé). En l'absence de surexpression de *cox1*, le système de défense n'est pas plus sollicité (*sod(Mn)* réprimé) et le pool basal semble être suffisant.

Ainsi, l'expression de *sod(Mn)* semble être modulée par celle de *cox1*. Une étude récente a aussi montré que l'expression du gène codant pour le complexe IV est fortement et positivement corrélée à l'expression du gène codant pour la superoxyde dismutase cytosolique chez le poisson *Perca flavescens* exposés à des concentrations environnementales de Cd (Pierron et al., 2009).

Enfin, les réponses géniques prennent en compte les besoins cellulaires en protéines fonctionnelles présentant elles-mêmes des durées de vie différentes. Ainsi, la durée de vie de ces protéines peut agir directement sur les niveaux d'expression de gènes et conduire à des variations d'expression.

Les analyses en composantes principales (cf. Chapitre V) des réponses géniques ont montré que dans les expositions à fortes doses d'U et de Cd (40 µM), le gène *atp6* présentait la plus grande variabilité d'expression parmi les gènes étudiés (ex : jusqu'à 183 fois surexprimé dans le cas du Cd et 3 fois dans le cas de l'U), confirmant un impact significatif des xénobiotiques sur la demande énergétique cellulaire. L'expression des gènes *mt* et *I2S* était différente entre les deux conditions d'exposition. En effet, Le gène *mt* était surexprimé uniquement dans les tissus fortement contaminés à l'U alors qu'il était surexprimé dans toutes nos conditions d'exposition au Cd. Jusqu'à ce jour, le rôle des MT dans la prise en charge de l'U et dans sa détoxification n'est pas clair. Toutefois, il est confirmé que ces protéines peuvent piéger les ERO et participer à la gestion de la balance anti-oxydante (Fang et al., 2010 ; Viarengo et al., 2000). Il est donc fort probable que l'U a généré un stress oxydant à fortes doses, conduisant à la surexpression du gène *mt*.

Le gène *mt* semble être un biomarqueur idéal de toxicité du Cd puisqu'il suit le même pattern d'expression quels que soient les organes, le temps et les concentrations d'exposition. Le nombre des mitochondries (suivi par l'expression du gène *I2S*) semble augmenter dans le cas d'une exposition aiguë au Cd contrairement à l'U. Ces résultats soulignent une différence dans les réponses cellulaires face à une contamination au Cd et à l'U. Il s'avère que le nombre de mitochondries augmente pour palier au dysfonctionnement de la chaîne respiratoire dans le cas d'une contamination au Cd mais pas à l'U. Il faut noter que les altérations des expressions des gènes *cox1* et *atp6* sont moins importantes dans le cas de l'U que dans le cas du Cd indiquant une différence dans le degré de dysfonctionnement.

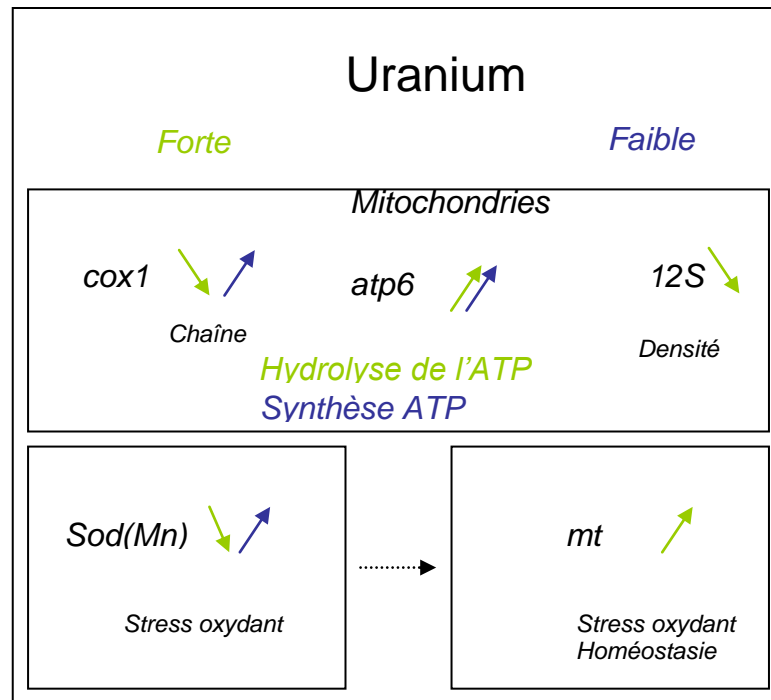


Figure 83 : Synthèse de la tendance de l'expression des gènes étudiés suite à une forte (0.6, 4 et 8 mg/L) ou faible (30 µg/L) exposition à l'U. (↑) surexpression. (↓) répression.

Il est aussi intéressant de noter qu'après une exposition aiguë (40 µM), l'impact du Cd et de l'U sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale semble être similaire. En effet, le pattern de l'expression de *cox1* et de l'*atp6* semble être le même. Comme nous avons pu le voir précédemment (cf. Chapitre VI 2.3), le Cd et l'U peuvent conduire à l'apoptose. Il semblerait qu'à fortes doses, le Cd et l'U puissent conduire à la mort cellulaire programmée par la voie intrinsèque mitochondriale. Nous pouvons supposer que les deux métaux ont provoqué une diminution du potentiel membranaire (*cox1* réprimé) qui a été suivie par le déclenchement de la voie apoptotique (Pinot et al., 2000)(ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale, puis relargage du cytochrome C, suivi de l'activation des caspases conduisant à la fragmentation du noyau, et la mort cellulaire). De plus, dans les deux conditions, les tubules des hépatopancréas étaient en dégénérescence (mort cellulaire).

Les mécanismes d'action des deux métaux étaient différents suite à une exposition chronique (0.1 µM de Cd ou d'U). Le métabolisme mitochondrial semble plus élevé en présence de l'U (*cox1* surexprimé) qu'en présence du Cd (faible impact sur *cox1*). De plus, le gène *mt* était toujours surexprimé en présence du Cd, mais que ponctuellement en présence de l'U confirmant une meilleure prise en charge du Cd que l'U par cette protéine de séquestration. Ce résultat peut aussi être expliqué par les variations de la quantité des mitochondries suite à

la contamination. En effet, la diminution de l'expression du gène *12S* observée dans le cas de l'U a pu conduire à l'augmentation du métabolisme pour compenser la perte des organites, contrairement à ce qui a pu être observé dans le cas du Cd.

Les réponses moléculaires des antioxydants (activités enzymatiques et expressions des gènes) ont montré que l'U est capable de générer un stress oxydant chez l'écrevisse et ceci dès 4 jours d'exposition à une faible concentration environnementale (30 µg/L). Un stress oxydant généré par l'U chez *Danio rerio* a aussi été observé après 3 jours d'exposition (Barillet et al., 2007). Dans notre étude, le stress oxydant semblait être plus important dans les branchies que dans l'hépatopancréas de *P. clarkii* via la mesure de l'activité des enzymes. Ceci peut être dû au fait que les branchies constituent d'une part la première barrière biologique à entrer en contact avec le radionucléide (Borković et al., 2008), et présentent d'autre part des forts taux d'accumulation. Il est aussi possible que le niveau basal des antioxydants soit plus important dans l'hépatopancréas que dans les branchies (Atli et al., 2006; Borković et al., 2008; Pandey et al., 2008). Cette différence de sensibilité des organes face au stress oxydant a aussi été observée dans le cas du Cd. Les résultats de l'analyse en composantes principales ont montré que le stress oxydant après 60 jours d'exposition au Cd ou à l'U était plus important qu'après 30 jours. Les activités des enzymes avaient tendance à diminuer en fonction du stress. En effet, les activités de la CAT et de la GST ont été affectées par la présence des deux métaux. De plus, l'activité de la SOD et de la GPX étaient significativement plus faibles dans les branchies contaminées à l'U que dans celles contaminées au Cd. Sur la base de ces résultats, il semblerait que l'U génère un stress oxydant plus important que le Cd. Cependant, les branchies ont bioaccumulé 22 fois plus d'U que de Cd alors que les différences des activités des enzymes entre les deux conditions n'étaient pas très élevées (ex : GPX : -33%, SOD : -18%). Comme nous avons déjà mentionné, une partie de l'U a pu précipiter et/ou s'adsorber aux parois biologiques contribuant à réduire la fraction toxique. Nous sommes alors incapables de savoir à ce niveau d'analyse lequel des deux éléments est capable de générer le plus de stress oxydant chez ce modèle biologique.

L'ensemble des résultats acquis durant ce travail de recherche souligne la complexité des mécanismes d'action de ces deux métaux. Malgré cette complexité, nous avons tenté de lier les réponses des différents paramètres biologiques étudiés entre eux. L'un des mécanismes de toxicité de l'U que nous proposons, est fondé sur les travaux effectués par Pourahmad et al. (2006) (**Figure 84**). Ces auteurs ont rapporté que dans les cellules, l'U

pourrait être réduit en présence du glutathion, passant ainsi de la valence VI à V puis IV. Cette réaction semble consommer beaucoup de dioxygène et conduit à la formation de quantités considérables d'ions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). De plus, elle conduit à la transformation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). Les ERO engendrées par cette réaction peuvent oxyder les enzymes et les rendre ainsi inactives (Blum et Fridovich, 1985; Davies, 2005). Ceci peut expliquer la diminution des activités enzymatiques observées au cours de nos expériences. L'hypothèse de la complexation directe de l'U sur les enzymes doit être aussi prise en compte (Labrot et al., 1996). En effet, l'effet toxique des métaux comme le Cd, l'arsenic et le plomb est expliqué par leur fixation sur les groupes sulphydryles des antioxydants conduisant ainsi à leur inactivation (Jomova et Valko, 2011). Une étude récente a montré que l'U est capable de se lier à certaines protéines comme la MT, la ferritine, la transferrine et l'albumine, cependant la fixation de ce radionucléide sur les enzymes impliquées dans la défense contre le stress oxydant n'a pas encore été étudiée (Michon et al., 2010). Une diminution de l'activité d'une enzyme peut aussi être le résultat d'une répression de la transcription du gène correspondant (Lerebours et al., 2009). Ceci montre la nécessité de coupler l'approche enzymatique et génétique dans le but d'éclaircir les mécanismes d'action des toxiques. Dans le cas de la GST et de la GPx, la diminution du substrat (GSH) peut aussi expliquer une telle diminution. Une diminution de l'activité de la SOD va conduire à la diminution des concentrations de H_2O_2 dans les cellules et par conséquent, contribuer à réduire l'activité de la CAT et de la GPX. Le dysfonctionnement du système de défense va conduire à l'augmentation des niveaux de ERO dans la cellule. Le stress oxydant va alors modifier l'expression génique (ex : surexpression de gènes pour compenser les dommages, de gènes impliqués dans la défense et la détoxification) et les ERO vont cibler les mitochondries (ex : membrane, complexes) ce qui va engendrer des perturbations au niveau de la chaîne respiratoire (fonctionnement des complexes, expression des gènes mitochondriaux). Ceci va être suivi par une diminution du potentiel membranaire et l'enclenchement de l'apoptose. La mort cellulaire va potentiellement conduire à des dommages histologiques qui peuvent avoir des conséquences physiologiques graves telles une perturbation du fonctionnement de l'organe qui peut mener à la mort de l'individu. Dans le cas du Cd, nous pouvons imaginer qu'un mécanisme similaire puisse survenir suite à une diminution des activités enzymatiques.

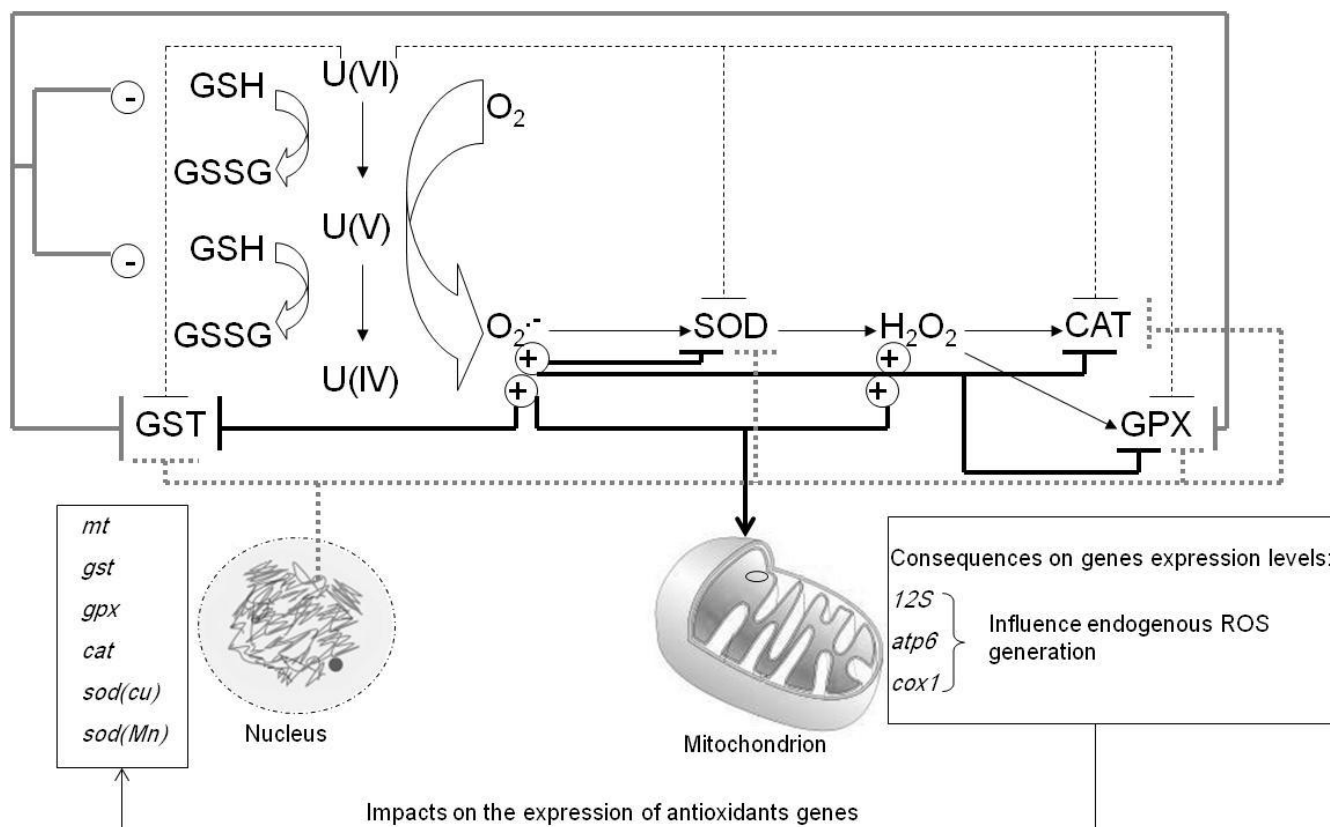


Figure 84 : Proposition d'un mécanisme de cytotoxicité induit par la présence de l'U.

(GSH) glutathion réduit, (GSSG) glutathion oxydé, (O₂) dioxygène, (O₂⁻) anion superoxyde, U (VI) uranium de valence VI, U (V) uranium de valence V, U (IV) uranium de valence IV, (SOD) superoxyde dismutase, (H₂O₂) peroxyde d'hydrogène, (CAT) catalase, (GPX) glutathion peroxydase, (GST) glutathion S transférase, *mt*: gène codant pour la métallothionéine, (*gst*) gène codant pour la GST, (*gpx*) gène codant pour la GPX, (*cat*) gène codant pour la CAT, *sod(Cu)* gène codant pour la SOD cytosolique, *sod(Mn)* gène codant pour la SOD mitochondriale, (*12S*) gène codant pour l'RNA ribosomale 12S, (*atp6*) gène codant pour sous-unité 6 de l'ATP synthase, (*cox1*) gène codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase, (-) indique une diminution du substrat, (+) indique une augmentation d'un produit, une flèche avec un trait indique une inhibition, une flèche normale indique un impact (ex: sur les mitochondries et les expressions des gènes).

2.5. Chimiotoxicité vs radiotoxicité (cf. Chapitre I-A objectif iv)

Nous nous sommes intéressés dans une approche préliminaire à discriminer la radio- et la chimiotoxicité de l'U en utilisant comme marqueurs d'effets, les expressions de gènes mitochondriaux (*cox1*, *atp6*, *12S*), de gènes codant pour des antioxydants (*mt*, *sod(Mn)*) et les activités des enzymes (SOD, CAT, GPx, GST) impliquées dans la défense contre le stress oxydant. Lors de cette approche, nous avons exercé une chimio-toxicité équivalente entre les deux formes de l'U (UA, ²³³U) et une radiotoxicité élevée dans le cas de l'exposition au ²³³U. Les niveaux de bioaccumulation entre l'UA et l'²³³U sont différents pour un seul

compartiment biologique, la carapace (cf. Chapitre IV-C). Barillet et al. , 2007 met en évidence une différence transitoire d'accumulation entre ces deux formes d'U dans la branchie du *Danio rerio*. Les auteurs proposent comme hypothèse un impact de la radiotoxicité sur la structure branchiale conduisant à des modifications du taux d'accumulation. Une telle hypothèse ne peut être proposée dans le cas de la carapace, puisque une grande part de l'U accumulée est en fait adsorbée sur sa surface.

