

IRSNINSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE*Faire avancer la sûreté nucléaire*

Développements analytiques pour la spéciation de l'uranium dans les branchies du poisson zèbre (*Danio rerio*) après exposition.

Guillaume BUCHER

Novembre 2013

ISRN/IRSN-2014/170

L2BT - Laboratoire de Biogéochimie, Biodisponibilité et Transferts des radionucléides.

Université de Pau et des Pays de l'Adour

Ecole doctorale des Sciences Exactes et leurs Applications (ED 211)

THESE

Présentée par

Guillaume Bucher

Le 22 Novembre 2013

Pour obtenir le grade de DOCTEUR

Discipline : Chimie Analytique et Environnement

**Développements analytiques pour la spéciation de l'uranium dans
les branchies du poisson zèbre (*Danio rerio*) après exposition**

DIRECTEUR DE THESE

Ryszard LOBINSKI

ENCADREMENT

Sandrine FRELON et Sandra MOUNICOU

JURY

A. GEFFARD	Professeur, Université de Reims	<i>Rapporteur</i>
C. VIDAUD	Chercheur CEA, Marcoule	<i>Rapporteur</i>
S. FRELON	Chercheur IRSN, Cadarache	
R. LOBINSKI	Directeur de recherche CNRS (LCABIE, UMR 5254 CNRS-UPPA), Pau	
S. MOUNICOU	Chargée de recherche CNRS (LCABIE, UMR 5254 CNRS-UPPA), Pau	
J. RUIZ-ENCINAR	Professeur, Université d'Oviedo (Espagne)	

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je tiens à remercier l'IRSN ainsi que le Conseil Régional Aquitain pour le cofinancement de ces 3 années de thèse.

Je remercie le Professeur Ryszard Lobinski, directeur du Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE), d'avoir accepté de prendre la direction de ce travail et de m'avoir accueilli au sein de son équipe durant la moitié de ma thèse.

Je remercie également Rodolphe Gilbin, responsable du Laboratoire de Biogéochimie, Biodisponibilité et Transfert des radionucléides (L2BT) pour m'avoir accueilli l'autre moitié de ma thèse ainsi que pour son aide précieuse à chaque étape de ce travail.

J'adresse ensuite mes plus sincères remerciements à chacun des membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse : Docteur Claude Vidaud et Professeur Alain Geffard en tant que rapporteurs et Professeur Jorge Ruiz-Encinar en tant que président du jury.

Je remercie chaleureusement Sandrine Frelon (L2BT) et Sandra Mounicou (LCABIE) pour leur confiance dans la réalisation de cette thèse et pour leur encadrement dans ces deux laboratoires d'accueil. Merci pour votre disponibilité, votre soutien, votre aide, vos conseils, votre partage de connaissances, vos relectures et corrections et d'autres bons moments.

J'ai eu l'opportunité de travailler à l'interface entre différents domaines de recherche et ainsi d'acquérir de nouvelles techniques et compétences tout au long de ma thèse grâce à plusieurs collaborateurs : Olivier Simon, Laureline Février, Frédéric Coppin, Magali Floriani, Hugues Preud'homme, Ming Xu, Carine Arnaudguilhem et d'autres que j'oublie certainement. Merci à vous tous pour le temps que vous m'avez accordé au bureau comme au labo.

Claudine, Géraldine et Mickäel vous êtes des maillons indispensables au bon déroulement de tâches quotidiennes et missions. Merci pour votre bonne humeur, votre efficacité, votre aide précieuse et vos petites attentions durant ces 3 ans de thèse entre Cadarache et Pau.

J'aimerais à présent remercier ceux avec qui j'ai partagé le plus clair de mon temps aux bureaux et aux labos : *Danio rerio*, Uranium appauvri, Thermo Element XR, Agilent 7500, MicroRotofor, MS Office... ou plutôt les personnes avec qui j'ai passé d'excellents moments au bureau comme à l'extérieur durant 3 ans, à Cadarache comme à Pau : Simona^a, Nico^a, Delphine^a, Benoit^a, Adrien^a, Antoine^a, Morgan^a, Karine^a, Marie^a, Hind^b, Anji^b, Julek^b, Stéphanie^b, Sébastien^b, Bobby^b, Alain^b, Magali^b, Simon^b, Pamela^b, Oihan^b, Ariane^b, Marc^b, Mauro^b, Julien^b, Eugenio, Lukasz...

^a IRSN - Laboratoire de Biogéochimie, Biodisponibilité et Transferts des radionucléides - BP3 - 13115 St Paul lez Durance Cedex - FRANCE

^b Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (+ EPCP et ECP) - Technopôle Hélioparc Pau Pyrénées - 2 avenue du Président Angot - 64053 Pau Cedex 09 - FRANCE

Merci à Julien pour son accueil à Washington DC durant la plus grande partie de ma phase de rédaction.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce projet et que j'ai oublié de nommer ici.

Pour finir, un MERCI tout particulier à mes parents, mon frère, ma grand-mère et ma femme pour leur soutien sans faille dans toutes les étapes de cette thèse (notamment de multiples déménagements intenses).

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

Chapitre I

1 Etude bibliographique (Partie 1) : Etat de l'art sur l'uranium, sa chimie et sa toxicité en lien avec sa biodisponibilité et les aspects de compartimentalisation et spéciation.....	9
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------

1.1 Approches pour l'évaluation de la toxicité des métaux.....	9
1.1.1 Définitions de la biodisponibilité et de la spéciation	9
1.1.2 Approches FIAM et BLM	10
1.1.3 Approche CBR et compartimentalisation BIM/BAM.....	12
1.2 Généralités sur l'uranium	14
1.3 Devenir et toxicité de l'uranium chez l'homme et les mammifères.....	15
1.4 Toxicité de l'uranium chez les espèces aquatiques : focus sur <i>Danio rerio</i>	16
1.5 Etat de l'art sur les complexes uranium-protéine	20

2 Etude bibliographique (Partie 2) : Outils et stratégies pour la spéciation biologique de l'uranium.....	27
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

2.1 Approches permettant l'identification des protéines	27
2.2 Préparation des échantillons et fractionnement subcellulaire.....	29
2.2.1 Etude du tampon de lyse cellulaire	29
2.2.2 Etude de la méthode de lyse cellulaire	30
2.2.3 Etude de la technique de fractionnement subcellulaire	31
2.3 Techniques séparatives pour l'analyse des (métallo)protéines intactes	32
2.3.1 Techniques chromatographiques.....	33
2.3.2 Techniques électrophorétiques	40
2.4 Couplages de techniques séparatives pour la séparation multidimensionnelle à haute résolution.....	52
2.4.1 2D-GE en conditions natives.....	52

2.4.2	2D-LC en conditions natives	53
2.5	Les détecteurs couplés aux techniques séparatives	54
2.5.1	La spectrométrie de masse multiélémentaire à plasma induit (ICP-MS).....	55
2.5.2	La spectrométrie de masse moléculaire.....	56

Chapitre II

3	Matériel et méthodes	61
3.1	Exposition des poissons et échantillonnage.....	61
3.1.1	Exposition des poissons : dispositif expérimental.....	61
3.1.2	Suivi et régulation de la pression de contamination et des paramètres abiotiques.	62
3.1.3	Echantillonnage	62
3.2	DGT	63
3.2.1	Préparation et exposition des dispositifs DGT	63
3.2.2	Analyse des dispositifs DGT et calcul de la concentration labile moyenne d'exposition.....	64
3.3	Minéralisation des organes pour la détermination de la bioaccumulation	65
3.4	Fractionnement subcellulaire.....	66
3.4.1	Procédure à l'échelle individuelle pour l'analyse en SEC-ICP-SFMS	66
3.4.2	Procédure en « pool » pour le fractionnement par focalisation isoélectrique en phase liquide (IEF hors-gel).....	66
3.5	Dosage des métaux par ICP-AES et ICP-MS.....	67
3.5.1	Dosage de U, Na, K, Ca et Mg dans les eaux d'exposition.....	67
3.5.2	Dosage de U, Cu, Fe et Zn dans les échantillons biologiques	68
3.6	Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la spectrométrie de masse à plasma induit et à secteur magnétique (SEC-ICP-SFMS).....	70
3.6.1	Préparation des éluants	70
3.6.2	Nettoyage et conditionnement de la colonne	70
3.6.3	Paramètres d'élution et d'injection (SEC)	71

3.6.4	Paramètres de détection (UV-Vis et ICP-SFMS).....	71
3.6.5	Étalonnage de la colonne en poids moléculaire	73
3.6.6	Taux de recouvrement en uranium.....	73
3.7	Focalisation isoélectrique hors-gel (IEF hors-gel)	74
3.7.1	Préparation des électrolytes et équilibrage des membranes	74
3.7.2	Préparation de la chambre de focalisation.....	75
3.7.3	Préparation du mélange à fractionner.....	76
3.7.4	Mise en place et fractionnement.....	76
3.7.5	Récolte et stockage des fractions	78
3.7.6	Nettoyage du matériel	79
3.8	Dosage des protéines dans les fractions IEF hors-gel, cytosols et broyats : méthode BCA microplaque.....	79
3.8.1	Préparation de la gamme d'étalonnage	79
3.8.2	Protocole du dosage	80
3.8.3	Traitement des résultats.....	80
3.9	Focalisation isoélectrique in-gel en condition native (ND-IEF)	81
3.9.1	Préparation des bandelettes IEF	81
3.9.2	Focalisation isoélectrique	81
3.9.3	Coloration.....	82
3.9.4	LA-ICP-MS.....	82
3.10	Analyse protéomique à partir des bandelettes IEF et des fractions IEF hors-gel (stratégie bottom-up).....	82
3.10.1	Préparation des solutions de travail.....	83
3.10.2	Préparation des échantillons à digérer.....	83
3.10.3	Protocole de digestion	84
3.10.4	Analyse μ RP-HPLC-ESI-MS ²	84
3.11	Analyse protéomique à partir des fractions liquides IEF hors-gel (stratégie top- down)	84

3.12	Traitement des données et analyse statistique.....	86
------	----------------------------------------------------	----

Chapitre III

4	Résultats et discussion (Partie 1) : Développement des méthodes analytiques	89
4.1	Optimisation des conditions de préparation des cytosols	90
4.1.1	Fractionnement subcellulaire	92
4.1.2	Profil U-biomolécule par SEC-ICP-SFMS	93
4.1.3	Stabilité des échantillons à la congélation.....	95
4.2	Pourquoi utiliser un ICP-MS à haute résolution en couplage ?.....	97
4.2.1	Gain en sensibilité sur la détection de l'uranium en mode basse résolution (LR).	97
4.2.2	Suivi de ⁵⁶ Fe et ³¹ P en mode moyenne résolution (MR)	99
4.3	Optimisations de la SEC.....	102
4.3.1	Nettoyage de la colonne et taux de recouvrement (protéines et U).....	102
4.3.2	Problématique de contamination de la colonne par Fe, Cu et Zn	104
4.4	IEF hors-gel et couplage avec la SEC-ICP-SFMS	106
4.4.1	Problématique de concentration en sels pour l'IEF hors-gel	106
4.4.2	Optimisation de la proportion (%) et du type d'ampholytes porteurs.....	108
4.4.3	Validation de la technique IEF hors-gel.....	112
4.4.4	Couplage IEF hors-gel – SEC-ICP-SFMS : possibilités et limitations.....	117
4.5	Stratégie d'identification des protéines « top-down »	121
4.5.1	RP(C ₄)-ICP-SFMS	122
4.5.2	RP(C ₄)-ESI-MS	126
5	Résultats et discussion (Partie 2) : Application des méthodes analytiques et interprétations en écotoxicologie.....	131
5.1	Exposition des poissons à l'uranium	132
5.1.1	Effet de l'activité biologique des poissons sur le pH (étude préliminaire)	132
5.1.2	Evolution du pH durant la période d'exposition	134

5.1.3	Suivi des cations majeurs durant la période d'exposition	137
5.1.4	Suivi de la pression de contamination durant la période d'exposition.....	138
5.2	Bioaccumulation de l'uranium	143
5.2.1	Organotropisme	143
5.2.2	Répartition au sein des branchies	146
5.3	Etude histologique et MET-EDX des tissus branchiaux	151
5.4	Etude de la distribution cytosolique de l'uranium par SEC-ICP-SFMS	153
5.5	Influence de l'exposition à l'uranium sur certains métaux essentiels (Fe, Cu et Zn) dans les branchies.....	158
5.5.1	Niveaux de Fe, Cu et Zn dans l'épithélium branchial et le cytosol.....	158
5.5.2	Distribution de Fe, Cu et Zn sur les biomolécules cytosoliques par SEC-ICP-SFMS	159
5.6	Etude de la distribution cytosolique de l'uranium par IEF hors-gel et couplage hors ligne avec l'analyse SEC-ICP-SFMS.....	162
5.6.1	Préfractionnement des cytosols par IEF hors-gel.....	162
5.6.2	Analyse des fractions IEF hors-gel par SEC-ICP-SFMS : cartographie pI-PM	165
5.7	Identification de cibles protéiques de l'uranium	170
5.7.1	Approche bottom-up à partir de fractions de l'IEF sur bandelette et de l'IEF hors-gel	170
5.7.2	Approche top-down par RP(C ₄)-ICP-SFMS et RP(C ₄)-ESI-MS à partir de l'IEF hors-gel	175
	Synthèse.....	179
	Conclusion générale et perspectives	183
	Production scientifique	191
	Références bibliographiques	193
	Annexe : publication soumise au journal « Chemosphere »	207

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mécanismes de prise en charge des métaux par les organismes aquatiques (d'après Pelletier et Campbell, 2008) ; (i) diffusion passive de complexes neutres ML_n ; (ii) prise en charge de l'ion libre M^{Z+} (éventuellement issu de la dissociation de ML_n) par un site X ; (iii) transport « accidentel » de complexes MZ par un transporteur membranaire de « Z » peu sélectif.....	11
Figure 2 : Répartition schématique des compartiments cellulaires (eucaryote) dans lesquels un métal est métaboliquement actif (BAM) ou inactif (BIM) d'après Eyckmans <i>et al.</i> (2012).....	13
Figure 3 : Branchie de <i>Danio rerio</i> observée à la loupe binoculaire (épithélium séparé de l'arc branchial) (gauche) et coupe d'un feuillet vue au microscope optique (droite)	17
Figure 4 : Représentation schématique d'une portion de branchie de poisson téléostéen incluant deux filaments et leurs lamelles secondaires (adapté de Perry, 2008).....	18
Figure 5 : Approches protéomiques intégrant la détection élémentaire pour la localisation des métalloprotéines (extrait de Mounicou <i>et al.</i> 2009).....	28
Figure 6 : Fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle.....	32
Figure 8 : Relation entre log (PM) et le volume d'élution.....	33
Figure 7 : Schéma de principe du fonctionnement de la SEC.....	33
Figure 9 : Principe de fonctionnement du FFF illustré par la séparation de deux analytes (bleu et rouge) ayant des propriétés différentes (<i>e.g.</i> taille, pI)	36
Figure 10 : Schéma de principe du fonctionnement de l'IEF	44
Figure 11 : Schéma de principe de fonctionnement du dispositif OFFGEL 3100 de Agilent (modifié d'après AgilentTechnology, 2010)	47
Figure 12 : Schéma descriptif du dispositif ZOOM IEF de Invitrogen (gauche) et deux exemples de gradient de pH (droite) (d'après le manuel ZOOM IEF, Invitrogen, 2010)	48
Figure 13 : Schéma descriptif de la chambre de focalisation du Micro-Rotofor de Bio-Rad..	49
Figure 14 : Vue en coupe d'un dispositif DGT	64
Figure 15 : Droite de calibration de la colonne d'exclusion stérique (Superdex 200) dans les conditions d'élution (0,7 mL/min – NH ₄ Acétate 100 mM pH 7,4)	73
Figure 16 : Chambre de focalisation et réservoirs anodique/cathodique	74
Figure 17 : Membranes échangeuse d'ions anodique (rouge) et cathodique (noire)	75

Figure 18 : Chambre de focalisation assemblée montrant l'alignement des orifices de récolte des 10 fractions avec les événements des compartiments anodique (rouge) et cathodique (noir)	75
Figure 19 : Générateur électrique (gauche) et Micro-Rotofor (droite)	77
Figure 20 : Recueil des fractions (gauche) et tiroir de récolte compartimenté (droite)	78
Figure 21 : Molécule d'HEPES.....	90
Figure 22 : Profils SEC-ICP-SFMS typiques obtenus pour des échantillons (c _{20-3j}) préparés dans les deux systèmes de tampon avec le signal ²³⁸ U (a et b) présenté à gauche et le signal UV à 225 et 280 nm (c et d) correspondant présenté à droite	94
Figure 23 : Répartition de l'aire de l'uranium sur les profils SEC-ICP-SFMS (gauche) et zoom + normalisation (intensité max locale = 1) des profils SEC-ICP-SFMS entre 10 et 26 min (droite)	94
Figure 24 : Profils SEC-ICP-SFMS avec le signal ²³⁸ U (a) et les signaux UV à 225 et 280 nm (b) obtenus pour un même échantillon c _{20-3j} fraîchement préparé (rouge), après 2 jours de stockage à -80°C (vert) et après 16 jours de stockage à -80°C ; évolution de l'aire de quatre fractions définies sur le profil ²³⁸ U (c).....	96
Figure 25 : Comparaison des profils SEC de l'uranium obtenus pour un même échantillon c _{20-30j} avec détection par ICP-MS quadripolaire (Agilent 7500) en bleu et par ICP-SFMS (Thermo Element XR) en rouge	98
Figure 26 : Profils SEC-ICP-SFMS du fer contenu dans un même échantillon de cytosol avec détection de ⁵⁷ Fe en mode basse résolution LR (a), ⁵⁷ Fe en mode moyenne résolution MR (b) et ⁵⁶ Fe en mode moyenne résolution MR (c).....	100
Figure 27 : Profil SEC-ICP-SFMS d'un cytosol c _{250-3j} avec détection de ³¹ P en mode moyenne résolution (rouge) et ²³⁸ U en basse résolution (bleu)	101
Figure 28 : Chromatogramme SEC-ICP-SFMS ²³⁸ U d'un « run » de nettoyage composé de 5 injections de 200 µL de bicarbonate d'ammonium (NH ₄ HCO ₃) 200 mM.....	103
Figure 29 : Profils typiques SEC-ICP-SFMS de Zn, Cu et Fe dans les cytosols avec (gris) et sans (noir) nettoyage de la colonne par l'EDTA	105
Figure 30 : Gradients de pH (a) et profils de tension (b) obtenus en IEF hors-gel (MicroRotofor) avec différents types et pourcentage d'ampholytes porteurs (AP).....	109
Figure 31 : Distributions moyennes et taux de recouvrement de U et Fe obtenus pour l'ensemble des pool de cytosols analysés par IEF hors-gel avec 0,5% AP pH 3-10 (a) et 0,5% AP pH 4-7 (b)	111

Figure 32 : Distribution de la BSA (n = 3) et taux de recouvrement cumulé après focalisation IEF-hors-gel d'un mélange BSA+U à 0,5%AP pH 4-7	112
Figure 33 : Distribution de l'uranium (n = 2) et taux de recouvrement cumulé après focalisation IEF-hors-gel d'un mélange BSA+U à 0,5%AP pH 4-7	113
Figure 34 : Superposition des profils U-pH obtenus pour un même pool de cytosols par ND-IEF-LA-ICPMS sur bandelette de gel (rouge) et IEF hors-gel (bleu), avec un gradient de pH large 3-10 (a) et restreint 4-7 (b) ; pH indicatif selon données constructeur	115
Figure 35 : Répartition de l'uranium et des protéines parmi les 10 fractions de l'IEF hors-gel en condition 0,5%AP pH 4-7	116
Figure 36 : Comparaison entre les profils SEC-ICP-SFMS d'un pool (n = 5) de cytosols brut, du même pool après ajout de 0,5%AP et du signal obtenu en sommant les profils SEC-ICP-SFMS des 10 fractions IEF hors-gel de ce même pool de cytosols ; le profil « U inorganique + 0,5%AP » est ajouté pour comparaison.....	119
Figure 37 : Profils d'élution de la BSA (1 µg/µl) dopée à l'uranium (2 pg/µl) et du blanc (10 mM NH ₄ Ac) sur la colonne UHPLC C ₄ BEH 300 avec un gradient Eau/Acétonitrile à 0,1% d'acide formique pH 2,6 ; V _{injection} = 2 µL.....	123
Figure 38 : Profils d'élution de la BSA (1 µg/µl) dopée à l'uranium (2 pg/µl) et du blanc (10 mM NH ₄ Ac) sur la colonne UHPLC C ₄ BEH 300 avec un gradient Eau/Acétonitrile à 10 mM d'acétate (5mM NH ₄ Ac + 5 mM AAc) pH 4,6 ; V _{injection} = 2 µL.....	124
Figure 39 : Profils d'élution de la transferrine (1 µg/µl) dopée à l'uranium (2 pg/µl) et du blanc (10 mM NH ₄ Ac) sur la colonne UHPLC C ₄ BEH 300 avec un gradient Eau/Acétonitrile à 10 mM d'acétate (5mM NH ₄ Ac + 5 mM AAc) pH 4,6 ; V _{injection} = 4 µL.....	125
Figure 40 : Profils d'élution de la fraction pH 5,33 issue de l'IEF hors-gel du mélange U-BSA et du blanc (10 mM NH ₄ Ac) sur la colonne UHPLC C ₄ BEH 300 (Waters) avec un gradient Eau/Acétonitrile à 10 mM d'acétate (5mM NH ₄ Ac + 5 mM AAc) pH 4,6 ; V _{injection} = 4 µL	126
Figure 41 : Courant ionique total (TIC) de la fraction pH 5,33 de l'IEF hors-gel du mélange U-BSA obtenu par couplage RP(C ₄)-ESI-MS ; gradient Eau/Acétonitrile à 10 mM d'acétate (5mM NH ₄ Ac + 5 mM AAc) pH 4,6 ; V _{injection} = 4 µL	127
Figure 42 : Spectre de masse moyenné entre 17 et 18 min extrait du TIC de la fraction pH 5,33 de l'IEF hors-gel de U-BSA	128
Figure 43 : Evolution du pH dans le milieu d'exposition après introduction des poissons....	133
Figure 44 : Evolution du pH et niveau de nitrites dans le milieu d'exposition c ₀ (témoin) sur les 30 jours d'exposition.....	134

Figure 45 : Evolution du pH et niveau de nitrites dans le milieu d'exposition c_{20} sur les 30 jours d'exposition	135
Figure 46 : Evolution du pH et niveau de nitrites dans le milieu d'exposition c_{250} sur les 3 jours d'exposition	135
Figure 47 : Spéciation de l'uranium ($20 \mu\text{g.L}^{-1}$) à l'équilibre thermodynamique dans l'eau LRE (Simulation CHESS, BDT IRSN LRE v6) en fonction du pH.....	137
Figure 48 : Evolution de la concentration en uranium total et de la fraction dissoute dans le milieu d'exposition c_{20} sur les 30 jours d'exposition	139
Figure 49 : Evolution de la concentration en uranium total et de la fraction dissoute dans le milieu d'exposition c_{250} sur les 3 jours d'exposition	139
Figure 50 : Répartition relative (%) moyenne de l'uranium dans les organes du poisson zèbre en fonction des modalités (niveau et durée) d'exposition	146
Figure 51: Relation linéaire entre les concentrations en uranium dans l'épithélium branchial et le cytosol pour les échantillons c_{250} -3j (cercles), c_{20} -3j (triangles) et c_{20} -30j (carrés) ; les symboles creux représentent des valeurs définies comme aberrantes par un Q-Test au seuil 90% ; la pente représente la fraction d'uranium cytosolique	150
Figure 52 : Observation de coupes des tissus branchiaux au microscope optique (zoom 40x) dans chaque condition d'exposition († = gain de mucus, ‡ = perte de mucus et * = absence de lamelle).....	151
Figure 53 : Profils SEC-ICP-SFMS typiques obtenus pour les cytosols de chaque condition d'exposition avec le signal ^{238}U (trait plein noir) et le signal UV 280 nm (trait pointillé gris) ; les six fractions identifiées sont délimitées par des traits pointillés verticaux et le marquage des poids moléculaires est obtenu à partir de la calibration de la colonne SEC	154
Figure 54 : Distribution de l'uranium parmi les six fractions définies dans les chromatogrammes (aire de chaque fraction rapportée à l'aire totale du chromatogramme) ; $n = 4$ (c_0) et $n = 5$ (c_{20} et c_{250}) ; les lettres a et b définissent des groupes statistiquement différents (Test de Mann-Whitney au seuil $\alpha = 5\%$).....	156
Figure 55 : Profils typiques de Fe, Cu et Zn d'un cytosol (c_{250} -3j) en SEC-ICP-SFMS mis en regard du profil U correspondant.....	160
Figure 56 : Distribution de U, Fe, Zn, P, Cu et des protéines obtenues après fractionnement de différents pools de cytosols par IEF hors-gel sur gradient 4-7	163
Figure 57 : Cartographie 2D (IEFxSEC) d'un pool de cytosols c_{20} -30j ; échelle de couleur : (a-e) intensité ICP-SFMS (cps), (f) absorbance UV à 280 nm (mU.A.).....	167

Figure 58 : Cartographie 2D (IEF _x SEC) d'un pool de cytosols c _{250-3j} ; échelle de couleur : (a-e) intensité ICP-SFMS (cps), (f) absorbance UV à 280 nm (mU.A.).....	168
Figure 59 : Profils U-pH obtenus par ND-IEF-LA-ICPMS pour un pool de cytosols c _{250-3j} (a) et un pool de cytosols c _{20-3j} (b) fractionnés sur des bandelettes de gel IEF pH 4-7 de 13 cm ; Les numéros de 1 à 10 (cf. Tableau 29) correspondent aux parties de gel excisées pour l'identification des protéines par approche bottom-up.....	171
Figure 60 : (a) Profil d'élution RP(C4)- ICP-MS et (b) courant ionique total (TIC) RP(C4)-ESI-MS de la fraction IEF hors-gel (F10) de pH 6,76 issue d'un pool de cytosol c _{250-3j} ; gradient Eau/ACN 10 mM « Acétate » pH 4,6 - 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	176
Figure 61 : Profil d'élution RP(C4)-ICP-MS de la fraction IEF hors-gel (F05) de pH 5,12 issue d'un pool de cytosol c _{250-3j} ; gradient Eau/ACN 10 mM « Acétate » pH 4,6 - 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	177