L'analyse des marqueurs géniques montre une augmentation de l'expression du gène *atp6* dans les deux organes étudiés après 10 jours d'exposition dans les deux conditions. Notons toutefois que cette augmentation est plus élevée après exposition des branchies à l'²³³U qu'à l'UA. Il semble que la lutte contre le stress induit par la radiotoxicité nécessite plus d'énergie. Une différence de l'activité de la GST dans les branchies a été observée après 10 jours d'exposition à l'²³³U. En effet, la GST a été induite lorsque la radiotoxicité a augmenté. Ceci semble être dû à une augmentation des ERO suite à la radioactivité. Les autres paramètres biologiques étudiés n'ont pas pu discriminer la radio- de la chimiotoxicité de l'U.

En parallèle, nous avons calculé le débit de dose dans l'hépatopancréas suite à l'exposition à l'UA (0.86 µGh/h) et à l'²³³U (12900µGh/h). Les calculs ont montré que la dose interne était 15000 fois supérieure dans les organes contaminés à l'²³³U qu'à l'UA. Malgré cette grande différence, l'impact de la radioactivité sur les paramètres biologiques testés n'était significatif que sur l'activité de la GST et l'expression du gène *atp6*. Ainsi, cette approche nous a permis de conclure que dans la gamme des concentrations massiques utilisées, représentatives de concentrations environnementales, la toxicité de l'U est plus liée à ses propriétés chimiques qu'à sa radioactivité mais que cette dernière augmentait la toxicité.

Durant cette expérience, nous avons aussi comparé la sensibilité des biomarqueurs étudiés. Au niveau enzymatique, seules les activités de la CAT (inhibé à T4) et de la GST étaient différentes de celles des témoins, alors que l'expression des 5 gènes étudiés était altérée significativement en présence des deux formes d'U. Nous pouvons ainsi conclure qu'à faible dose (30 µg/L) et à courte durée (4- 10 jrs) d'exposition, les biomarqueurs géniques sont plus sensibles que les biomarqueurs enzymatiques. Ceci a été confirmé lors de l'expérience chronique (30 µg/L 30-60 jrs).

2.6. Classification de la toxicité des métaux (cf. Chapitre I-A objectif v)

Suite à l'ensemble des résultats mentionnés, il est évident que la comparaison des impacts du Cd et de l'U peut être utilisée dans le but de classer la toxicité des métaux. La classification est plus simple lorsque nous prenons en compte les effets à des niveaux élevés de l'organisation biologique. La comparaison des taux de mortalité des écrevisses a montré clairement que le Cd est plus toxique que l'U pour *P. clarkii*. Cependant, plus nous affinons l'étude, plus la comparaison des effets devient compliquée. Ainsi dans un but d'évaluation comparative de la toxicité des métaux il est préférable de se contenter des réponses biologiques à des échelles élevées de l'intégration biologique. Néanmoins, l'étude d'impact sur les niveaux moléculaires a un grand intérêt mécanistique et constitue un outil sensible à la contamination.

3. Perspectives de recherche

Ces travaux ouvrent plusieurs perspectives de recherche comme approfondir les connaissances sur les mécanismes d'action de l'U sur les mitochondries et sur la balance oxydative, établir un lien entre l'expression d'un gène et sa traduction au niveau protéique, essayer de lier les impacts étudiés à la distribution de l'U dans différentes fractions cellulaires, vérifier la réponse des biomarqueurs retenus chez *P. clarkii* à différents stades de mues et chez d'autres organismes aquatiques sentinelles présentant des résistances différentes face au contaminant, et étudier des effets *in situ*.

3.1. Eclaircir les mécanismes de toxicité de l'U sur les mitochondries

Nos résultats de l'expression des gènes *cox1*, *atp6* et *12S* ont mis en évidence un impact de l'U sur les mitochondries. Cependant, le mécanisme d'action s'est avéré très complexe et l'étude de l'expression de ces quelques gènes seule n'est pas suffisante pour établir un diagnostic complet de la situation. Ainsi, nous proposons d'essayer de séquencer des gènes codant pour des sous unités du complexe I, II et III de la mitochondrie et de gènes impliqués dans l'apoptose. Comme nous avons pu le voir, les atteintes mitochondriales peuvent déclencher une apoptose. L'identification du déclenchement de ce phénomène est aussi possible grâce à des techniques histologiques de marquage. En effet, la méthode « tunnel » (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling) permet d'identifier les cellules apoptotiques. Cette méthode se base sur le fait que les cellules apoptotiques voient leur ADN clivé par des nucléases. Cette dégradation génère des 3' OH libres qui sont reconnus par la transférase qui va leur ajouter un dUTP biotinylé ou marqué avec un

fluorochrome. Il suffit ensuite de visualiser le marquage. Il est possible de distinguer facilement les cellules vivantes des cellules mortes en cytométrie en flux et de distinguer les cellules nécrotiques des cellules apoptotiques en réalisant un double marquage. Le dosage de la cytochrome C est aussi envisageable puisqu'elle est relâchée de la mitochondrie vers le milieu intracellulaire lorsque la voie apoptotique mitochondriale est activée. Le dosage du potentiel membranaire mitochondrial et du taux d'ATP peut aussi clarifier le mécanisme par lequel l'U impacte la mitochondrie.

3.2. Eclaircir les mécanismes de toxicité de l'U sur la balance oxydative

L'observation d'une baisse ou d'une augmentation d'activité enzymatique peut avoir de nombreuses origines (sous-surexpression génétique, altérations directes de la protéine, etc...). Dans un but de compréhension des mécanismes par lesquels l'U génère un stress oxydant, nous proposons d'essayer de séquencer les gènes codant pour la CAT, GPX, SOD (cytosolique) et la GST chez *P. clarkii*. Ceci permettra de vérifier si l'origine des réponses enzymatiques est liée à un impact au niveau génique. De plus, le dosage des substrats des enzymes pourrait éclaircir les variations des activités enzymatiques. Notre équipe a récemment développé une méthode analytique (transposition de la méthode classique de quenching de fluorescence à une technique "haut débit", utilisant un spectrofluorimètre lecteur de microplaques) afin de déterminer les constantes de complexation de l'U aux protéines. Comme nous avons émis l'hypothèse qu'une diminution de l'activité d'une enzyme peut être liée à la fixation directe de l'U à la protéine, ceci mérite d'être vérifié chez les enzymes participant à la défense contre le stress oxydant (la CAT, la SOD, la GPX et la GST). Cette étude pourrait être réalisée à partir de protéines pures ou de protéines extraites de cytosol de *P. clarkii* et séparées par chromatographie basse pression. Il s'agira de déterminer *in vitro* par fluorimétrie les constantes de complexation de l'uranium avec chacune des enzymes d'intérêt. Les concentrations d'U à tester dans cette expérience seront en relation avec les niveaux d'accumulation de l'U dans la fraction cytosolique obtenue à partir de l'hépatopancréas et les branchies des écrevisses exposés pendant 4 et 10 jours à 30, 600 et 4000 µg/L d'U (analyses en cours). Une fois validé pour chacune des enzymes, nous pourrions contaminer une fraction cytosolique d'une écrevisse avec de l'U et suivre la décroissance de l'activité de l'enzyme concernée en fonction de l'augmentation des concentrations. Cette étape est nécessaire afin de déterminer une relation entre l'activité de l'enzyme et les concentrations d'U dans un milieu intracellulaire. En effet, il se peut que l'U en présence d'un

pool protéique présente des constantes d'affinités plus élevées pour les protéines présentes dans le milieu que pour l'enzyme testée.

3.3. Lien entre le niveau génique et enzymatique

Une absence de différence entre les mesures des activités enzymatiques effectuées chez les organismes exposés à l'U et celles réalisées chez les témoins peut aussi bien être interprétée comme une absence totale d'effet ou au contraire comme un indicateur d'un stress trop important. En effet, certaines enzymes ont des réponses qui suivent une courbe en cloche (Dagnino et al., 2007) en fonction de l'augmentation du stress ce qui peut mener à une confusion lors de l'interprétation. Afin de remédier à ce problème, il est nécessaire d'avoir une approche multimarqueurs pour obtenir une image plus précise de la toxicité de l'U. Le couplage de l'étude de l'expression du gène codant pour l'enzyme étudiée et le suivi de son activité présente plusieurs avantages. Cette approche peut aussi bien aider à mieux interpréter les résultats que permettre de comparer la sensibilité des deux outils utilisés afin de choisir les biomarqueurs les plus pertinents.

3.4. Distribution de l'U dans différentes fractions cellulaires

Actuellement au sein du LRE, l'accent est porté sur la détermination du comportement de l'U dans le milieu biologique. En effet, la caractérisation des biomolécules interagissant avec un élément est un point clé pour élucider la toxicité de cet élément. Cependant, la détermination de la « spéciation biologique » nécessite avant tout une connaissance précise de la distribution de l'élément dans le milieu d'intérêt. Pour cela, nous avons envisagé de mettre en évidence la distribution de l'U dans les différentes fractions cellulaires provenant des branchies et de l'hépatopancréas des écrevisses exposés à 30, 600 et 4000 $\mu\text{g/L}$ d'U. Cette étude nous permettra de connaître les fractions les plus contaminées et pourra nous guider dans le choix de tester d'autres mécanismes susceptibles d'être impactés par l'U et ainsi identifier de nouveaux biomarqueurs. De plus, compte tenu de la biodisponibilité des polluants et de la diversité des mécanismes d'entrée, certains auteurs proposent d'exprimer les effets toxiques chroniques en fonction d'une « dose de polluant » accumulée dans les organes. L'approche «Critical Body Residue (CBR)» tente de relier les effets toxiques observés aux capacités de bioaccumulation des polluants plutôt qu'aux concentrations dans la colonne d'eau. Le dosage de l'U dans les différentes fractions de la cellule permettra de relier les effets que nous avons observés au niveau génique à la bioaccumulation subcellulaire et ainsi répondre à l'approche CBR.

3.5. Etude d'impact de la mue sur les biomarqueurs retenus

La physiologie d'un organisme influence la réponse d'un biomarqueur. Il est possible de distinguer notamment des facteurs intrinsèques, tels que l'âge, le sexe, le statut reproducteur ou les stades de mues dans le cas où l'espèce sentinelle est un crustacé. Durant nos études, nous avons choisi de travailler avec des écrevisses males au stade adulte afin de limiter ces variations physiologiques. Cependant, nous n'avons pas pu empêcher le déclenchement naturel du phénomène de mue. Ainsi dans l'une de nos expériences, les écrevisses étaient au stade de prémue (chapitre IV-C) et en conséquent nous avons remarqué des variations de l'expression des gènes étudiés (surtout de l'*atp6*) en les comparant avec celles des écrevisses au stade d'intermue (Chapitre IV-A). Il est donc nécessaire d'étudier les réponses des biomarqueurs d'U à différents stades de mue de l'écrevisse (intermue, prémue, mue et post-mue). L'une des expériences envisageables consiste à contaminer des écrevisses adultes à l'U puis à déclencher artificiellement la mue (ex : par injection d'éclydysone).

3.6. Etude des effets chez des organismes présentant différentes résistances à l'U

Afin de permettre l'application des biomarqueurs dans un grand nombre de situations, il semble également intéressant de valider l'utilisation de ces outils chez différents taxa. En effet, une approche plurispécifique fournit des indicateurs de stress chez des espèces qui diffèrent à la fois par leur sensibilité à la pollution, par leur physiologie, le groupe fonctionnel auquel elles appartiennent au sein d'une communauté, ainsi que par le compartiment de l'écosystème auquel elles sont principalement exposées, à savoir la colonne d'eau, le sédiment ou leur interface. Afin de préserver un certain réalisme écologique, les biomarqueurs doivent être validés chez différentes espèces sentinelles susceptibles d'être présentes sur le terrain. Idéalement, les biomarqueurs, étudiés au niveau individuel, devraient permettre de prédire les effets à l'échelle supérieure de la population ou de la communauté. A ce jour, cet objectif n'est pas atteint avec notre modèle biologique *P. clarkii* car cette espèce s'est révélée très résistante à l'U et nécessite des efforts supplémentaires afin d'approcher une évaluation du risque écotoxicologique. Ceci nécessite soit une étude de l'impact de l'U sur d'autres mécanismes biologiques (ex : reproduction, croissance...) chez *P. clarkii* qui sont plus susceptibles de traduire une conséquence écologique, soit d'évaluer la réponse des biomarqueurs étudiés durant cette thèse chez des organismes plus sensibles.

3.7. Etude des effets *in situ*

Si l'influence de facteurs confondants (intrinsèques : physiologiques, extrinsèques : abiotique ex : température, spéciation...) peut être en partie limitée en conditions contrôlées, l'interprétation de la réponse des biomarqueurs devient extrêmement plus délicate en milieu naturel. Le biomarqueur parfait et universel n'existe pas. Un biomarqueur peut s'avérer très pertinent dans certaines conditions, mais ne pas répondre dans d'autres, voire induire un diagnostic erroné. La nécessité d'étudier les réponses des biomarqueurs *in situ* semble évidente. En effet, les mélanges de substances et les contaminations multiples impliquent des synergies et des antagonismes qui peuvent influencer grandement les réponses biologiques. Nous pouvons envisager de prélever de l'eau polluée à l'U du terrain (ex : Limousin) et exposer des écrevisses au laboratoire. Cette approche présente l'avantage de limiter les impacts des facteurs extrinsèques tels que la variation de température et d'autres paramètres abiotiques qui peuvent influencer la physiologie de l'écrevisse et la réponse des biomarqueurs.

Références

- Adams SM, Greeley MS, 2000. Ecotoxicological indicators of water quality: using a multi-response indicator to assess the health of aquatic ecosystem. *Water, Air, and Soil pollution*, 123: 103-115.
- Adams WJ, Blust R, Borgmann, Brix KV, Deforest DK, Green AS, Meyer JS, McGeer JC, Paquin PR, Rainbow PS, Wood CM, 2010. Utility of tissues residues for predicting effects of metals on aquatic organism. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 7:75-98.
- Adelung, D., 1971. Studies on the moulting physiology of decapod crustaceans as exemplified by the shore crab *Carcinus maenas*. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*. 22, 66-119.
- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A., 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 74, 324-329.
- Ahearn, G.A., Mandal, P.K., Mandal, A., 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 174, 439-452.
- Aigueperse, J., Bouvier, C., Chambrette, V., et al., 2001. Etat des connaissances sur les risques potentiels associés à l'uranium appauvri utilisé dans les armes. Fontenay aux Roses, Institut de Protection et de Sûreté Nucléaire, 25.
- Al Kaddissi S, Legeay A, Elia C, Gonzalez P, Camilleri V, Gilbin R, Simon O, 2012. Effects of uranium on crayfish *Procambarus clarkii* mitochondria and antioxidants responses after chronic exposure: what have we learned?. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78, 218-224.
- Al Kaddissi, S., Legeay, A., Gonzalez, P., Floriani, M., Camilleri, V., Gilbin, R., Simon, O., 2011. Effects of uranium uptake on transcriptional responses, histological structures and survival rate of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1800-1807.
- Alberstadt, P., Steele, C., Misra, K., Skinner, C., Wilson, B., Robaskiewicz, S., 1999. Effects of sublethal exposure to cadmium on shelter-seeking behavior of juvenile *Orconectes rusticus* (Girard) crayfish. *ASTM Special Technical Publication*. ASTM, Atlanta, GA, USA, pp. 362-369.
- Alcorlo, P., Otero, M., Crehuet, M., Baltanás, A., Montes, C., 2006. The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiamar (SW, Spain). *Science of The Total Environment* 366, 380-390.

- Allen, J.I., Moore, M.N., 2004. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? *Marine Environmental Research* 58, 227-232.
- Almar, M.M., Diaz-Mayans, J., Romero, F.J., 1987. Glutathione content and GSH S-transferase activity in midgut gland of *Procambarus clarkii*. Sex differences, the effect of fasting, and their implications in cadmium toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 87, 433-435.
- Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F.G., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C., Novelli, E.L.B., 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International* 27, 673-679.
- Atli, G., Alptekin, O., Tükel, S., Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 143, 218-224.
- Alves LC, Borgmann U, Dixon DG, 2009. Kinetics of uranium in soft water and the effect of body size, bioaccumulation and toxicity to *Hyalella azteca*. *Environmental Pollution* 157: 2239-2247.
- Amara, S., Garrel, C., Favier, A., Rhouma, K.B., Sakly, M., Abdelmelek, H., 2009. Effect of static magnetic field and/or cadmium in the antioxidant enzymes activity in rat heart and skeletal muscle. *General Physiology and Biophysics* 28, 414-419.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160-202.
- Amiard, J.-C., Caquet, T., Lagadic, L., 1998. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, edited by L. Lagadic, T. Caquet, J.C., Amiard and F. Ramade (Paris: Lavoisier, Technique et Documentation), XXI-XXXI.
- Anderson, M.B., Reddy, P., Preslan, J.E., Fingerman, M., Bollinger, J., Jolibois, L., Maheshwarudu, G., George, W.J., 1997. Metal Accumulation in Crayfish, *Procambarus clarkii*, Exposed to a Petroleum-Contaminated Bayou in Louisiana. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37, 267-272.
- Andrews, G.K., 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology* 59, 95-104.

- Antón, A., Serrano, T., Angulo, E., Ferrero, G., Rallo, A., 2000. The use of two species of crayfish as environmental quality sentinels: The relationship between heavy metal content, cell and tissue biomarkers and physico-chemical characteristics of the environment. *Science of the Total Environment* 247, 239-251.
- Antunes, S.C., de Figueiredo, D.R., Marques, S.M., Castro, B.B., Pereira, R., Gonçalves, F., 2007a. Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of the Total Environment* 374, 252-259.
- Antunes, S.C., Pereira, R., Gonçalves, F., 2007b. Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53, 207-213.
- Arfsten, D.P., Bekkedal, M., Wilfong, E.R., Rossi Iii, J., Grasman, K.A., Healey, L.B., Rutkiewicz, J.M., Johnson, E.W., Thitoff, A.R., Jung, A.E., Lohrke, S.R., Schaeffer, D.J., Still, K.R., 2005. Study of the reproductive effects in rats surgically implanted with depleted uranium for up to 90 days. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 68, 967-997.
- Arrignon, J., 1991. L'écrevisse et son élevage. Lavoisier-Technique et Documentation. 2th édition.
- Arrignon J. L'écrevisse et son élevage. Coll Aquaculture-Pisciculture, 4^{ème} édition. 284 p.
- Arthur, J.R., 2000. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 1825-1835.
- Aschner, M., Jiang, G.C.T., 2009. Toxicity studies on depleted uranium in primary rat cortical neurons and in *Caenorhabditis elegans*: What have we learned? *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews* 12, 525-539.
- ASTDR, 1999. Toxicological profile for uranium. public health service. Agency for toxic substances and disease registry.
- ASTM E729, 1996. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. Available at: www.astm.org (Reapproved 2007), 22 p.
- Ballestros, M., Wunderlin, D., Bistoni, M., 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72, 199-205.
- Banday, A.A., Priyamvada, S., Farooq, N., Yusufi, A.N.K., Khan, F., 2008. Effect of uranyl nitrate on enzymes of carbohydrate metabolism and brush border membrane in different kidney tissues. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2080-2088.

- Barata, C., Baird, D.J., Markich, S.J., 1999. Comparing metal toxicity among *Daphnia magna* clones: An approach using concentration-time-response surfaces. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 326-331.
- Barillet, S., 2007. Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). IRSN-2007/ 84- FR. 475 p.
- Barillet, S., Adam, C., Palluel, O., Devaux, A., 2007. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 497-505.
- Barillet, S., Adam-Guillermin, C., Palluel, O., Porcher, J.M., Devaux, A., 2011. Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environmental Pollution* 159, 495-502.
- Barillet, S., Larno, V., Floriani, M., Devaux, A., Adam-Guillermin, C., 2010. Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure. *Aquatic Toxicology* 100, 295-302.
- Bartosiewicz, M., Penn, S., Buckpitt, A., 2001. Applications of gene arrays in environmental toxicology: Fingerprints of gene regulation associated with cadmium chloride, benzo(a)pyrene, and trichloroethylene. *Environmental Health Perspectives* 109, 71-74.
- Baudrimont, M., Andrès, S., Metivaud, J., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2472-2477.
- Beaugelin-Seiller K, Jasserand F, Garnier-Laplace J, Gariel, JC, 2004. EDEN: Software to calculate the dose rate of energy for the non-human biota, due to the presence of radionuclides in the environment. *Environmental Studies* 11:87-96
- Belabed, W., Kestali, N., Semsari, S., Gaid, A., 1994. Toxicity study of some heavy metals with *Daphnia* test. [Evaluation de la toxicite de quelques metaux lourds a l'aide du test daphnie]. *Techniques Sciences Methodes. Genie Urbain-Genie Rural*. 6, 331-335.
- Bem, H., Bou-Rabee, F., 2004. Environmental and health consequences of depleted uranium use in the 1991 Gulf War. *Environment International* 30, 123-134.
- Berson, A., 2005. Hépatotoxicité médicamenteuse par atteinte mitochondriale. *Mini-revue, Hépatogastro* 12, 191-198.
- Betcher, R.N., Gascoyne, M., Brown, D., 1988. Uranium in groundwaters of southeastern Manitoba, Canada. *Canadian Journal of Earth Sciences* 25, 2089-2103.

- Beyersmann, D., Hechtenberg, S., 1997. Cadmium, Gene Regulation, and Cellular Signalling in Mammalian Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 144, 247-261.
- Bird, G.A., Evenden, W.G., 1996. Transfer of ^{60}Co , ^{65}Zn , ^{95}Tc , ^{134}Cs and ^{238}U from water to organic sediment. *Water, Air and Soil Pollution* 86, 251-261.
- Bjerregaard, P., Depledge, M.H., 1994. Cadmium accumulation in *Littorina littorea*, *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas*: The influence of salinity and calcium ion concentrations. *Marine Biology* 119, 385-396.
- Bleise, A., Danesi, P.R., Burkart, W., 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *Journal of Environmental Radioactivity* 64, 93-112.
- Blum, J., Fridovich, I., 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 240, 500-508.
- Boets, P., Lock, K., Cammaerts, R., Plu, D., Goethals, P.L.M., 2009. Occurrence of the invasive crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) in Belgium (*Crustacea: Cambaridae*). *Belgian Journal of Zoology*. 139, 173-175.
- Bondavalli, C., Ulanowicz, R.E., 1999. Unexpected effects of predators upon their prey: The case of the american alligator. *Ecosystems* 2, 49-63.
- Bondgaard, M., Bjerregaard, P., 2005. Association between cadmium and calcium uptake and distribution during the moult cycle of female shore crabs, *Carcinus maenas*: An in vivo study. *Aquatic Toxicology* 72, 17-28.
- Bonin, B., Blanc, P.L., 2001. L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine (Chapitre 1), in EDP Science, ed., L'uranium de l'environnement à l'Homme: Collection IPSN: Les Ulis. 7-42.
- Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H.J., 1991. The genetic basis of xeroderma pigmentosum. *Annales de Genetique* 34, 143-150.
- Borković, S.S., Pavlović, S.Z., Kovacević, T.B., Štajn, A.S., Petrović, V.M., Saičić, Z.S., 2008. Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny cheek crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 147, 122-128.
- Bossy-Wetzel, E., Talantova, M.V., Lee, W.D., Schölzke, M.N., Harrop, A., Mathews, E., Götz, T., Han, J., Ellisman, M.H., Perkins, G.A., Lipton, S.A., 2004. Crosstalk between Nitric Oxide and Zinc Pathways to Neuronal Cell Death Involving Mitochondrial Dysfunction and p38-Activated K^+ Channels. *Neuron* 41, 351-365.

- Bourrachot, S., 2009. Etude des effets biologiques de l'exposition à l'uranium chez le poisson zèbre (*D. rerio*). Impact sur les stades de vie. N° ISRN/IRSN-2009/119. 240 p.
- Bourrachot, S., Simon, O., Gilbin, R., 2008. The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 90, 29-36.
- Brady, H.R., Kone, B.C., Brenner, R.M., Gullans, S.R., 1989. Early effects of uranyl nitrate on respiration and K⁺ transport in rabbit proximal tubule. *Kidney International* 36, 27-34.
- Breton, J., Sichel, F., Prévost, V., 2003. Stress oxydant et génotoxicité. ARET (Association pour la Recherche en Toxicologie) - Actualités, 20-25.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K., 2005. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204, 274-308.
- Brooks, B.W., Stanley, J.K., White, J.C., Turner, P.K., Wu, K.B., La Point, T.W., 2004. Laboratory and field responses to cadmium: An experimental study in effluent-dominated stream mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1057-1064.
- Budd, S.L., Tenneti, L., Lishnak, T., Lipton, S.A., 2000. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6161-6166.
- Bywater, J.F., Banaczowski, R., Bailey, M., 1991. Sensitivity to uranium of six species of tropical freshwater fishes and four species of cladocerans from Northern Australia. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10, 1449-1458.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., Sauvaigo, S., 1999. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424, 9-21.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., Ravanat, J.L., Sauvaigo, S., 2002. Les lésions radio-induites de l'ADN. *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*. 26, 119-125.
- Campbell, H.A., Couillard, Y., 2004. Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques. In: *Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Eds.: E Pelletier, PGC Campbell and F Denizeau. Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy (Quebec), Canada, 9-61.

- Campbell, P.G.C., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons Ltd., 45-102.
- Cannino, G., Ferruggia, E., Luparello, C., Rinaldi, A.M., 2009. Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion* 9, 377-384.
- Cao, L., Huang, W., Liu, J., Yin, X., Dou, S., 2010. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 151, 386-392.
- Carafoli, E., Tiozzo, R., Pasquali-Ronchetti, I., et al., 1971. A study of Ca²⁺ metabolism in kidney mitochondria during acute uranium intoxication. *Laboratory Investigation* 25, 516-527.
- Casalino, E., Calzaretti, G., Sblano, C., Landriscina, C., 2002. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 179, 37-50.
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, C., 1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: The possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 346, 171-179.
- CEA/DSV, 2002. Comparaison du nombre de lésions radioinduites par type, sans et sous irradiation (1 Gy). in: *Mécanismes biologiques Partie 2 : Lésions radioinduites de l'ADN*. <http://www-dsv.cea.fr/dsv/instituts/unite-protection-sanitaire-contre-les-rayonnements-ionisants-et-toxiques-nucleaires-prosion/pour-comprendre/bases-biologiques-de-la-radioprotection/mecanismes-biologiques>.
- Chassard-Bouchaud, C., 1982. Uranium concentration by crustacea: A structural, ultrastructural and microanalytical study by secondary ion emission and electron probe X ray microanalysis. *Comptes rendus des Séances de l'Académie des Sciences. Série III. Sciences de la vie*. 294, 919-924.
- Chavez-Crooker, P., Garrido, N., Ahearn, G.A., 2002. Copper transport by lobster (*Homarus americanus*) hepatopancreatic mitochondria. *Journal of experimental Biology*. 205, 405-413.
- Cheng W, Tunga YH, Liu CH, Chenb JH, 2006. Molecular cloning and characterisation of cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology* 20: 438-449.

- Choi, C.Y., An, K.W., Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2007. Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 145, 595-600.
- Choi, J., Lee, J.Y., Yang, J.S., 2009. Biosorption of heavy metals and uranium by starfish and *Pseudomonas putida*. *Journal of Hazardous Materials* 161, 157-162.
- Cillard, J., Cillard, P., 2006. Lipid peroxidation biomarkers. *Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations* 13, 24-29.
- Clifford, M., McGeer, J.C., 2010. Development of a biotic ligand model to predict the acute toxicity of cadmium to *Daphnia pulex*. *Aquatic Toxicology* 98, 1-7.
- Collas, M., Julien, C., Monnier, D., 2007. Technical note situation of the crayfish in france results of the national surveys performed between 1977 and 2006 by the conseil supérieur de la pêche (CSP). *Bulletin Français de la pêche et de la Protection des Milieux Aquatiques.*, 01-38.
- Colle, C., Garnier-Laplace, J., Roussel-Debet, S., Adam, C., Baudin, J.P., 2001. Comportement de l'uranium dans l'environnement. Metivier, H. (Ed.), *L'uranium de l'environnement à l'homme*. EDP Sci., Les Ulis., 187-211.
- Connon, R., Hooper, H.L., Sibly, R.M., Lim, F.L., Heckmann, L.H., Moore, D.J., Watanabe, H., Soetaert, A., Cook, K., Maund, S.J., Hutchinson, T.H., Moggs, J., De Coen, W., Iguchi, T., Callaghan, A., 2008. Linking molecular and population stress responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium. *Environmental Science and Technology* 42, 2181-2188.
- Cooley, H.M., Evans, R.E., Klaverkamp, J.F., 2000. Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* 48, 495-515.
- Cooley, H.M., Klaverkamp, J.F., 2000. Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* 48, 477-494.
- Correia, A.M., 2001. Seasonal and interspecific evaluation of predation by mammals and birds on the introduced red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea, Cambaridae) in a freshwater marsh (Portugal). *Journal of Zoology* 255, 533-541.
- Coulon, R., 1990. bilan de la contamination des produits alimentaires. in: les éléments radioactifs dans l'environnement. Conférence du 17 octobre 1990 à Paris, Société Française d'Energie Nucléaire.
- Craft, E.S., Abu-Qare, A.W., Flaherty, M.M., Garofolo, M.C., Rincavage, H.L., Abou-Donia, M.B., 2004. Depleted and natural uranium: Chemistry and toxicological effects.

- Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews 7, 297-317.
- Crandall, K.A., 2006. Applications of phylogenetics to issues in freshwater crayfish biology. Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5: Water Pollution, pp. 953-963.
- Crandall, K.A., 2010. *Procambarus clarkii*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 3.1. International Union for Conservation of Nature.
- Crandall, K.A., Buhay, J.E., 2008. Global diversity of crayfish (*Astacidae*, *Cambaridae*, and *Parastacidae* - *Decapoda*) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 295-301.
- Cruz, M.J., Rebelo, R., 2007. Colonization of freshwater habitats by an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*, in Southwest Iberian Peninsula. *Hydrobiologia*. 575, 191-201.
- Culotta, V.C., Earl, R.S.a.P.B.C., 2001. Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Current Topics in Cellular Regulation*. Academic Press, pp. 117-132.
- Cupit, M., Larsson, O., de Meeûs, C., Eduljee, G.H., Hutton, M., 2002. Assessment and management of risks arising from exposure to cadmium in fertilisers -- II. The Science of The Total Environment 291, 189-206.
- Cusimano, R. F., Brakke, D. F., Chapman, G. A., 1986. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*).43, 1497–1503.
- Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A.R., Munters, E., Artois, T.J., Nawrot, T., Vangronsveld, J., Smeets, K., 2010. Cadmium stress: An oxidative challenge. *BioMetals* 23, 927-940.
- Dagnino, A., Allen, J.I., Moore, M.N., Broeg, K., Canesi, L., Viarengo, A., 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers* 12, 155-172.
- Dallinger, R., Egg, M., Köck, G., Hofer, R., 1997. The role of metallothionein in cadmium accumulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from high alpine lakes. *Aquatic Toxicology* 38, 47-66.
- Darolles C, Broggio D, Feugier A, Frelon S, Dublineau I, De Meo M, Petitot F, 2010. Different genotoxic profiles between depleted and enriched uranium. *Toxicology letters* 192: 337-348.
- Davies, M.J., 2005. The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1703, 93-109.
- Del Ramo, J., Diaz-Mayans, J., Torreblanca, A., Nunez, A., 1987. Effects of temperature on the acute toxicity of heavy metals (Cr, Cd, and Hg) to the freshwater crayfish,

- Procambarus clarkii* (Girard). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 38, 736-741.
- Delacroix, D., Guerre, J.P., Leblanc, P., 2004. Manuel pour la manipulation de substances radioactives dans les laboratoires de faible à moyenne activité 4th ed. Radioprotection. Revue de la société Française de radioprotection. 39, 270 p.
- Demers, A., Souty-Grosset, C., Trouilhé, M.C., Füreder, L., Renai, B., Gherardi, F., 2006. Tolerance of three European native species of crayfish to hypoxia. Hydrobiologia 560, 425-432.
- Denison, F., 2004. Uranium(VI) speciation : modelling, uncertainty and relevance to bioavailability models - Application to uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve. Université de Provence Aix - Marseille I, 338 p.
- Denmark, 2002. guidance document on cadmium and its compounds. HELSINKI commission Baltic Marine Environment Protection Commission., 51.
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., Santore, R.C., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. Environmental Toxicology and Chemistry 20, 2383-2396.
- Diaz-Mayans, J., Hernandez, F., Medina, J., 1986. Cadmium accumulation in the crayfish, *Procambarus clarkii*, using graphite furnace atomic absorption spectroscopy. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 37, 722-729.
- Dickinson, D.A., Forman, H.J., 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. Biochemical Pharmacology 64, 1019-1026.
- Dizdaroglu, M., 1998. Mechanisms of free radical damage to DNA. in "DNA and free radicals: techniques, mechanisms and applications". Aruoma, O.I. & Halliwell, B. (Eds.). St. Lucia, OICA International, 3-26.
- Doelman, C.J.A., Leurs, R., Oosterom, W.C., Bast, A., 1990. Mineral dust exposure and free radical-mediated lung damage. Experimental Lung Research 16, 41-55.
- Domingo, J.L., 1994. Metal-induced developmental toxicity in mammals: A review. Journal of Toxicology and Environmental Health 42, 123-141.
- Domingo, J.L., 2001. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: A review. Reproductive Toxicology 15, 603-609.
- Dörr, A.J.M., La Porta, G., Pedicillo, G., Lorenzoni, M., 2006. Biology of *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) in Laketrasimeno. BFPP - Bulletin Français de la Pêche et de la Protection des Milieux Aquatiques, pp. 1155-1167.

- Dörr, A.J.M., Pacini, N., Abete, M.C., Prearo, M., Elia, A.C., 2008. Effects of a selenium-enriched diet on antioxidant response in adult crayfish (*Procambarus clarkii*). *Chemosphere* 73, 1090-1095.
- Dorta, D.J., Leite, S., DeMarco, K.C., Prado, I.M.R., Rodrigues, T., Mingatto, F.E., Uyemura, S.A., Santos, A.C., Curti, C., 2003. A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *Journal of Inorganic Biochemistry* 97, 251-257.
- Downs, C.A., Fauth, J.E., Woodley, C.M., 2001. Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: A molecular biomarker system. *Marine Biotechnology* 3, 380-397.
- Doyen P, Biggot A, Vasseur P, Rodius F, 2008. Molecular cloning and expression study of pi-class glutathione S-transferase (pi-GST) and selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) transcripts in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 147: 69-77.
- Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* 62, 649-671.
- Duchen, M.R., 2004a. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular Aspects of Medicine* 25, 365-451.
- Duchen, M.R., 2004b. Roles of Mitochondria in Health and Disease. *Diabetes* 53, S96-S102
- Duncan, K.E.R., Ngu, T.T., Chan, J., Salgado, M.T., Merrifield, M.E., Stillman, M.J., 2006. Peptide folding, metal-binding mechanisms, and binding site structures in metallothioneins. *Experimental Biology and Medicine* 231, 1488-1499.
- Durbin, P.W., Wrenn, M.E., 1975. metabolism and effects of uranium in animals. *Energy Research and Development Administration, Arlington, VA* 93, 67- 129.
- Elia, A.C., Dörr, A.J.M., Mastrangelo, C., Prearo, M., Abete, M.C., 2006. Glutathione and antioxidant enzymes in the hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) of Lake Trasimeno (Italy). *Bulletin Francais de la Pêche et de la Protection des Milieux Aquatiques.*, 1351-1361.
- Elia, A.C., Dörr, A.J.M., Prearo, M., Taticchi, M.I., Abete, M.C., 2007. Detoxification enzymes of freshwater crayfish *Procambarus clarkii* fed a diet enriched in selenium: Preliminary results. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 40, 195-199.
- Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Dörr, A.J.M., Mantilacci, L., 2003. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 162-167.