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition isotopique (%) et activité massique de l'uranium naturel et appauvri (Madic et Genet, 2001)	15
Tableau 2 : Caractéristiques des isotopes naturels de l'uranium (AIEA; Bleise <i>et al.</i> , 2003) .	15
Tableau 3 : Etat de l'art sur les effets et organotropisme liés à la contamination à l'uranium appauvri par voie directe du poisson zèbre.....	19
Tableau 4 : Caractéristiques de certaines protéines cibles de l'uranium à pH 7,4 (sauf indication contraire).....	22
Tableau 5 : Comparaison des méthodes physiques de lyse cellulaires	31
Tableau 6 : Inventaire (non exhaustif) des colonnes SEC analytiques commerciales et leurs principales caractéristiques	35
Tableau 7 : Gamme de séparation en SDS-PAGE en fonction du pourcentage d'acrylamide (d'après la note technique CarlRoth, 2012).....	41
Tableau 8 : Comparatif de trois dispositifs IEF hors-gel commercialisés	50
Tableau 9 : Caractéristiques de l'eau LRE et conditions de maintien des poissons zèbre	61
Tableau 10 : Détail des cycles de minéralisation pour les différents organes prélevés	65
Tableau 11 : Préparation de la gamme d'étalonnage en U, Fe, Cu et Zn pour l'analyse totale par ICP-MS.....	68
Tableau 12 : Paramètres de l'ICP-MS Agilent 7500 utilisés pour la détermination des concentrations en U, Fe, Cu et Zn totale.....	69
Tableau 13 : Paramètres de l'ICP-SFMS Thermo Element XR optimisés pour le couplage avec la chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....	72
Tableau 14 : Type et volume d'ampholytes porteurs à ajouter à l'échantillon à fractionner (3 mL) en fonction des conditions souhaitées	76
Tableau 15 : Composition de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines.....	80
Tableau 16 : Caractéristiques des éluants et gradients utilisés en RP-HPLC (débit 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) avec la colonne Waters BEH300 C ₄	85
Tableau 17 : Paramètres principaux optimisés de la source ESI en mode positif (+).....	86
Tableau 18 : Logarithme des constantes de formation des complexes 1:1 entre différents contre-ions volatiles et l'uranyle.....	91
Tableau 19 : Caractéristiques des broyats et cytosols obtenus avec les tampons HEPES-Sucrose (Référence) et NH ₄ Ac (Alternative) ; Chaque « n » correspond aux branchies d'un individu unique (c _{20-3j} , c _{20-30j} ou c _{250-3j})	92

Tableau 20 : Comparatif des critères de réponse pour ^{238}U des ICP-MS quadripolaire et haute résolution (mode LR) en condition de couplage mais sans colonne SEC	98
Tableau 21 : Taux de recouvrement de l'uranium sur le système chromatographique (SEC) par FIA et dosage total de l'éluat.....	103
Tableau 22 : Caractéristiques des broyats et cytosols obtenus avec les tampons NH_4Ac 100 mM (Référence) et NH_4Ac 10 mM (Alternative) ; Chaque « n » correspond aux branchies d'un individu ou d'un pool d'individus uniques (toutes conditions d'expositions confondues).....	108
Tableau 23 : Apports en U, Fe, Cu et Zn net et relatif au cytosol des ampholytes porteurs (AP) pour l'IEF hors-gel à 0,5%	118
Tableau 24 : Distribution moléculaire de l'uranium par SEC-ICP-SFMS pour le pool de cytosol (Référence) et évolution de la distribution de l'uranium par rapport à cette référence.....	120
Tableau 25: Concentrations moyennes en éléments majeurs (Ca, K, Mg et Ca) sur la durée d'exposition (30 jours pour c_0 et c_{20} et 3 jours pour c_{250}).....	138
Tableau 26 : Expérimental : pH et concentrations moyennes en uranium total, dissous et labile pour les différentes conditions et durées d'exposition ; Simulation : concentrations en uranium biodisponible, labile, lié à des ligands inorganiques et lié à de la matière organique dissoute estimées par simulation Visual MINTEQ à partir des données expérimentales ($[\text{U}]_{\text{dissous}}$ et pH)	142
Tableau 27 : Concentrations moyennes en uranium (ngU.mg^{-1} poids sec) mesurées dans les gonades, les muscles, le foie, les branchies, le rein et le reste du corps des poissons zèbre en fonction de la condition d'exposition.....	145
Tableau 28 : Concentrations individuelles et moyennes en uranium (pgU.mg^{-1} poids frais) dans les branchies du poisson zèbre en fonction de la condition d'exposition.....	148
Tableau 29 : Concentrations moyennes en Fe, Cu et Zn (ng.mg^{-1} poids frais de branchie) dans l'épithélium branchial et la fraction cytosolique des poissons zèbre en fonction de l'exposition (n = 2)	159
Tableau 30 : Identification et pH des fractions digérées pour l'approche bottom-up	170
Tableau 31 : Protéines identifiées par analyse des digestats tryptiques des fractions ND-IEF et/ou IEF hors-gel par $\mu\text{RP-ESI-MS/MS}$	172
Tableau 32 : Déconvolution des spectres MS de F10	176

LISTE DES ABREVIATIONS

A

a : Pente (régression linéaire)

AAc : Acide Acétique

ACN : Acetonitrile

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine DiPhosphate

AFo : Acide Formique

Ag : Argent élémentaire

Al : Aluminium élémentaire

ANR : Agence Nationale de la Recherche

AP : Ampholytes Porteurs

APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Ionisation chimique à pression atmosphérique)

APPI : Atmospheric Pressure PhotoIonization (Photoionisation à pression atmosphérique)

Asp : Acide Aspartique

Ar : Argon élémentaire

ATP : Adénosine TriPhosphate

ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry (Agence pour le Registre des Substances Toxiques et Maladies)

B

b : Ordonnée à l'origine (régression linéaire)

BCA : Acide BicinChoninic

BdF (BdF_{moy}) : Bruit de Fond (moyen)

BDT : Base de Données Thermodynamiques

BEH : Ethylene Bridged Hybrid

BLM : Biotic Ligand Model (Modèle du ligand biotique)

BN-PAGE : Blue Native PAGE (Bleu d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide natif)

Bq : Becquerel

BPM : Bas Poids Moléculaire

BSA : Bovine Serum Albumin (Albumine du sérum bovin)

C

- c_0 : Condition témoin (niveau basal, pas d'apport d'uranium)
- c_{20} : Condition d'exposition à 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ d'uranium appauvri
- c_{250} : Condition d'exposition à 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ d'uranium appauvri
- Ca : Calcium élémentaire
- Ca^{2+} : Cation calcium
- CaCO_3 : Carbonate de Calcium
- CBR : Critical Body Residues (charge corporelle critique)
- Cd : Cadmium élémentaire
- Ce : concentration en métal dans l'éluat de résine Chelex-100 (application DGT) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
- CE : Capillary Electrophoresis (Electrophorèse capillaire)
- CEC : Capillary Electrophoresis Chromatography (Electrochromatographie capillaire)
- CF : ChromatoFocalisation
- CFF-IEF : Continuous Free Flow IEF (fractionnement IEF continu en écoulement libre)
- CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
- CH_3COOH : Acide acétique (cf. AAc)
- CHES : CHEMical Equilibrium Speciation with Surfaces (Spéciation des équilibre chimique avec les surfaces)
- CI : Chromatographie Ionique
- CID : Collision Induced Dissociation (Dissociation induite par collision)
- CIEF : Capillary IsoElectric Focusing (Focalisation isoélectrique capillaire)
- CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
- Cl^- : Ion chlorure
- CL_{50} : Concentration Létale pour 50% de la population
- CO_2 : Dioxyde de carbone
- COD : Carbone Organique Dissous
- COX : CycloOxygénase
- Cu : Cuivre élémentaire
- $[\text{Cu}]_{\text{cytosol}}$: Concentration en cuivre dans le cytosol
- CZE : Capillary Zone Electrophoresis (Electrophorèse capillaire de zone)

D

Da : Dalton (unité de poids moléculaire équivalente à 1 g.mol^{-1})

DBL : Diffusive Boundary Layer (Couche limite de diffusion)

D^{eau} : coefficient de diffusion du métal dans l'eau ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)

2D-GE : 2-Dimensional Gel Electrophoresis (gel d'électrophorèse bidimensionnel)

D^{gel} : coefficient de diffusion du métal au sein du gel ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)

DGT : Diffusive Gradient in Thin films (Gradient de diffusion en film mince)

2D-LC : 2-Dimensional Liquid Chromatography (Chromatographie liquide bidimensionnel)

DL₅₀ : Dose Létale pour 50% de la population

DTT : DiThioThreitol

E

ECD : Electron Capture Dissociation (Dissociation par capture électronique)

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

EDX: Energy Dispersive X-ray (Analyse de rayons X dispersive en énergie)

ESI-MS : ElectroSpray Ionization - Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse à ionisation par électrospray)

EXAFS : Extended X-Ray Absorption Fine Structure (spectrométrie d'absorption des rayons X utilisant principalement le rayonnement synchrotron)

F

f_e : facteur d'éluion de la résine Chelex-100 (application DGT)

Fe : Fer élémentaire

[Fe]_{cytosol} : Concentration en fer dans le cytosol

FFE : Free Flow Electrophoresis (Electrophorèse en écoulement libre)

FFF : Field Flow Fractionation (Fractionnement par couplage flux-force)

F_i : Fraction *i* (avec *i* compris entre 1 et 10)

FIA : Flow Injection Analysis

FIAM : Free Ion Activity Model (modèle de l'ion libre)

FIFFF : Flow Field Flow Fractionation (Fractionnement par couplage flux-force à flux croisé)

FT-MS : Fourier Transform Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse à transformée de Fourier)

FT-ICR : Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (Résonance Cyclotronique Ionique à transformée de Fourier)

G

γ : épaisseur de la couche limite de diffusion (DBL) (cm)

GE : Gel Electrophoresis (Electrophorèse sur gel)

Glu : Acide Glutamique

GSH : Glutathione

H

H^+ : ion hydronium / proton

HCl : Acide Chlorhydrique

HCO_3^- : Ion hydrogénocarbonate

He : Hélium élémentaire

HEPES : Acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique

Hg : Mercure élémentaire

HILIC : Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (Chromatographie d'interaction hydrophile)

HNO_3 : Acide nitrique

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène

HPLC : High-Performance Liquid Chromatography (Chromatographie en phase liquide haute performance)

HPM : Haut Poids Moléculaire

H_3PO_4 : Acide phosphorique

HR : Haute Résolution

HrCN-PAGE : HighResolutionClearNative-PAGE

HSP : Heat Shock Proteins (Protéines de choc thermique)

I

ICP-AES : Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (Spectrométrie d'émission atomique à plasma induit)

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse à plasma induit)

ICP-QMS : Inductively Coupled Plasma Quadrupole Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse à plasma induit à analyseur quadripolaire)

ICP-SFMS : Inductively Coupled Plasma Sector Field Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse à plasma induit à analyseur secteur magnétique)

IEF : IsoElectric Focusing (Focalisation isoélectrique)

IMAC : Immobilized Metal Affinity Chromatography (Chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés)

I_{\max} : Intensité maximum

In : Indium élémentaire

IPG : Immobilized pH Gradient (Gradient de pH immobilisé)

IR : Infra-Rouge

IRSN: Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

ISTD : Internal STanDard (Etalon interne)

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry (Union internationale de chimie pure et appliquée)

J

J3 : trois jours d'exposition [à l'uranium]

J30 : 30 jours d'exposition [à l'uranium]

K

K^+ : Ion potassium

K (log K) : Constante de complexation

K_d : Constante de dissociation apparente

L

L : Ligand

LA : Laser Ablation (Ablation laser)

LC : Liquid Chromatography (Chromatographie en phase liquide)

Li : Lithium élémentaire

LD : Limite de Détection

Log MM : Log Masse Moléculaire

LQ : Limite Quantification

LTQ : Linear Trap Quadrupole (Trappe [à ions] quadripolaire linéaire)

LR : Low Resolution (Basse résolution)

LRE : Laboratoire de Radioécologie et Ecotoxicologie [Actuellement L2BT+LECO+GARM]

M

M_{acc} : masse de métal accumulée sur la résine Chelex-100 (ng)

M : unité de concentration $1 \text{ M} = 1 \text{ mol.L}^{-1}$

M^{Z+} : Ion métallique libre

MET-EDX : Microscopie électronique en transmission à analyse dispersive en énergie

Mn²⁺ : Ion manganèse

MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (Source d'ionisation laser assistée par une matrice)

Mg : Magnésium élémentaire

Mg²⁺ : Ion magnésium

ML_n : Complexe métal-ligand

MOD : Matière Organique Dissoute

MR : Medium Resolution (Résolution moyenne)

MRG : Metal-Rich Granules (Granules riches en métaux)

MRP : Multi-drug Resistance Proteins

MS/MS : Tandem Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse moléculaire en tandem)

MT : métallothionéines

MTLP : MetalloThionein Like Proteins (Protéines de la « famille » des MT)

MWD : Multiple Wavelength Detector (DéTECTEUR à longueurs d'ondes multiples)

N

n : Nombre de réplicats

Na : Sodium élémentaire

Na⁺ : Ion sodium

NaCl : Chlorure de sodium

NaNO₃ : Nitrate de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

ND-IEF : Non-Denaturing Isoelectric Focusing Gel Electrophoresis (Focalisation isoélectrique en conditions non dénaturantes)

NH₃ : Ammoniaque

NH₄Ac : Acétate d'ammonium

NH₄HCO₃ : Bicarbonate d'ammonium

Ni : Nickel élémentaire

NO₂⁻ : Ion nitrite

NO₃⁻ : Ion nitrate

NP : Normal-Phase (Phase normale [Chromatographie])

O

O₂ : Dioxygène

P

P : Phosphore élémentaire

PA : PolyAcrylamide

PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (électrophorèse sur gel de polyacrylamide)

Pb : Plomb élémentaire

PBS : Phosphate-Buffer Saline (Tampon phosphate salin)

pI : Point Isoélectrique

PEEK : PolyEther Ether Ketone

PEG : Polyéthylène glycol

PES : PolyEtherSulfone

PIXE : Particle-Induced X-ray Emission (Emission de rayons X induite par particules chargées)

P/L : densité de poissons (Nombre de poissons par litre d'eau)

PM : Poids Moléculaire

PNEC : Predicted No-Effect Concentration (Concentration prédite sans effet)

[Protéines]_{Cytosol} : Concentration en protéine dans le cytosol

[Protéines]_{Broyat} : Concentration en protéine dans le broyat

PTFE : PolyTetraFluoroEthylene

Q

QQQ : Triple quadripôle (Analyseur en spectrométrie de masse)

R

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Reactive Oxygen Species (Espèces réactives de l'oxygène)

RP : Reversed-Phase (Phase inverse [Chromatographie])

S

S : Soufre élémentaire

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate (Laurylsulfate de sodium)

SEC : Size Exclusion Chromatography (Chromatographie d'exclusion stérique)

SLTR : Spectroscopie Laser Résolue en Temps

S/B : Rapport signal sur bruit

SO₄²⁻ : Ion sulfate

SOD : SuperOxyde Dismutase

ST MALO : SpeciaTion of uraniuM in Aquatic Living Organisms (Spéciation de l'uranium dans des organismes vivants en milieu aquatique)

T

T[°]_{amb} : Température ambiante

TIC : Total Ion Current (Courant ionique total)

TOF-MS : Time Of Flight Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse à temps de vol)

Tyr : Tyrosine

U

U : Uranium élémentaire

UC0 à UC7 : Gamme d'étalonnage

[U]_{biodisponible} : Concentration en uranium biodisponible

[U]_{Broyat} : Concentration en uranium dans le broyat

[U]_{Cytosol} : Concentration en uranium dans le cytosol

[U]_{Dissous} : Concentration en uranium dissous

[U]_{max}^{dyn} : Concentration en uranium labile théorique [obtenue par simulation]

[U]_{inorganique} : Concentration en uranium inorganique

[U]_{labile} : Concentration en uranium labile

[U]_{MOD} : Concentration en uranium lié à la matière organique dissoute

UO₂²⁺ : Cation uranyle

UHPLC (UPLC) : Ultra Haute Performance Liquid Chromatography (Chromatographie en phase liquide ultra haute performance)

[U]_{total} : Concentration en uranium total

UV : UltraViolet

UV-Vis : UltraViolet-Visible

V

V_{gel} : volume de la résine chelex

Vh : Volt-heure (unité de mesure d'une tension × un temps)

V_{HNO3} : volume d'élution Chelex-100 (Application DGT) (mL)

W

WHO : World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé)

X

XANES : X-Ray Absorption Near Edge Structure (spectroscopie de structure près du front d'absorption de rayons X)

Z

Z : numéro atomique

Zn : Zinc élémentaire

Zn²⁺ : Ion zinc

[Zn]_{cytosol} : Concentration en zinc dans le cytosol

INTRODUCTION GENERALE

Dans un cadre où la pollution des eaux et l'exposition aux métaux toxiques sont une préoccupation constante pour la société, l'écotoxicologie s'applique à étudier l'impact éventuel d'un contaminant sur les composants biotiques d'un écosystème afin de pouvoir prendre les mesures nécessaires à sa protection (Meador *et al.*, 2011; Schwarzenbach *et al.*, 2006; Sheppard *et al.*, 2005). Des études sur la toxicité des métaux ont permis de mettre en évidence que leur toxicité n'est pas uniquement corrélée aux conditions d'exposition mais que leur compartimentalisation au sein même des organismes (*e.g.* organes → tissus → cellules → organites → biomolécules) doit être prise en compte (Campbell, 1995; Geffard *et al.*, 2010; Markich, 2002; Van Campenhout *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2003). Ainsi, la fraction cytosolique des cellules, riche en protéines structurelles et fonctionnelles, peptides et métabolites solubles (ensemble ici nommé « biomolécules »), est une fraction d'intérêt toxicologique. En effet, un métal non-essentiel présent dans cette fraction peut former des complexes avec certaines biomolécules et éventuellement altérer leur fonction biologique. Néanmoins, ces complexes ne sont pas forcément toxiques et l'identification des cibles moléculaires des métaux, mises en regard des effets biologiques est nécessaire pour élucider leur toxicité (Bresson *et al.*, 2011; Szpunar, 2004). C'est ici qu'apparaît la notion de spéciation chimique en milieu biologique, c'est-à-dire la distribution d'un élément (*e.g.* uranium) parmi des espèces définies (*e.g.* biomolécules) au sein d'un système (*e.g.* cytosol) (Templeton *et al.*, 2000).

Plus largement, l'analyse de spéciation chimique consiste à identifier et/ou quantifier, les différentes espèces sous lesquelles se trouve un élément (*e.g.* complexes métal-ligand) dans un échantillon considéré. Elle intervient à différents stades de l'exposition et gouverne en grande partie la biodisponibilité, le transfert et la toxicité du métal. En amont, la spéciation chimique dans le milieu d'exposition conditionne l'entrée du contaminant dans l'organisme. Par exemple, des espèces chimiques dissoutes d'un élément n'ont pas le même taux d'internalisation dans un organisme que des espèces précipitées ; parmi les espèces dissoutes, le taux d'internalisation peut aussi être différent. Durant la contamination, la spéciation chimique en milieu biologique régit la migration et le stockage du contaminant dans l'organisme. Par exemple, des complexes métal-biomolécule spécifiques pourraient franchir certaines barrières biologiques alors que l'ion libre pourrait passer à travers des canaux ioniques faiblement sélectifs par analogie physico-chimique avec d'autres métaux essentiels. Enfin, en aval de la contamination, la spéciation joue un rôle sur le devenir du contaminant et notamment son transfert trophique, son dépôt, sa fixation et sa migration dans l'environnement.

Cette thèse s'inscrit dans un contexte d'évaluation des risques chroniques après exposition d'organismes aquatiques aux radionucléides, réalisée à l'IRSN depuis 2001 dans le cadre du programme ENVIRHOM. Elle se rattache au projet ST MALO (SpeciaTion of uranium in Aquatic Living Organisms – Analytical Developments ; ANR-10-JCJC-0713) ayant pour objectif le développement de méthodes analytiques permettant la caractérisation *in vivo* des biomolécules cibles de l'uranium dans des organismes aquatiques après différentes conditions d'exposition.

Parmi les radionucléides, l'uranium est un élément naturellement présent dans une large gamme de concentrations (ng.L^{-1} - mg.L^{-1}) dans les écosystèmes aquatiques (Salonen, 1994; WHO, 2001). Cette amplitude de concentrations s'explique notamment par l'érosion des roches de type granitique, les phénomènes de pollution diffuse à proximité des sites d'extraction (mines) ou d'épandage d'engrais phosphatés riches en uranium (surfaces agricoles) et les rejets accidentels (cycle du combustible pour l'industrie électronucléaire). Dans le cadre du programme ENVIRHOM notamment (IRSN, 2004-2012), il a été montré que l'exposition de différents organismes à cet élément radio- et chimio-toxique, pouvait altérer le métabolisme de certains éléments essentiels (*e.g.* Fe), provoquer des atteintes histologiques des tissus (branchies, muscles...) ou encore induire des effets sur des paramètres relatifs au stress oxydant (Al Kaddissi *et al.*, 2012; Barillet *et al.*, 2010; Donnadiou-Claraz *et al.*, 2007; IRSN, 2004-2012). Cependant les mécanismes impliqués ne sont pas élucidés. Leur compréhension nécessite d'analyser ceux engagés dans le transport, l'assimilation, l'accumulation ainsi que l'excrétion de l'uranium, élément ayant une chimie complexe.

Généralement rencontré sous la forme du cation dur uranyle (UO_2^{2+}) en milieu aérobie, l'uranium présente une affinité pour les biomolécules contenant des fonctions azotées et oxygénées (*e.g.* protéines, peptides, métabolites) (Dedieu *et al.*, 2009; Michon *et al.*, 2010; Van Horn et Huang, 2006).

Chez le poisson, les branchies sont les portes d'entrée d'une exposition par voie directe et assurent une fonction respiratoire, chimio- et osmorégulatrice (Glynn, 1996; Hwang, 2009; Playle, 1998) pouvant être altérée par l'exposition à certains métaux non-essentiels (Farrell *et al.*, 2011). Déterminer la fraction d'uranium toxique dans cet organe et notamment la fraction soluble potentiellement transférable aux autres organes revêt donc un intérêt majeur. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est d'étudier la compartimentalisation cellulaire et la prise en charge de l'uranium par les protéines cytosoliques des cellules branchiales du poisson zèbre (*Danio rerio*) dans des conditions

d'exposition contrastées. La nature des protéines impliquées dans la prise en charge de l'uranium est appréhendée par des outils de la chimie analytique ainsi que l'analyse simultanée de l'uranium et de certains métaux essentiels. La spécificité de ce travail de thèse et donc les défis associés sont en partie dus à la nature non-covalente des interactions U-biomolécule et à leur faible concentration. En effet, la préservation de la stabilité des complexes U-biomolécule, de l'étape d'extraction des branchies jusqu'à la caractérisation moléculaire, est une difficulté analytique majeure.

Le présent manuscrit s'articule en trois chapitres. Le chapitre I est une étude bibliographique divisée en deux parties. Une première partie présente les approches d'évaluation de la toxicité des métaux pour les organismes aquatiques, suivi d'un état de l'art sur l'uranium avec un accent sur sa toxicité et son interaction avec les biomolécules. Une seconde partie décrit les outils et stratégies analytiques pouvant être mis en œuvre pour la caractérisation des complexes U-biomolécule *in vivo*. Le chapitre II détaille le matériel et les méthodes employés pour mener à bien la partie expérimentale de l'étude elle-même comprenant deux sous-parties (i) la création d'une banque d'échantillon par exposition contrôlée de poissons zèbre à l'uranium par voie directe et (ii) la spéciation de l'uranium dans la fraction cytosolique des cellules branchiales. Le chapitre III présente les résultats obtenus et leur discussion en deux parties. La première partie concerne les travaux de développement des outils analytiques permettant *in fine* la caractérisation des complexes U-biomolécule *in vivo*. La deuxième partie regroupe les données liées à la caractérisation de l'exposition des poissons et les résultats de l'application des outils analytiques aux échantillons d'intérêt et leur interprétation écotoxicologique. Finalement, une conclusion générale rappelle les principaux résultats de cette étude et propose des perspectives pour ces travaux.

CHAPITRE I
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE
PARTIE 1

1 Etude bibliographique (Partie 1) : Etat de l'art sur l'uranium, sa chimie et sa toxicité en lien avec sa biodisponibilité et les aspects de compartimentalisation et spéciation

1.1 Approches pour l'évaluation de la toxicité des métaux

Depuis plus de 40 ans, de nombreuses approches ont été développées afin d'évaluer la toxicité des métaux vis-à-vis des organismes aquatiques. Les approches telles que le modèle de l'ion libre (FIAM) ou le modèle du ligand biotique (BLM) visent à relier des effets biologiques à une quantité de métal biodisponible dans le milieu d'exposition (Campbell *et al.*, 2004; Peijnenburg et Vijver, 2007). D'un autre point de vue, l'approche par la détermination de la charge corporelle critique (CBR) s'attache à lier des effets biologiques à un niveau de bioaccumulation du métal dans tout ou partie d'un organisme (Van Campenhout *et al.*, 2010; Vijver *et al.*, 2004). Ces différentes approches reposent sur les concepts de biodisponibilité et de spéciation qui seront définis dans la suite du document.

1.1.1 Définitions de la biodisponibilité et de la spéciation

Un métal est dit biodisponible lorsqu'il est sous une forme chimique assimilable par un organisme vivant (Duffus *et al.*, 2007; Luoma, 1983; Paquin *et al.*, 2002; Rainbow, 2007). La biodisponibilité est donc étroitement liée à la spéciation chimique du métal dans le milieu d'exposition qui représente sa distribution parmi des espèces définies (*e.g.* différents complexes avec des ligands inorganiques et/ou organiques) au sein d'un système (*e.g.* milieu d'exposition) (Templeton *et al.*, 2000).