- EPA (US Environmental Protection Agency), 2000. National Primary Drinking Water Regulations; Radionuclides. Final Rule. Federal Register. 76708–76753., 7 December 2000.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry* 1, 529-539.
- Erk, M., Muysen, B.T.A., Ghekiere, A., Janssen, C.R., 2008. Metallothionein and cellular energy allocation in the estuarine mysid *shrimp Neomysis integer* exposed to cadmium at different salinities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 357, 172-180.
- Escartín, E., Porte, C., 1996. Acetylcholinesterase inhibition in the crayfish *Procambarus clarkii* exposed to fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34, 160-164.
- Eyckmans M, Celis N, Horemans N, Blust R, De Boeck G, 2011. Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in the three freshwater species. *Aquatic Toxicology* 103: 112-120.
- Fang, Y., Yang, H., Wang, T., Liu, B., Zhao, H., Chen, M., 2010. Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam *Macra veneriformis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 151, 325-333.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cultured Aquatic Species Information Programme *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Procambarus_clarkii/en> [Accessed 08 septembre 2011].
- Faraway, J., 2002. Practical Regression and Anova using R [online]. available at: <http://cran.r-project.org/doc/contrib/Faraway-PRA.pdf> [accessed 2009].
- Faria, M., Huertas, D., Soto, D.X., Grimalt, J.O., Catalan, J., Riva, M.C., Barata, C., 2010. Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain). *Chemosphere* 78, 232-240.
- Favier, A., 2003. The oxidative stress: Concept and experimental interest to understand diseases mechanisms and therapeutic approaches. *Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique*, 108-115.

- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., Geffard, O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (*Crustacea: Amphipoda*) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 86, 413-425.
- Fernandes, D., Potrykus, J., Morsiani, C., Raldua, D., Lavado, R., Porte, C., 2002. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality in two low-stream rivers (NE Spain). *Environmental Research* 90, 169-178.
- Finerty, M.W., Madden, J.D., Feagley, S.E., Grodner, R.M., 1990. Effect of environs and seasonality on metal residues in tissues of wild and pond-raised crayfish in Southern Louisiana. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19, 94-100.
- Fisenne, I.M., Welford, G.A., 1986. Natural U concentrations in soft tissues and bone of New York City residents. *Health Physics* 50, 739-746.
- Fjeld, E., Hessen, D.O., Roos, N., Taugbøl, T., 1988. Changes in gill ultrastructure and haemolymph chloride concentrations in the crayfish, *Astacus astacus*, exposed to de-acidified aluminium-rich water. *Aquaculture* 72, 139-150.
- Fortin, C., Denison, F.H., Garnier-Laplace, J., 2007. Metal-phytoplankton interactions: Modeling the effect of competing ions (H^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+}) on uranium uptake. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 242-248.
- Fortin, C., Dutel, L., Garnier-Laplace, J., 2004. Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 974-981.
- Foster, J., David, H., 2007. Status and ecosystem interactions of the invasive Louisianan red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in East Africa. In Francesca Gherardi, *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats Invading Nature - Springer Series In Invasion Ecology*. Volume 2, Part 2, 91-101.
- Fournier, E., Tran, D., Denison, F., Massabuau, J.C., Garnier-Laplace, J., 2004. Valve closure response to uranium exposure for a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*): Quantification of the influence of pH. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1108-1114.
- Freedman, J.H., Slice, L.W., Dixon, D., Fire, A., Rubin, C.S., 1993. The novel metallothionein genes of *Caenorhabditis elegans*. Structural organization and inducible, cell-specific expression. *Journal of Biological Chemistry* 268, 2554-2564.
- Freeman, B.A., Crapo, J.D., 1982. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation* 47, 412-426.

- Freire, C.A., Onken, H., McNamara, J.C., 2008. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 151, 272-304.
- Frengstad, B., Midtgard Skrede, A.K., Banks, D., Reidar Krog, J., Siewers, U., 2000. 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 International* 246, 21-40.
- Frutiger, a., Borner, S., Busser, T., Eggen, R., Muller, R., Muller, S., Wasmer, H.R., 1999. How to control unwanted populations of *Procambarus clarkii* in Central Europe. Proceedings of the 12th Symposium, International Association of Astacology, Augsburg, Bavaria, Germany. *Freshwater Crayfish*. 12, 714-726.
- Gagnaire, B., Boyer, P., Bonzom, J.M., Lecomte-Pradines, C., Simon, O., Gilbin, R., 2011. Transfer modelling and toxicity evaluation of the effluent from an installation of cleansing and uranium recovery using a battery of bioassays. *Ecotoxicology* 20, 187-201.
- Gao, L., Laude, K., Cai, H., 2008. Mitochondrial Pathophysiology, Reactive Oxygen Species, and Cardiovascular Diseases. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* 38, 137-155.
- Garceau, N., Pichaud, N., Couture, P., 2010. Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquatic Toxicology* 98, 107-112.
- Garcia-Santos, S., Fontainhas-Fernandes, A., Wilson, J.M., 2006. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: Assessment of some ionoregulatory parameters. *Environmental Toxicology* 21, 33-46.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D., 2003. Reactive oxygen species. How oxygen may become toxic? *Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique?*, 91-96.
- Garnier-Laplace J, Della-Vedova C, Gilbin R, Copplestone D, Hingston J, Ciffroy P, 2006. First derivation of predicted-no-effect values for freshwater and terrestrial ecosystems exposed to radioactive substances. *Environmental Science and Technology* 40: 6498-6505.
- Garnier-Laplace, J., Colle, C., Morello, M., 2001. in Fiche radionucléide: Uranium naturel et environnement. Rapport IRSN, direction de l'environnement et de l'intervention-service d'étude du comportement des radionucléides dans les écosystèmes., 16 p.

- Garnier-Lapalace, 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. 2001.IPSN, 63p.
- Garvey, J.E., Stein, R.A., Thomas, H.M., 1994. Assessing how fish predation and interspecific prey competition influence a crayfish assemblage. *Ecology* 75, 532-547.
- Geffard, A., Sartelet, H., Garric, J., Biagianti-Risbourg, S., Delahaut, L., Geffard, O., 2010. Subcellular compartmentalization of cadmium, nickel, and lead in *Gammarus fossarum*: Comparison of methods. *Chemosphere* 78, 822-829.
- Gherardi, F., 2006. Crayfish invading Europe: the case study of *Procambarus clarkii*. *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology* 39, 175-191.
- Gherardi, F., Vadim, P., 2006. Data sheet *Procambarus clarkii*. DAISIE (Delivering Alien Invasive Species inventories for Europe). http://www.europe-aliens.org/pdf/Procambarus_clarkii.pdf [Accessed 7 January 2011]
- Giovanetti A, Fesenkob S, Cozzellac ML, Asenciod LD, Sansone U, 2010. Bioaccumulation and biological effects in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to natural and depleted uranium. *Journal of Environmental Radioactivity* 101: 509-516.
- Goertzen MM, Driessnack MK, Janz DM, Weber LP. 2011. Swimming performance and energy homeostasis in juvenile laboratory raised fathead minnow (*Pimephales promelas*) exposed to uranium mill effluent. *Comparative Biochemistry Physiology part C* 154: 420-426.
- Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 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.
- Gough, J., 1931. Mitochondrial changes in experimental oxalate and uranium nephritis. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 34, 423-428.
- Grouselle, M., Boudou, A., Oreja-Erroz, B., 1996. Cadmium uptake in a single MDCK cell evidenced by fura-2 titration. A fluorescence digital imaging study. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences - Series III*. 319, 277-287.
- Guan, R., Wang, W.X., 2004. Cd and Zn uptake kinetics in *Daphnia magna* in relation to Cd exposure history. *Environmental Science and Technology* 38, 6051-6058.
- Gutteridge, J.M.C., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 41, 1819-1828.
- Hamer, D.H., 1986. Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* 55, 913-951.

- Hagger, J.A., Jones, M.B., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T.S., 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: Are there more questions than answers? *Integrated Environmental Assessment and Management* 2, 312-329.
- Haq, F., Mahoney, M., Koropatnick, J., 2003. Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 533, 211-226.
- Hartwell, L.H., Weinert, T.A., 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.
- Hartwig, A., Asmuss, M., Ehleben, I., Herzer, U., Kostelac, D., Pelzer, A., Schwerdtle, T., Bürkle, A., 2002. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: Molecular mechanisms. *Environmental Health Perspectives* 110, 797-799.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, pp. 51-88.
- Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1995. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part II. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30, 521-600.
- He, X., Nie, X., Wang, Z., Cheng, Z., Li, K., Li, G., Hung Wong, M., Liang, X., Tsui, M.T.K., 2011. Assessment of typical pollutants in waterborne by combining active biomonitoring and integrated biomarkers response. *Chemosphere* 84, 1422-1431.
- Heintze E, Aguilera C, Davis M, Fricker A, Li Q, Martinez J, Gage MJ, 2011. Toxicity of depleted uranium complexes is independent of p53 activity. *Journal of Inorganic Biochemistry* 105: 142-148.
- Henttonen, P., Huner, J.V., 1999. The introduction of alien species of crayfish in Europe: A historical introduction. In Gherardi, F. and Holdich, D.M. (eds.) *Crustacean Issues 11: Crayfish in Europe as Alien Species (How to make the best of a bad situation?)*. A.A. Balkema, Rotterdam, Netherlands., 13-22.
- Herberholz, J., Sen, M.M., Edwards, D.H., 2004. Escape behavior and escape circuit activation in juvenile crayfish during prey-predator interactions. *Journal of Experimental Biology* 207, 1855-1863.
- Higuera, P., Oyarzun, R., Lillo, J., Sánchez-Hernández, J.C., Molina, J.A., Esbri, J.M., Lorenzo, S., 2006. The Almadén district (Spain): Anatomy of one of the world's largest Hg-contaminated sites. *Science of the Total Environment* 356, 112-124.

- Hirai, T., 2004. Diet composition of introduced bullfrog, *Rana catesbeiana*, in the Mizorogaike Pond of Kyoto, Japan. *Ecological Research* 19, 375-380.
- Hofmann W, Kakir H, Pihet P, 2007. Internal microdosimetry of inhaled radon progeny in bronchial airways: advantages and limitations. *Radiation Protection Dosimetry* 127: 40-45.
- Hogan, A.C., Van Dam, R.A., Houston, M.A., Harford, A.J., Nou, S., 2010. Uranium exposure to the tropical duckweed *Lemna aequinoctialis* and Pulmonate snail *Amerianna cumingi*: Fate and toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 59, 204-215.
- Holdich, D.M., 1993. A review of astaciculture: freshwater crayfish farming. *Aquatic Living Resources* 6, 307-317.
- Holdich, D.M., 2002. Distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries. *Bulletin Francais de la Peche et de la Protection des Milieux Aquatiques*, 611-650.
- Horwitz, P., 1994. Distribution and conservation status of the Tasmanian giant freshwater lobster *Astacopsis gouldi* (*Decapoda: Parastacidae*). *Biological Conservation* 69, 199-206.
- Hosseini A, Thorrying H, Brown JE, Saxen R, Ilus E, 2008. Transfer of radionuclides in aquatic ecosystem-default concentration ratios for aquatic biota in the Erica tool. *Journal of Environmental Radioactivity* 99: 1408-1429.
- Hothem, R.L., Bergen, D.R., Bauer, M.L., Crayon, J.J., Meckstroth, A.M., 2007. Mercury and trace elements in crayfish from northern California. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79, 628-632.
- Huettenbrenner, S., Maier, S., Leisser, C., Polgar, D., Strasser, S., Grusch, M., Krupitza, G., 2003. The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 543, 235-249.
- Huner, J.V., 1978. crawfish population dynamics as they affect production in several small, open commercial crawfish ponds in Louisiana. *Proceedings of the annual meeting - World Mariculture Society* 9, 617-640.
- Huner, J.V., Romaine, R.P., 1979. Size at maturity as a means of comparing populations of *Procambarus clarkii* (Girard) (*Crustacea, Decapoda*) from different habitats. *Freshwater Crayfish*. 4, 53-64.
- Huxley, T., 1880. L'écrevisse l'introduction à la zoologie. Librairie Gremer Baillière. *Bibliothèque scientifique internationale*, 260.
- IRSN, 2009. Fiche N°1 l'extraction de l'uranium en France: données et chiffres clés.6p.

- Issartel, J., Boulo, V., Wallon, S., Geffard, O., Charmantier, G., 2010. Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Chemosphere* 81, 701-710.
- ISSG, Global Invasive Species Database.
 <<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=608&fr=1&sts=&lang=FR>>
 [Accessed 08 septembre 2011].
- Iszard, M.B., Liu, J., Klaassen, C.D., 1995. Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats. *Toxicology* 104, 25-33.
- Ivanina, A.V., Habinck, E., Sokolova, I.M., 2008. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 148, 72-79.
- Jackson, T., Macgillivray, A., 1995. Accounting for cadmium: tracking emissions of cadmium from the global economy. *Chemistry & Ecology* 11, 137-181.
- Jacobi, H., Eicke, B., Witte, I., 1998. DNA strand break induction and enhanced cytotoxicity of propyl gallate in the presence of copper(II). *Free Radical Biology and Medicine* 24, 972-978.
- Jemai, H., Messaoudi, I., Chaouch, A., Kerkeni, A., 2007. Protective effect of zinc supplementation on blood antioxidant defense system in rats exposed to cadmium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21, 269-273.
- Jensen, S.J.K., 2003. Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 666-667, 387-392.
- Jia, X., Zhang, H., Liu, X., 2010. Low levels of cadmium exposure induce DNA damage and oxidative stress in the liver of Oujiang colored common carp *Cyprinus carpio* var. *color*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1-7.
- Jiang, G.C.T., Hughes, S., Sturzenbaum, S.R., Evje, L., Syversen, T., Aschner, M., 2009. *Caenorhabditis elegans* metallothioneins protect against toxicity induced by depleted uranium. *Toxicological Sciences* 111, 345-354.
- Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65-87.
- Jones, D., Domotor, S., Higley, K., Kocher, D., Bilyard, G., 2003. Principles and issues in radiological ecological risk assessment. *Journal of Environmental Radioactivity* 66, 19-39.

- Jurczuk, M., Brzóška, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Gałazyn-Sidorczuk, M., Kulikowska-Karpińska, E., 2004. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food and Chemical Toxicology* 42, 429-438.
- Kaiser, H., Rice, J., 1974. Little jiffy mark IV. *Educational and Psychological Measurement*. 34, 111-117.
- Kaplan, E.L., 1983. in a retrospective on the seminal paper in "This week's citation classic". *Current Contents* 24.
- Kelly, J.M., Janz, D.M., 2009. Assessment of oxidative stress and histopathology in juvenile northern pike (*Esox lucius*) inhabiting lakes downstream of a uranium mill. *Aquatic Toxicology* 92, 240-249.
- Kerby, J.L., Riley, S.P.D., Kats, L.B., Wilson, P., 2005. Barriers and flow as limiting factors in the spread of an invasive crayfish (*Procambarus clarkii*) in southern California streams. *Biological Conservation*. 126, 402-409.
- Khan, F.R., Bury, N.R., Hogstrand, C., 2010. Cadmium bound to metal rich granules and exoskeleton from *Gammarus pulex* causes increased gut lipid peroxidation in zebrafish following single dietary exposure. *Aquatic Toxicology* 96, 124-129.
- Khangarot, B.S., Das, S., 2009. Acute toxicity of metals and reference toxicants to a freshwater ostracod, *Cypris subglobosa Sowerby*, 1840 and correlation to EC50 values of other test models. *Journal of Hazardous Materials* 172, 641-649.
- Klaassen, C.D., Liu, J., 1997. Role of metallothionein in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Drug Metabolism Reviews* 29, 79-102.
- Knapen D, Reynders, Bervoets, Verheyen E, Blust R, 2007. Metallothionein gene and protein expression as a biomarker for metal pollution in natural gudgeon populations. *Aquatic Toxicology* 3: 163-172.
- Koliadima, A., Karaiskakis, G., 1990. Coastal water pollution : dissolved heavy metals and suspended particulate matter. *Multilingue* 23, 102-105.
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *Journal of Biological Chemistry* 257, 5751-5754.
- Korte, F., 1983. Ecotoxicology of cadmium: General overview. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 7, 3-8.
- Kouba, A., Buřič, M., Kozák, P., 2010. Bioaccumulation and effects of heavy metals in crayfish: A review. *Water, Air, and Soil Pollution* 211, 5-16.

- Kovacević, T.B., Borković, S.S., Pavlović, S.Z., Despotović, S.G., Sačić, Z.S., 2008. Glutathione as a suitable biomarker in hepatopancreas, gills and muscle of three freshwater crayfish species. *Archives of Biological Sciences* 60, 59-66.
- Kratz, S., Schnug, E., 2006. Rock phosphates and P fertilizers as sources of U contamination in agricultural soils. In *Uranium in the Environment*, 57-67.
- Kuhne, W.W., Caldwell, C.A., Gould, W.R., Fresquez, P.R., Finger, S., 2002. Effects of depleted uranium on the health and survival of *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2198-2203.
- Kurochkin, I.O., Etzkorn, M., Buchwalter, D., Leamy, L., Sokolova, I.M., 2010. Top-down control analysis of the cadmium effects on molluscan mitochondria and the mechanisms of cadmium-induced mitochondrial dysfunction. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 300, R21-R31.
- Kurtio, 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.
- Kurun A, Balkis N, Erkam M, Balkis H, Aksu, Ersan MS, 2010. Total metal levels in crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823), and surface sediments in lake Terkos, Turkey. *Environmental monitoring and assessment* 169: 385-395.
- Labrot, F., Narbonne, J.F., 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.
- Labrot, F., Ribera, D., Saint Denis, M., Narbonne, J.F., 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: Lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers* 1, 21-28.
- Lacroix, G.L., Peterson, R.H., Susan Belfry, C., Martin-Robichaud, D.J., 1993. Aluminum dynamics on gills of Atlantic salmon fry in the presence of citrate and effects on integrity of gill structures. *Aquatic Toxicology* 27, 373-401.
- Lagadic, L., Amiard, J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In *Biomarqueurs en Ecotoxicologie. Aspects Fondamentaux*. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.). Paris, Masson, 1-9.
- Lagadic, L., Caquet, T., 1996. Marqueurs biologiques de pollution: des outils au service de l'écotoxicologie. *Phytoma - La Défense des Végétaux* 480, 10-13.

- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J., Ramade, F., 1998. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Ed Tec & Doc.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Paris, Masson, 418 p.
- Lagauzère, S., Terrail, R., Bonzom, J.M., 2009. Ecotoxicity of uranium to *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Clitellata, Tubificidae) exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 527-537.
- Lassalle, P., 1985. Echelle de développement, cuticulogénèses et écdystéroïdes chez l'embryon de l'écrevisse *Astacus (Pontastacus) Leptodactylus* Eschscholtz 1823. Université Bordeaux 1. 2105, 59 p.
- Lei, W., Wang, L., Liu, D., Xu, T., Luo, J., 2011. Histopathological and biochemical alternations of the heart induced by acute cadmium exposure in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. *Chemosphere* 84, 689-694.
- Lerebours, A., Adam-Guillermin, C., Brèthes, D., Frelon, S., Floriani, M., Camilleri, V., Garnier-Laplace, J., Bourdineaud, J.P., 2010 a. Mitochondrial energetic metabolism perturbations in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium. *Aquatic Toxicology* 100 66-74.
- Lerebours, A., Bourdineaud, J.P., Van Der Ven, K., Vandembrouck, T., Gonzalez, P., Camilleri, V., Floriani, M., Garnier-Laplace, J., Adam-Guillermin, C., 2010 b. Sublethal effects of waterborne uranium exposures on the zebrafish brain: Transcriptional responses and alterations of the olfactory bulb ultrastructure. *Environmental Science and Technology* 44, 1438-1443.
- Lerebours, A., Gonzalez, P., Adam, C., Camilleri, V., Bourdineaud, J.P., Garnier-Laplace, J., 2009. 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* 28, 1271-1278.
- Lewis, P.A., Horning II, W.B., 1991. Differences in acute toxicity test results of three reference toxicants on *Daphnia* at two temperatures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10, 1351-1357.
- Li, J., Yan, B., Liu, N., Wang, Q., Wang, L., 2010. Effects of cadmium on apoptosis of hepatopancreas cell in freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense*. *Huanjing Kexue Xuebao/Acta Scientiae Circumstantiae* 30, 2277-2284.

- Li, L., Zheng, B., Liu, L., 2010. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: Definitions, approaches and trends. *Procedia Environmental Sciences*, Beijing, pp. 1510-1524.
- Li, M., Kondo, T., Zhao, Q.L., Li, F.J., Tanabe, K., Arai, Y., Zhou, Z.C., Kasuya, M., 2000. Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca²⁺-calpain and caspase-mitochondriaindependent pathways. *Journal of Biological Chemistry* 275, 39702-39709.
- Li, Z., Neufeld, G.J., 2001. Isolation and characterization of mitochondrial F1-ATPase from crayfish (*Orconectes virilis*) gills. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 128, 325-338.
- Liberge, M., Barthélémy, R.M., 2007. Localization of metallothionein, heat shock protein (Hsp70), and superoxide dismutase expression in Hemidiaptomus roubaui (Copepoda, Crustacea) exposed to cadmium and heat stress. *Canadian Journal of Zoology* 85, 362-371.
- Lide, D.R., 1998-1999. *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press LLC 79th Edition.
- Limson Zamora, M., Tracy, B.L., Zielinski, J.M., Meyerhof, D.P., Moss, M.A., 1998. Chronic ingestion of uranium in drinking water: A study of kidney bioeffects in humans. *Toxicological Sciences* 43, 68-77.
- Lin, r.H., Wu, L.J., Lee, C.H., Lin-Shiau, S.Y., 1993. Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology Testing and Biomonitoring of Environmental or Occupational Exposure* 319, 197-203.
- Lindqvist, O.V., Huner, J.V., 1999. Life history characteristics of crayfish: What makes some of them good colonisers? . In Gherardi, F. and Holdich, D.M. (eds.) *Crustacean Issues 11: Crayfish in Europe as Alien Species (How to make the best of a bad situation?)* A.A. Balkema, Rotterdam, Netherlands, 23-31.
- Liu, J., Qu, W., Kadiiska, M.B., 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238, 209-214.
- Liu, T., He, W., Yan, C., Qi, Y., Zhang, Y., 2011. Roles of reactive oxygen species and mitochondria in cadmium-induced injury of liver cells. *Toxicology and Industrial Health* 27, 249-256.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- Δ CT method. *Methods* 25., 402-408.
- Lodge, D.M., Rosenthal, S.K., Mavuti, K.M., Muohi, W., Ochieng, P., Stevens, S.S., Mungai, B.N., Mkoji, G.M., 2005. Louisiana crayfish (*Procambarus clarkii*) (Crustacea:

- Cambaridae) in Kenyan ponds: non-target effects of a potential biological control agent for schistosomiasis. *African Journal of Aquatic Science*. 30, 119-124.
- Loffredo, N., 2011. Devenir du séléniate dans les sols : mise en évidence expérimentale et modélisation des phénomènes d'hystérèse de sorption/désorption. IRSN-2011/143. 259 p.
- Loizzi, R.F., 1971. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 113, 420-440.
- Lourenço, J., Castro, B.B., MacHado, R., Nunes, B., Mendo, S., Gonçalves, F., Pereira, R., 2010. Genetic, biochemical, and individual responses of the teleost fish *Carassius auratus* to uranium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 1023-1031.
- Lukhaup, C., 2005. Crusta 10:
http://www.crusta10.de/templates/index.php?sideid=galerie&showpicture=850&galerie_id=141&lang_id=1&showid=36&katid=2
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? *Biodynamics as a unifying concept*. *Environmental Science and Technology* 39, 1921-1931.
- Lyon, R., Simkiss, K., 1984. The ultrastructure and metal-containing inclusions of mature cell types in the hepatopancreas of a crayfish. *Tissue and Cell* 16, 805-817.
- Ma, W., Wang, L., He, Y., Yan, Y., 2008. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanense* during acute exposure to waterborne cadmium. *Environmental Toxicology* 23, 393-400.
- Madic, C., Genet, M., 2001. Propriétés physiques et chimiques de l'uranium (Chapitre 2), in EDP Science, ed., *L'uranium de l'environnement à l'Homme: Collection IPSN: Les Ulis*. 43-82.
- Mahler, B.J., Van Metre, P.C., Callender, E., 2006. Trends in metals in urban and reference lake sediments across the United States, 1970 to 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1698-1709.
- Manca, D., Ricard, A.C., Tra, H.V., Chevalier, G., 1994. Relation between lipid peroxidation and inflammation in the pulmonary toxicity of cadmium. *Archives of Toxicology* 68, 364-369.
- Mantel, L.H., Farmer, L.L., 1983. Osmotic and ionic regulation. in: Mantel L.H. (ed) *The biology of Crustacea* 5, Academic Press, New York, 53-161.

- Manyin, T., Rowe, C.L., 2008. Modeling effects of cadmium on population growth of *Palaemonetes pugio*: Results of a full life cycle exposure. *Aquatic Toxicology* 88, 111-120.
- Mao, Y., Desmeules, M., Schaubel, D., Bérubé, D., Dyck, R., Brûlé, D., Thomas, B., 1996. Inorganic components of drinking water and microalbuminuria. *Environmental Research* 71, 135-140.
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique* 56, 358-392.
- Markich, S.J., 2002. Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *TheScientificWorldJournal* [electronic resource] 2, 707-729.
- Markich, S.J., Brown, P.L., Jeffree, R.A., 1996. The Use of Geochemical Speciation Modelling to Predict the Impact of Uranium to Freshwater Biota. *Radiochimica Acta* 74, 321-326.
- Markich, S.J., Brown, P.L., Jeffree, R.A., Lim, R.P., 2000. Valve movement responses of *Velesunio angasi* (*Bivalvia: Hyriidae*) to manganese and uranium: An exception to the free ion activity model. *Aquatic Toxicology* 51, 155-175.
- Marques, S.M., Gonçalves, F., Pereira, R., 2008. Effects of a uranium mine effluent in the early-life stages of *Rana perezi* Seoane. *Science of the Total Environment* 402, 29-35.
- Martin, D.J., Rainbow, P.S., 1998. The kinetics of zinc and cadmium in the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Aquatic Toxicology* 40, 203-231.
- Martin-Diaz, M.L., Bamber, S., Casado-Martínez, C., Sales, D., DelValls, T.A., 2004. Toxicokinetics of heavy metals from a mining spill using *Carcinus maenas*. *Marine Environmental Research* 58, 833-837.
- Martín-Díaz, M.L., Tuberty, S.R., McKenney Jr, C.L., Blasco, J., Sarasquete, C., DelValls, T.A., 2006. The use of bioaccumulation, biomarkers and histopathology diseases in shape *Procambarus clarkii* to establish bioavailability of Cd and Zn after a mining spill. *Environmental Monitoring and Assessment* 116, 169-184.
- Martin-Diaz, M.L., Villena-Lincoln, A., Bamber, S., Blasco, J., DelValls, T.A., 2005. An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, *Carcinus maenas*. *Chemosphere* 58, 615-626.
- Martin-Garin, A., Simon O., Adam, C., 2004. Fiche radionucléides-Cd 109 et environnement. Direction de l'environnement et de l'intervention-Service d'étude du comportement des radionucléides dans les écosystèmes. IRSN, 14.

- Martins, J., Oliva Teles, L., Vasconcelos, V., 2007. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International* 33, 414-425.
- Massabuau, J.C., 1984. Etude des mécanismes de la régulation respiratoire chez l'Ecrevisse. *Université de Strasbourg* 1, No : 1535, 184 p.
- Massabuau, J.C., Burtin, B., 1984. Regulation of oxygen consumption in the crayfish *Astacus leptodactylus* at different levels of oxygenation: role of peripheral O₂ chemoreception. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 155, 43-49.
- Massabuau, J.C., Eclancher, B., Dejours, P., 1980. Ventilatory Reflex Response to Hyperoxia in the Crayfish, *Astacus pallipes*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 140, 193-198.
- Massarin, S., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., Poggiale, J.C., 2010. Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. *Aquatic Toxicology* 99, 309-319.
- Massarin, S., Beaudouin, R., Zeman, F., Floriani, M., Gilbin, R., Alonzo, F., Pery, A.R.R., 2011. Biology-based modeling to analyze uranium toxicity data on *Daphnia magna* in a multigeneration study. *Environmental Science and Technology* 45, 4151-4158.
- Mathews T, Beaugelin-Seiller K, Garnier-Laplace, Gilbin R, Adam C, Della-Vedo C. 2008. A probabilistic assessment of the chemical and radiological risks of chronic exposure to uranium in freshwater ecosystems. *Environmental Science and Technology* 43: 6684-6690.
- McAleer, M.F., Tuan, R.S., 2001a. Metallothionein overexpression in human trophoblastic cells protects against cadmium-induced apoptosis. *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research* 14, 25-42.
- McAleer, M.F., Tuan, R.S., 2001b. Metallothionein protects against severe oxidative stress-induced apoptosis of human trophoblastic cells. *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research* 14, 219-231.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., Wasiak, S., 2006. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology* 16, R551-R560
- McClain, D.E., Benson, K.A., Dalton, T.K., Ejnik, J., Emond, C.A., Hodge, S.J., Kalinich, J.F., Landauer, M.A., Miller, A.C., Pellmar, T.C., Stewart, M.D., Villa, V., Xu, J., 2001. Biological effects of embedded depleted uranium (DU): Summary of Armed Forces Radiobiology Research Institute research. *Science of the Total Environment* 274, 115-118.

- Melville, G.E., 1995. Changes in the pelagic crustacean zooplankton of high-boreal Island Lake, Saskatchewan, associated with uranium mining. *Environmental Monitoring and Assessment* 34, 45-58.
- Meyer, W., Kretschmer, M., Hoffmann, A., Harisch, G., 1991. Biochemical and histochemical observations on effects of low-level heavy metal load (lead, cadmium) in different organ systems of the freshwater crayfish, *Astacus astacus* L. (*Crustacea: Decapoda*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21, 137-156.
- Miccadei, S., Floridi, A., 1993. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport by cadmium. *Chemico-Biological Interactions* 89, 159-167.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J., 1994. Importance of se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 17, 235-248.
- Michon, J., Frelon, S., Garnier, C., Coppin, F., 2010. Determinations of uranium (VI) binding properties with some metalloproteins (transferrin, albumin, metallothionein and ferritin) by fluorescence quenching. *Journal of Fluorescence* 20, 581-590.
- Milani, D., Reynoldson, T.B., Borgmann, U., Kolasa, J., 2003. The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 845-854.
- Milgram, S., Carrière, M., Thiebault, C., Berger, P., Khodja, H., Gouget, B., 2007. Cell-metal interactions: A comparison of natural uranium to other common metals in renal cells and bone osteoblasts. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 260, 254-258.
- Miller, A.C., Stewart, M., Brooks, K., Shi, L., Page, N., 2002. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: Absence of significant alpha particle decay. *Journal of Inorganic Biochemistry* 91, 246-252.
- Miller, A.C., Xu, J., Stewart, M., et al., 2002. Potential late health effects of depleted uranium and tungsten used in armor-piercing munitions: Comparison of neoplastic transformation and genotoxicity with the known carcinogen nickel. *Military Medicine* 167, 120-122.
- Miossec, G., 2004. Pistes de valorisation de deux espèces animales envahissantes: Le Ragondin, L'écrevisse de Louisiane. in *Etude prospective*. ed. Forum des Marais Atlantiques, Quai aux Vivres, Rochefort., 20 p.
- Miranda-Anaya, M., 2004. Circadian locomotor activity in freshwater decapods: An ecological approach. *Biological Rhythm Research* 35, 69-78.

- Mkoji, G.M., Hofkin, B.V., Kuris, A.M., Stewart-Oaten, A., Mungai, B.N., Kihara, J.H., Mungai, F., Yundu, J., Mbui, J., Rashid, J.R., Kariuki, C.H., Ouma, J.H., Koech, D.K., Loker, E.S., 1999. Impact of the crayfish *Procambarus clarkii* on *Schistosoma haematobium* transmission in Kenya. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*. 61, 751-759.
- Momose, Y., Iwahashi, H., 2001. Bioassay of cadmium using a DNA microarray: Genome-wide expression patterns of *Saccharomyces cerevisiae* response to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2353-2360.
- Momot, W.T., 1995. Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Reviews in fisheries science* 3, 33-63.
- Morel, F.M.M., 1983. Principles of aquatic chemistry. Wiley-Interscience, New-York. , 301 p.
- Morin, S., Vivas-Nogues, M., Thi, T.D., Boudou, A., Coste, M., Delmas, F., 2007. Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Fundamental and Applied Limnology* 168, 179-187.
- Moss, J.C., Hardaway, C.J., Richert, J.C., Sneddon, J., 2010. Determination of cadmium copper, iron, nickel, lead and zinc in crawfish [*Procambrus clarkii*] by inductively coupled plasma optical emission spectrometry: a study over the 2009 season in Southwest Louisiana. *Microchemical Journal* 95, 5-10.
- Moustacchi, E., 1999. DNA repair pathways and dose responses to ionizing radiations. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 322, 139-141.
- Muhlia-Almazan, A., Martinez-Cruz, O., Navarrete Del Toro, M.D.L.A., Garcia-Carreno, F., Arreola, R., Sotelo-Mundo, R., Yepiz-Plascencia, G., 2008. Nuclear and mitochondrial subunits from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* F0F1 ATP-synthase complex: CDNA sequence, molecular modeling, and mRNA quantification of *atp9* and *atp6*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40, 359-369.
- Muller, L., 1986. Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: Mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Toxicology* 40, 285-295.
- Muriana, F.J.G., Ruiz-Gutierrez, V., Gallardo-Guerrero, M.L., Minguez-Mosquera, M.I., 1993. A study of the lipids and carotenoprotein in the prawn, *Penaeus japonicus*. *Journal of Biochemistry* 114, 223-229.