De la même manière, une fois le métal présent dans un organisme, la spéciation chimique du métal en milieu biologique joue un rôle sur son devenir et sa toxicité. L'analyse de spéciation chimique en milieu biologique consiste à identifier et/ou quantifier, les différentes espèces uniques (*e.g.* complexes métal-biomolécule, précipités...) sous lesquelles se trouve le métal dans le milieu biologique considéré (Templeton *et al.*, 2000). Différentes approches existent pour la détermination de la spéciation chimique des métaux en milieu biologique (Bresson *et al.*, 2011) :

- *in silico* : modélisation et prédiction informatique des interactions métal-ligand par le biais des bases de données thermodynamiques ;

- *in analytico* : étude expérimentale de systèmes modèles simples (métal + ligand modèle) ;
- *in vitro* : exposition de systèmes biologiques isolés (fluide biologique, culture cellulaire) et identification des complexes métal-ligand dans ces matrices complexes ;
- *in vivo* : exposition des organismes entiers (poisson, plante, mammifère) et identification des complexes métal-ligand dans tout ou partie de l'organisme considéré (organes, tissus).

Ces approches sont complémentaires et permettent de contribuer à la compréhension des mécanismes de toxicité des métaux (Ansoborlo *et al.*, 2006). La spéciation expérimentale (*in analytico*, *in vitro* et *in vivo*) repose sur l'utilisation d'outils de la chimie analytique tels que les techniques spectroscopiques (*e.g.* RMN, EXAFS, XANES, UV, IR, SLRT) qui s'attachent à l'étude de systèmes modèles et les techniques analytiques directes (*e.g.* ESI-MS, MALDI, ICP-MS) qui se complètent entre elles pour obtenir des informations à l'échelle moléculaire (masse molaire, stœchiométrie, stabilité) et élémentaire (isotopie, concentration élémentaire). Couplées à des techniques séparatives ces dernières permettent l'étude de systèmes très complexes (*in vivo*) comme c'est le cas dans cette étude. Les aspects analytiques et certaines techniques en particulier seront développés ultérieurement dans ce document.

1.1.2 Approches FIAM et BLM

D'après Campbell *et al.* (2004) le modèle de l'ion libre (Free Ion Activity Model, FIAM), initialement formulé par Morel en 1983, considère que la réponse biologique d'un organisme suite à l'exposition à un métal dissous est fonction de la concentration en ion métallique libre (M^{z+}) dans le milieu d'exposition. En effet, l'ion M^{z+} , éventuellement issu de la dissociation d'un complexe hydrophile ML_n ($L = \text{Ligand}$), va pouvoir se lier à des sites X-cellule (**Figure 1 (ii)**) présents à la surface des cellules exposées (dans notre cas l'épithélium branchial), et la réponse biologique sera directement fonction de la concentration en complexes M-X-cellule. Néanmoins, certaines hypothèses limitent le domaine d'application du FIAM aux expositions courtes (Paquin *et al.*, 2002). De plus, le FIAM ne prend pas en compte la chimie de l'eau alors que la toxicité des métaux est fortement dépendante de certains paramètres abiotiques tels que le pH ou la dureté de l'eau. En effet, ces derniers gouvernent directement la spéciation chimique du métal dans le milieu d'exposition et donc sa biodisponibilité.

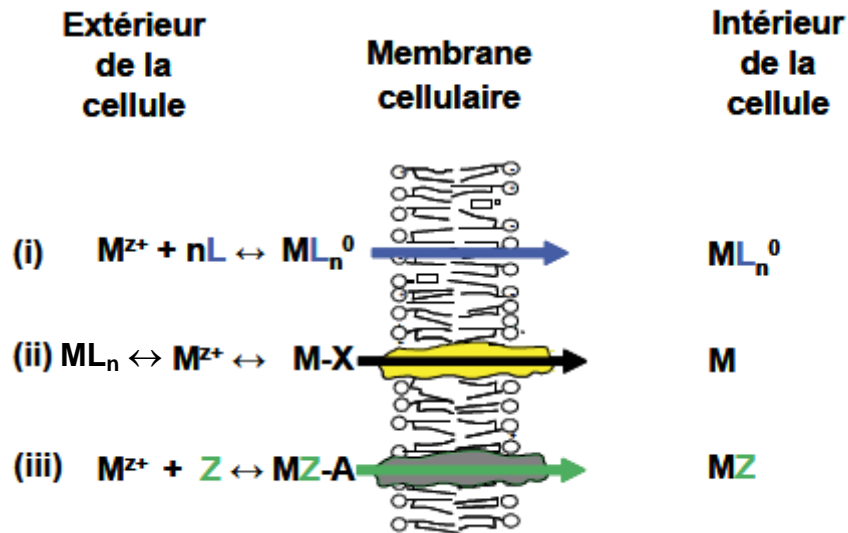


Figure 1 : Mécanismes de prise en charge des métaux par les organismes aquatiques (d'après Pelletier et Campbell, 2008) ; (i) diffusion passive de complexes neutres ML_n ; (ii) prise en charge de l'ion libre M^{z+} (éventuellement issu de la dissociation de ML_n) par un site X ; (iii) transport « accidentel » de complexes MZ par un transporteur membranaire de « Z » peu sélectif

Le modèle du ligand biotique (Biotic Ligand Model, BLM), introduit plus récemment, reprend les hypothèses de base formulées pour le FIAM (Di Toro *et al.*, 2001) et intègre (i) l'impact de la chimie de l'eau (pH, dureté, matière organique dissoute) sur la spéciation du métal ainsi que (ii) la compétition entre les cations majeurs (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ et H^+) et le métal pour la complexation avec le « ligand biotique » (X-cellule). Cette évolution a permis de faire du BLM une approche de référence pour développer des objectifs environnementaux de rejet pour les métaux auprès de différentes instances gouvernementales (Peijnenburg et Vijver, 2007). Des modèles BLM sont aujourd'hui disponibles pour différents métaux parmi lesquels Cu, Cd, Zn, et Ni, mais peu d'études portent sur l'uranium (Fortin *et al.*, 2007). L'application du BLM dans les conditions classiques (*i.e.* pH et dureté de l'eau constants, présence de ligands formant des complexes ML_n hydrophiles) fournit une corrélation entre une réponse biologique choisie et la concentration en métal libre (Campbell, 1995). Toutefois, dans certains cas la réponse biologique n'est pas expliquée par l'ion libre seul et la contribution des espèces hydroxylées, carbonatées ou complexées à de petits métabolites a été envisagée (**Figure 1 (i), (ii) et (iii)**) pour expliquer la toxicité observée. De manière générale, selon le BLM, la complexation de M^{z+} avec des ligands organiques ou inorganiques entraîne une diminution de la biodisponibilité du métal. Cependant, le manque d'études quantitatives

permettant de tester le BLM en présence de MOD (Matière Organique Dissoute) d'origine naturelle (*e.g.* acides humiques et fulviques) limite son applicabilité aux eaux naturelles (Campbell *et al.*, 2004). De plus, le BLM a été développé et calibré avec des résultats de tests de toxicité aiguë et ne s'applique normalement qu'à des espèces aquatiques assimilant le métal dissous par voie directe, *i.e. via* la colonne d'eau. Pour cette raison, il n'est généralement appliqué au poisson que dans le cadre d'une exposition courte pour laquelle la voie directe est le vecteur principal de prise en charge (Pelletier et Campbell, 2008). En effet, l'hypothèse d'absence d'acclimatation ou de changement de la barrière biologique (épithélium branchial) est difficile à maintenir sur un temps d'exposition long comme le montre certaines études (Kamunde *et al.*, 2002; Klinck *et al.*, 2007). Certaines adaptations du BLM pour l'exposition chronique de la daphnie au cuivre ont néanmoins été testées avec plus ou moins de succès (Villavicencio *et al.*, 2011).

1.1.3 Approche CBR et compartimentalisation BIM/BAM

Si les approches FIAM et BLM considèrent que seule une fraction du métal dissous dans le milieu d'exposition est biodisponible et toxique, l'approche charge corporelle critique (Critical Body Residue, CBR) considère de la même manière que seule une fraction du métal internalisé dans une cellule est biologiquement disponible et potentiellement toxique. La CBR définit une quantité seuil pour un métal dans un organisme au-delà de laquelle apparaissent des effets toxiques. Elle repose sur les hypothèses suivantes (Vijver *et al.*, 2004) :

- La concentration corps entier est proportionnelle à la concentration au niveau de la cible toxique ;
- La réponse biologique est proportionnelle à la quantité de métal lié à la cible toxique ;
- La cible toxique est en contact indirect avec le milieu contaminé.

De ce fait, la CBR intègre les mécanismes de transport, les processus métaboliques et la toxicité spécifique à une cible. Ce dernier point fait intervenir le concept de compartimentalisation intracellulaire des métaux. En effet, les organismes sont capables de répartir la charge de métal (**Figure 2**) entre des compartiments cellulaires où le métal pourra être métaboliquement actif (BAM) (*e.g.* cytosol, noyau, mitochondries) et des compartiments où il sera detoxifié (BIM) (*e.g.* granules riches en métaux, lysosomes) (Adams *et al.*, 2011; Vijver *et al.*, 2004; Wallace *et al.*, 2003). La concentration intracellulaire totale du métal s'avère alors peu utile comme prédicteur de toxicité (Pelletier et Campbell, 2008) et l'étude de la compartimentalisation des métaux à l'échelle subcellulaire est nécessaire afin de (i) mieux définir la relation entre la bioaccumulation d'un métal et sa toxicité, et de (ii) mieux

comprendre la cinétique d'entrée, de précipitation et d'interaction du métal avec les biomolécules durant la fixation, le transport et l'incorporation dans une cellule ou un tissu.

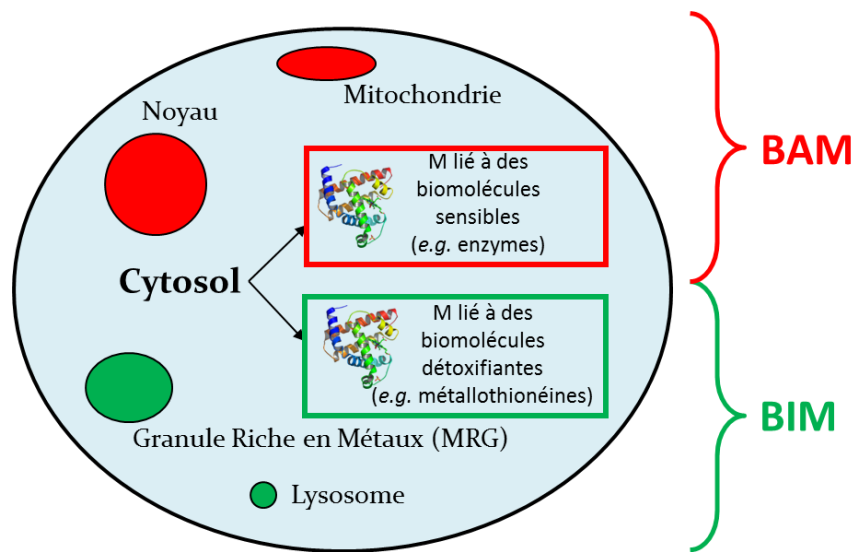


Figure 2 : Répartition schématique des compartiments cellulaires (eucaryote) dans lesquels un métal est métaboliquement actif (BAM) ou inactif (BIM) d'après Eyckmans *et al.* (2012)

Au sein des différents compartiments cellulaires, l'identification des fractions toxiques dans le cytosol présente un intérêt particulier puisque ce dernier est connu pour jouer un rôle dans la toxicocinétique et la toxicodynamique des métaux. Le cytosol est en effet le premier milieu rencontré après traversée de la membrane cellulaire (**Figure 1**). Des études menées sur différents modèles biologiques montrent que cette fraction subcellulaire présente des capacités importantes d'accumulation des métaux. Pour rappel, le cytosol constitue le milieu interne de la cellule (54% du volume cellulaire) dans lequel baignent les organites (*e.g.* noyau, mitochondries, lysosomes...) ainsi que de nombreux ions et biomolécules (*e.g.* protéines, acides aminés, métabolites). Le pool de biomolécules regroupe à la fois des espèces impliquées dans la détoxification des métaux (*e.g.* métallothionéines) et d'autres sensibles à la présence de métaux (*e.g.* enzymes) (Geffard *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2003). En effet, Perceval *et al.* (2006) et Wang *et al.* (1999) ont montré que certains effets toxiques étaient liés à une augmentation de la concentration cytosolique en complexes métal-biomolécule et que des métaux non-essentiels pouvaient former des complexes avec des protéines cytosoliques impliquées dans les mécanismes de detoxication (*e.g.* Cd-métallothionéine). L'identification des biomolécules cibles des métaux est donc un élément clé pour la compréhension des mécanismes de prise en charge, incorporation, stockage et élimination des métaux et *in fine* de leur toxicité (Szpunar, 2004). Aujourd'hui la spéciation chimique des métaux en milieu biologique, autrement dit l'identification et la quantification des métallobiomolécules,

appartient plus largement à une discipline nommée métallomique (Bresson *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2006; Lobinski *et al.*, 2010).

1.2 Généralités sur l'uranium

L'uranium, découvert en 1789 par M.H. Klaproth, est un radioélément faisant partie de la famille des radionucléides primordiaux, c'est-à-dire ceux présents au moment de la formation de la Terre. Il existe 17 isotopes de cet actinide dont le numéro atomique (Z) est 92, mais il est présent naturellement sous la forme de 3 isotopes uniquement : ^{238}U , ^{235}U et ^{234}U . Sa concentration moyenne dans la croûte terrestre et l'eau de mer est de 3 mg/kg et 3 µg/L, respectivement (Bleise *et al.*, 2003). Dans les eaux douces de surface la concentration en uranium est très variable et s'étend de 0,01 µg/L à 12,4 mg/L en fonction du bruit de fond géologique et des activités anthropiques civiles ou militaires (Bonin et Blanc, 2001; Salonen, 1994; WHO, 2011). Il est utilisé industriellement en tant que combustible dans le cycle électronucléaire, contrepoids ou lest d'avions en raison de sa forte densité ($19,3 \text{ g.cm}^{-3}$), bouclier de protection contre les rayonnements ionisants (médecine, conteneurs pour matières radioactives à forte activité) mais aussi militairement pour le blindage de chars, les projectiles sans oublier l'armement nucléaire (ATSDR, 1999; Bleise *et al.*, 2003). L'isotopie de l'uranium est artificiellement modifiée en fonction de l'application souhaitée par le biais de techniques d'enrichissement. L'enrichissement et l'appauvrissement concernent la teneur en isotope fissile ^{235}U par rapport à celle de l'uranium naturel (**Tableau 1**). On parle alors d'uranium enrichi ou appauvri et l'activité massique de ces mélanges se voit aussi modifiée puisqu'elle dépend directement de l'isotopie (**Tableau 2**). L'uranium est un élément non-essentiel (WHO, 2001) qui présente à la fois une toxicité chimique et radiologique. Toutefois, en tant qu'émetteur principalement alpha, la toxicité radiologique de l'uranium se manifeste essentiellement lors d'une contamination interne (ingestion, inhalation ou blessure). Elle est généralement discutée au-delà d'un enrichissement à 5-6% (Mathews *et al.*, 2009). La toxicité chimique reste prépondérante et équivalente dans le cas de l'uranium naturel ou appauvri (ATSDR, 1999; Goulet *et al.*, 2011; Sheppard *et al.*, 2005; Souidi *et al.*, 2009). L'uranium peut adopter quatre états d'oxydation +III, +IV, +V et +VI, néanmoins, en milieu aqueux aérobie il est généralement rencontré à l'état d'oxydation +VI et plus particulièrement sous la forme du cation uranyle (UO_2^{2+}). Il s'agit d'un cation dur, selon la classification de Lewis, de géométrie trans-dioxo linéaire ayant une chimie de coordination très importante et susceptible de former de nombreux complexes avec des biomolécules riches en atomes électronégatifs

(e.g. protéines, peptides, acides nucléiques) (Ansoborlo *et al.*, 2006; Averseng *et al.*, 2010; Dedieu *et al.*, 2009; Michon *et al.*, 2010).

Tableau 1 : Composition isotopique (%) et activité massique de l'uranium naturel et appauvri (Madic et Genet, 2001)

<i>Isotope</i>	<i>Uranium naturel</i>	<i>Uranium appauvri</i>
²³⁸ U	99,2745%	99,8%
²³⁵ U	0,7200%	0,2%
²³⁴ U	0,0055%	< 0,001%
Activité massique (Bq.mg ⁻¹)	25,4	14,8

Tableau 2 : Caractéristiques des isotopes naturels de l'uranium (AIEA; Bleise *et al.*, 2003)

<i>Isotope</i>	<i>Demi-vie (années)</i>	<i>Activité massique (Bq.mg⁻¹)</i>
²³⁸ U	4,5x10 ⁹	12,4
²³⁵ U	7,0x10 ⁸	80
²³⁴ U	2,5x10 ⁵	231000

1.3 Devenir et toxicité de l'uranium chez l'homme et les mammifères

L'ingestion, *via* l'eau de boisson et la nourriture, est la source principale d'exposition du grand public. Le lieu principal d'absorption et de transfert de l'uranium est alors l'intestin grêle, mais seuls 0,1 à 6% de l'uranium ingéré parvient au système sanguin, le reste étant rapidement excrété par les selles (ATSDR, 1999; WHO, 2001). Une fois distribué par le sang, l'uranium est retrouvé dans l'ensemble des tissus mais les principaux lieux de stockage sont les os (66 à 75% de la charge totale en uranium) par échange calcium-uranyle à leur surface (Priest *et al.*, 1982) et les reins (précipités de phosphates d'uranyle dans les cellules tubulaires proximales). Le profil d'accumulation est irrégulier avec des pics à 3, 10 et 19 mois (Paquet *et al.*, 2006) et la voie principale d'excrétion est l'urine (50% à 1 jour, 70% à 10 jours, 85% à 3 mois) (Leggett et Pellmar, 2003). Les reins étant une cible privilégiée de l'uranium, c'est dans cet organe que s'exprime essentiellement la toxicité de l'uranium chez l'homme notamment par une altération de la fonction rénale et des dommages aux cellules tubulaires proximales.

En tant qu'élément radioactif, l'uranium est susceptible d'être carcinogène, toutefois, l'uranium naturel ou appauvri n'est à ce jour pas classé comme tel par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC).

De manière plus générale, l'impact ainsi que la bioaccumulation de l'uranium chez les mammifères, en particulier chez le rongeur, ont été largement étudiés. Les voies de contamination généralement étudiées sont les voies trophique (ingestion de nourriture et eau de boisson), respiratoire (inhalation) et sanguine (blessures). La DL_{50}^1 par voie trophique, voie principale d'exposition, a été définie à 204 mg/kg chez le rat et 242 mg/kg chez la souris (Domingo *et al.*, 1987). De la même manière que pour l'homme, le rat accumule principalement l'uranium au niveau des os et des reins. La toxicité de l'uranium s'exprime également par une altération de la fonction rénale mais aussi par une baisse de la fertilité, des troubles comportementaux ainsi que des effets sur la croissance et le développement des jeunes rats (ATSDR, 1999; Souidi *et al.*, 2009). Par ailleurs, la plupart de ces effets dépendent non-seulement de la dose mais aussi de la forme chimique de l'uranium. En effet, alors qu'aucun effet n'a été observé sur les reins de rats après 30 jours d'exposition par voie trophique à 12000 mgU/kg/jour sous forme UO_2 insoluble, des effets toxiques ont été observés après la même durée et modalité d'exposition à 140-270 mgU/kg/jour sous forme $UO_2(NO_3)_2$ soluble (ATSDR, 2004).

1.4 Toxicité de l'uranium chez les espèces aquatiques : focus sur *Danio rerio*

La contamination des espèces aquatiques d'eau douce passe par deux voies d'inégale importance que sont les voies trophique et directe (*i.e.* respiratoire). Dans de nombreuses études la voie de contamination choisie est la voie directe, c'est-à-dire *via* la colonne d'eau. Cette voie, généralement minoritaire chez les mammifères, permet une contamination plus homogène de la population chez les espèces aquatiques par opposition à la voie trophique plus individu dépendante. Selon le FIAM présenté précédemment, c'est la concentration en ion uranyle (UO_2^{2+}) qui gouvernerait la biodisponibilité et la toxicité de l'uranium dans la colonne d'eau. Toutefois, certaines études ont montré des limites à l'applicabilité du FIAM pour l'uranium, en particulier lorsque que le pH varie (Fortin *et al.*, 2007; Markich *et al.*, 2000). A titre d'exemple, la toxicité de l'uranium augmente de manière inversement proportionnelle avec l'augmentation de la dureté de l'eau à pH constant (Sheppard *et al.*, 2005). Dans le cas

¹ Dose Létale pour 50% de la population

de l'uranium, et en accord avec les observations du BLM, les espèces supposées biodisponibles sont UO_2^{2+} , UO_2OH^+ , $\text{UO}_2(\text{OH})_2$ et UO_2CO_3 (Beaugelin-Seiller *et al.*, 2009; Fortin *et al.*, 2007; Goulet *et al.*, 2011; Markich, 2002). Par ailleurs, dans le cas du poisson, le choix de la voie directe promeut la branchie au rang d'organe d'entrée du contaminant dans l'organisme et en fait un organe d'intérêt toxicologique majeur.

Les branchies représentent l'organe de respiration et d'excrétion du poisson. Elles sont présentes au nombre de huit et se composent de trois parties principales (**Figure 3**) :

1. L'arc branchial, servant de support aux deux feuillets formant l'épithélium branchial ;
2. Les filaments branchiaux, par le biais desquels est apporté le sang appauvri en dioxygène (O_2) et enrichi en dioxyde de carbone (CO_2) ;
3. Les lamelles secondaires, siège de l'échange gazeux.

Le rôle principal des branchies consiste donc à échanger le dioxyde de carbone (CO_2), produit de l'activité biologique et transporté par le sang, avec le dioxygène (O_2) dissous dans l'eau et nécessaire à l'activité biologique. Toutefois, la respiration dans un milieu 784 fois plus dense que l'air et 25 000 fois plus pauvre en dioxygène requiert certaines spécificités (**Figure 4**). En effet, cet échange est rendu possible thermodynamiquement par une forte affinité de l'hémoglobine (pigment respiratoire riche en Fe) pour le dioxygène couplée à une circulation eau/sang à contre-courant, une surface d'échange très importante (très nombreuses lamelles secondaires d'épaisseur cellulaire) et un temps de contact eau/branchie allongé par la capacité du poisson à fermer ses opercules et donc à retenir temporairement l'eau dans la cavité branchiale. Par ailleurs, les branchies sont aussi impliquées dans le processus d'osmorégulation du poisson par échange d'eau et de NaCl (*via* des canaux ioniques) avec le milieu extérieur (Hwang).

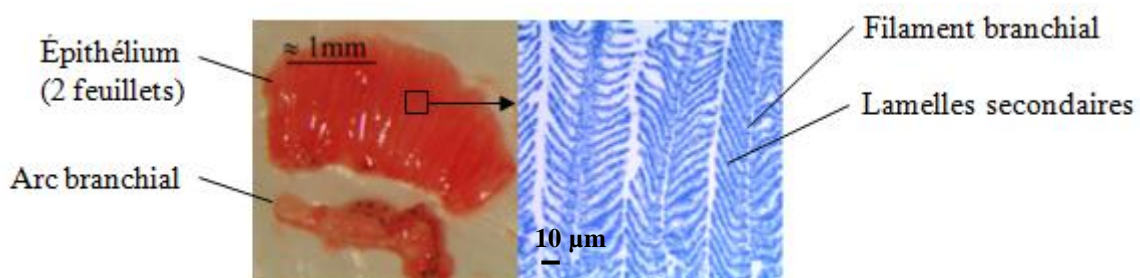


Figure 3 : Branchie de *Danio rerio* observée à la loupe binoculaire (épithélium séparé de l'arc branchial) (gauche) et coupe d'un feuillet vue au microscope optique (droite)

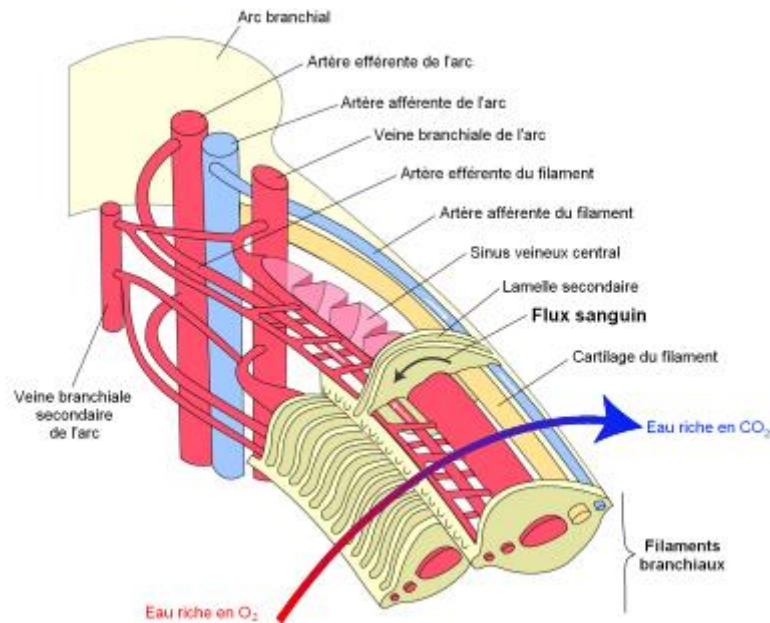


Figure 4 : Représentation schématique d'une portion de branchie de poisson téléostéen incluant deux filaments et leurs lamelles secondaires (adapté de Perry, 2008)

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un eucaryote de l'infra-classe des téléostéens et appartenant à la famille des cyprinidés. Il se distingue depuis plus de vingt ans parmi les modèles de vertébrés inférieurs notamment dans le cadre d'études en génétique et développement mais aussi plus récemment pour l'étude de certaines maladies humaines, le criblage des molécules thérapeutiques sans oublier, bien sûr, la toxicologie aquatique et le comportement (Hill *et al.*, 2005; Lawrence, 2007). Sa petite taille (3-4 cm de long pour 400-500 mg), son génome intégralement séquencé, son développement rapide, sa robustesse, sa tolérance en termes de température, pH et qualité de l'eau en font un modèle de choix (Lawrence, 2007). Pour ces raisons, le poisson zèbre a été choisi à plusieurs reprises pour étudier les effets de la contamination par l'uranium (Goulet *et al.*, 2011; Labrot *et al.*, 1999) et a notamment fait l'objet de différentes thèses au sein de l'IRSN (Augustine, 2012; Barillet, 2007; Bourrachot, 2009; Lerebours, 2009). Toutefois, à ce jour peu de données sont disponibles sur le devenir de l'uranium dans cet organisme et les mécanismes exacts de toxicité ne sont pas toujours connus (Goulet *et al.*, 2011).

Selon Labrot *et al.* (1999) le poisson zèbre présente une CL_{50}^2 (96 h) de $3,05 \text{ mgU.L}^{-1}$ après une exposition aiguë à l'acétate d'uranyle par voie directe ce qui le place comme relativement sensible par rapport à des espèces telles que le bivalve *Corbicula fluminea* pour lequel la CL_{50}

² Concentration Létale pour 50% de la population

est de 1800 mgU.L⁻¹. Ils montrent aussi au cours d'une exposition chronique (151 µgU.L⁻¹ sur 28 jours par voie directe) que *Danio rerio* accumule l'uranium très lentement et/ou l'élimine rapidement en parallèle puisque la bioaccumulation se poursuit régulièrement jusqu'au 28^{ème} jour pour atteindre la concentration corps entier de 1,04 ± 0,10 µgU.g⁻¹ de poids frais de poisson. Cette bioaccumulation est réversible puisqu'une période de dépurative consécutive met en évidence une forte diminution de la charge en uranium (Labrot *et al.*, 1999). Les principaux effets pouvant être observés suite à la contamination du poisson zèbre par voie directe après exposition chronique (20 à 30 jours) ou aiguë (3 à 10 jours) sont résumés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Etat de l'art sur les effets et organotropisme liés à la contamination à l'uranium appauvri par voie directe du poisson zèbre

Effets et organotropisme	Exposition
Bioaccumulation dans les branchies, le foie, les reins, les muscles, le cerveau et les gonades (impliquant le passage des barrières hémato-encéphalique et hémato-testiculaire) (Barillet <i>et al.</i> , 2011; Lerebours <i>et al.</i> , 2010)	0, 20, 100 et 500 µg.L ⁻¹ 0, 5 et 20 jours
Altérations histologiques des branchies, des muscles, des gonades et du cerveau (Barillet <i>et al.</i> , 2010; Bourrachot <i>et al.</i> , 2008; Lerebours <i>et al.</i> , 2010)	0, 20, 100 et 500 µg.L ⁻¹ 0, 3, 5, 10, 20 et 28 jours
Domages à l'ADN (cassures double brin) des érythrocytes, hépatocytes, cellules germinales et embryonnaires (Barillet, 2007; Barillet <i>et al.</i> , 2011)	500 µg.L ⁻¹ 20 jours
Perturbation de la balance oxydative du foie (SOD, Catalase) (Barillet, 2007)	100 µg.L ⁻¹ U _{appauvri} et U enrichi en ²³³ U 3, 10 et 20 jours
Diminution du succès reproducteur et de la survie de la progéniture (Bourrachot <i>et al.</i> , 2008; Simon, 2013 (Unpublished))	0, 20, 250 et 500 µg.L ⁻¹ 0, 3, 5, 10, 20 et 28 jours
Inhibition du contrôle respiratoire (Lerebours <i>et al.</i> , 2010)	0, 20 et 100 µg.L ⁻¹ 3, 10, 21 et 28 jours
Perturbation de la synthèse protéique et notamment diminution de la synthèse de vitellogénine (réserves nutritives embryonnaires) et augmentation de COXI et COXIV (chaîne respiratoire) (Bourrachot <i>et al.</i> , 2008; Lerebours <i>et al.</i> , 2010)	0, 20, 100 et 500 µg.L ⁻¹ 0, 3, 5, 10, 20 et 28 jours

Un niveau d'exposition de 20 µg.L⁻¹ est représentatif d'une possible contamination environnementale alors que des niveaux d'exposition de l'ordre de 100 à 500 µg.L⁻¹ sont plutôt représentatifs d'une contamination incidentelle (Goulet *et al.*, 2011). Notons que la

PNEC³ actuellement retenue pour l'uranium dans les écosystèmes aquatiques est de 0,3 µg.L⁻¹ (Beaugelin-Seiller *et al.*, 2009) et un effort particulier est porté sur la détermination d'une PNEC conditionnelle, *i.e.* fonction de la dureté, du pH et de la MOD dans le milieu d'exposition.

La bioaccumulation mesurée par Barillet *et al.* (2011) met en évidence une distribution hétérogène de l'uranium à travers le corps du poisson zèbre avec une concentration maximum au niveau des branchies, du foie et des reins. Lorsqu'il s'agit de femelles, plus de 20% de l'uranium corporel peut être présent dans les ovocytes et est donc susceptible d'être dépuré lors de la ponte (Simon *et al.*, 2011b). De plus, les cycles de ponte ne sont pas synchronisés entre différentes femelles, ce qui peut ajouter un facteur de variabilité interindividuelle. Pour ces raisons, l'étude présentée dans ce manuscrit ne concerne que des mâles. L'étude des données bibliographiques montre que la bioaccumulation de l'uranium conduit à des effets à différentes échelles moléculaires, biochimiques, physiologiques et comportementales. Cependant, la perturbation des mécanismes d'ionorégulation des éléments traces essentiels (*e.g.* Fe, Cu, Zn), observée pour plusieurs métaux toxiques (*e.g.* Pb, Cd, Ag et Al) chez différentes espèces de poissons (Farrell *et al.*, 2011), n'a pas été rapportée à ce jour pour l'uranium. Par ailleurs, plusieurs études se sont intéressées à l'induction de métallothionéine, une protéine cytosolique connue pour son rôle détoxifiant *via* sa capacité à séquestrer des métaux tels que Hg, Cu, Cd et Zn (Amiard *et al.*, 2006; Geffard *et al.*; Wright et Welbourn, 2002). Il apparaît que dans le cas de l'uranium, l'induction est aléatoire voire absente (Al Kaddissi *et al.*, 2011; Cooley *et al.*, 2000). Ce résultat est en accord avec la faible capacité de la métallothionéine à lier l'uranium ($\log K = 6,8$) (Michon *et al.*, 2010).

1.5 Etat de l'art sur les complexes uranium-protéine

A ce jour, la spéciation chimique de l'uranium en milieu biologique a été principalement étudiée dans les fluides biologiques et en particulier dans le plasma (ou sérum) sanguin (Chevari et Likhner, 1968; Sutton et Burastero, 2004). Dans ce fluide, l'uranium se répartit entre les carbonates (50-60%), les protéines (30%) et les érythrocytes (10-20%). Les protéines présentes dans le plasma font encore aujourd'hui l'objet d'études *in silico*, *in analytico*, *in vitro* et *in vivo* pour l'identification des cibles protéiques de l'uranium ainsi que des propriétés des complexes uranium-protéine (*e.g.* sites de fixation, stœchiométrie, constante de stabilité)

³ Predicted No-Effect Concentration : concentration qui devrait ne causer aucun effet adverse à une population naturelle dans un environnement à risque d'exposition à une substance donnée.

(Averseng *et al.*, 2010; Basset *et al.*, 2013; Dedieu *et al.*, 2009; Hémadi *et al.*, 2011; Michon *et al.*, 2010; Montavon *et al.*, 2009; Scapolan *et al.*, 1998; Vidaud *et al.*, 2005; Vidaud *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2013). D'un point de vue thermodynamique, le cation uranyle (UO_2^{2+}), acide dur selon la classification de Lewis, est susceptible de se lier à des groupements donneurs riches en oxygène tels que les fonctions carboxyle ou alcool portées par certains acides aminés contenus dans les protéines (Glu, Asp, Tyr) ou les groupements phosphates. Cependant, la configuration électronique de l' $\text{U}^{(\text{VI})}$ prédit une prédominance des interactions électrostatiques dans la chimie de coordination de l'uranyle (Van Horn et Huang, 2006) et donc suppose la formation de complexes essentiellement non-covalents. Par ailleurs, l'uranium s'est révélé perturbateur du métabolisme du fer après contamination de rongeurs pour lesquels des précipités de fer et de ferritine ont été observés dans les reins (Donnadiu-Claraz *et al.*, 2007). Ce résultat motive notamment l'étude de métalloprotéines impliquées dans le transport et le stockage de métaux essentiels.

Le **Tableau 4** regroupe les caractéristiques de plusieurs protéines cibles potentielles de l'uranium préalablement identifiées et dont la complexation avec l'uranyle a été étudiée *in vitro*. La complexation de l'uranium par la transferrine a été particulièrement étudiée. Il a été mis en évidence que (i) l'uranium occupe la place du fer dans les lobes C et N terminaux avec pour conséquence (ii) une modification de la structure tertiaire de la protéine accompagnée d'une perte d'activité biologique (Hémadi *et al.*, 2011; Vidaud *et al.*, 2007). Toutefois, l'affinité du fer pour la transferrine reste supérieure à celle de l'uranium. L'étude de l'albumine par Montavon *et al.* (2009) a montré que la formation du complexe ternaire albumine-uranyle-carbonate est favorisée avec un log K de 17 comparé au log K de 11 obtenu pour la formation du complexe binaire albumine-uranyle. Plus récemment, Basset *et al.* (2013) ont observé que la féтуine présente une affinité plus de 1000 fois supérieure pour l'uranyle en comparaison à la transferrine et de l'albumine. Cette protéine serait donc une cible majoritaire de l'uranium dans le sérum en dépit d'une concentration physiologique inférieure à celles de la transferrine et de l'albumine (Basset *et al.*, 2013), et donc un nombre de sites inférieur. De plus, des résultats *in vitro* préliminaires montrent qu'au moins une fonction biologique de la féтуine ne serait pas altérée lors de la formation du complexe U-féтуine. Enfin, la complexation de l'uranium par la ferritine (474 kDa) a été étudiée par Michon *et al.* (2010) et il apparaît que cette protéine est capable de lier pas moins de 500 ions uranyle.

Tableau 4 : Caractéristiques de certaines protéines cibles de l'uranium à pH 7,4 (sauf indication contraire)

<i>Protéine</i>	<i>Stœchiométrie (U:protéine)</i>	<i>Logarithme de la constante de complexation (Log K)</i>	<i>Constante de dissociation apparente (K_d)**</i>	<i>Origine</i>	<i>Référence</i>
Transferrine (80 kDa)	2:1		2,8 µM	Sérum	(Averseng <i>et al.</i> , 2010)
	2:1	14*		Sérum	(Montavon <i>et al.</i> , 2009)
	2:1	7,7*		Sérum	(Michon <i>et al.</i> , 2010)
Ferritine (474 kDa)	521:1	5,3		Rate	(Michon <i>et al.</i> , 2010)
Métallothionéines (6-7 kDa)	3:2	6,5		Foie	(Michon <i>et al.</i> , 2010)
Albumine (65 kDa)	1:1		17 µM	Sérum humain	(Averseng <i>et al.</i> , 2010)
	1:1	11*		Sérum humain	(Montavon <i>et al.</i> , 2009)
	5:1	6,1*		Sérum humain	(Michon <i>et al.</i> , 2010)
	1,3:1	4,8		Sérum bovin	(Yang <i>et al.</i> , 2013)
Calmoduline (peptide EF-hand 1)			25 nM (pH 6) 5 nM (pH 6)	Synthétique « natif » « phosphorylé »	(Pardoux <i>et al.</i> , 2012)
Ostéopontine (peptide H8V)	1:1	5,4 (pH 4,5)		Synthétique	(Safi <i>et al.</i> , 2013)
Immunoglobuline (150 kDa)			20 µM	Sérum	(Basset <i>et al.</i> , 2013)
Apolipoprotéine (31 kDa)			10 µM	Sérum	(Basset <i>et al.</i> , 2013)
Féтуine (48 kDa)	3:1		30 nM	Sérum	(Basset <i>et al.</i> , 2013)

*Hypothèses de calcul différentes (interaction U-Protéine mono/bidentate)

**K_d = ([Protéine][UO₂²⁺])/[Protéine-UO₂²⁺] ↔ K_d ∝ affinité ↗

Des peptides de synthèse représentant des fragments de séquence protéique d'intérêt ont également fait l'objet d'études *in vitro* pour la complexation de l'uranyle. L'ostéopontine, une protéine impliquée dans la régulation de la croissance osseuse, a été identifiée comme cible potentielle de l'uranium (Safi *et al.*, 2013). Une région particulière de cette protéine a été soupçonnée d'être responsable de la complexation de l'uranium. Il s'agit du peptide phosphorylé H8V. Il apparaît que ce peptide est en effet capable de lier un ion uranyle par le biais d'un oxygène porté par un groupement phosphate et des deux oxygènes portés par un

groupement carboxyle. La constante de complexation ($\log K$) est de l'ordre de 3 à 5 pour un pH compris entre 3,5 et 4,5 (Safi *et al.*, 2013). Le rôle potentiel de la phosphorylation dans la complexation de l'uranium par les protéines a été particulièrement appuyé par l'étude de Pardoux *et al.* (2012) en montrant que l'affinité d'un peptide spécifique du calcium (calmoduline EF-Hand 1) pour l'uranium à pH 6 pouvait être augmentée d'un facteur 5 après phosphorylation. Le pH joue aussi un rôle important puisque pour le même peptide phosphorylé, l'affinité pour l'uranium augmente encore d'un facteur 15 entre pH 6 et 7 (Pardoux *et al.*, 2012). Li *et al.* (2010) ont aussi montré la capacité de la phosphovitine, une protéine hautement phosphorylée dérivée de la vitellogénine (Wallace et Selman, 1981), à lier l'uranium.

Certains organes cibles de l'uranium ont été récemment étudiés sur le plan moléculaire *in vivo* après exposition d'organismes ou *via* des cultures cellulaires. Les reins de rongeurs (Dedieu *et al.*, 2009; Frelon *et al.*, 2009) ainsi que l'hépatopancréas et les branchies d'écrevisses (Frelon *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013) ont pu faire l'objet de ces études. Le criblage des protéines susceptibles de lier l'uranium dans les reins de rats exposés à l'uranium met en évidence le caractère plutôt acide des protéines liant l'uranium ainsi que la tendance prononcée de l'uranium à se lier de manière non-covalente aux protéines (Frelon *et al.*, 2009). Quelques protéines ont été proposées comme cibles potentielles pour l'uranium parmi lesquelles l'albumine, la serotransferrine, la ferritine et l'actine. Enfin, les travaux de Dedieu *et al.* (2009) ont permis l'identification de 64 protéines susceptibles de lier l'uranium dans un extrait cellulaire des cellules rénales humaines (HK-2). Parmi celles-ci se trouvent des protéines phosphorylées ou phosphorylables ainsi que des protéines ayant des capacités pour lier des cations durs de Lewis (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}). Enfin, dans le cytosol des cellules de l'hépatopancréas d'écrevisses exposées à l'uranium, Xu *et al.* (2013) ont identifié l'hémocyanine comme cible potentielle de l'uranium. Il s'agit d'un pigment respiratoire, équivalent de l'hémoglobine présente chez les vertébrés, contenant du cuivre à la place du fer. Par ailleurs, il a été une fois de plus noté que les protéines liant l'uranium affichent un caractère plutôt acide.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 2

2 Etude bibliographique (Partie 2) : Outils et stratégies pour la spéciation biologique de l'uranium

2.1 Approches permettant l'identification des protéines

Comme nous l'avons vu dans la première partie de cette étude bibliographique, l'identification des protéines impliquées dans la liaison de l'uranium est un prérequis pour comprendre les mécanismes de toxicité de ce métal. Cette identification peut potentiellement être obtenue par les trois approches développées pour l'analyse protéomique (**Figure 5**) (Mounicou *et al.*, 2009) :

1. L'approche **bottom-up** permet l'identification d'une protéine par mesure de la masse exacte de quelques peptides constitutifs de celle-ci, et en particulier des peptides dits uniques, *i.e.* qui n'appartiennent qu'à une seule protéine. Elle repose généralement sur l'isolement des protéines d'un échantillon sur un gel d'électrophorèse bidimensionnel (2D-GE) suivi de l'excision des taches (spot) protéiques d'intérêt, de leur digestion enzymatique et de l'analyse par spectrométrie de masse moléculaire en tandem (ESI-MS/MS) des peptides résultants.
2. L'approche **shotgun** est comparable à l'approche Bottom-up dans le sens où les protéines sont identifiées par le biais de leurs peptides constitutifs mais dans ce cas l'extrait protéique entier subit une digestion enzymatique suivi d'une séparation des peptides par chromatographie liquide bidimensionnelle (2D-LC) haute résolution et analyse par spectrométrie de masse moléculaire en tandem (ESI-MS/MS).
3. L'approche **top-down** vise à séparer (généralement par chromatographie en phase liquide) les protéines intactes pour les introduire dans un spectromètre de masse moléculaire haute résolution (ESI-FT-MS) dans lequel elles seront directement fragmentées (par photodissociation, collision ou capture d'électrons). La masse exacte des fragments obtenus permet de remonter à l'identité de la protéine.

Les approches décrites ci-dessus sont celles développées pour la protéomique mais la métallobiologie impose l'adaptation des protocoles afin de (i) préserver le lien entre métal et protéine à chaque étape, (ii) pouvoir localiser les protéines porteuses du métal d'intérêt (généralement par ICP-MS) et (iii) purifier et/ou préconcentrer les complexes métal-protéine (Mounicou *et al.*, 2009). De plus, lorsque la liaison entre un métal et une protéine est de type non-covalent, comme c'est le cas pour l'uranium, des précautions supplémentaires doivent être prises afin de maintenir l'intégrité des complexes métal-protéine. A cet effet,

l'approche shotgun n'est pas applicable puisqu'elle repose sur la dénaturation de l'ensemble des protéines (digestion enzymatique) résultant souvent en la perte des métaux faiblement liés. Seules les approches bottom-up et top-down permettent la séparation et la localisation des complexes métal-protéine non-covalents intacts avant l'étape ultime d'identification.

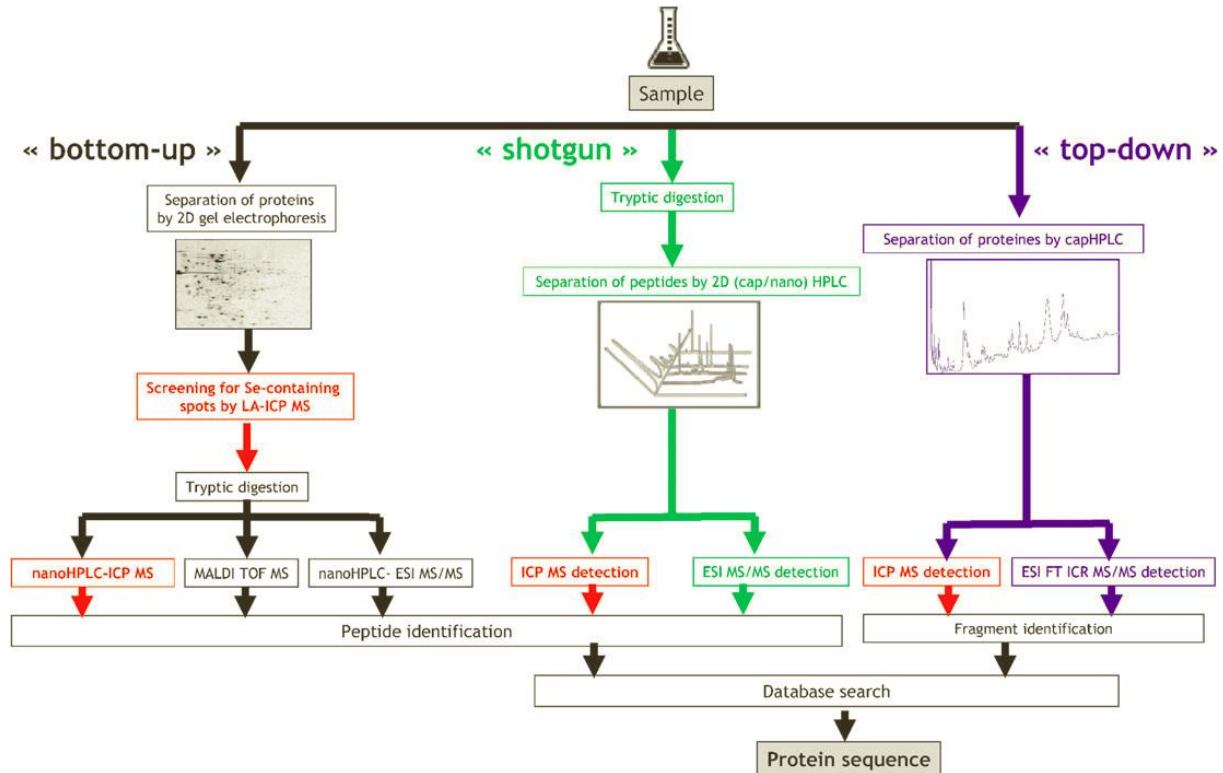


Figure 5 : Approches protéomiques intégrant la détection élémentaire pour la localisation des metalloprotéines (extrait de Mounicou *et al.* 2009)

Si l'approche bottom-up a fait ses preuves pour l'identification des protéines dans les mélanges complexes, les techniques d'électrophorèse sur gel qui sont habituellement employées dans cette stratégie peuvent entraîner la perte des complexes uranium-protéine faibles par échange avec les impuretés métalliques éventuellement présentes dans le gel ou bien suite à la coloration/décoloration des gels en vue de visualiser les protéines sur le gel. Il est impératif d'utiliser des réactifs de très haute pureté ainsi que des méthodes de coloration « douces » voire d'éviter la coloration. La localisation des metalloprotéines dans les gels peut être réalisée par ablation laser (LA) couplée à la spectrométrie de masse élémentaire (ICP-MS), spectroscopie de rayons X (*e.g.* EDX, PIXE) ou encore autoradiographie. La technique LA-ICP-MS est généralement préférée pour sa sensibilité et ses limites de détection plus basses (Becker *et al.*, 2008). Toutefois, quand le gel n'est pas coloré, et donc que les protéines ne sont pas localisées, il est nécessaire de scanner l'intégralité de la surface du gel à « l'aveugle » ce qui peut s'avérer long (*e.g.* 15 heures pour 5 cm²) (Mounicou *et al.*, 2009).

D'autre part, l'identification des protéines requiert l'excision des taches protéiques d'intérêt suivie d'un traitement chimique et enzymatique avant analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse moléculaire (LC-ESI-MS/MS). L'ensemble de ce processus d'identification peut s'avérer long lorsqu'il y a plusieurs taches protéiques à traiter. L'approche top-down peut constituer une alternative techniquement plus simple en couplant des méthodes séparatives non-dénaturantes en milieu liquide. En outre, elle permet de s'affranchir de certains produits chimiques utilisés dans l'approche bottom-up, présentant des risques importants pour la santé (*e.g.* acrylamide, iodoacétamide, DTT). En effet, les métalloprotéines peuvent être théoriquement détectées et identifiées par couplage direct « en ligne » avec l'ICP-MS et en parallèle avec l'ESI-MS/MS. Le succès de cette stratégie repose cependant sur quelques conditions parmi lesquelles (i) la nécessité de disposer d'un spectromètre de masse moléculaire à haute résolution et (ii) la capacité à séparer des métalloprotéines intactes et en particulier celles de haut poids moléculaire.

Les paragraphes suivants vont s'attacher à la description des techniques existantes pour la préparation des échantillons et la séparation des biomolécules, et en particulier des métallobiomolécules. La pertinence des méthodes sera discutée en regard de la problématique de maintien des complexes uranium-biomolécule.

2.2 Préparation des échantillons et fractionnement subcellulaire

D'un point de vue pratique et schématique, il s'agit d'exposer des poissons zèbre à l'uranium, de les sacrifier, d'en extraire les branchies, de séparer l'épithélium, de lyser les cellules et de réaliser un fractionnement subcellulaire permettant l'isolement de la fraction cytosolique. La préparation des échantillons fait l'objet d'un chapitre à part entière et sera développé plus loin dans ce manuscrit (cf. section 4.1). Elle comporte plusieurs étapes importantes et nécessite l'étude de trois paramètres en regard des critères de maintien des complexes uranium-biomolécule, de petitesse des échantillons et de niveaux d'exposition proches de l'environnement : l'étude (i) du tampon de lyse cellulaire, (ii) de la méthode de lyse cellulaire et (iii) de la technique de fractionnement subcellulaire.

2.2.1 Etude du tampon de lyse cellulaire

La lyse cellulaire consiste donc en la rupture de la membrane plasmique donnant ainsi accès au contenu intracellulaire. Cet éclatement cellulaire doit être réalisé sans dénaturation des membranes des organites afin de pouvoir étudier le cytosol seul comme décrit dans la

première partie de cette étude bibliographique. La lyse cellulaire est réalisée dans un tampon répondant généralement à plusieurs critères qui sont : un pKa proche du pH « physiologique » (7-7,5), la neutralité chimique, une faible absorbance UV, une osmolarité proche du milieu biologique étudié, un pouvoir tampon faiblement impacté par une variation de la température ou de la force ionique et une bonne perméabilité membranaire (Scopes, 1994). Le choix du tampon dépend également des applications prévues en aval. Ainsi, des critères de volatilité ou de densité peuvent être pris en compte. Les tampons biologiques historiques tels que le phosphate salin (PBS) ou le trishydroxyméthylaminométhane-HCl (Tris-HCl) ne sont pas particulièrement adaptés pour l'étude des complexes uranium-biomolécule en raison de leur pouvoir complexant vis-à-vis de l'uranium. Dans la littérature, les tampons HEPES et MES sont utilisés comme alternative pour l'analyse des complexes protéiques de l'uranium en raison de leur très faible pouvoir complexant de l'uranium (Mirto *et al.*, 1999; Scapolan *et al.*, 1998). Cependant, HEPES et MES présentent d'autres inconvénients comme une faible volatilité. Ce dernier point sera discuté dans le chapitre dédié en section 4.1.