- Naqvi, S.M., Howell, R.D., 1993. Toxicity of cadmium and lead to juvenile red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, and effects on fecundity of adults. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 303-308.
- NatureServe, 2003. NatureServe Explorer: An online encyclopedia of life [Online Database]. Version 1.8. NatureServe, Arlington, Virginia.
http://www.natureserve.org/explorer/servlet/NatureServe?loadTemplate=tabular_report.wmt&paging=home&save=all&sourceTemplate=reviewMiddle.wmt [Accessed 22 August 2003].
- NEA-IAEA, 2010. Uranium Group, Uranium 2009 : Resources, Production and Demand. OECD Nuclear Energy Agency, Paris, 456.
- Neumann NF, Galvez F, 2002. DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology ? *Biotechnology Advances* 20: 319-419.
- Nevière, R., 2008. Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Physiopathologie mitochondriale et syndrome septique. Réanimation.* 17, 185-191.
- Newairy, A.A., El-Sharaky, A.S., Badreldeen, M.M., Eweda, S.M., Sheweita, S.A., 2007. The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. *Toxicology* 242, 23-30.
- Niyogi, S., Wood, C.M., 2004. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environmental Science and Technology* 38, 6177-6192.
- Novelli Filho, J.L.V.B., Novelli, E.L.B., Manzano, M.A., Lopes, A.M., Cataneo, A.C., Barbosa, L.L., Ribas, B.O., 2000. Effect of α -tocopherol on superoxide radical and toxicity of cadmium exposure. *International Journal of Environmental Health Research* 10, 125-134.
- Nunez-Nogueira, G., Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S., 2006. Subcellular distribution of zinc and cadmium in the hepatopancreas and gills of the decapod crustacean *Penaeus indicus*. *Marine Biology* 150, 197-211.
- Ochi, T., Takahashi, K., Ohsawa, M., 1987. Indirect evidence for the induction of a prooxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction. *Mutation Research* 180, 257-266.
- Oliveira, J., Fabiao, A., 1998. Growth responses of juvenile red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* Girard, to several diets under controlled conditions. *Aquaculture Research.* 29, 123-129.

- Olsson, K., Nyström, P., Stenroth, P., Nilsson, E., Svensson, M., Granéli, W., 2008. The influence of food quality and availability on trophic position, carbon signature, and growth rate of an omnivorous crayfish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 65, 2293- 2304.
- Orloff, K.G., Mistry, K.C., P., Metcalf, S., Marino, R., Shelly, T., Melaro, E., Donohoe, A.M., Jones, R.L., 2004. Human exposure to uranium in groundwater. *Environmental Research* 94, 319-326.
- Orsière, T., Sari-Minodier, I., Decome, L., Botta, C., Iarmarcovai, G., Botta, A., 2005. De la génotoxicologie à la biosurveillance. 28èmes journées nationales de santé au travail dans le BTP : Cancérogènes et BTP., 25-28.
- Osterauer, R., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2010. Histopathological alterations and induction of hsp70 in ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*) and zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to PtCl₂. *Aquatic Toxicology* 99, 100-107.
- Overnell, J., Good, M., Vašák, M., 1988. Spectroscopic studies on cadmium (II)- and cobalt(II)-substituted metallothionein from the crab *Cancer pagurus*. Evidence for one additional low-affinity metal-binding site. *European Journal of Biochemistry* 172, 171-177.
- Pal, S., Pal, P.B., Das, J., Sil, P.C., 2011. Involvement of both intrinsic and extrinsic pathways in hepatoprotection of arjunolic acid against cadmium induced acute damage in vitro. *Toxicology* 283, 129-139.
- Palmiter, R.D., 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8428-8430.
- Pandey, S., Parvez, S., Ansari, R.A., Ali, M., Kaur, M., Hayat, F., Ahmad, F., Raisuddin, S., 2008. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Chemico-Biological Interactions* 174, 183-192.
- Paolucci, M., Di Cristo, C., Liberato, C., Di Cosmo, A., 2004. First results about topoisomerase activity in *Astacus astacus* and *Austropotamobius pallipes* as a biomarker for crayfish viability. *BFPP - Bulletin Francais de la Peche et de la Protection des Milieux Aquatiques*, 401-408.
- Parnes, S., Khalaila, I., Hulata, G., Sagi, A., 2003. Sex determination in crayfish: Are intersex *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae) genetically females? *Genetical Research* 82, 107-116.

- Paul-Pont, I., 2010. Sensibilité et adaptation de populations de bivalves marins soumis à des stress multiples : infestation parasitaire, contamination microbienne et pollution métallique. Université de Bordeaux 1, 4008: 339 p.
- Paul-Pont, I., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Nili, H., de Montaudouin, X., 2010. Short-term metallothionein inductions in the edible cockle *Cerastoderma edule* after cadmium or mercury exposure: Discrepancy between mRNA and protein responses. *Aquatic Toxicology* 97, 260-267.
- Pedersen, S.N., Pedersen, K.L., Højrup, P., Depledge, M.H., Knudsen, J., 1996. Primary structures of decapod crustacean metallothioneins with special emphasis on freshwater and semi-terrestrial species. *Biochemical Journal* 319, 999-1003.
- Pedersen, S.N., Pedersen, K.L., Højrup, P., Knudsen, J., Depledge, M.H., 1998. Induction and identification of cadmium-, zinc- and copper-metallothioneins in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 120, 251-259.
- Perceval, O., Couillard, Y., Pinel-Alloul, B., Campbell, P.G.C., 2006. Linking changes in subcellular cadmium distribution to growth and mortality rates in transplanted freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*). *Aquatic Toxicology* 79, 87-98.
- Periyakaruppan, A., Kumar, F., Sarkar, S., Sharma, C.S., Ramesh, G.T., 2007. Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells. *Archives of Toxicology* 81, 389-395.
- Periyakaruppan, A., Sarkar, S., Ravichandran, P., Sadanandan, B., Sharma, C.S., Ramesh, V., Hall, J.C., Thomas, R., Wilson, B.L., Ramesh, G.T., 2009. Uranium induces apoptosis in lung epithelial cells. *Archives of Toxicology* 83, 595-600.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Bourdineaud, J.P., Elie, P., Massabuau, J.C., 2007. Common pattern of gene expression in response to hypoxia or cadmium in the gills of the European glass eel (*Anguilla anguilla*). *Environmental Science and Technology* 41, 3005-3011.
- Pierron, F., Bourret, V., St-Cyr, J., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2009. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). *Ecotoxicology* 18, 620-631.
- Pierron, F., Normandeau, E., Defo, M., Campbell, P., Bernatchez, L., Couture, P., 2011. Effects of chronic metal exposure on wild fish populations revealed by high-throughput cDNA sequencing. *Ecotoxicology* 20, 1388-1399.

- Pillai, S., Menon, N.R., 1998. Structural alterations accompanying acute and chronic toxicity of heavy metal exposure in hepatopancreas of green mussel *Perna viridis* (Class-Pelecypoda). *Indian Journal of Marine Sciences* 27, 416-420.
- Pinot, F., Kreps, S.E., Bachelet, M., Hainaut, P., Bakonyi, M., Polla, B.S., 2000. Cadmium in the environment: Sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. *Reviews on Environmental Health* 15, 299-323.
- Pinto, A.L., Varandas, S., Coimbra, A.M., Carrola, J., Fontáinhas-Fernandes, A., 2010. Mullet and gudgeon liver histopathology and macroinvertebrate indexes and metrics upstream and downstream from a wastewater treatment plant (Febros River-Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment* 169, 569-585.
- Poston, T.M., Hanf, R.W., Simmons, M.A., 1984. Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. *Water, Air, and Soil Pollution* 22, 289-298.
- Pourahmad, J., Ghashang, M., Ettehad, H.A., Ghalandari, R., 2006. A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity. *Environmental Toxicology* 21, 349-354.
- Pourahmad, J., Shaki, F., Tanbakosazan, F., Ghalandari, R., Hossein Ali, E., Dahaghin, E., 2011. Protective effects of fungal β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan against oxidative stress cytotoxicity induced by depleted uranium in isolated rat hepatocytes Human and *Experimental Toxicology* 30, 173-181.
- Poynton, H.C., Taylor, N.S., Hicks, J., Colson, K., Chan, S., Clark, C., Scanlan, L., Loguinov, A.V., Vulpe, C., Viant, M.R., 2011. Metabolomics of microliter hemolymph samples enables an improved understanding of the combined metabolic and transcriptional responses of *Daphnia magna* to cadmium. *Environmental Science and Technology* 45, 3710-3717.
- Poynton, H.C., Wintz, H., Vulpe, C.D., 2008. Progress in ecotoxicogenomics for environmental monitoring, mode of action, and toxicant identification. *Advances in Experimental Biology*, pp. 21-73,322-323.
- Pulido, M.D., Parrish, A.R., 2003. Metal-induced apoptosis: Mechanisms. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 533, 227-241.
- Pyle GG, Clulow FV, 1998. Radionuclide equilibria between the aquatic environment and fish tissues. *Journal of Environmental Radioactivity* 40(1): 59-74.
- R Development Core Team, 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

- Ragnarsdottir, K.V., Charlet, L., 2000. Uranium behavior in natural environments. Environmental mineralogy: Microbial interactions, anthropogenic influences. Contaminated land and waste management. Mineral society of Great Britain & Ireland ed., 333-377.
- Rainbow, P.S., 1995. Physiology, Physiochemistry and Metal Uptake- A Crustacean Perspective. Marine Pollution Bulletin 31, 55-59.
- Rainbow, P.S., 1997. Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. Estuarine, Coastal and Shelf Science 44, 169-175.
- Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: Why and so what? Environmental Pollution 120, 497-507.
- Rainbow PS, Luoma SN. 2011. metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates-medelling zinc in crustaceans. Aquatic Toxicology 105:455-465.
- Raisonnier, A., 2004. Respiration mitochondriale. Objectifs au cours de Révisions Biochimie PCEM2. Révisions Biochimie Métabolique. Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie., <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/RMbioch/rmbioch.pdf>.
- Ramana, C.V., Boldogh, I., Izumi, T., Mitra, S., 1998. Activation of apurinic/apyrimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 5061-5066.
- Reddy, P.S., Fingerman, M., 1995. Effect of cadmium chloride on physiological color changes of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Ecotoxicology and Environmental Safety 31, 69-75.
- Reddy, P.S., Tuberty, S.R., Fingerman, M., 1997. Effects of cadmium and mercury on ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. Ecotoxicology and Environmental Safety 37, 62-65.
- Rémita, S., 2001. Radiation-induced lipid peroxidation: Factors determining the oxidizability of lipids. De la peroxydation lipidique radioinduite: Les facteurs déterminant l'oxydabilité des lipides 79, 144-153.
- Renault, S., Baudrimont, M., Mermer-Dudons, N., Gonzalez, P., Mornet, S., Brisson, A., 2008. Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: A phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). Gold Bulletin 41, 116-126.
- Reynders, H., van der Ven, K., Moens, L.N., van Remortel, P., De Coen, W.M., Blust, R., 2006. Patterns of gene expression in carp liver after exposure to a mixture of

- waterborne and dietary cadmium using a custom-made microarray. *Aquatic Toxicology* 80, 180-193.
- Ribera, D., Labrot, F., Tisnerat, G., Narbonne, J.F., 1996. Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 146, 53-89.
- Richert, J.C., Sneddon, J., 2008. Determination of heavy metals in crawfish (*Procambrus clarkii*) by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry: A study over the season in southwest Louisiana. *Analytical Letters* 41, 3198-3209.
- Risso-De Faverney, C., Orsini, N., De Sousa, G., Rahmani, R., 2004. Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: Involvement of oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 69, 247-258.
- Roast, S.D., Widdows, J., Jones, M.B., 2000. Mysids and trace metals: Disruption of swimming as a behavioural indicator of environmental contamination. *Marine Environmental Research* 50, 107-112.
- Robertson, J.D., Orrenius, S., 2000. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Critical Reviews in Toxicology* 30, 609-627.
- Rodríguez Moreno, P.A., Medesani, D.A., Rodríguez, E.M., 2003. Inhibition of molting by cadmium in the crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda Brachyura). *Aquatic Toxicology* 64, 155-164.
- Rodriguez, C.F., Becares, E., Fernandez-Alaez, M., Fernandez-Alaez, C., 2005. Loss of diversity and degradation of wetlands as a result of introducing exotic crayfish. *Biological Invasions*. 7 1, 75-85.
- Roqueplo, C., 1992. La production intensive d'écrevisses en plans d'eau. Association Française de Limnologie. Centre d'information et de formation sur l'aménagement rural. Ministère de l'agriculture et du développement rural, 40 P.
- Rost-Roszkowska, M.M., Poprawa, I., Chachulska-Zymeka, A., 2010. Apoptosis and autophagy in the midgut epithelium of *Acheta domesticus* (Insecta, Orthoptera, Gryllidae). *Zoological Science* 27, 740-745.
- Ruas, C.B.G., Carvalho, C.d.S., de Araújo, H.S., Espíndola, E.L.G., Fernandes, M.N., 2008. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 86-93.
- Saari, H.K., Schmidt, S., Huguet, S., Lanoux, A., 2008. Spatiotemporal variation of dissolved ²³⁸U in the Gironde fluvial-estuarine system (France). *Journal of Environmental Radioactivity* 99, 426-435.

- Salazar-Medina, A.J., Garcia-Rico, L., Garcia-Orozco, K.D., Valenzuela-Soto, E., Contreras-Vergara, C.A., Arreola, R., Arvizu-Flores, A., Sotelo-Mundo, R.R., 2010. Inhibition by Cu^{2+} and Cd^{2+} of a Mu-class glutathione S-transferase from shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 24, 218-222.
- Salonen, L., 1994. ^{238}U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock. *Future groundwater resources at risk*, 71-84.
- Sánchez López, F.J., Gil García, M.D., Martínez Vidal, J.L., Aguilera, P.A., Garrido Frenich, A., 2004. Assessment of Metal Contamination in Doñana National Park (Spain) using Crayfish (*Procambarus Clarkii*). *Environmental Monitoring and Assessment* 93, 17-29.
- Schlenk, D., 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin* 39, 48-53.
- Schuhmacher, M., Domingo, J.L., Llobet, J.M., Corbella, J., 1995. Variations of heavy metals in water, sediments, and biota from the delta of ebro river, Spain. *Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology* 30, 1361-1372.
- Schwaiger, J., Wanke, R.d., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebkorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health)* 6, 75-86.
- Sela, M., Tel-Or, E., Fritz, E., Huttermann, A., 1988. Localization and toxic effects of cadmium, copper, and uranium in *Azolla*. *PLANT PHYSIOL.* 88, 30-36.
- Semaan, M., Holdway, D.A., Van Dam, R.A., 2001. Comparative sensitivity of three populations of the cladoceran *Moinodaphnia macleayi* to acute and chronic uranium exposure. *Environmental Toxicology* 16, 365-376.
- Seong-Gil K, Jung-Hoon J, Ju-Chan K. 2004. Cadmium accumulation and elimination in tissues of juveniles olive flounder, *Paralichthys olivaceus* after sub chronic cadmium exposure. *Environmental Pollution* 11127:117-123.
- Shaw, J.R., Colbourne, J.K., Davey, J.C., Glaholt, S.P., Hampton, T.H., Chen, C.Y., Folt, C.L., Hamilton, J.W., 2007. Gene response profiles for *Daphnia pulex* exposed to the environmental stressor cadmium reveals novel crustacean metallothioneins. *BMC Genomics* 8 (477), 19 p.

- Sheir, S.K., Handy, R.D., 2010. Tissue injury and cellular immune responses to cadmium chloride exposure in the common mussel *Mytilus edulis*: Modulation by lipopolysaccharide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 59, 602-613.
- Sheppard, S.C., Sheppard, M.I., Gallerand, M.O., Sanipelli, B., 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity* 79, 55-83.
- Shi, H., Sui, Y., Wang, X., Luo, Y., Ji, L., 2005. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 140, 115-121.
- Silvestre, F., Dierick, J.F., Dumont, V., Dieu, M., Raes, M., Devos, P., 2006. Differential protein expression profiles in anterior gills of *Eriocheir sinensis* during acclimation to cadmium. *Aquatic Toxicology* 76, 46-58.
- Silvestre, F., Trausch, G., Pequeux, A., Devos, P., 2004. Uptake of cadmium through isolated perfused gills of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 137, 189-196.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5, 415-418.
- Simon, O., 2000. Etude des voies de contamination -directe et trophique- des organismes aquatiques continentaux par les métaux -mercure, cadmium, zinc-. Approches expérimentales au laboratoire et in situ. Université Bordeaux 1 N°2244., 171 p.
- Simon, O., Floriani, M., Cavalie, I., Camilleri, V., Adam, C., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., 2011. Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages in the chronically exposed bivalve *Corbicula fluminea*. *Journal of Environmental Radioactivity* 102, 766-773.
- Simon, O., Garnier-Laplace, J., 2005. Laboratory and field assessment of uranium trophic transfer efficiency in the crayfish *Orconectes limosus* fed the bivalve *C. fluminea*. *Aquatic Toxicology* 74, 372-383.
- Simon, O., Mottin, E., Geffroy, B., Hinton, T., 2011. Effects of dietary uranium on reproductive endpoints-fecundity, survival, reproductive success-of the fish *Danio rerio*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 220-225.
- Skurdal, J., Taugbol, T., 2001. Crayfish of commercial importance. *Astacus.in: Biology of Freshwater Crayfish*. HOLDICH D.M (ed.) 467-510 Blackwell Science, Oxford.