2.2.2 Etude de la méthode de lyse cellulaire

Différentes techniques plus ou moins douces peuvent être employées pour la lyse cellulaire, et reposent sur une action physique ou chimique. D'autre part, le travail à l'échelle individuelle (quelques mg de tissus) nécessite le recours à des techniques adaptées aux faibles volumes (quelques centaines de μL). Pour cette étude, notre attention s'est portée sur la conservation maximum de la spéciation native de l'uranium et des interactions faibles uranium-biomolécule. Pour cette raison, les méthodes chimiques faisant notamment appel à des détergents n'ont pas été envisagées. Le **Tableau 5** récapitule certaines caractéristiques, avantages et inconvénients des méthodes physiques en regard de notre problématique de conservation de la spéciation de l'uranium ainsi que de la faible dimension et de la texture de notre échantillon, l'épithélium branchial, qui est un tissu mou.

Tableau 5 : Comparaison des méthodes physiques de lyse cellulaires

<i>Méthode</i>	<i>Echantillon</i>	<i>Volume utile</i>	<i>Avantages</i>	<i>Inconvénients</i>
Broyeurs à lames rotatives type Ultra-Turrax	Corps entier, organes et muscles	1 mL à quelques litres	Rapide Echantillon à 4°C Faible volume	Adsorption sur lames Echauffement localisé au niveau des lames
Broyeurs à billes type Precellys	Organes divers et muscles	0,5 à quelques millilitres	Rapide Faible volume Maintien à 4°C optionnel	Echauffement rapide de l'échantillon Prix et disponibilité Adsorption et perte de matière sur billes
Broyeur à piston type Potter-Elvehjem	Suspension cellulaire, organes et tissus mous	0,1 à quelques millilitres	Bio-inerte (PTFE, verre) Rapide Prix Faible volume Echantillon à 4°C	Plus lent afin de limiter l'échauffement du piston
Presse de French	Suspension cellulaire	40 à 250 mL	Rapide (1 à 2 passes)	Volume et type d'échantillon inappropriés Prix et disponibilité Control en température ?
Sonication	Suspension cellulaire, organes et tissus mous émincés	≈ 1 à 100 mL	Rapide Faible volume Directement dans le tube centrifuge	Adsorption sur sonde Prix et disponibilité Echauffement localisé intense et risque d'agrégation des protéines
Cycles congélation-décongélation	Suspension cellulaire	Faible (≈ millilitre)	Faible volume Directement dans le tube centrifuge	Long Type d'échantillon Décongélation > 4°C

L'étude des caractéristiques de chaque méthode fait ressortir une technique, *a priori* plus adaptée à nos exigences, à savoir le broyeur à piston de type Potter-Elvehjem. Il combine un faible coût, la rapidité, l'adaptation aux faibles volumes et aux tissus mous et la conservation de l'échantillon à basse température.

2.2.3 Etude de la technique de fractionnement subcellulaire

En fonction de la problématique, il peut s'avérer nécessaire de récupérer différents compartiments subcellulaires ou organites. On pense notamment à l'approche de compartimentalisation BIM/BAM exposée dans la section 1.1.3. Ce fractionnement subcellulaire est essentiellement réalisé par centrifugation différentielle (**Figure 6**) (Frelon *et al.*, 2013; Geffard *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2003). Cette technique simple repose sur la

différence de densité entre chacun des organites et nécessite une augmentation de la densité du tampon par ajout de sucre.

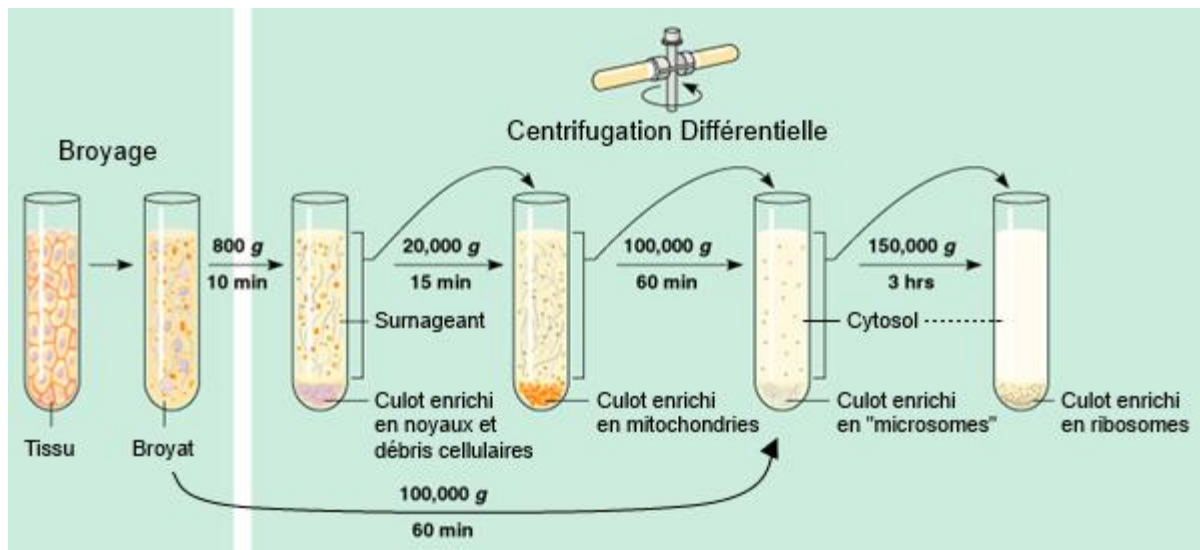


Figure 6 : Fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle

Dans cette étude, certaines contraintes (*e.g.* volatilité du tampon, dimension de l'échantillon, rapidité) nous cantonnent à l'isolement direct du cytosol en l'absence de sucre par une simple étape d'ultracentrifugation à 100 000 g durant 1 heure.

La fraction cytosolique des cellules contient de très nombreuses biomolécules (*e.g.* protéines, peptides, enzymes, complexes protéiques) plus ou moins abondantes. Il est de ce fait nécessaire de mettre en œuvre des techniques hautement résolutive pour séparer ce mélange complexe et identifier ces biomolécules. Différentes techniques sont disponibles en fonction du paramètre de discrimination choisi (Issaq *et al.*, 2002) et seront décrites dans le chapitre suivant.

2.3 Techniques séparatives pour l'analyse des (métallo)protéines intactes

Le pool protéique contenu dans le cytosol peut être fractionné par différentes techniques reposant chacune sur un critère physico-chimique de séparation qui lui est propre (*e.g.* rayon hydrodynamique, point isoélectrique, charge, hydrophobicité, interaction analyte-récepteur spécifique). On peut dans un premier temps distinguer les techniques chromatographiques pour lesquelles les analytes (neutres ou chargés) sont entraînés par une phase mobile (liquide ou gaz) et les techniques électrophorétiques pour lesquelles les analytes (chargés) sont

entraînés par une différence de potentiel électrique. Une critique sera portée sur l'applicabilité des techniques présentées dans cette étude bibliographique à la séparation de protéines « intactes » et notamment à la problématique de conservation des complexes uranium-biomolécule.

2.3.1 Techniques chromatographiques

Parmi les techniques chromatographiques nous allons nous intéresser dans un premier temps à la chromatographie d'exclusion stérique et au fractionnement flux-force. Pour ces deux techniques le critère de séparation est le rayon hydrodynamique des protéines, c'est-à-dire le rapport entre leur masse (structure primaire = séquence) et leur géométrie (structures secondaire, tertiaire et quaternaire). Nous nous intéresserons ensuite à la chromatographie ionique ainsi qu'à la chromatofocalisation qui reposent sur la densité de charge des protéines (rapport charge/taille) et leur point isoélectrique, respectivement. Le critère d'hydrophobicité sera ensuite exploré avec l'utilisation de la chromatographie en phase inverse et normale pour la séparation de protéines. Enfin, un cas particulier de chromatographie d'affinité spécifique lié à l'étude des complexes U-biomolécule sera présenté.

2.3.1.1 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

En chromatographie d'exclusion stérique (SEC) (Issaq *et al.*, 2002; Mounicou *et al.*, 2009; Ponce De León *et al.*, 2002) la phase stationnaire contenue dans une colonne est assimilable à

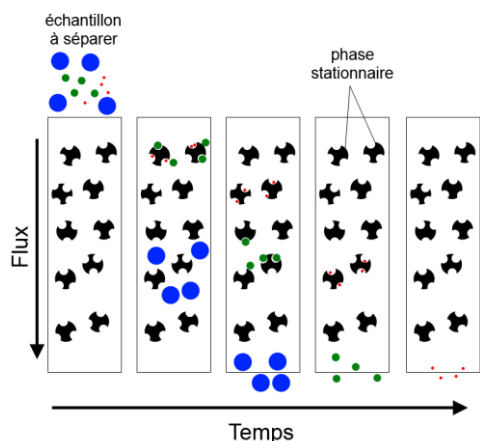


Figure 8 : Schéma de principe du fonctionnement de la SEC

un réseau poreux agissant comme un tamis moléculaire vis-à-vis du mélange protéique (Figure 8). Les molécules ayant une taille supérieure au maillage sont

exclues et éluées en premier dans le volume mort (V_{mort}) alors que les molécules de taille inférieure à celle des pores sont particulièrement retenues et sont éluées en dernier au volume de perméation total (V_{total}). Toutes les molécules de taille intermédiaire

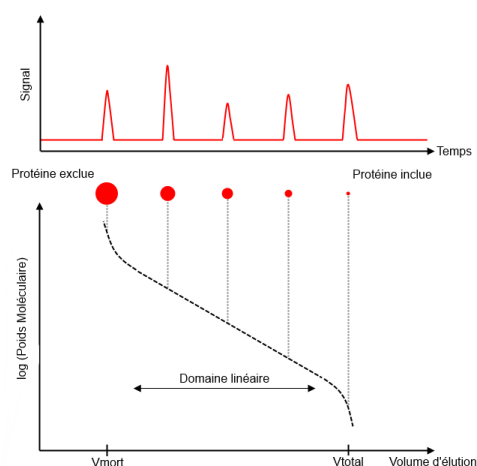


Figure 7 : Relation entre log (PM) et le volume d'élution

en premier dans le volume mort (V_{mort}) alors que les molécules de taille inférieure à celle des pores sont particulièrement retenues et sont éluées en dernier au volume de perméation total (V_{total}). Toutes les molécules de taille intermédiaire

sont fractionnées en fonction de leur taille (**Figure 7**) selon une relation linéaire du type $\log(\text{Poids Moléculaire}) = f(V_{\text{élution}})$. Toute molécule qui élué après V_{total} peut être soupçonnée d'interagir avec la phase stationnaire. Ces interactions peuvent être fonction des conditions d'élution (*e.g.* force ionique, pH). Les phases mobiles typiques en SEC sont des tampons (organiques ou minéraux) à pH « physiologique » ($\approx 7-7,5$) permettant ainsi de conserver la structure ainsi que l'activité des biomolécules. L'élution est systématiquement réalisée en mode isocratique⁴. Pour la détection des métalloprotéines, le couplage avec la spectrométrie de masse élémentaire (ICP-MS) « en ligne » est facilement réalisable. En revanche, pour l'identification des protéines, le couplage avec la spectrométrie de masse moléculaire (ESI-MS) est plus délicat et nécessite des adaptations en raison du caractère aqueux et salin du tampon d'élution (Polec-Pawlak *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2001).

Différentes phases stationnaires et tailles de colonnes sont disponibles commercialement pour la séparation des biomolécules en SEC (**Tableau 6**). Le choix repose principalement sur la gamme de masse des molécules à séparer, la dimension de l'échantillon (*e.g.* volume, concentration en protéines) et, dans notre cas, la neutralité chimique vis-à-vis des complexes uranium-biomolécule. On peut distinguer deux familles de phases stationnaires. La première fait intervenir la silice comme matériau support sur lequel des polymères ou des chaînes fonctionnalisées (*e.g.* diols) sont chimiquement greffés. La seconde est intégralement constituée d'un réseau polymérique (*e.g.* dextran-agarose, polyhydroxyméthacrylate). Les phases à base de silice sont à proscrire en raison du risque de rétention de l'uranium par les groupements silanols pouvant entraîner la dénaturation des complexes uranium-biomolécule (Kowal-Fouchard *et al.*, 2004). Les phases stationnaires polymériques sont *a priori* plus inertes vis-à-vis des métaux (Wrobel *et al.*, 1995). Quelle que soit la phase stationnaire choisie, les facteurs de forme de colonnes généralement proposés par les fabricants sont une longueur de 30 cm pour un diamètre interne allant de 4,6 à 10 mm. Par ailleurs, les colonnes sont généralement fabriquées en acier, afin de supporter les fortes pressions, mais certains fabricants proposent des colonnes en PEEK ou en verre, des matériaux plus inertes chimiquement et biologiquement. Ce paramètre peut avoir de l'importance dans le cas de l'uranium qui peut facilement s'adsorber sur des surfaces métalliques. Enfin, les gammes de séparation disponibles sont nombreuses et peuvent couvrir la majorité des besoins entre 0,1 et 2000 kDa. Dans le cas contraire, il est possible de combiner en série plusieurs colonnes de gammes complémentaires. La littérature fait état de nombreuses applications de la SEC pour

⁴ Composition et débit de phase mobile constants (par opposition au mode « gradient »)

la séparation ou le fractionnement des métalloprotéines contenues dans des échantillons biologiques (Doker *et al.*, 2010; Geffard *et al.*, 2010; Giguère *et al.*, 2003; Krasnići *et al.*, 2013; Mounicou *et al.*, 2006; Perceval *et al.*, 2006; Pizarro *et al.*, 2004) et notamment les complexes uranium-biomolécule (Frelon *et al.*, 2013; Vidaud *et al.*, 2005).

Tableau 6 : Inventaire (non exhaustif) des colonnes SEC analytiques commerciales et leurs principales caractéristiques

<i>Fabricant (Dénomination produit)</i>	<i>Phenomenex (TSKgel PW XL)</i>			<i>Phenomenex (TSKgel SW XL et Super SW)</i>	<i>Agilent (Bio SEC 3 et 5)</i>	<i>Phenomenex (BioSep)</i>
	<i>GE Healthcare (Superdex)</i>	<i>Waters (Ultrahydrogel) Shodex (Ohpak) Agilent (PL aquagel-OH)</i>	<i>Phenomenex (PolySep-SEC)</i>			
Phase stationnaire	Séphadex = dextran-agarose réticulé	Polyhydroxyméthacrylate	polymère hydrophile	groupements diol sur base silice	silice enrobée de polymère hydrophile	silice greffée hydrophile
Matériel colonne	Verre	Inox ou non-précisé	Inox (PEEK sur demande)	Inox (certaines disponibles en PEEK ou verre)	Non-précisé	Inox
Diamètre interne (mm)	10 ou 3,2	4,6 - 7,8 ou 8	7,8	(SW) 7,5 - 7,8 (Super SW) 4,6	4,6 ou 7,8	4,6 ou 7,8
Longueur (cm)	30	30	30	30 ou 60	15 ou 30	30
Gammes de Poids Moléculaire	7 - 0,1 kDa 70 - 3 kDa 600 - 10 kDa	<10 kDa 80 - 1 kDa 100 - 5 kDa 400 - 10 kDa <1000 kDa	20 - 3 kDa 100 - 10 kDa 250 - 75 kDa 400 - 3 kDa 2000 - 50 kDa	150 - 5 kDa 500 - 10 kDa 10 - 0,2 MDa	100 - 0,1 kDa 150 - 0,5 kDa 1200 - 5 kDa	300 - 1 kDa 700 - 5 kDa 1500 - 15 kDa

Après comparaison, notre choix s'est porté sur les colonnes proposées par GE Healthcare et plus particulièrement celle proposant la gamme de séparation théorique la plus large allant de 10 à 600 kDa (Superdex 200). Ce choix est notamment motivé par le caractère polymérique de la phase stationnaire et l'utilisation du verre comme matériel de construction de la colonne afin de limiter la dénaturation des complexes uranium-protéine. Pour ces raisons, les colonnes Superdex sont fréquemment utilisées pour la séparation des métalloprotéines (Doker *et al.*, 2010; Frelon *et al.*, 2013; Krasnići *et al.*, 2013; Mounicou *et al.*, 2006; Pizarro *et al.*, 2004).

2.3.1.2 Fractionnement par couplage flux-force (FFF)

Le **fractionnement par couplage flux-force (FFF)**, initialement introduit en 1966 pour la séparation d'espèces de grande taille telles que des macromolécules, des colloïdes ou des particules (Giddings, 1966), trouve aujourd'hui des applications dans la séparation de protéines (Ratanathanawongs Williams et Lee, 2006; Reschiglian et Moon, 2008). Le principe général de fonctionnement (**Figure 9**) repose sur (i) l'entraînement de l'échantillon dans un canal par un flux laminaire de phase mobile, combiné à (ii) l'application d'un champ de force (*e.g.* fluïdique, thermique, électrique...) perpendiculaire au canal. Le champ de force permet aux analytes de se positionner dans l'épaisseur du canal en fonction de certaines propriétés intrinsèques aux analytes (*e.g.* taille, pI...) et de la nature du champ de force. Si ces conditions sont réunies, les analytes les plus au centre du canal vont être entraînés plus rapidement que les analytes sur les bords du canal en raison du profil de vitesse parabolique lié au flux laminaire (Ratanathanawongs Williams et Lee, 2006).

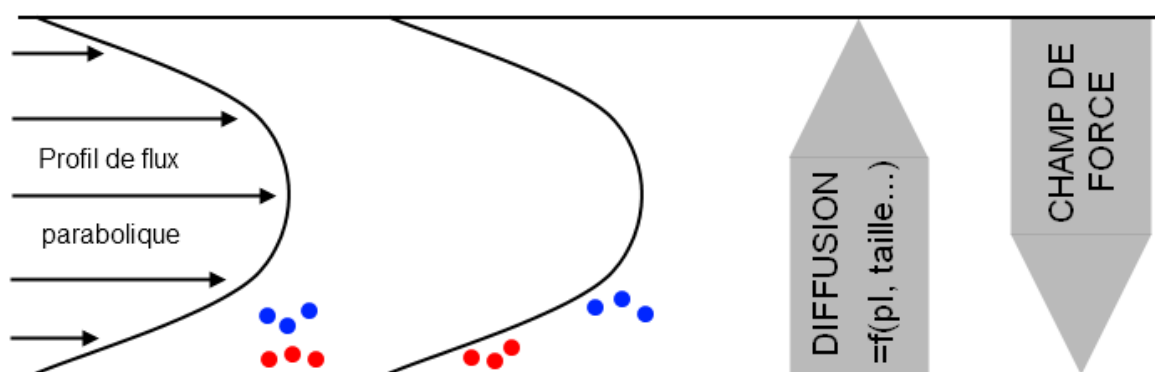


Figure 9 : Principe de fonctionnement du FFF illustré par la séparation de deux analytes (bleu et rouge) ayant des propriétés différentes (*e.g.* taille, pI)

Pour la séparation des protéines, le champ de force fluïdique est le plus utilisé. On parle alors de fractionnement par couplage flux-force à flux croisé (FIFFF), pour lequel il existe encore des variantes (Ratanathanawongs Williams et Lee, 2006). La séparation se fait alors en fonction du rayon hydrodynamique, c'est-à-dire de la taille des protéines. La gamme de séparation utile peut s'étendre de 1 à 20 000 kDa mais le FFF est plus généralement utilisé pour les molécules de haut voire très haut poids moléculaire. Parmi les avantages du FIFFF, il est facilement couplé avec l'ICP-MS voire plus rarement à l'ESI-MS (éluants volatils) (Kim et Moon, 2011), fonctionne en conditions non-dénaturantes (éluants de la SEC), mais surtout il n'y a pas de phase stationnaire réduisant ainsi les pertes liées à l'adsorption des analytes. En revanche, ce mode de fonctionnement du FFF requiert l'utilisation d'une membrane à seuil de coupure (MWCO) à la base du canal sur laquelle peuvent tout de même s'adsorber les

analytes (Claveranne-Lamolère *et al.*, 2009). Enfin, les applications pour la séparation de mélanges biologiques complexes tel qu'un cytosol sont encore rares même si le principe de fonctionnement a été validé sur des protéines commerciales. Siripinyanond et Barnes (1999) ont démontré la faisabilité du couplage FIFFF-ICP-MS pour la séparation et la détection de mélanges de metalloprotéines commerciales (Siripinyanond et M. Barnes, 1999). Un mélange de metalloprotéines contenant du fer et du cuivre, isolées du plasma sanguin, a été séparé avec succès par FIFFF-ICPMS (Heroult *et al.*, 2012)

2.3.1.3 Chromatographie ionique (CI) et Chromatofocalisation (CF)

La **chromatographie ionique (CI)** permet de séparer des protéines en fonction de leur charge ou plus précisément de leur densité de charge en conditions natives. La phase stationnaire est une résine cationique (échangeuse d'anions) ou anionique (échangeuse de cations). A pH constant, plus la densité de charge d'un analyte est élevée plus il sera retenu. L'élution est obtenue par un gradient de force ionique à pH constant. Les sels généralement utilisés pour réaliser le gradient ne sont pas volatils et donc incompatibles avec la spectrométrie de masse moléculaire (ESI-MS). Dans leurs travaux, Magalhaes *et al.* (2004) ont recouru à un échangeur d'anions faible afin de purifier la vitéllogénine dans le plasma de la carpe en conditions natives.

La **chromatofocalisation (CF)** est un cas particulier de la chromatographie ionique dans laquelle le gradient salin est remplacé par un gradient de pH (Ahamed *et al.*, 2007; Frey *et al.*, 2001; Kang et Frey, 2003). Cette technique permet ainsi la séparation des protéines en fonction de leur pI^5 sur une chaîne HPLC classique. Il s'agit bien ici d'une méthode chromatographique et non d'une méthode électrophorétique faisant intervenir un champ électrique comme les méthodes IEF qui seront présentées plus loin dans ce manuscrit. La CF est réalisée sur une colonne échangeuse d'anions faible voire plus rarement de cations faible (Kang et Frey, 2003). Une colonne échangeuse d'anions est initialement équilibrée avec un tampon de départ basique (pH 8-9). Après injection de l'échantillon, les protéines neutres ou positivement chargées ($pI \geq pH_{\text{tampon basique}}$) ne sont pas retenues et sont éluées avec le tampon basique. Le tampon est ensuite échangé pour un tampon acide (pH 2-3). Un gradient de pH se forme avec l'arrivée progressive du tampon acide et les protéines sont éluées lorsque le pH est environ égal à leur pI . La mesure du pH en sortie de colonne donne accès au pI apparent des protéines (Frey *et al.*, 2001). Cette méthode est très séduisante puisqu'elle permet de séparer des protéines dont le pI est séparé de seulement 0,02 unités (Amersham, 1998) mais la

⁵ Point isoélectrique : pH auquel une protéine possède une charge globale nulle (cf. section 2.3.2.3)

difficulté principale réside dans l'obtention d'un gradient de pH linéaire avec un tampon d'élution simple. En effet cela nécessite l'utilisation d'un mélange de nombreux ampholytes dans le tampon d'élution acide ce qui peut impacter la spéciation de l'uranium et le bruit de fond du signal lors d'un couplage ESI-MS (Staub *et al.*, 2011a). Plusieurs applications de la CF sont décrites dans la littérature et concernent la séparation de protéines, voire de métalloprotéines, mais aucune ne fait référence au maintien des interactions métal-protéine non-covalentes. Ahamed *et al.* (2007) réalisent avec succès la séparation de plusieurs métalloprotéines commerciales (*e.g.* anhydrase carbonique, myoglobine, ovotransferrine) mais le taux de recouvrement des métaux n'est pas étudié (Ahamed *et al.*, 2007). Shan *et al.* (2008) exploitent le couplage CF-ESI-MS grâce à des tampons volatils afin d'identifier des protéines en ligne (Shan *et al.*, 2008). Kim *et al.* (2008) ont réalisé le fractionnement de protéines intactes par micro-CF (Kim et Lubman, 2008). Enfin, Wang *et al.* (2006) ont appliqué la CF aux lysats de 14 lignées cellulaires cancéreuses de l'ovaire puis 30 fractions (récoltées toutes les 0,15 unités de pH) sont soumises en 2nd dimension à une RP-HPLC afin d'obtenir une cartographie 2D pour chaque lignée (Wang *et al.*, 2006).

2.3.1.4 Chromatographie en phase inverse et normale

Un autre mécanisme de séparation des protéines repose sur leur degré d'hydrophobicité (Waters). On peut citer ici principalement la chromatographie en phase normale (NP) ou inverse (RP) et la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC). En phase normale, les analytes polaires sont séparés en fonction de leur affinité pour une phase stationnaire polaire (*e.g.* silice, diols, amines) et les analytes apolaires ne sont pas retenus. La phase mobile est 100% organique et l'élution est obtenue par augmentation de la polarité de l'éluant (*e.g.* gradient hexane → méthanol). Inversement en phase inverse, les analytes apolaires sont séparés en fonction de leur affinité pour une phase stationnaire apolaire (*e.g.* chaînes C₁₈, C₈, C₄) et les analytes polaires ne sont pas retenus. La phase mobile est en partie aqueuse et l'élution est obtenue par diminution de la polarité de l'éluant (*e.g.* gradient eau → acétonitrile). Enfin l'HILIC, souvent décrite comme une phase « inverse inversée », fait intervenir une phase stationnaire polaire (*e.g.* diols, amines) avec une phase mobile en partie aqueuse (*e.g.* eau/acétonitrile). Les analytes polaires interagissent avec la phase stationnaire puis sont élués par augmentation de la polarité de la phase mobile (*e.g.* gradient acétonitrile → eau). L'HILIC est complémentaire à NP et RP puisqu'elle permet la séparation d'analytes

trop retenus en NP et trop peu retenus en RP. De plus, l'utilisation des solvants de la RP permet un couplage aisé avec la spectrométrie de masse à source électrospray (ESI-MS).

Au regard de notre problématique de séparation des complexes uranium-protéine intacts, plusieurs inconvénients apparaissent avec ces méthodes :

- L'utilisation de solvants organiques peut provoquer la dénaturation voir la précipitation de certaines protéines (Staub *et al.*, 2011a).
- La formulation des phases stationnaires fait généralement intervenir un support à base de silice susceptible de retenir les métaux.
- La porosité de ces supports est parfois trop faible (*e.g.* 80-120Å) provoquant l'exclusion des protéines au-delà d'une certaine taille (Staub *et al.*, 2011a).

Récemment sont apparues sur le marché des phases stationnaires RP dédiées à la séparation des protéines grâce à une porosité supérieure (300Å), des chaînes courtes (*e.g.* C₄), des particules inférieures à 2 µm (UHPLC) et un support soit polymérique (BEH, Waters) soit à base de silice « fondue » recouverte d'une mince pellicule (0,2 µm) de silice poreuse fonctionnalisée (Core-Shell, Phenomenex). Ces optimisations permettent de réduire les interactions secondaires avec les silanols ainsi que d'améliorer la cinétique des équilibres (phase mobile ↔ phase stationnaire) (Staub *et al.*, 2011b). Les mêmes améliorations ont été portées aux phases HILIC, toutefois, les applications de l'HILIC pour la séparation des protéines intactes sont encore peu nombreuses (Tetaz *et al.*, 2011). Il existe aussi des colonnes monolithiques RP inorganiques et organiques, ces colonnes méso-poreuses permettent une séparation rapide avec une faible perte de charge (Causon *et al.*, 2010; Wouters *et al.*, 2012). Toutes ces techniques chromatographiques peuvent théoriquement être couplées « en ligne » aux spectromètres de masse élémentaire (ICP-MS) et moléculaire (ESI-MS) pour la détection et l'identification des métalloprotéines à condition de disposer des interfaces adéquates.

2.3.1.5 Chromatographie d'affinité spécifique

Une forme plus particulière de fractionnement du pool protéique fait appel à des **interactions spécifiques métal-ligand**, il s'agit de l'IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography). Contrairement aux techniques décrites précédemment, l'idée de l'IMAC n'est pas de séparer des complexes métal-biomolécule, mais de séparer des biomolécules en fonction de leur affinité pour un métal en particulier. A cette fin, le métal d'intérêt (*e.g.* uranium) est fixé sur une phase stationnaire, l'échantillon (*e.g.* pool protéique) y est déposé, puis un premier rinçage permet d'éluer les molécules non liées, autrement dit les molécules ne présentant pas d'affinité particulière pour le métal d'intérêt. S'en suit l'élution des molécules

ayant une affinité pour le métal d'intérêt par gradient de pH ou déplacement de l'équilibre de complexation à l'aide d'un ligand ayant une affinité très forte pour le métal. En première approche, cette technique permet le criblage des biomolécules potentiellement cibles d'un métal donné. Une interrogation importante est cependant soulevée par cette approche quant à l'influence de la forme chimique du métal immobilisé sur son affinité pour les biomolécules. En effet, la fixation du métal sur la phase stationnaire implique une restriction de son degré de liberté et une probable modification de sa sphère de coordination. Ainsi, puisque les protéines peuvent présenter une structure tridimensionnelle complexe, certains sites de complexation des métaux situés au cœur des protéines peuvent ne pas être accessibles au métal immobilisé. D'autre part, certains complexes métal-biomolécule ne se formeront peut-être pas si la sphère de coordination du métal est partiellement occupée par une liaison avec le support chromatographique.

Une telle technique a été développée pour l'uranium (Basset *et al.*, 2008) et appliquée à un extrait de cellules rénales (Dedieu *et al.*, 2009). La phase stationnaire est composée d'un copolymère styrène-divinylbenzène greffée avec des groupements aminophosphonates ($-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{PO}_3^{2-}$). Ces groupements présentent une forte affinité pour l'uranium sous forme de l'ion uranyle (UO_2^{2+}) qui va être fixé par simple mise en contact d'une solution d'acétate d'uranyle à pH 4. Une fois chargé en uranyle, le support IMAC ainsi préparé est débarrassé de l'excès d'uranyle par lavage et dialyse. L'échantillon préparé dans un tampon HEPES+NaCl à pH 7,4 est mis en contact avec le support IMAC. Les protéines ayant une affinité pour l'uranyle immobilisé vont s'y fixer et les autres protéines restent dans le surnageant et sont écartées par une série de lavage et dialyse. Enfin, les protéines retenues par le support IMAC sont éluées par ajout d'une solution de carbonates (NaHCO_3 à 200 mM), ligand fort de l'uranyle, déplaçant ainsi l'équilibre de complexation des protéines vers leur libération. 64 protéines cibles de l'uranyle ont ainsi pu être identifiées par une approche bottom-up après dessalage et digestion enzymatique des fractions issues de l'IMAC.

2.3.2 Techniques électrophorétiques

Les techniques électrophorétiques reposent toutes sur la migration d'espèces chargées sous l'influence d'un champ électrique. Les critères de séparation restent néanmoins aussi variés que pour les techniques chromatographiques. Nous allons nous intéresser dans un premier temps à l'électrophorèse sur gel, une technique très répandue pour la séparation des protéines en fonction de leur rayon hydrodynamique. Nous nous intéresserons ensuite à une technique à l'interface entre l'électrophorèse sur gel et la chromatographie, à savoir l'électrophorèse

capillaire. Cette technique versatile peut faire intervenir différents critères de séparation des protéines tels que le rayon hydrodynamique, le point isoélectrique, la densité de charge, l'hydrophobicité et la mobilité électrophorétique. Enfin, un accent particulier sera mis sur l'utilisation de la focalisation isoélectrique pour la séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique sur gel et en phase liquide.

2.3.2.1 Electrophorèse sur gel (GE)

En **électrophorèse sur gel (GE)** (Garcia *et al.*, 2006; Issaq *et al.*, 2002) la phase stationnaire est un polymère (gel) de polyacrylamide (PA) réticulé. L'échantillon est déposé à une extrémité du gel et les protéines chargées migrent à travers le gel sous l'influence d'un courant électrique dans un tampon de migration. Le degré de réticulation, déterminé par le pourcentage d'acrylamide/bisacrylamide mis en œuvre pour former le gel, conditionne la taille du maillage et donc la capacité du gel à fractionner les molécules en fonction de leur taille (**Tableau 7**). Un gel dont le pourcentage d'acrylamide est plus faible aura un maillage plus large et va faciliter le déplacement des molécules de haut poids moléculaire et inversement.

Tableau 7 : Gamme de séparation en SDS-PAGE en fonction du pourcentage d'acrylamide (d'après la note technique CarlRoth, 2012)

<i>Acrylamide (%)</i>	<i>6</i>	<i>8</i>	<i>10</i>	<i>12</i>	<i>15</i>
Gamme de séparation (kDa)	50 - 200	30 - 95	20 - 80	12 - 60	10 - 43

La technique la plus appliquée car la plus résolutive en taille est SDS-PAGE dans laquelle les protéines sont entièrement dénaturées et leur charge apparente est rendue uniformément négative par ajout d'un tensioactif dénaturant : le dodécylsulfate de sodium (SDS). De fait toutes les molécules migrent vers l'anode (+) et leur séparation est seule fonction de leur masse. Des techniques ont par la suite été développées en conditions natives. Toutefois, en l'absence d'agent modifiant la charge apparente des protéines, celle-ci est directement fonction du pH du milieu. Il faut alors prêter grande attention au choix des tampons et du pH. Si le pH est en dessous du pI la protéine est chargée positivement et s'il est au-dessus elle est chargée négativement. Ainsi en Native-PAGE, les protéines chargées positivement vont migrer vers la cathode (-) alors que les protéines chargées négativement vont migrer vers l'anode (+) entraînant la perte d'une partie des protéines. Afin de remédier à ce problème, des équipes ont développé des méthodes d'électrophorèse sur gel en conditions natives impliquant

des molécules capables de donner une charge négative aux protéines sans les dénaturer. A cet effet, la méthode BlueNative-PAGE (BN-PAGE) utilise le bleu de Coomassie (Schägger et von Jagow, 1991) alors que la méthode HighResolutionClearNative-PAGE (HrCN-PAGE) utilise le déoxycholate de sodium (Magalhães *et al.*, 2004; Wittig et Schägger, 2005). HrCN-PAGE permet notamment la visualisation d'activité enzymatique in-gel (Wittig *et al.*, 2007). Quelle que soit la méthode utilisée, cette technique est assez résolutive pour un préfractionnement mais nécessite beaucoup de manipulations (préparation des gels, dépôt de l'échantillon, coloration, excision des bandes protéiques). A titre d'exemple, la séparation de mélanges simples de metalloprotéines intactes (*e.g.* catalase, SOD, myoglobine) a pu être réalisée par HrCN-PAGE (Chaumande, 2011). La détection sensible des metalloprotéines, ou plus exactement des métaux qu'elles portent, nécessite ensuite le recours à l'ablation laser (LA) couplée à l'ICP-MS.

2.3.2.2 Electrophorèse capillaire (CE)

L'**électrophorèse capillaire (CE)** est une technique reposant, comme l'électrophorèse sur gel, sur la séparation des protéines en fonction de leur charge, taille et forme sous l'influence d'un champ électrique. Toutefois, cette technique présente certains avantages parmi lesquels la rapidité, la résolution, le très faible volume d'échantillon à introduire et la détection multimodale en ligne (*e.g.* UV, élémentaire, moléculaire) (Staub *et al.*, 2011a). Typiquement, la phase stationnaire est contenue dans un capillaire de silice fondue qui plonge à chaque extrémité dans un électrolyte de fond assurant le contact électrique avec l'anode et la cathode. L'échantillon est chargé à une extrémité du capillaire puis, sous l'influence d'un courant électrique, migre dans ce dernier où les protéines sont séparées selon diverses caractéristiques en fonction du mode choisi. Il existe différents modes en électrophorèse capillaire chacun nécessitant certaines modifications de la phase stationnaire contenue dans le capillaire. On notera principalement les modes :

- Electrophorèse sur gel capillaire, équivalent à SDS-PAGE, le capillaire est rempli de gel (*e.g.* polyacrylamide, PEG) et les protéines sont uniformément chargées par incubation avec SDS. La séparation est fonction de la taille des protéines.
- Focalisation isoélectrique capillaire (CIEF), le capillaire est rempli de gel ou de glycérol et l'électrolyte de fond contient des ampholytes porteurs afin de former un gradient de pH sous l'influence du champ électrique. La séparation est fonction du pI des protéines et la résolution est de l'ordre de 0,005 unités pH. La détection

moléculaire par ESI-MS est possible mais nécessite de minimiser la concentration en ampholytes car cette dernière peut supprimer le signal (Staub *et al.*, 2011a).

- Electrochromatographie capillaire (CEC), équivalent de la chromatographie liquide, le capillaire est rempli d'une phase stationnaire classique de la chromatographie (*e.g.* RP, CI) éventuellement monolithique. La séparation est fonction de la phase stationnaire mais bénéficie des avantages de l'électrophorèse capillaire. Aucune application à la séparation de protéines intactes n'a été reportée dans la littérature notamment en raison de l'inexistence de capillaires dédiés à cette application.
- Electrophorèse capillaire en zone (CZE), le capillaire n'est généralement pas modifié mais simplement rempli d'électrolyte de fond. La séparation est fonction de la mobilité électrophorétique des protéines. Il s'agit de la méthode la plus appliquée à la séparation de protéines intactes puisqu'elle ne fait intervenir que l'électrolyte de fond qui peut être 100% volatil et donc compatible avec la détection moléculaire (ESI-MS).

Pour toutes ces méthodes, l'inconvénient majeur est l'adsorption, parfois irréversible, des protéines et des métaux sur la silice chargée négativement et plus particulièrement en l'absence de modifications de la chimie de surface du capillaire. De plus, les hauts voltages appliqués (*e.g.* plusieurs kV (Andón *et al.*, 2006; Schaumlöffel *et al.*, 2002; Strege et Lagu, 2004)) peuvent aussi être une source de dénaturation dans notre contexte de conservation des complexes uranium-protéine intacts. Enfin, les analytes doivent être particulièrement concentrés pour améliorer les chances de détection et la LD est de l'ordre de quelques dizaine de $\mu\text{g.L}^{-1}$ au mg.L^{-1} pour les protéines en ESI-MS (Andón *et al.*, 2006; Strege et Lagu, 2004).

2.3.2.3 Focalisation isoélectrique (IEF)

En **focalisation isoélectrique** (IEF) (Issaq *et al.*, 2002) la phase stationnaire se constitue soit d'un gradient de pH immobilisé (IPG) sur un hydrogel, soit d'un mélange d'ampholytes porteurs permettant la formation d'un gradient de pH sous l'influence d'un champ électrique. Une fois l'échantillon introduit, les protéines du mélange à fractionner vont acquérir une charge qui est fonction de leur pI et du pH local, autrement dit de leur position sur le gradient de pH. Si le pH est inférieur au pI de la protéine, les groupements acido-basiques portés par certains acides-aminés constitutifs sont majoritairement protonés (formes $-\text{COOH}$ et $-\text{NH}_3^+$) et la charge de la protéine est globalement positive. Inversement, si le pH est supérieur au pI de la protéine, les groupements acido-basiques sont majoritairement déprotonés (formes $-\text{COO}^-$ et $-\text{NH}_2$) et la charge globale de la protéine est négative. Dans ces conditions et sous

l'influence d'une différence de potentiel électrique, chaque protéine chargée va migrer naturellement vers l'électrode de charge opposée jusqu'à la position où le pH est équivalent à son pI (**Figure 10**). En effet, à cet endroit précis la protéine est électriquement globalement neutre (autant de groupements acido-basique sous forme $-\text{COO}^-$ que $-\text{NH}_3^+$ sur les protéines) et ne subit donc plus l'influence de la différence de potentiel électrique, elle cesse de migrer.

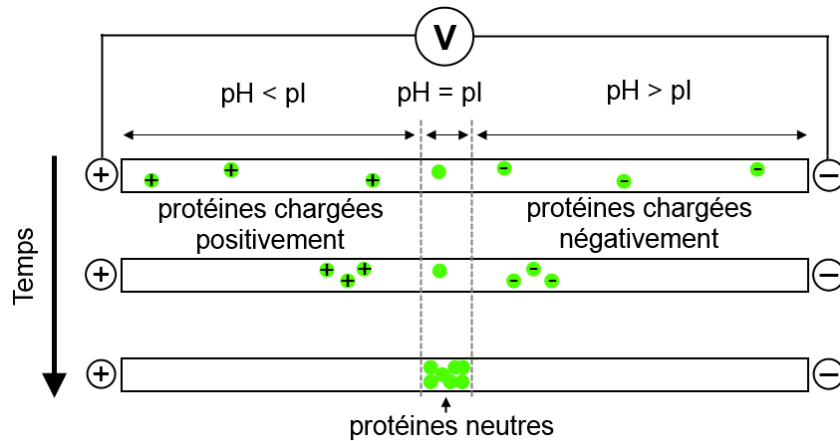


Figure 10 : Schéma de principe du fonctionnement de l'IEF

On distingue les méthodes d'IEF **sur gel** (in-gel) pour lesquelles les protéines sont fractionnées au sein d'un gel et les méthodes d'IEF **hors-gel** (off-gel) pour lesquelles les protéines sont fractionnées et récupérées en phase liquide. L'inconvénient majeur quelle que soit la méthode IEF employée est le risque de précipitation, parfois irréversible, des protéines neutres immobilisées à $\text{pH} = \text{pI}$. Ceci est particulièrement vrai en conditions purement non-dénaturantes (*e.g.* absence d'agents de solubilisation des protéines). La détection des métalloprotéines *via* leurs métaux associés est systématiquement réalisée « hors ligne » soit par ablation laser (LA) couplée à l'ICP-MS pour les bandelettes de gel, soit par analyse multiélémentaire totale des fractions liquides par ICP-MS.

2.3.2.3.1 Focalisation isoélectrique sur gel (IEF in-gel)

Bandelettes à gradient de pH immobilisé

Parmi l'ensemble des techniques de focalisation isoélectrique, l'IEF sur bandelette est la plus connue et la plus utilisée seule ou comme 1^{ère} dimension d'une séparation par électrophorèse sur gel 2D (Issaq *et al.*, 2002). En pratique, il s'agit généralement d'un gel de polyacrylamide ($L \times l \times h = 80-240 \times 3 \times 0,5 \text{ mm}$) dont le diamètre des pores et de l'ordre de quelques nanomètres, supporté par une bandelette en plastique. Le gradient de pH est obtenu par des

ampholytes immobilisés (« immobilines » fixées de manière covalente) directement dans le gel lors de sa fabrication. De nombreux gradients de pH (*e.g.* large ou étroit, linéaire ou non) et longueurs (*e.g.* 7, 11, 13, 18, 24 cm) sont disponibles commercialement. Le gel, initialement déshydraté, est réhydraté directement par l'échantillon à séparer préalablement déposé dans un canal prévu à cet effet. Pour les applications protéomiques, l'échantillon en question est généralement additionné d'urée (6 à 8 M), d'un tensioactif (*e.g.* CHAPS à 1%*m/v*), d'un agent réducteur (*e.g.* DTT à 0,2%*m/v*) et d'un mélange d'ampholytes (0,25 à 2%*m/v*) adapté au gradient de la bandelette choisie (GEHealthcare, 2004). Dans notre cas, l'ajout de ces réactifs est à proscrire car elle peut entraîner la dénaturation ou la perte des complexes uranium-biomolécule. Techniquement, rien n'empêche la réalisation d'une telle séparation sur un cytosol brut (Chevreux *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2013), seule la résolution et la solubilité des protéines peuvent se voir impactées. La focalisation isoélectrique dans des conditions non-dénaturantes dure en général 12 heures en limitant le voltage appliqué à 3000V.

Micro-colonnes de gel

Cette technique est généralement appliquée à la séparation non-dénaturante de protéines et complexes protéiques de haut poids moléculaire (300 – 1000 kDa) (Jin et Manabe, 2009a, b; Manabe et Jin, 2010; Shimazaki *et al.*, 2010). Elle n'est pas commercialisée et nécessite la préparation de colonnes de gel artisanales à partir de poudre de polyacrylamide ou d'agarose pour IEF. Le gel est additionné d'ampholytes (0,5 à 2%) directement lors de la préparation puis coulé dans un capillaire de verre d'un diamètre interne allant de 1 à quelques millimètres et d'une longueur de l'ordre de 3 à 4 cm. La focalisation isoélectrique est réalisée en maintenant le capillaire verticalement dans l'anolyte (*e.g.* H₃PO₄ 0,01M), l'échantillon (1 à 2 µL) est alors déposé à l'extrémité cathodique puis le contact électrique est assuré par un catholyte (*e.g.* NaOH 0,04M). Le gradient de pH est ici formé, sous l'influence du champ électrique, entre les extrémités basique (cathode) et acide (anode) par le mélange d'ampholytes préalablement ajouté au gel. La focalisation dure généralement moins d'une heure en ne dépassant pas 300V. Après focalisation, le gel peut être extrudé du capillaire par application d'une pression avec de l'eau ou bien à l'aide d'une tige en plastique ajustée au diamètre du capillaire. Le cylindre de gel ainsi obtenu peut être découpé, digéré ou bien déposé directement sur un gel d'électrophorèse afin de subir une seconde dimension séparative. Les applications de cette technique originale sont peu nombreuses dans la littérature. Jin *et al.* (2009) ont réalisé le fractionnement non-dénaturant de protéines et de

complexes protéiques de haut poids moléculaire (67 – 1000 kDa) du plasma humain. De la même manière, Manabe *et al.* (2010) ont réalisé le fractionnement non-dénaturant des protéines solubles d'*Escherichia coli* (10 – 6000kDa) et Shimazaki *et al.* (2010) d'enzymes et d'isozymes contenues dans la fraction cytosolique du foie de souris. Enfin, une occurrence concerne la séparation de tungstoptéines (W-protéine) contenues dans un extrait cellulaire de *Pyrococcus furiosus* (Bol, 2007).

2.3.2.3.2 Focalisation isoélectrique hors-gel (IEF off-gel)

Les développements récents en protéomique et l'émergence des stratégies analytiques « gel-free » ont naturellement conduit au développement de méthodes de préfractionnement des échantillons en milieu liquide. A cet effet, la focalisation isoélectrique hors-gel est le pendant, en milieu liquide, de l'IEF sur bandelettes à gradient de pH immobilisé. Cette technique est donc très intéressante puisqu'elle permet une récupération aisée de fractions liquides ultérieurement analysables par des techniques de chromatographie en phase liquide (Righetti *et al.*, 2003). Trois types d'instruments sont aujourd'hui commercialement disponibles à l'échelle analytique (échantillon de quelques mL, [protéines] $\approx 1 \text{ mg.mL}^{-1}$) avec des conceptions différentes et complémentaires entraînant un nombre croissant d'applications dans la littérature (D'Amici *et al.*, 2008; Heller *et al.*, 2005; Mena *et al.*, 2011; Michel *et al.*, 2003; Pioselli *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 2008; Tomáš *et al.*, 2008).

IEF sur gel à fractions liquides

Le dispositif **OFFGEL 3100** de Agilent repose, contrairement à ce qu'indique son nom, sur l'utilisation des bandelettes IEF. Un cadre en plastique de 12 ou 24 puits est directement apposé sur une bandelette IEF (**Figure 11**) fournissant le gradient de pH souhaité (*e.g.* large ou étroit, linéaire ou non). Le mélange à séparer, dont la composition fait habituellement intervenir des agents permettant le maintien des protéines en solution ainsi que des ampholytes, est distribué également dans chaque puits après réhydratation (15 min) de la bandelette IEF. La focalisation peut être réalisée selon le constructeur en abaissant la température ($\approx T_{\text{ambiante}} - 10^\circ\text{C}$) et la durée standard est de 24 heures avec un gradient allant de 200 à 1500V (AgilentTechnology, 2010). La littérature fait état de plusieurs applications parmi lesquelles la séparation de protéines et peptides du plasma humain (Heller *et al.*, 2005) ou encore la séparation de protéines liant le platine dans le cytosol des cellules rénales de rats exposés au *cis*-platine (Mena *et al.*, 2011).

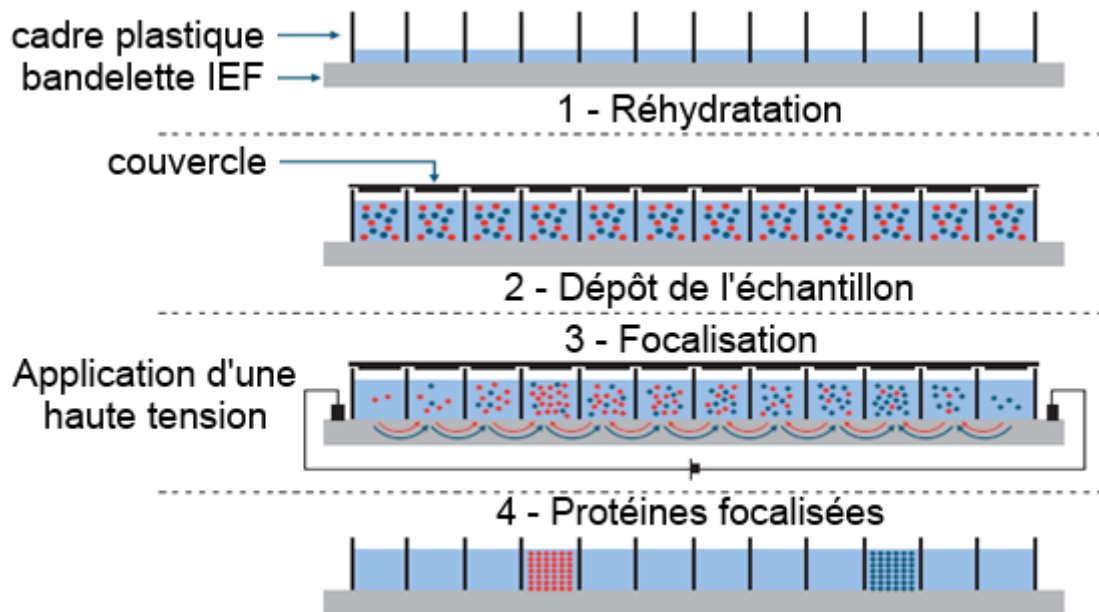


Figure 11 : Schéma de principe de fonctionnement du dispositif OFFGEL 3100 de Agilent (modifié d'après AgilentTechnology, 2010)

Electrolyseurs multicompartiments à membranes isoélectriques

Le **ZOOM IEF** de Invitrogen est un modèle commercial d'électrolyseurs multicompartiments à membranes isoélectriques à mi-chemin avec l'IEF sur bandelette. Dans ce dispositif les fractions sont séparées l'une de l'autre par des disques en hydrogel (membranes isoélectriques) contenant des immobilines (ampholytes immobilisés) et imposant le pH à l'interface entre deux fractions consécutives (**Figure 12** gauche). Ainsi en choisissant judicieusement les disques à placer entre chaque fraction, il est possible d'obtenir le gradient de pH souhaité et la gamme de pH peut être très facilement restreinte dans une fraction particulière (Figure 12 droite). Un maximum de 7 fractions liquides de 650 μ L peut être obtenu selon la configuration des membranes isoélectriques (Invitrogen, 2010). De la même manière qu'en IEF sur bandelettes de gel, l'échantillon est généralement préparé en ajoutant des agents contribuant à la solubilité des protéines (*e.g.* urée, tensioactif, agent réducteur) ainsi que des ampholytes. Lors de la focalisation les limites recommandées sont de 2W et 600V (3,5W et 1500V max.) et l'analyse dure en moyenne 3 heures. Le système entier peut être placé en chambre froide. Richardson *et al.* (2008) ont utilisé le ZOOM IEF pour préfractionner un lysat d'*Escherichia coli* en 5 fractions avant d'appliquer une stratégie 2D IEF « gradient étroit » – PAGE permettant ainsi gain important en résolution en comparaison d'une stratégie directe 2D IEF « gradient large » – PAGE. Pioselli *et al.* (2009) ont démontré la capacité du dispositif à séparer et conserver intactes des metalloprotéines de Cu, Zn et Fe

commerciales ou naturellement présentes dans le cytosol des cellules de foie d'agneau, en conditions natives (*i.e.* absence d'urée, DTT et tensioactif) et dénaturantes. Sans surprise, la condition native favorise le maintien des métalloprotéines mais est accompagnée d'une perte de résolution.