- šmietana, P., Krzywosz, T., 2006. Determination of the rate of growth of *Pacifastacus leniusculus* in Lake Pobledzie, using polymodal length-frequency distribution analysis. BFPP - Bulletin Francais de la Peche et de la Protection des Milieux Aquatiques, pp. 1229-1243.
- Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H., 2004. Ecotoxicogenomics: The challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 67, 143-154.
- Soegianto, A., Charmantier-Daures, M., Trilles, J.P., Charmantier, G., 1999. Impact of cadmium on the structure of gills and epipodites of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Aquatic Living Resources* 12, 57-70.
- Sokolova, I.M., Evans, S., Hughes, F.M., 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *Journal of Experimental Biology* 207, 3369-3380.
- Sokolova, I.M., Sokolov, E.P., Ponnappa, K.M., 2005. Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (*Bivalvia: Ostreidae*). *Aquatic Toxicology* 73, 242-255.
- Solé, M., Potrykus, J., Fernandez-Diaz, C., Blasco, J., 2004. Variations on stress defences and metallothionein levels in the Senegal sole, *Solea senegalensis*, during early larval stages. *Fish Physiology and Biochemistry* 30, 57-66.
- Sparla, A.M., Overnell, J., 1990. The binding of cadmium to crab cadmium metallothionein: a polarographic investigation. *Biochemical Journal* 267, 539-540.
- Spehar, R.L., Carlson, A.R., 1984. Derivation of site-specific water quality criteria for cadmium and the St. Louis River Basin, Duluth, Minnesota. *Environmental Toxicology and Chemistry* 3, 651-665.
- Staessen, J.A., Buchet, J.P., Ginucchio, G., Lauwerys, R.R., Lijnen, P., Roels, H., Fagard, R., 1996. Public health implications of environmental exposure to cadmium and lead: An overview of epidemiological studies in Belgium. *Journal of Cardiovascular Risk* 3, 26-41.
- Stark, G., 2005. Functional consequences of oxidative membrane damage. *The Journal of Membrane Biology* 205, 1-16.
- Stearns, D.M., Yazzie, M., Bradley, A.S., Coryell, V.H., Shelley, J.T., Ashby, A., Asplund, C.S., Lantz, R.C., 2005. Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis* 20, 417-423.

- Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M., Feist, S.W., 2003. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research* 55, 137-159.
- Sterling, K.M., Mandal, P.K., Roggenbeck, B.A., Ahearn, S.E., Gerencser, G.A., Ahearn, G.A., 2007. Heavy metal detoxification in crustacean epithelial lysosomes: Role of anions in the compartmentalization process. *Journal of Experimental Biology* 210, 3484-3493.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 321-336.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., 2001. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *Journal of environmental pathology, toxicology, and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* 20, 77-88.
- Stolyar, O.B., Mudraya, A.Y., Falfushinskaya, G.I., 2006. The antioxidant protection system of hepatopancreas of *astacus leptodactylus* as a biomarker of water pollution with heavy metal ions. *Hydrobiological Journal* 42, 75-81.
- Suárez-Serrano, A., Alcaraz, C., Ibáñez, C., Trobajo, R., Barata, C., 2010. *Procambarus clarkii* as a bioindicator of heavy metal pollution sources in the lower Ebro River and Delta. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 280-286.
- Systema Naturae, 2011. Created by Systema Naturae 2000 Publisher 1.1
<<http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=33804&tree=0.1>>
- Sztajnkrzyca, M.D., Otten, E.J., 2004. Chemical and Radiological Toxicity of Depleted Uranium. *Military Medicine* 169, 212-216.
- Tan, S.H., He, Y., Xie, J., Xiao, J.J., Xie, C.X., 2007. Effects of high concentration of Zn^{2+} on immunochemical variation of *procambarus clarkii*. *Journal of Ecology and Rural Environment* 23, 67-71.
- Tang, W., Shaikh, Z.A., 2001. Renal cortical mitochondrial dysfunction upon cadmium metallothionein administration to sprague-dawley rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 63, 221-235.
- Taqi Khan, M.M., Martell, A.E., 1969. Kinetics of metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid. IV. Uranyl ion catalyzed oxidation. *Journal of the American Chemical Society* 91, 4668-4672.

- Tasat, D.R., Orona, N.S., Mandalunis, P.M., Cabrini, R.L., Ubios, A.M., 2007. Ultrastructural and metabolic changes in osteoblasts exposed to uranyl nitrate. *Archives of Toxicology* 81, 319-326.
- Taulan, M., Paquet, F., Maubert, C., Delissen, O., Demaille, J., Romey, M.C., 2004. Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environmental Health Perspectives* 112, 1628-1635.
- Tayal, A.K., Kaur, I., Mathur, R.P., 2000. Bioaccumulation and localization of exogenous cadmium in a teleost by electron microscopy (TEM) and its specific quantitation by electron probe X-ray microanalysis (EPMA). *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 8, 475-482.
- Tessier, F., Marconnet, P., 1995. Free radicals, antioxidant systems and exercise. Literature review. *Sciences et sports* 10 (1), 1-13
- Thiébaud, C., Carrière, M., Milgram, S., Simon, A., Avoscan, L., Gouget, B., 2007. Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicological Sciences* 98, 479-487.
- Thompson, J., Hipwell, E., Hui, V.L., Bannigan, J., 2005. Effects of cadmium on cell death and cell proliferation in chick embryos. *Reproductive Toxicology* 20, 539-548.
- Thornalley, P.J., Vasak, M., 1985. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 827, 36-44.
- Thornton, I., 1992. Sources and pathways of cadmium in the environment. IARC scientific publications, 149-162.
- Timbrell, J.A., Draper, R., Waterfield, C.J., 1994. Biomarkers in toxicology: new uses for some old molecules? *Toxicology and Ecotoxicology News* 1, 4-14.
- Tokumoto, M., Ohtsu, T., Honda, A., Fujiwara, Y., Nagase, H., Satoh, M., 2011. DNA microarray analysis of normal rat kidney epithelial cells treated with cadmium. *Journal of Toxicological Sciences* 36, 127-129.
- Torreblanca, A., Del Ramo, J., Arnau, J.A., Diaz-Mayans, J., 1989. Cadmium, mercury, and lead effects on gill tissue of freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *Biological Trace Element Research* 21, 343-347.
- Tran, D., Ciret, P., Ciutat, A., Durrieu, G., Massabuau, J.C., 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: Application to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 914-920.

- Tran, D., Massabuau, J.C., Garnier-Laplace, J., 2008. Impact of hypoxia on hemolymph contamination by uranium in an aquatic animal, the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Environmental Pollution* 156, 821-826.
- Tricot, A., 1999. Le cadmium. *Encyclopaedia Universalis*, France.
- Triebkorn, R., Köhler, H.-R., 1996. The impact of heavy metals on the grey garden slug, *Deroceras reticulatum* (Müller): Metal storage, cellular effects and semi-quantitative evaluation of metal toxicity. *Environmental Pollution* 93, 327-343.
- Trujillo-Jiménez P, Sedeño-Díaz JE, Camargo JA, López-López E, 2011. Assessing environmental conditions of the Río Champotón (México) using diverse indices and biomarkers in the fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860). *Ecological Indicators* 11: 1636-1646.
- Untersteiner, H., Gretschel, G., Puchner, T., Napetschnig, S., Kaiser, H., 2005. Monitoring behavioral responses to the heavy metal cadmium in the marine shrimp *Hippolyte inermis* Leach (*Crustacea: Decapoda*) with video imaging. *Zoological Studies* 44, 71-80.
- USEPA., 2001. Update of ambient water quality criteria for cadmium. United States Environmental Protection Agency (USEPA). EPA-822-R-01-001. .
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12, 1161-1208.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1-40.
- Van der Lee, J., 1998. Thermodynamic and mathematical concepts of CHESS. GIG-Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau, France.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- Van Ginneken, L., Chowdhury, M.J., Blust, R., 1999. Bioavailability of cadmium and zinc to the common carp, *Cyprinus carpio*, in complexing environments: A test for the validity of the free ion activity model. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2295-2304.
- Vandegheuchte, M.B., Kyndt, T., Vanholme, B., Haegeman, A., Gheysen, G., Janssen, C.R., 2009. Occurrence of DNA methylation in *Daphnia magna* and influence of multigeneration Cd exposure. *Environment International* 35, 700-706.

- Vašák, M., 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19, 13-17.
- Verboost, P.M., Van Rooij, J., Flik, G., Lock, R.A.C., Wendelaar Bonga, S.E., 1989. The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *Journal of Experimental Biology* 145, 185-197.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and Molecular Biology* 46, 407-417.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 146, 281-300.
- Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Mazzucotelli, A., Orunesu, M., Bouquegneau, J.M., 1989. Purification and biochemical characterization of a lysosomal copper-rich thionein-like protein involved in metal detoxification in the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 93, 389-395.
- Viehweger, K., Geipel, G., Bernhard, G., 2011. Impact of uranium (U) on the cellular glutathione pool and resultant consequences for the redox status of U. *BioMetals*, 1-8.
- Vijver MG, Van Gestel CAM Lanno RP, Van Straalen NM Peijnenburg WJGM, 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. *Environmental Science and Technology* 18(38): 4705-4711.
- Vioque-Fernández, A., de Almeida, E.A., Ballesteros, J., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., López-Barea, J., 2007a. Doñana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: Esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicology Letters* 168, 260-268.
- Vioque-Fernández, A., de Almeida, E.A., López-Barea, J., 2007b. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 145, 404-412.
- Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou MJ, Valavanidis A, 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin* 54: 1361-1371.

- Vogt G, 2002. Functional anatomy. In: Holdich, D.M. (Eds.), Biology of freshwater crayfish, Blackwell Science, London, pp. 53-151.
- Vuillez, J.P., 2011. Chapitre 5: effets biologiques des rayonnements ionisants ou radiobiologie. Université Joseph Fournier-Grenoble. http://umvf.biomedicale.univ-paris5.fr/wiki/docvideos/Grenoble_1011/vuillez_jean_philippe/vuillez_jean_philippe_p05/vuillez_jean_philippe_p05.pdf.
- Wallace, W.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). Marine Ecology Progress Series 257, 125-137.
- Wang, H., Oster, G., 1998. Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. Nature 396, 279-282.
- Wang, L., Li, J., Li, J., Liu, Z., 2010. Effects of Lead and/or Cadmium on the Oxidative Damage of Rat Kidney Cortex Mitochondria. Biological trace element research. Humana Press Incorporated, pp. 69-78.
- Wang, L., Yang, X., Wang, Q., Wang, D.-X., 2001. The accumulation of Cd²⁺ and the effect of EST in five tissues and organs of *Eriocheir sinensis*. Acta Zoologica Sinica. 47, 96-100.
- Wang, M.-H., Wang, G.-Z., 2009. Biochemical Response of the *Copepod Tigriopus japonicus mori* Experimentally Exposed to Cadmium. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 57, 707-717.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S.S., Rao, K.M.K., 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. Free Radical Biology and Medicine 36, 1434-1443.
- Watjen, W., Beyersmann, D., 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: Influence of oxidative stress. BioMetals 17, 65-78.
- Wen-Hong, F., Tang, G., Zhao, C.M., Duan, Y., Zhang, R., 2009. Metal accumulation and biomarker responses in *Daphnia magna* following cadmium and zinc exposure. Environmental Toxicology and Chemistry 28, 305-310.
- WHO, 1992. Cadmium—Environmental aspects. Environmental Health Criteria No.135. World Health Organisation (WHO), The International Programme on Chemical Safety (IPCS). Geneva.
- WHO, 2001. Depleted uranium, sources, exposure and health effects. World Health Organisation.

- WHO, 2004. Guidelines for drinking-Water Quality, third ed. World Health Organisation (Geneva).
- Wigginton, A.J., Birge, W.J., 2007. Toxicity of cadmium to six species in two genera of crayfish and the effect of cadmium on molting success. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 548-554.
- Williams, T.D., Diab, A.M., George, S.G., Godfrey, R.E., Sabine, V., Conesa, A., Minchin, S.D., Watts, P.C., Chipman, J.K., 2006. Development of the GENIPOL European flounder (*Platichthys flesus*) microarray and determination of temporal transcriptional responses to cadmium at low dose. *Environmental Science and Technology* 40, 6479-6488.
- Wilson, A., Salamatian, L., 2003. Les radicaux libres : Une question d'équilibre. Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, 37.
- Wrońska-Nofer, T., Wisniewska-Knypl, J., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., 1999. Prooxidative and genotoxic effect of transition metals (cadmium, nickel, chromium, and vanadium) in mice. *Trace Elements and Electrocytes* 16, 87-92.
- Wu, J.P., Chen, H.C., 2005. Metallothionein induction and heavy metal accumulation in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to cadmium and zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 140, 383-394.
- Yang, C.F., Shen, H.M., Shen, Y., Zhuang, Z.X., Ong, C.N., 1997. Cadmium-induced oxidative cellular damage in human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells). *Environmental Health Perspectives* 105, 712-716.
- Yang, P.M., Chiu, S.J., Lin, K.A., Lin, L.Y., 2004. Effect of cadmium on cell cycle progression in chinese hamster ovary cells. *Chemico-Biological Interactions* 149, 125-136.
- Yang, Z.S., Yu, J.S., Chen, H.Y., 2002. Studies on the interaction of 1,10- phenanthroline - Cd^{2+} with DNA. *Chinese Journal of Inorganic Chemistry* 18, 373-377.
- Yapar, K., Çavuşoğlu, K., K., Oruç, E., Yalçın, E., 2010. Protective role of *Ginkgo biloba* against hepatotoxicity and nephrotoxicity in uranium-treated mice. *Journal of Medicinal Food* 13, 179-188.
- Yazzie, M., Gamble, S.L., Civitello, E.R., Stearns, D.M., 2003. Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chemical Research in Toxicology* 16, 524-530.
- Yu, T.W., Anderson, D., 1997. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutation Research* 379, 201-210.

- Zalups, R.K., Ahmad, S., 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and Applied Pharmacology* 186, 163-188.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., Kroemer, G., 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *The Journal of Experimental Medicine* 182, 367-377.
- Zeman, F.A., Gilbin, R., Alonzo, F., Lecomte-Pradines, C., Garnier-Laplace, J., Aliaume, C., 2008. Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 86, 370-378.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta* 606, 135-150.
- Zirino, A., Yamamoto, S., 1972. A pH-dependent model for the chemical speciation of copper, zinc, cadmium, and lead in seawater. *Limnology and Oceanography* 17(5), 661-671.

Annexes

Période : voir U238 et U235 **Activité massique** : $2,54 \cdot 10^4 \text{ Bq.g}^{-1}$ **Groupe de risque** : 1

1 Bq d'Unat = 0,487 Bq d'U238 + 0,0027 Bq d'U235 + 0,487 Bq d'U234 (voir annexe 3)

U nat

Uranium naturel

Principales émissions

	Gamma / X		Beta (Emax)		Electrons		Alpha	
	E (keV)	%	E (keV)	%	E (keV)	%	E (keV)	%
E1	610	22	1540	9	131	10	5490	48
E2	1764	8	2281	47	261	4	6003	48
E3	2205	2	3270	8	454	1	7687	48
% omis		126		233		150		257

Seuils d'exemption

Quantité en Bq	1.10 ³
Concentration en Bq.g ⁻¹	1

Transport (Bq)

A1	illimité
A2	illimité

Exposition externe ($\mu\text{Sv.h}^{-1}$) pour une activité de 1 Bq

Source ponctuelle

ds $2,2 \cdot 10^{-4}$ β et e^-
 ds $2,1 \cdot 10^{-6}$ γ et X
 dp $1,5 \cdot 10^{-6}$ γ et X

flacon 10 ml

à 100 cm : $1,3 \cdot 10^{-7}$

au contact : $1,5 \cdot 10^{-3}$

bécher 50 ml

au col : $2,8 \cdot 10^{-3}$

au contact : $5,8 \cdot 10^{-4}$

Seringue 5 ml

au contact : $3,3 \cdot 10^{-2}$

Contamination de la peau

dépôt uniforme (1 Bq.cm⁻²) : 4,2

goutte de 0,05 ml (1 Bq) : 2,4

Exposition interne pour les travailleurs

Dose efficace engagée par unité d'incorporation en Sv.Bq⁻¹

Inhalation		h(g)	
La plupart des composés hexavalents (UF ₆ , UO ₂ F ₂ et UO ₂ (NO ₃) ₂)	R	1 μm	$1,4 \cdot 10^{-5}$
		5 μm	$1,6 \cdot 10^{-5}$
Composés moins solubles et la plupart des composés hexavalents	M	1 μm	$3,4 \cdot 10^{-5}$
		5 μm	$2,3 \cdot 10^{-5}$
Composés très insolubles	L	1 μm	$1,7 \cdot 10^{-5}$
		5 μm	$1,1 \cdot 10^{-5}$
Ingestion		f ₁	e(g)
Composés non spécifiés		0,02	$7,8 \cdot 10^{-7}$
La plupart des composés tétravalents ; UO ₂ , U ₃ O ₈ , UF ₄		0,002	$5,2 \cdot 10^{-8}$

Données pratiques

Débit de dose efficace par immersion ⁽¹⁾	LPCA ^{(2),(3)}
$2,1 \cdot 10^{-6} \mu\text{Sv.h}^{-1}$ par Bq.m ⁻³	$2,5 \cdot 10^{-1} \text{ Bq.m}^{-3}$

Organe exposé contribuant le plus à la dose efficace

Inhalation : Surfaces osseuses (R-M-L 1 μm), voies respiratoires supérieures (L 5 μm)
 Ingestion : Surfaces osseuses

Al₂₀inhalation (Bq)⁽²⁾ : $6,0 \cdot 10^2$

Al₂₀ingestion (Bq)⁽²⁾ : $2,6 \cdot 10^4$

(1) Calculée dans un volume de 100 m³.

(2) Valeurs les plus restrictives.

(3) La LPCA prend en compte l'exposition par inhalation et par immersion.