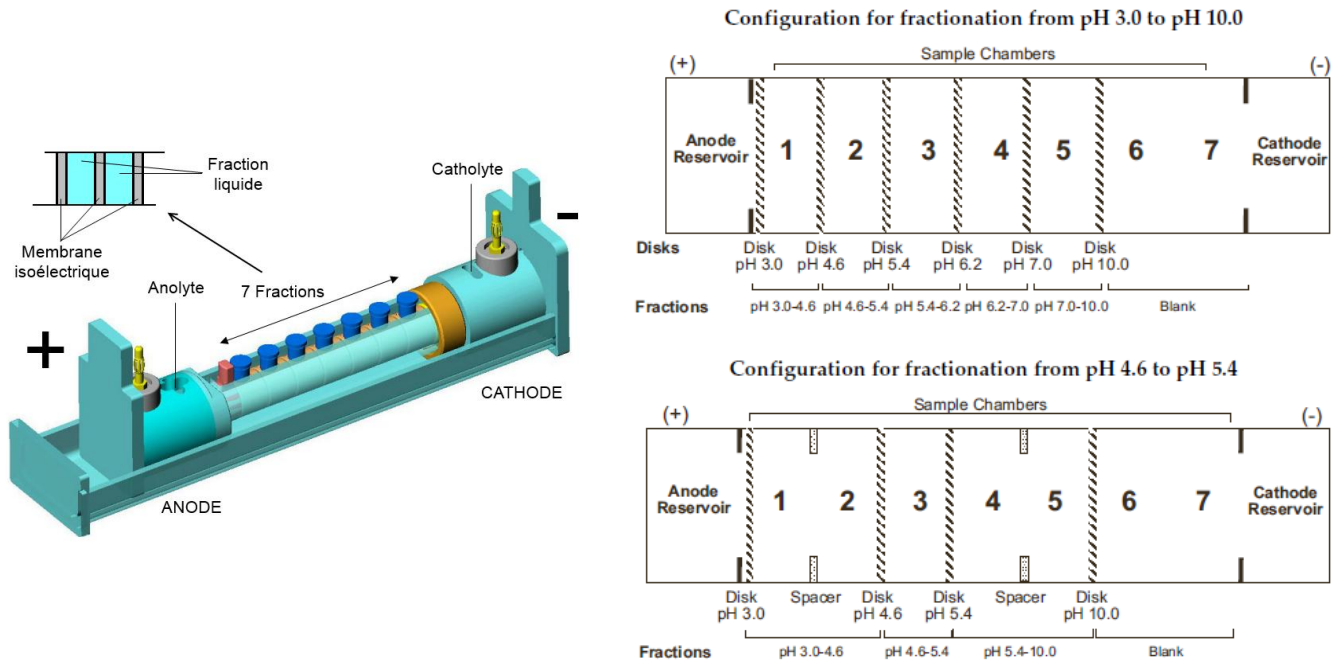


Figure 12 : Schéma descriptif du dispositif ZOOM IEF de Invitrogen (gauche) et deux exemples de gradient de pH (droite) (d'après le manuel ZOOM IEF, Invitrogen, 2010)

IEF en phase liquide stabilisée par rotation

Le **Rotofor** (rotationally stabilized focusing apparatus), commercialisé par Bio-Rad, repose sur le concept initialement développé par Bier (1998). Dans sa version analytique (Micro-Rotofor), cet instrument est composé d'une chambre de focalisation compartimentée en 10 fractions de 250 μ L par des membranes plastiques perméables (**Figure 13**). Les extrémités de la chambre de focalisation sont scellées par des membranes échangeuses d'ions jouant le rôle de pont électrochimique avec les réservoirs contenant l'anolyte (*e.g.* H_3PO_4 , CH_3COOH) et le catholyte (*e.g.* $NaOH$). De la même manière que pour les autres dispositifs présentés, en plus des ampholytes (0,5 à 5%), le constructeur conseille d'ajouter au mélange à séparer de l'urée, un tensioactif et un agent réducteur, afin d'assurer la solubilité des protéines (Bio-Rad, 2005). Toutefois, la littérature fait état de séparations en conditions natives dans lesquelles seuls les ampholytes sont ajoutés (Pioselli *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2011). L'ensemble du dispositif est placé dans une enceinte thermostatée capable de maintenir la température de l'échantillon à 10 ou 20°C (4°C en chambre froide) et d'imposer des oscillations régulières

afin d'éviter les phénomènes d'électrodécantation induits par la gravité (Righetti *et al.*, 2003). La focalisation est typiquement réalisée à puissance constante (1W) avec une tension limitée à 1000V et dure généralement 1 à 3 heures selon la complexité de l'échantillon. Les applications couvrent la séparation de protéines membranaires de l'épinard (D'Amici *et al.*, 2008), de digestat tryptiques (Tomáš *et al.*, 2007) et l'isolement de la SOD provenant de l'ail suivi d'un test d'activité enzymatique (Yuan *et al.*, 2011).

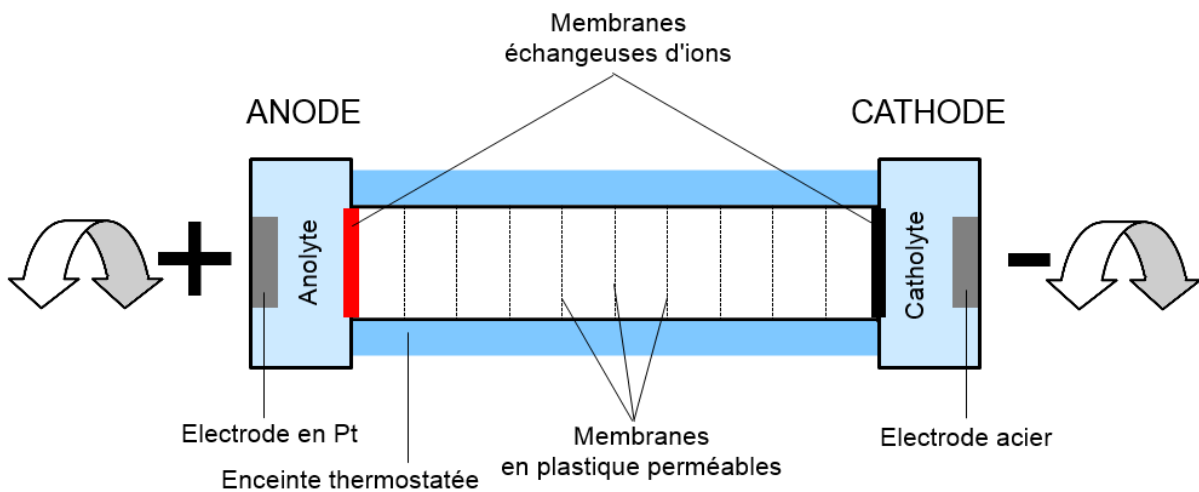


Figure 13 : Schéma descriptif de la chambre de focalisation du Micro-Rotofor de Bio-Rad

Le **Tableau 8** reprend les caractéristiques techniques principales des instruments présentés précédemment avec leurs avantages et inconvénients en regard de la problématique de maintien de la spéciation de l'uranium dans nos échantillons.

Tableau 8 : Comparatif de trois dispositifs IEF hors-gel commercialisés

	<i>Micro-Rotofor</i>	<i>ZOOM IEF</i>	<i>OFFGEL 3100</i>
Gradient pH	Ampholytes porteurs	Immobilines sur hydrogel	Bandelette IEF
Fractions	10	7	12 ou 24
Volume fraction	250 µL	650 µL	100-300µL
Volume échantillon	2,5 mL	6,5 mL	1,2-7,2 mL
Quantité protéines	µg au mg	1-2 mg	50-5000 µg
Runs simultanés	non	non	jusqu'à 2x8
Temps moyen	≤ 2-3 h	3 h	≥ 24 h
Sels / Tampons	≤ 10 mM	≤ 10 mM	≤ 10 mM
Inconvénients	Ampholytes, aiguilles de récolte acier (adsorption U ?)	Nombre de fractions, membranes en gel (interaction U ?, usage unique/cout)	Système à base gel, pertes de U in-gel, T ≥ 10°C, récupération des fractions par pipetage, variation de volume entre les fractions
Avantages	Faible volumes, gradients ajustables, 4°C, récupération rapide et quantitative des fractions	Plus grands échantillons, Possible sans ampholytes, 4°C	Volumes, gradients disponibles, fonctionnement possible sans ampholytes

Tous les appareils permettent théoriquement une séparation à basse température ($\leq 10^{\circ}\text{C}$) garantissant la faible activité des protéases en l'absence d'inhibiteur. Ils permettent aussi, au moins théoriquement, de s'affranchir des réactifs généralement additionnés aux échantillons afin de maintenir la solubilité des protéines (*e.g.* urée, tensioactifs, agent réducteur) voire même des ampholytes porteurs. Ces caractéristiques sont des atouts en faveur de notre problématique de conservation des complexes uranium-protéine. Bien qu'attirante à première vue, la capacité des systèmes ZOOM IEF et OFFGEL 3100 à réaliser une focalisation sans ajout d'ampholytes porteurs présente un inconvénient puisqu'elle nécessite l'utilisation de gels à gradient de pH immobilisé. Avec le ZOOM IEF, les gels présents entre les fractions peuvent agir comme des tamis et ralentir certaines protéines voire interagir avec les métaux qu'elles portent (Righetti *et al.*, 2003). Concernant l'OFFGEL 3100, l'utilisation des bandelettes IEF avec un cadre de 24 puits permet de bénéficier en théorie d'une bonne résolution en pH, toutefois, la précipitation de certaines protéines dans le gel peut empêcher la récupération de ces dernières en phase liquide. Dans tous les cas, les gels peuvent interagir avec l'uranium porté par les protéines et sont à éviter dans la mesure du possible (Mounicou

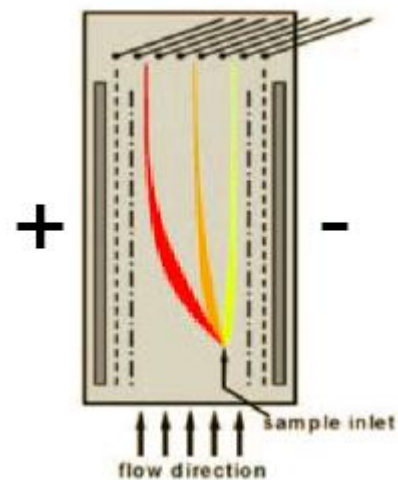
et al., 2009). Seule la technique Micro-Rotofor est purement réalisée en milieu liquide. Il reste toutefois à vérifier l'impact des ampholytes sur la distribution de l'uranium parmi les protéines.

Autres systèmes IEF hors-gel

Il existe d'autres systèmes IEF en milieu liquide sur le marché qui n'ont pas été développés ici en raison d'un format inadapté à nos besoins et du manque de littérature ou d'informations sur les applications :

- Le Gradiflow MF-10 de NuSep commercialisé en 2008 peut être adapté pour réaliser une séparation IEF en 6 fractions de 400 μ L séparées par des membranes à seuil de coupure (MWCO) de 1000 kDa en présence d'ampholytes porteurs (Fitzgerald et Walsh, 2010).
- L'IsoPrime de Amersham est un électrolyseur multicompartiments à membranes isoélectriques comparable au ZOOM IEF prévu pour l'échelle semi-préparative.
- Le ProMetHEUS (ou Octopus) de FFE Weber GmbH est un dispositif permettant un fractionnement IEF continu en écoulement libre (CFF-IEF) (Wang *et al.*, 2004; Weber et Wildgruber, 2004). Cette méthode dérive de

l'électrophorèse en écoulement libre (FFE) initialement développée pour séparer les constituants cellulaires (*i.e.* organites) en fonction de leur coefficient de diffusion (Satori *et al.*, 2012). En bref, l'échantillon est injecté et entraîné en continu dans un canal rectangulaire très mince (0,4 mm) bordé d'électrodes imposant un champ électrique perpendiculaire à l'écoulement de l'échantillon dans le canal. Les protéines migrent horizontalement dans le canal et se positionnent en fonction de leur charge et donc de leur pI tout en étant entraînées par le flux principal de tampon. Un ensemble de 96 capillaires permet la récolte des fractions à l'extrémité du canal.



2.4 Couplages de techniques séparatives pour la séparation multidimensionnelle à haute résolution

Bien que préalablement fractionnés et regroupés en différentes gammes de pI ou de taille, les mélanges protéiques restent complexes. De ce fait, l'identification *in fine* des protéines nécessite de recourir à des techniques de séparation très résolutive couplées à des techniques de détection ultra sensibles. On parle ici de séparation multidimensionnelle sur gel (2D-GE) ou en phase liquide (2D-LC) et de méthodes de détection faisant appel à la spectrométrie de masse (ESI-FT-MS/MS, TOF-MS, ICP-MS). Un paramètre primordial lors du couplage de deux méthodes séparatives est l'orthogonalité des techniques (Tomáš *et al.*, 2008). Deux méthodes sont orthogonales si les critères de séparation de chacune sont complémentaires (*e.g.* poids moléculaire et pI, poids moléculaire et hydrophobicité, charge et hydrophobicité). De plus, gardons en mémoire que les complexes uranium-biomolécules sont reconnus pour être facilement dénaturés puisque l'uranyle est essentiellement lié aux protéines de manière non-covalente (Frelon *et al.*, 2009). Il est donc primordial de s'attacher à développer et mettre en œuvre des couplages de méthodes qui seront non-dénaturants.

2.4.1 2D-GE en conditions natives

Historiquement, l'électrophorèse sur gel bidimensionnelle (2D-GE) est la technique de choix pour la séparation des mélanges complexes de protéines notamment en raison de sa résolution élevée. Généralement la 2D-GE se compose d'une première dimension en IEF (séparation selon le pI) en conditions natives puis d'une seconde dimension SDS-PAGE (séparation selon la taille) en conditions dénaturantes (Garcia *et al.*, 2006). Dans la problématique de séparation des complexes uranium-biomolécule intacts, la seconde dimension SDS-PAGE n'est pas envisageable en raison de son caractère dénaturant. On trouve dans la littérature des exemples de séparation 2D-GE en conditions natives permettant de conserver l'intégrité des protéines. La séparation de protéines du plasma humain, de protéines de la fraction cytosolique des cellules de foie de souris et des protéines solubles d'*Escherichia coli* a été réalisée par couplage de l'IEF sur gel micro-colonne en 1^{ère} dimension et d'une micro-2D-GE sur gradient linéaire de polyacrylamide en 2nd dimension (Jin et Manabe, 2009a, b; Manabe et Jin, 2010; Shimazaki *et al.*, 2010). Dans les trois cas, la conservation de l'activité enzymatique a pu être vérifiée après séparation ce qui implique la conservation des structures tertiaire et quaternaire des protéines. Suivant la même stratégie de couplage entre l'IEF micro-colonne et

l'électrophorèse sur gel en conditions natives, la séparation de tungstoptéines intactes contenues dans un extrait cellulaire de *Pyrococcus furiosus* a pu être réalisée (Bol, 2007). La séparation des protéines contenues dans le cytosol des cellules rénales de rats a été réalisée par 2D IEF-BN-PAGE en conditions natives (Susanne Becker *et al.*, 2009). Les métaux (*e.g.* Cu, Zn, Fe, Mn) ont été cartographiés dans le gel 2D obtenu par LA-ICPMS afin de localiser les métalloprotéines. Enfin, certaines métalloprotéines ont été identifiées par MALDI-TOF-MS. Cette dernière stratégie, très séduisante, reste toutefois moyennement résolutive et nécessite beaucoup de temps notamment pour scanner un gel 2D par LA-ICPMS. Les couplages 2D-LC peuvent être une alternative.

2.4.2 2D-LC en conditions natives

Par opposition aux techniques faisant intervenir une séparation sur gel, les méthodes en phase liquide sont souvent décrites comme faciles à mettre en œuvre, plus reproductibles et plus rapides (Horvatovich *et al.*, 2010; Jandera, 2006; Tomáš *et al.*, 2008). Différents couplages sont envisageables (Jandera, 2006) parmi lesquels RP × CI, SEC × RP et SEC × NP sont les plus fréquemment mis en œuvre (compatibilité des éluants). Le couplage NP × RP ou inverse est plus délicat à réaliser mais peut être substitué par HILIC × RP. Généralement, pour les biomolécules, les couplages rencontrés sont SEC × RP, Anion-Exchange (en mode CI ou CF) × RP ou encore SEC × Anion-Exchange. Avec l'apparition de l'IEF hors-gel de nouveaux couplages sont envisageables tels que IEF × SEC, IEF × HILIC ou encore IEF × RP (Heller *et al.*, 2005; Righetti *et al.*, 2003).

En pratique, l'ensemble de ces couplages peut être réalisé de selon quatre modes (Tomáš *et al.*, 2008) en fonction notamment du degré de compatibilité et du facteur de dilution/concentration des différentes méthodes. Ces quatre modes sont :

- Séparation continue en ligne : colonnes directement connectées en série
- Séparation en ligne « heart-cut » : seules certaines fractions sont dirigées, via une valve, vers la seconde colonne
- Séparation discontinue dans la file (technique stop-flow répétée) : lorsqu'une première fraction est dirigée vers la seconde colonne, la séparation dans la première colonne est stoppée jusqu'à détection des analytes sur la seconde dimension
- Séparation discontinue hors ligne : requiert la récolte des différentes fractions avant seconde injection sur la deuxième colonne

Dans certains cas, le passage d'une dimension à l'autre requiert une étape d'évaporation-redissolution pouvant affecter la performance globale de la séparation et l'intégrité des protéines (Horvatovich *et al.*, 2010) ou des complexes.

Un exemple de séparation des complexes uranium-protéines du sérum humain par SEC × CI est décrit par Vidaud *et al.* (2005). Les fractions d'intérêt, *i.e.* riches en uranium, sont ultérieurement séparées par 2D-GE pour l'identification des protéines (Vidaud *et al.*, 2005). De la même manière, Tu *et al.* (2012) étudient la distribution cytosolique de Fe et Mn de *Bacillus anthracis* par CI × SEC couplé à la détection élémentaire par ICP-MS. Heller *et al.* (2005) réalisent par IEF hors-gel × RP-HPLC-ESI-MS/MS, la séparation de peptides, issus de la digestion de fractions du plasma humain, préfractionnées par IEF hors-gel.

2.5 Les détecteurs couplés aux techniques séparatives

Dans cette partie ne seront détaillés que les détecteurs utilisés au cours des travaux de thèse. Les systèmes de détection des protéines au sein des gels d'électrophorèse ne seront pas présentés mais ils sont très bien décrits dans la littérature et notamment dans la revue bibliographique de Westermeier *et al.* (2005).

Les techniques séparatives présentées dans la partie 2.3 peuvent être couplées de différentes manières à des méthodes d'analyse et de détection moléculaires ou élémentaires sensibles et résolutive principalement basées sur la spectrométrie de masse. On peut distinguer dans un premier temps les couplages « en-ligne » (on-line) des couplages « hors-ligne » (off-line). En effet dans le premier cas la détection est réalisée directement et sans manipulation des échantillons après l'étape séparative. On pense notamment aux couplages du type LC-ICP-MS ou LC-ESI-MS. Dans le second cas il faut transférer manuellement l'échantillon, avec ou sans étapes préparatoires intermédiaires, vers le couple analyseur/détecteur. On peut citer ici les couplages impliquant une récupération des fractions liquides (*e.g.* LC, IEF en phase liquide) ou solides (*e.g.* excision des taches protéiques GE) avant l'analyse par la spectrométrie de masse moléculaire ou élémentaire mais aussi dans une autre mesure l'ablation laser des gels d'électrophorèse (LA-ICP-MS).

2.5.1 La spectrométrie de masse multiélémentaire à plasma induit (ICP-MS)

Les spectromètres à plasma induit ICP-AES et ICP-MS sont des outils de choix pour la détection et la quantification multiélémentaire on- et off-line (Garcia *et al.*, 2006). L'ICP-MS présente toutefois plusieurs avantages parmi lesquels, sa sensibilité, sa sélectivité, sa précision et sa détection multi-isotopique. Son fonctionnement repose sur (i) l'atomisation et l'ionisation de l'échantillon à l'aide d'un plasma d'argon ($T = 6000-10000$ K) généré par une bobine d'induction alimentée par un courant électrique de haute fréquence suivi de (ii) la sélection des ions à analyser par filtrage des rapports masse sur charge (m/z) et de (iii) la mesure d'un signal électrique proportionnel au nombre d'ions de rapport m/z . L'ICP-MS donne accès à la quasi-totalité des éléments du tableau périodique. Le filtrage des rapports m/z peut être réalisé par différents analyseurs plus ou moins résolutifs. Pour simplifier, la résolution (R) est définie comme étant le rapport entre la « masse » de l'analyte et la différence de « masse » entre l'analyte et l'interférént ($R = m_{\text{analyte}} / (|m_{\text{analyte}} - m_{\text{interférént}}|)$). Plus rigoureusement, en ICP-MS le terme « masse » correspond au rapport m/z d'un ion mono- ou poly-atomique. La précision de « masse » correspond alors à la plus petite différence de m/z mesurable et détermine donc la capacité de l'analyseur à discriminer deux espèces de rapport m/z proche. Deux types d'analyseurs ont été mis en œuvre dans ces travaux :

- Les ICP-MS conventionnels sont équipés d'un analyseur quadripolaire (ICP-QMS). Ce dispositif permet un balayage très rapide de la gamme de m/z . En revanche, sa précision de masse de l'ordre de 0,2 pour ^{56}Fe ($R = 300$) peut s'avérer être une contrainte face aux interférences spectrales (*e.g.* ions poly-atomiques [$^{56}\text{Fe}^+$ vs. $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$], ions multichargés [$^{56}\text{Fe}^+$ vs. $^{112}\text{Cd}^{++}$]). Ces interférences peuvent néanmoins être réduites par réaction ou collision avec certains gaz injectés en amont de l'analyseur. Pour l'uranium, élément non interféré, la limite de quantification en dosage hors-ligne est de l'ordre de 1 ng.L^{-1} .

- Les ICP-MS dit à « haute résolution » sont équipés d'un secteur magnétique et d'un secteur électrostatique (ICP-SFMS) permettant une double focalisation des ions. Cette configuration permet un gain important en sensibilité sur les éléments lourds (nombre d'ions transmis \nearrow) ainsi qu'en résolution par rapport à l'ICP-QMS. A titre d'exemple, un tel appareil est capable de différencier $^{75}\text{As}^+$ de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ dont les rapports m/z ne diffèrent que de 0,00963. En revanche, pour atteindre une telle précision de masse, l'appareil doit réduire de 89 à 99% le nombre d'ions transmis à l'analyseur et donc la sensibilité. Les instruments commercialisés par Thermo proposent trois modes de résolution : (i) le mode basse résolution

(LR) pour lequel le nombre d'ions transmis et donc la sensibilité sont maximum mais la précision de m/z est comparable à l'ICP-QMS à savoir de l'ordre de 0,2 pour ^{56}Fe ($R = 300$), (ii) le mode moyenne résolution (MR) pour lequel seuls 7 à 11% des ions sont transmis par rapport au mode LR mais la précision en m/z est de l'ordre de 0,014 pour ^{56}Fe ($R = 4000$), et enfin (iii) le mode haute résolution (HR) pour lequel le pourcentage d'ions transmis se limite à 1 à 3% par rapport au mode LR et la précision en m/z est de l'ordre de 0,0056 pour ^{56}Fe ($R = 10000$). Puisque l'uranium n'est pas interféré, le mode basse résolution est suffisant, la transmission des ions est alors maximale et la limite de quantification en dosage hors-ligne est de l'ordre de $0,1 \text{ ng.L}^{-1}$ en routine (inférieure en salle blanche). Enfin, le balayage en m/z est plus lent et un compromis doit être réalisé entre les m/z suivis (nombre et gamme), la fréquence d'échantillonnage et le mode de résolution (unique/multiple). Enfin, l'investissement initial et les coûts de maintenance sont plus élevés pour ce type d'appareil.

Différentes interfaces existent ou sont en cours de développement afin de coupler directement (en-ligne) l'ICP-MS à de nombreuses techniques chromatographiques en phase liquide (*e.g.* SEC, RP, CI, FFF). Cependant, concernant les techniques séparatives sur gel, le recours à l'ablation laser (LA) est nécessaire pour volatiliser l'échantillon à analyser. En effet, l'ablation laser permet de vaporiser localement l'échantillon par impact laser (50-250 μm de diamètre). L'aérosol formé est ensuite transporté vers l'ICP-MS par un flux d'hélium afin d'y être atomisé, ionisé et analysé. Le déplacement tridimensionnel (selon x , y et z) de l'échantillon dans la cellule d'ablation permet la cartographie multi-élémentaire d'un échantillon solide (*e.g.* gel d'électrophorèse, bandelette IEF, coupe biologique). Si l'obtention d'une cartographie qualitative et semi-quantitative est relativement aisée, l'information quantitative précise est plus difficile à obtenir. En effet, cela nécessite de disposer d'étalons préparés dans la matrice d'intérêt puisque la réponse ICP-MS va directement dépendre de l'efficacité de l'ablation laser qui est notamment fonction de l'échantillon. Xu *et al.* (2013) proposent une méthode de quantification LA-ICP-MS de l'uranium présent sur les bandelettes IEF. Des applications similaires de cette technique pour l'analyse de l'uranium dans des gels d'électrophorèse existent dans la littérature (Becker *et al.*, 2005; Frelon *et al.*, 2009).