Ecrans, détection, contamination des surfaces

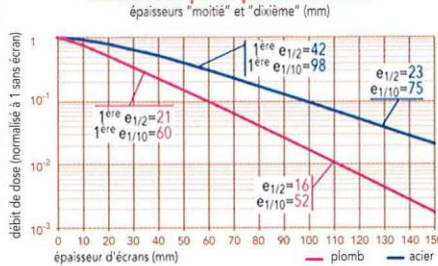
Parcours β et e^- (mm)

Verre	8,9
Plexiglas	14,3

Sondes⁽¹⁾

recommandées	
Alpha	++
Beta	++
Gamma	++
X	+

Atténuation par le plomb ou l'acier



Plan 5 m x 5 m uniformément contaminé (1 Bq.cm⁻²)

Débits de dose ($\mu\text{Sv.h}^{-1}$)⁽²⁾

à 1 m :
 ds β, e^- : $5,0 \cdot 10^{-1}$
 ds γ, X : $1,2 \cdot 10^{-2}$
 dp γ, X : $9,1 \cdot 10^{-3}$

à 10 cm :
 ds β, e^- : 2,5
 ds γ, X : $3,9 \cdot 10^{-2}$
 dp γ, X : $2,7 \cdot 10^{-2}$

Limites pratiques

LPC _L	$4,10^{-2} \text{ Bq.cm}^{-2}$
LPC _F	2 Bq.cm^{-2}

1) Si aucune sonde n'est préconisée, faire un frottis et le mesurer en laboratoire.
 2) Attention ! Toute contamination surfacique labile doit être éliminée.

Activités maximales manipulables (Bq)

Etat physico-chimique	coefficient de volatilité (k)	Sous réserve de respecter les LIMITES D'EXPOSITION EXTERNE				
		Zone Surveillée (ZS)		Zone Contrôlée (ZC)		
		Paillasse	Hotte ventilée	Paillasse	Hotte ventilée	Boîte à gants
La plup. des comp. hexav. (UF ₆ , UO ₂ F ₂ et UO ₂ (NO ₃) ₂)	0,001	$3,9 \cdot 10^3$	$3,9 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^7$
Comp. moins solubles et la plupart des comp. hexavalents	0,001	interdit	$1,8 \cdot 10^4$	interdit	$6,2 \cdot 10^4$	$6,2 \cdot 10^6$
Composés très insolubles	0,001	$3,7 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^7$



Uranium - 233

Principales émissions

	Gamma / X		Beta (E _{max})		Electrons		Alpha	
	E (keV)	%	E (keV)	%	E (keV)	%	E (keV)	%
E1	13	4			22	6	4729	2
E2	114	< 1			37	2	4783	13
E3					77	< 1	4824	84
% omis		0				5		< 1

Seuils d'exemption

Quantité en Bq	1.10 ⁴
Concentration en Bq.g ⁻¹	1.10 ¹
Transport (Bq)	
A1	4.10 ¹³
A2	6.10 ⁹

Exposition externe (μSv.h⁻¹) pour une activité de 1 Bq

Source ponctuelle

ds 0 β et e⁻
 ds 4,9.10⁻⁸ γ et X
 dp 5,9.10⁻⁹ γ et X

flacon 10 ml

4,8.10⁻¹¹
 100 cm
 au contact 2,8.10⁻⁷

bécher 50 ml
 au col 1,5.10⁻⁵

au contact 3,1.10⁻⁷

Seringue 5 ml

au contact 3,2.10⁻⁵

Contamination de la peau

dépôt uniforme (1 Bq.cm⁻²) 2,2.10⁻³

goutte de 0,05 ml (1 Bq) 8,2.10⁻⁴

Exposition interne pour les travailleurs

Dose efficace engagée par unité d'incorporation en Sv.Bq⁻¹

Inhalation		h(g)	
La plupart des composés hexav. (UF ₆ , UO ₂ F ₂ et UO ₂ (NO ₃) ₂)	R	1 μm	5,7.10 ⁻⁷
		5 μm	6,6.10 ⁻⁷
Composés moins solubles (UO ₃ , UF ₄ , UCl ₄) et autres comp. hexav.	M	1 μm	3,2.10 ⁻⁶
		5 μm	2,2.10 ⁻⁶
Composés très insolubles (UO ₂ et U ₃ O ₈)	L	1 μm	8,7.10 ⁻⁶
		5 μm	6,9.10 ⁻⁶
Ingestion		f ₁	e(g)
Composés non spécifiés		0,02	5,0.10 ⁻⁸
La plupart des composés tétravalents ; UO ₂ , U ₃ O ₈ , UF ₄		0,002	8,5.10 ⁻⁹

Données pratiques

Débit de dose efficace par immersion ⁽¹⁾	LPCA ⁽³⁾
1,2.10 ⁻⁹ μSv.h ⁻¹ par Bq.m ⁻³	9,6.10 ⁻¹ Bq.m ⁻³

Organe exposé contribuant le plus à la dose efficace

Inhalation : Surfaces osseuses (R), poumons (M-L 1μm), voies respiratoires supérieures (L 5μm)
 Ingestion : Surfaces osseuses

Al_{20inhalation} (Bq)⁽²⁾ : 2,3.10³

Al_{20ingestion} (Bq)⁽²⁾ : 4,0.10⁵

(1) Calculée dans un volume de 100 m³.

(2) Valeurs les plus restrictives.

(3) La LPCA prend en compte l'exposition par inhalation et par immersion.

Ecrans, détection, contamination des surfaces

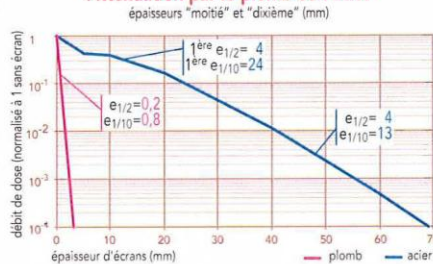
Parcours β et e⁻ (mm)

Verre	< 0,1
Plexiglas	< 0,1

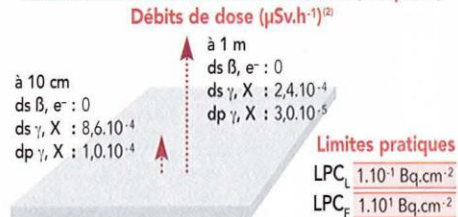
Sondes⁽¹⁾ recommandées

Alpha	++
Beta	
Gamma	
X	

Atténuation par le plomb ou l'acier



Plan 5 m x 5 m uniformément contaminé (1 Bq.cm⁻²)



1) Si aucune sonde n'est préconisée, faire un frottis et le mesurer en laboratoire.

2) Attention ! Toute contamination surfacique labile doit être éliminée.

Activités maximales manipulables (Bq)

Etat physico-chimique	coefficient de volatilité (k)	Sous réserve de respecter les LIMITES D'EXPOSITION EXTERNE				
		Zone Surveillée (ZS)		Zone Contrôlée (ZC)		
		Paillasse	Hotte ventilée	Paillasse	Hotte ventilée	Boîte à gants
La plup. des comp. hexav. (UF ₆ , UO ₂ F ₂ et UO ₂ (NO ₃) ₂)	0,001	9,5.10 ⁴	9,5.10 ⁵	3,2.10 ⁵	3,2.10 ⁶	3,2.10 ⁸
Comp. moins sol. (UO ₃ , UF ₄ et UCl ₄) et autres comp. hexav.	0,001	2,0.10 ⁴	2,0.10 ⁵	6,5.10 ⁴	6,5.10 ⁵	6,5.10 ⁷
Composés très insolubles (UO ₂ et U ₃ O ₈)	0,001	7,2.10 ³	7,2.10 ⁴	2,4.10 ⁴	2,4.10 ⁵	2,4.10 ⁷



Uranium - 238 et ses 1^{er} descendants

Principales émissions

	Gamma / X		Beta (E _{max})		Electrons		Alpha	
	E (keV)	%	E (keV)	%	E (keV)	%	E (keV)	%
E1	15	9	1236	< 1	131	20	4039	< 1
E2	1001	< 1	1471	< 1	454	2	4147	23
E3	1690	< 1	2281	99	694	< 1	4196	77
% omis		22		100		65		0

Seuils d'exemption

Quantité en Bq	1.10 ⁴
Concentration en Bq.g ⁻¹	1.10 ¹

Transport (Bq)

A1	illimité
A2	illimité

Exposition externe (μSv.h⁻¹) pour une activité de 1 Bq

Source ponctuelle

ds $8,6 \cdot 10^{-5}$ β et e⁻
ds $2,7 \cdot 10^{-7}$ γ et X
dp $7,0 \cdot 10^{-8}$ γ et X

flacon 10 ml

4,1.10⁻⁹
100 cm
au contact 1,2.10⁻³

bécher 50 ml au col

1,7.10⁻³
au contact 1,5.10⁻⁴

Seringue 5 ml

au contact 3,7.10⁻²

Contamination de la peau

dépôt uniforme (1 Bq.cm⁻²) 2,3
goutte de 0,05 ml (1 Bq) 1,4

Exposition interne pour les travailleurs

Dose efficace engagée par unité d'incorporation en Sv.Bq⁻¹

Inhalation	R	h(g) père		h(g) filiat.	
		1 μm	5 μm	1 μm	5 μm
La plupart des composés hexavalents (UF ₆ , UO ₂ F ₂ , UO ₂ (NO ₃) ₂)	R	4,9.10 ⁻⁷	4,9.10 ⁻⁷	4,9.10 ⁻⁷	4,9.10 ⁻⁷
Composés moins solubles et la plupart des composés hexavalents	M	2,6.10 ⁻⁶	1,6.10 ⁻⁶	2,6.10 ⁻⁶	1,6.10 ⁻⁶
Composés très insolubles	L	7,3.10 ⁻⁶	5,7.10 ⁻⁶	7,3.10 ⁻⁶	5,7.10 ⁻⁶

Ingestion	f ₁	e(g) père	e(g) filiat.
Composés non spécifiés	0,020	4,4.10 ⁻⁸	4,7.10 ⁻⁸
La plupart des composés tétravalents ; UO ₂ , U ₃ O ₈ , UF ₄	0,002	7,6.10 ⁻⁹	1,1.10 ⁻⁸

Données pratiques

Débit de dose efficace par immersion ⁽¹⁾	LPCA ^{(2),(3)}
4,8.10 ⁻⁸ μSv.h ⁻¹ par Bq.m ⁻³	1,1 Bq.m ⁻³

Organe exposé contribuant le plus à la dose efficace

Inhalation : Surfaces osseuses (R), poumons (M-L 1μm), voies respiratoires supérieures(L 5μm)
Ingestion : Surfaces osseuses ou gros intestin inférieur

Al_{20inhalation} (Bq)⁽²⁾ : 2,7.10³

Al_{20ingestion} (Bq)⁽²⁾ : 4,2.10⁵



(1) Calculée dans un volume de 100 m³.

(2) Valeurs les plus restrictives.

(3) La LPCA prend en compte l'exposition par inhalation et par immersion.

38

Ecrans, détection, contamination des surfaces

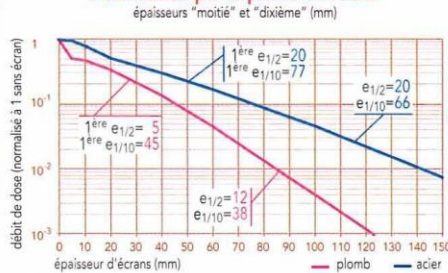
Parcours β et e⁻ (mm)

Verre	5,5
Plexiglas	9,0

Sondes⁽¹⁾ recommandées

Alpha	++
Beta	++
Gamma	
X	

Atténuation par le plomb ou l'acier



Plan 5 m x 5 m uniformément contaminé (1 Bq.cm⁻²)

Débits de dose (μSv.h⁻¹)⁽²⁾

à 1 m
ds β, e⁻ : 5,1.10⁻¹
ds γ, X : 1,4.10⁻³
dp γ, X : 4,0.10⁻⁴

à 10 cm
ds β, e⁻ : 1,4
ds γ, X : 4,9.10⁻³
dp γ, X : 1,3.10⁻³

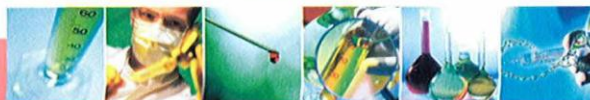
Limites pratiques
LPC_L 1.10⁻¹ Bq.cm⁻²
LPC_F 1.10¹ Bq.cm⁻²

1) Si aucune sonde n'est préconisée, faire un frottis et le mesurer en laboratoire.

2) Attention ! Toute contamination superficielle labile doit être éliminée.

Activités maximales manipulables (Bq)

Etat physico-chimique	coefficient de volatilité (k)	Sous réserve de respecter les LIMITES D'EXPOSITION EXTERNE				
		Zone Surveillée (ZS)		Zone Contrôlée (ZC)		
		Paillasse	Hotte ventilée	Paillasse	Hotte ventilée	Boîte à gants
La plupart des comp. hexavalents ; UF ₆ , UO ₂ F ₂ , UO ₂ (NO ₃) ₂	0,001	9,6.10 ⁴	9,6.10 ⁵	3,2.10 ⁵	3,2.10 ⁶	3,2.10 ⁶
Comp. moins solubles et la plupart des comp. hexavalents	0,001	2,3.10 ⁴	2,3.10 ⁵	7,8.10 ⁴	7,8.10 ⁵	7,8.10 ⁷
Composés très insolubles	0,001	8,5.10 ³	8,5.10 ⁴	2,8.10 ⁴	2,8.10 ⁵	2,8.10 ⁷



Résumé

L'étude des effets des radionucléides et des métaux sur les organismes vivants est nécessaire pour évaluer leur toxicité et leur risque écologique. Notre approche a visé dans un premier temps à étudier les impacts du cadmium (Cd) et de l'Uranium (U) sur différents niveaux biologiques de l'écrevisse *Procambarus clarkii* après exposition aiguë et chronique. Nous avons évalué leurs impacts sur les mitochondries, les réponses face à un stress oxydant, les structures histologiques et la survie. Nous avons tenté de lier ces effets entre eux et à la bioaccumulation dans les branchies et l'hépatopancréas. Nous avons aussi essayé de différencier la chimio- et la radiotoxicité de l'U en exposant des écrevisses soit à l'U appauvri soit au ^{233}U (présentant une activité spécifique plus élevée) au travers des mêmes critères d'effets. Nous avons démontré que le gène *mt* codant pour la métallothionéine était toujours surexprimé en présence du Cd. De ce fait, il semble être un bon biomarqueur de toxicité du Cd chez *P. clarkii*. Nous avons mis en évidence que les deux métaux affectent les mitochondries grâce au suivi des niveaux d'expressions des gènes mitochondriaux (*12s*, *atp6* et *cox1*), et que leur mécanismes d'action ne semblent pas être toujours les mêmes. Nous avons aussi prouvé que l'U génère plus de stress oxydant que le Cd grâce à la comparaison des niveaux d'expressions de gènes qui codent pour des antioxydants (*sod(Mn)* et *mt*) et des réponses enzymatiques de la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion S transférase. Toutefois, les symptômes des atteintes histo-pathologiques semblent être les mêmes pour les deux métaux. En comparant leurs effets sur la survie des écrevisses, nous avons conclu que le Cd était plus toxique que le radioélément. D'autre part, nous avons démontré que les effets toxiques de l'U aux concentrations rencontrées dans l'environnement, sont plus liés à la chimiotoxicité qu'à la radiotoxicité de cet élément. Nous avons démontré que, les réponses moléculaires varient en fonction de l'intensité et la durée du stress chimique imposé aux organismes. Nous avons proposé d'utiliser les expressions de l'ensemble des gènes étudiés en tant que biomarqueurs de toxicité de l'U plutôt que les activités enzymatiques à cause de leur sensibilité. Ce travail de thèse propose des mécanismes d'actions de l'U basé surtout sur les réponses moléculaires et confirme la nécessité d'approfondir l'étude du profil écotoxicologique de ce radioélément.

Mots clés : *écrevisses P. clarkii, uranium, cadmium, expressions géniques, activités enzymatiques, histologie, mitochondries, antioxydants.*

Abstract

The study of the effects of radionuclides and metals on organisms is necessary for the evaluation of their toxicity and their ecological threats. We first aimed to study the impacts of cadmium (Cd) and Uranium (U) on different biological levels of the crayfish *Procambarus clarkii* after acute and chronic exposures. We evaluated their impacts on mitochondria, oxidative stress responses, on histological structures, and the survival rates. We tried to connect these effects between them and to the bioaccumulation in the gills and the hepatopancreas. We also tried to discriminate the chemo and the radiotoxicity of U by exposing crayfish to either depleted or enriched U (^{233}U : presenting a higher specific activity) using the same criteria of effects. We demonstrated that the gene *mt* encoding for the metallothionein was always over-expressed in the presence of Cd. Therefore, it seems to be a good biomarker of Cd toxicity in *P. clarkii*. The follow up of mitochondrial genes expressions (*12s*, *atp6* and *cox1*), showed that both metals affect mitochondria and that their mechanisms of action do not seem to be always the same. We also observed that U generates more oxidative stress than Cd when comparing the expression levels of genes encoding for antioxidants (*sod (Mn)* and *mt*) and the enzymatic activities of superoxide dismutase, the catalase, the glutathione peroxidase and the glutathione S transferase. However, the symptoms of histo-pathological damages after Cd and U contamination were similar in both conditions. After comparing the survival rates of the crayfish, we concluded that Cd was more toxic than the radioelement. Moreover, we demonstrated that the toxic effect of U on *P. clarkii* exposed to a low environmental concentration is mainly due to its chemotoxicity rather than to its radiotoxicity. We established that, the molecular answers vary according to the intensity and the duration of the chemical stress applied to the organisms. We suggested the use of the expressions of all the studied genes as biomarkers of toxicity of U rather than the enzymatic activities because of their sensitivity. This work proposes mechanisms of actions of U based especially on the molecular responses and confirms the necessity of studying the ecotoxicological profile of this radioelement.

Keywords: *crayfish P. clarkii, uranium, cadmium, gene expression levels, enzymatic activities, histology, mitochondria, antioxidants.*