2.5.2 La spectrométrie de masse moléculaire

De la même manière qu'en ICP-MS, l'analyse par spectrométrie de masse moléculaire se découpe en trois étapes : (i) les molécules contenues dans l'échantillon sont ionisées dans une source d'ionisation avant d'être (ii) introduites dans un analyseur capable de filtrer les

molécules selon leur rapport m/z puis enfin (iii) un détecteur quantifie chaque espèce de rapport m/z donné. Il existe plusieurs sources d'ionisation (*e.g.* ESI, APPI, APCI, MALDI) ainsi que plusieurs analyseurs pour les spectromètres de masse moléculaire en fonction de l'application.

Les sources ESI, APPI et APCI fonctionnent toutes trois à pression atmosphérique et peuvent être couplées à la chromatographie en phase liquide alors que la source MALDI fonctionne sous vide et est dédiée à l'analyse hors-ligne de composés en phase solide. En effet, la source MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) permet l'ionisation d'analytes (préalablement mélangés avec une matrice photo-réactive et déposés sur un support spécifique) suite à une volatilisation par tir laser et un transfert de charge de la matrice vers les analytes en phase gaz. Les sources APPI (Atmospheric Pressure PhotoIonisation) et APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) sont particulièrement adaptées à l'analyse de molécules apolaires de poids moléculaire inférieur à quelques dizaines de kDa en couplage avec la chromatographie en phase liquide. APPI permet l'excitation et l'ionisation des molécules par le biais d'une source de lumière (photons), on parle de photoionisation, alors que la source APCI ionise les molécules sous l'influence d'une décharge électrique (corona) en phase gaz. Lorsqu'il s'agit, comme dans notre cas, d'interfacer la détection moléculaire avec la chromatographie liquide, l'ionisation par électrospray (ESI) est la technique la plus répandue et la plus universelle. Il s'agit d'une source d'ionisation dite « douce » puisqu'elle forme des ions moléculaires intacts éventuellement multichargés, *i.e.* jusqu'à plusieurs dizaines de charges, ce qui permet d'analyser des analytes de poids moléculaire atteignant la centaine de kDa. Pour former l'électrospray, l'échantillon traverse un tube capillaire avec un faible débit puis l'application d'une forte différence de potentiel (quelques kV) entre ce dernier et une contre électrode provoque la formation de gouttelettes chargées à la sortie du capillaire. L'application d'un gaz (et éventuellement de chauffage) va progressivement déssolvater ces gouttelettes chargées jusqu'à ce que les forces répulsives soient trop importantes et provoquent l'explosion coulombienne de la gouttelette libérant des molécules (multi)chargées.

Ces ions moléculaires vont pouvoir entrer dans l'analyseur dont il existe plusieurs types parmi lesquels le triple quadripôle (QQQ), le temps de vol (TOF), la trappe ionique, l'Orbitrap, ou encore la résonance cyclotronique ionique à transformé de Fourier (FT-ICR). De la même manière qu'en ICP-MS, ces analyseurs se différencient en partie par leur résolution, *i.e.* leur capacité à discriminer deux espèces de m/z proche. Le QQQ est l'analyseur le plus répandu de par son moindre coût et sa rapidité mais sa résolution et donc sa précision de masse sont

faibles ($\Delta(m/z) \approx 1$). Les analyseurs TOF, Orbitrap et FT-ICR sont tous trois des instruments à « haute résolution », *i.e.* capables de mesurer une masse très précise, mais leur gamme d'application (m/z , précision de masse) ainsi que leur prix les différencient. Dans notre cas, nous avons eu accès à un Orbitrap (Thermo LTQ-Orbitrap Velos). Cet analyseur dont le concept a été décrit par Kingdon en 1923 n'est apparu sur le marché qu'en 2005. Il est composé de deux électrodes imbriquées (trappe) capables de piéger des ions de différents rapports m/z en leur imposant une trajectoire particulière. La fréquence d'oscillation des ions dans cette trappe est fonction de leur rapport m/z et la mesure de cette fréquence suivie d'un traitement mathématique par transformée de Fourier permet de remonter à un rapport m/z avec une grande précision. En effet, une précision de masse ($\Delta(m/z)$) de l'ordre de 0,007 peut être obtenue en routine pour une molécule de m/z 400, ce qui correspond à une résolution ($(m/z)/\Delta(m/z)$) de 60000. D'autre part, la gamme dynamique de cet instrument est de l'ordre de 10^4 ce qui signifie que les molécules minoritaires 10000 fois moins concentrées que les majoritaires peuvent être théoriquement aussi bien détectées. Enfin, La gamme de m/z analysable est 50-2000 ou 200-4000. Le dispositif LTQ-Orbitrap permet de réaliser des analyses MS/MS voir MS^n . Cela signifie qu'un ion parent de m/z donné peut être sélectionné, isolé puis fragmenté par capture d'électrons (ECD) ou collision d'un gaz neutre (CID). Les ions fils produits (fragments) sont ensuite analysés et apportent un complément d'information sur l'ion parent (fragments caractéristiques, séquence d'acides aminés). En mode MS^n , les ions fils peuvent être à nouveau isolés et fragmentés pour obtenir une seconde génération d'ions fils et ainsi de suite, n fois. C'est la collecte et l'analyse d'informations sur les fragments qui permet de remonter avec un certain niveau de confiance à l'identité d'une protéine dans une stratégie protéomique. Si cette technique donne relativement facilement accès à des informations qualitatives (identification des espèces), l'obtention de données quantitatives est en revanche plus délicate et nécessite par exemple des stratégies d'étalonnage interne avec des espèces de références marquées isotopiquement.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

3 Matériel et méthodes

3.1 Exposition des poissons et échantillonnage

3.1.1 Exposition des poissons : dispositif expérimental

L'ensemble des poissons zèbre utilisés durant cette thèse sont des mâles provenant de l'Élevage de la Grande Rivière, 69490 St Forgeux, France. Ils sont réceptionnés à l'âge adulte de 6 mois et pèsent en moyenne 400 ± 50 mg pour une longueur de l'ordre de 3 à 4 cm. Dès leur arrivée, le sexe des poissons est vérifié individuellement. Les mâles ($n = 275$) sont acclimatés aux conditions du laboratoire (**Tableau 9**) pendant 1 mois avant le début des expérimentations et les éventuelles femelles sont isolées. L'eau utilisée durant les phases d'acclimatation et d'exposition est une eau douce reconstituée artificiellement par ajout de sels dans une eau déminéralisée (Tableau 9). Elle est dénommée « eau LRE » en référence à son utilisation historique au sein du Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie de l'IRSN (Bourrachot *et al.*, 2008). Le tableau ci-dessous résume les paramètres d'élevage et les caractéristiques de l'eau LRE. L'absence de phosphate et le pH de cette eau permettent une biodisponibilité maximum pour l'uranium lorsqu'il y est ajouté tout en respectant les tolérances du poisson zèbre.

Tableau 9 : Caractéristiques de l'eau LRE et conditions de maintien des poissons zèbre

<i>Paramètre</i>	<i>Consigne</i>
Température	$26 \pm 1^\circ\text{C}$
Cycle lumière / obscurité	12h / 12h
Densité de poissons	$2,75 \text{ poissons.L}^{-1}$
Composition ionique de l'eau (mg.L⁻¹)	$\text{Ca}^{2+} = 11.6$ $\text{Mg}^{2+} = 4.7$ $\text{Na}^+ = 7.4$ $\text{K}^+ = 5.9$ $\text{Cl}^- = 32.6$ $\text{SO}_4^{2-} = 9.6$ $\text{NO}_3^- = 19.2$ $\text{HCO}_3^- = 1.6$
pH à l'équilibre avec la pression partielle de CO₂	$6,5 \pm 1,0$
Nourriture (Tétramin en flocons)	2 fois par jour (5% de la masse totale de poisson)

Après acclimatation, les poissons sont divisés en trois groupes : témoins (c_0), c_{20} et c_{250} , respectivement composés de 110, 110 et 55 individus tout en conservant la densité de poissons de $2,75 \text{ poissons.L}^{-1}$ constante. **Chaque groupe est exposé à l'uranium appauvri par voie directe (i.e. via l'eau) à $0 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ (c_0) durant 3 et 30 jours, $20 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ (c_{20}) durant 3 et 30 jours et $250 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ (c_{250}) durant 3 jours.**

3.1.2 Suivi et régulation de la pression de contamination et des paramètres abiotiques

La pression de contamination est maintenue par apport continu, à l'aide de pompes péristaltiques, d'eau douce artificielle dopée à l'uranium à 0, 27 et $275 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ (nourrisses) pour les conditions c_0 , c_{20} et c_{250} , respectivement. Cet apport continu est compensé par le soutirage continu de la même quantité d'eau dans les dispositifs expérimentaux. Ceci permet un renouvellement quotidien de 50% de la colonne d'eau. La concentration totale en U ($[\text{U}]_{\text{total}}$) est mesurée quotidiennement, par ICP-AES, dans chaque unité expérimentale et corrigée par rapport aux consignes, si nécessaire, par ajout direct (stratégie double quantité) d'une solution concentrée de nitrate d'uranium ($\sim 1 \text{ g.L}^{-1}$). Les concentrations en U dissous ($[\text{U}]_{\text{dissous}}$) et U labile ($[\text{U}]_{\text{labile}}$) sont également suivies, quotidiennement par filtration de l'eau à $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ (Filtres seringues en PES, VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) et analyse par ICP-AES dans le cas de $[\text{U}]_{\text{dissous}}$ et sur 3 périodes couvrant la durée d'exposition des poissons par DGT dans le cas de $[\text{U}]_{\text{labile}}$ (cf. section 3.2).

Le pH est maintenu à $6,5 \pm 1,0$ dans chaque dispositif expérimental à l'aide d'un module de mesure du pH en ligne (pHstat, Consort) couplé à une pompe péristaltique délivrant de l'acide nitrique dilué (HNO_3 , 1 mM) en cas de dérive vers les pH basiques.

Les autres paramètres abiotiques tels que la température et la concentration en cations majeurs sont mesurés quotidiennement. Les nitrites et nitrates sont dosés une fois par semaine.

3.1.3 Echantillonnage

Après 3 jours d'exposition, 55 poissons de chaque condition sont sacrifiés à l'aide d'un bain d'eau glacée puis disséqués après exsanguination par incision directe dans le cœur. Les branchies ainsi que les reins de 50 individus sont récupérés, placés dans des eppendorf préalablement tarés, congelés dans l'azote liquide puis stockés dans un congélateur à -80°C pour la spéciation ultérieure de l'uranium. Parmi ces 50 individus, 10 sont sélectionnés au hasard afin d'étudier la bioaccumulation dans les gonades, le foie, les muscles et le reste du corps. Ces organes sont récupérés dans des micro-cupelles en aluminium (préalablement

tarées) puis sont séchés et conservés à l'étuve à 65°C avant minéralisation. Les branchies et les reins des 5 individus restant sont préparés selon le protocole décrit par Barillet *et al.* (2010) pour l'histologie par microscopie optique et la microlocalisation de l'uranium par imagerie MET-EDX.

Après avoir retiré 55 individus par condition, la colonne d'eau est immédiatement réduite de moitié dans les dispositifs c_0 et c_{20} (c_{250} s'arrêtant à 3 jours) afin de maintenir constante la densité de poisson pour les 27 jours restants. Au jour 30 de l'exposition le même protocole d'échantillonnage qu'au jour 3 est répété avec les 55 individus restant dans les unités expérimentales.

3.2 DGT

La DGT désigne un dispositif passif d'échantillonnage des métaux en solution qui, grâce à son design, donne accès à la concentration moyenne en espèces labiles intégrée sur la durée d'exposition.

3.2.1 Préparation et exposition des dispositifs DGT

Les unités expérimentales d'exposition des poissons n'étant pas des réacteurs parfaitement agités, il est nécessaire de prendre en compte la couche limite de diffusion (DBL) à l'interface entre le dispositif DGT et la solution (Warnken *et al.*, 2008; Warnken *et al.*, 2007). A cette fin, plusieurs épaisseurs de gel diffusif ont été utilisées. La relation entre l'inverse de la quantité de métal accumulée et l'épaisseur de gel diffusif donne ensuite accès à la DBL. Les dispositifs utilisés dans cette étude (**Figure 14**) ont une fenêtre d'exposition de 2,545 cm² (diamètre 1,8 cm) et sont composés d'un filtre de porosité 0,4 µm et de 22 µm d'épaisseur (Filtres HTTP, Millipore, Molsheim, France), d'un gel diffusif « open pore » de 0,4, 0,78 ou 2,0 mm d'épaisseur et d'une résine Chelex-100 (DGT Research, Lancaster, UK). Les dispositifs DGT sont assemblés et stockés dans NaNO₃ 100 mM sous hotte à flux laminaire, afin de limiter la contamination par les métaux ainsi que les poussières ambiantes, 16,5 h avant exposition. Les dispositifs sont exposés en triplicat pour chaque épaisseur de gel, dans chacune des unités expérimentale d'exposition des poissons durant les 3 périodes suivantes, 0 – 24 h, 24 – 72 h et 72 – 648 h après le début de l'exposition des poissons ce qui fait un total de 72 dispositifs et des durées de déploiement de 1 j, 2 j et 27 j.

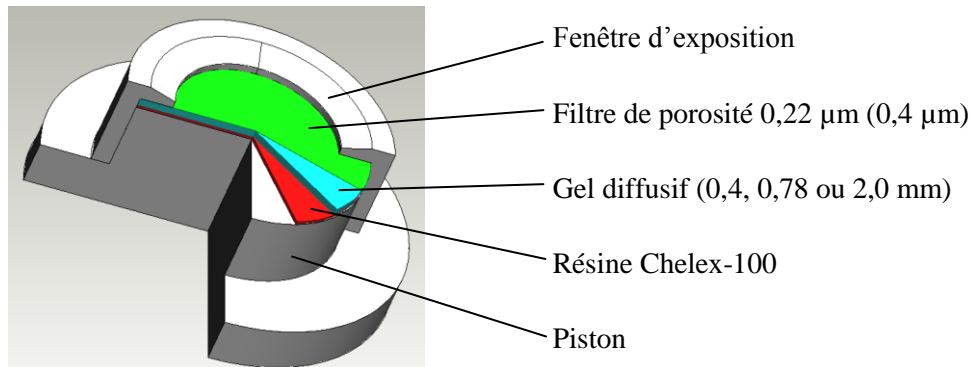


Figure 14 : Vue en coupe d'un dispositif DGT

3.2.2 Analyse des dispositifs DGT et calcul de la concentration labile moyenne d'exposition

Après exposition, les dispositifs DGT sont démontés sous hotte à flux laminaire, la résine Chelex-100 est récupérée à l'aide d'une pince en téflon et éluée passivement durant 7 jours à 4°C dans 1 mL d'acide nitrique 1 M. La concentration en uranium dans l'éluat ainsi obtenu (C_e) est mesurée par ICP-MS. A partir de cette concentration il est possible de remonter à la masse d'uranium accumulé dans la résine avec l'équation 1 et le facteur d'éluion (f_e) décrit par Li *et al.* (2006) :

$$M_{acc} = \frac{C_e \cdot (V_{HNO_3} + V_{gel})}{f_e} \quad \text{Équation 1}$$

Où

M_{acc} : masse de métal accumulée sur la résine chelex (ng)

C_e : concentration en métal dans l'éluat (1M HNO₃) ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

V_{HNO_3} : volume d'éluion (mL)

V_{gel} : volume de la résine chelex (typiquement 0,16 mL)

f_e : facteur d'éluion (0,678)

Le tracé de $(1/M_{acc}) = f(\text{épaisseur de gel})$ donne une droite d'équation générale $(1/M_{acc}) = a \cdot (\text{épaisseur de gel}) + b$. La concentration en espèces labile de U ($[U]_{labile}$) en solution intégrée sur la durée d'exposition est ensuite calculée d'après l'équation 2 décrites par Warnken *et al.* (2007 and 2008) explicitant les termes a et b. Le coefficient de diffusion de l'uranium au sein du gel utilisé est celui donné par Mihalik *et al.* (2012), à savoir $D^{gel} = 5,13 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

$$a = \frac{1}{[U]_{labile} \cdot A \cdot t \cdot D^{gel}} \quad b = \frac{\gamma}{[U]_{labile} \cdot A \cdot t \cdot D^{eau}} \quad \gamma = \frac{b}{a} \times \frac{D^{eau}}{D^{gel}} \quad \text{Équation 2}$$

Où

γ : épaisseur de la couche limite de diffusion (DBL) (cm)

b : ordonnée à l'origine

a : pente

A : surface de la fenêtre d'exposition de la DGT (2,545 cm²)

t : durée de déploiement de la DGT (s) → 1, 2 ou 27 jours

D^{gel} : coefficient de diffusion du métal au sein du gel corrigé à T et pH exposition (cm².s⁻¹)

D^{eau} : coefficient de diffusion du métal dans l'eau corrigé à T et pH exposition (cm².s⁻¹)

Les concentrations moyennes en espèces labile de U ([U]_{labile}) dans les milieux d'exposition à 3 et 30 jours sont finalement calculées selon les **équations 3** et **4** ci-dessous :

$$[U]_{labile}^{3j} = \frac{[U]_{labile}^{0-24h} + 2 \times [U]_{labile}^{24-72h}}{3} \quad \text{Équation 3}$$

$$[U]_{labile}^{30j} = \frac{[U]_{labile}^{0-24h} + 2 \times [U]_{labile}^{24-72h} + 27 \times [U]_{labile}^{72-648h}}{30} \quad \text{Équation 4}$$

3.3 Minéralisation des organes pour la détermination de la bioaccumulation

Après séchage à l'étuve, les gonades, foie, muscles et reste de corps collectés pour l'étude de la bioaccumulation de l'uranium lors de la campagne d'échantillonnage des branchies sont pesés puis transférés dans des flacons en verre munis de bouchons à vis préalablement tarés. Les organes sont minéralisés dans les flacons en verre par plusieurs cycles d'attaque acide et/ou oxydante à 105°C sur bain de sable et évaporation à sec comme décrit dans le **Tableau 10** en fonction de l'organe.

Tableau 10 : Détail des cycles de minéralisation pour les différents organes prélevés

(μL)	<i>Gonades et Foie</i>		<i>Muscles</i>		<i>Reste de corps</i>	
	HNO₃ 70%	H₂O₂ 30%	HNO₃ 70%	H₂O₂ 30%	HNO₃ 70%	H₂O₂ 30%
1	1000		2000		1000	
2	1000	200	1000	1000	1000	400
3	1000	200	200	1000	1000	400
4		500	200	1000	1000	200
5			200	1000		1000

Le résidu final incolore ou légèrement jaune est repris dans 3 mL d'acide nitrique à 2%, le bouchon est vissé et les flacons sont stockés à 4°C jusqu'à l'analyse par ICP-MS pour la détermination de la concentration totale en U.

3.4 Fractionnement subcellulaire

3.4.1 Procédure à l'échelle individuelle pour l'analyse en SEC-ICP-SFMS

L'épithélium des cellules branchiales de chaque individu utilisé pour ce fractionnement, préalablement stocké à -80°C est broyé à 4°C dans 600 µL de tampon acétate d'ammonium 100 mM (pH 7,4) à l'aide d'un Potter-Elvehjem 4 mL (piston en PTFE et cylindre en verre, Dutscher, Brumath, France, 2 x 1,5 min broyage, 30 sec pause) plongé dans un bain de glace. Le tampon 25 mM HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) additionné de 250 mM de sucrose (pH 7,4) est utilisé alternativement dans la phase de développement (cf. section 4.1). Un aliquot de 50 µL de broyat est placé dans un tube Eppendorf puis congelé dans l'azote liquide et stocké à -80°C pour la détermination ultérieure de la concentration en protéines. Un autre aliquot de 50 µL est conservé dans un flacon en plastique équipé d'un bouchon à vis de 5 mL afin d'être digéré pour la détermination de la concentration totale en U. Les 500 µL de broyat restants sont centrifugés (Micro Ultracentrifugeuse, Himac CS 120GX, Hitachi, Tokyo, Japon) à 100 000 g pendant 1 h à 4°C. Le surnageant obtenu correspond à la fraction cytosolique. Comme décrit précédemment pour le broyat, deux aliquots de 50 µL de cytosol sont récupérés pour le dosage des protéines et la détermination de la concentration totale en U. Le surnageant restant (\approx 400 µL) est divisé en trois portions placées dans des tubes Eppendorf. Deux sont congelés et stockés à -80°C, et le troisième est directement analysé par chromatographie d'exclusion stérique couplée à l'ICP-SFMS (SEC-ICP-SFMS). Le culot qui est composé de débris cellulaires, des granules et des organites cellulaires est transféré dans un flacon en plastique équipé d'un bouchon à vis de 5 mL afin d'être digéré pour la détermination de la concentration totale en U.

3.4.2 Procédure en « pool » pour le fractionnement par focalisation isoélectrique en phase liquide (IEF hors-gel)

Le fractionnement IEF hors-gel, développé plus loin dans ce manuscrit, requiert une quantité de cytosol de l'ordre de 1500 µL. Afin de ne pas trop diluer les échantillons et de maintenir une concentration convenable en protéines, il est nécessaire de combiner (« pooler ») les branchies issues de plusieurs individus. La préparation des groupes (« pools ») d'échantillons

reprend directement la procédure à l'échelle individuelle décrite précédemment mais le tampon utilisé est l'acétate d'ammonium à 10 mM (pH 7,4). La mise en commun des broyats (600 µL) issus des branchies de 4 individus permet ainsi d'obtenir environ 2400 µL de broyat. Un aliquot de 50 µL de broyat est placé dans un tube Eppendorf puis congelé dans l'azote liquide et stocké à -80°C pour la détermination ultérieure de la concentration en protéines. Un autre aliquot de 50 µL est conservé dans un flacon en plastique équipé d'un bouchon à vis de 5 mL afin d'être digéré pour la détermination de la concentration totale en U. Les 2300 µL de broyat restants sont répartis dans deux tubes et centrifugés (Micro Ultracentrifugeuse, Himac CS 120GX, Hitachi, Tokyo, Japon) à 100 000 g pendant 1 h à 4°C. Le surnageant obtenu dans les deux tubes, correspondants à la fraction cytosolique, sont réunis en un seul pool de cytosol. Comme décrit précédemment pour le broyat, deux aliquots de 50 µL de cytosol sont récupérés pour le dosage des protéines et la détermination de la concentration totale en U. Le cytosol restant (\approx 2100 µL) est divisé en trois aliquots. Un aliquot de 1500 µL est directement préparé pour l'IEF hors-gel et deux aliquots d'environ 250 µL sont congelés et stockés à -80°C pour analyse en SEC-ICP-SFMS et/ou en focalisation isoélectrique non dénaturante suivi de l'ablation laser couplée à l'ICP-MS (ND-IEF-LA-ICP-MS). Les deux culots qui sont composés de débris cellulaires, des granules et des organites cellulaires sont transférés dans un flacon en plastique équipé d'un bouchon à vis de 5 mL afin d'être digérés pour la détermination de la concentration totale en U.

Alternativement, certaines adaptations de ce protocole sont possibles :

- Si besoin, un pool de 5 individus peut être préparé
- Il est possible de broyer les branchies par 2 avec 1200 µL de tampon

3.5 Dosage des métaux par ICP-AES et ICP-MS

3.5.1 Dosage de U, Na, K, Ca et Mg dans les eaux d'exposition

Les échantillons d'eau provenant quotidiennement des unités expérimentales sont acidifiés directement après prélèvement à l'aide d'acide nitrique concentré (HNO₃, 70%) pour obtenir une concentration finale de 2%. Les métaux (U, Na, K, Ca et Mg) sont ensuite quantifiés par spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES Optima 4300DV, Perkin Elmer Inc., Wellesley, Massachusetts, États-Unis; LD pour U: 10 µg.L⁻¹) à l'aide d'une gamme d'étalonnage externe.

3.5.2 Dosage de U, Cu, Fe et Zn dans les échantillons biologiques

3.5.2.1 Préparation des solutions de travail et de la gamme d'étalonnage multiélémentaire

Toutes les solutions sont préparées dans des flacons en plastique de 5 mL, le volume total est toujours de 5 mL. Les solutions mères WU1 à 10 mg.L⁻¹ U et MultiM à 1 mg.L⁻¹ Fe, Cu et Zn sont préparées dans l'acide nitrique à 2% à partir des solutions mères mono-élémentaires commerciales. La gamme d'étalonnage multi-élémentaire (UC0 à UC7) est ensuite préparée dans l'acide nitrique à 2% à partir des solutions de travail (WU2 et WU3) comme indiqué dans le **Tableau 11**. Un étalon interne concentré (ISTD, ²⁰⁹Bi 100 µg.L⁻¹) est systématiquement ajouté à la concentration finale de 1 µg.L⁻¹ dans tous les étalons (UC0 à UC7).

Tableau 11 : Préparation de la gamme d'étalonnage en U, Fe, Cu et Zn pour l'analyse totale par ICP-MS

<i>Identifiant</i>	<i>V à prélever (µL)</i>	<i>de</i>	<i>V MultiM (µL)</i>	<i>V ISTD (µL)</i>	<i>V HNO₃ 2% (µL)</i>	<i>[U] (ng.L⁻¹)</i>	<i>[Fe, Cu, Zn] (µg.L⁻¹)</i>
WU2	50,00	WU1	-	-	4950	100 000	-
WU3	50,00	WU2	50	-	4900	1000	10,0
UC7	50,00	WU2	50	50	4850	1000	10,0
UC6	25,00	WU2	25	50	4900	500	5,0
UC5	500,00	WU3	-	50	4450	100	1,0
UC4	50,00	WU3	-	50	4900	10	0,10
UC3	25,00	WU3	-	50	4925	5	0,05
UC2	5,00	WU3	-	50	4945	1	0,01
UC1	2,50	WU3	-	50	4947,5	0,5	0,005
UC0	0,00	WU3	-	50	4950	0,0	0

3.5.2.2 Préparation des échantillons

Quel que soit l'échantillon, un étalon interne concentré (ISTD, ²⁰⁹Bi 100 µg.L⁻¹) est ajouté à la concentration finale de 1 µg.L⁻¹ avant analyse.

- Eluats de DGT et minéralisats d'organes pour l'étude de la bioaccumulation de U :

Les éluats des résines Chelex utilisées en DGT et les minéralisats d'organes sont dilués de manière adéquate pour ramener la concentration à 2% HNO₃ et rentrer dans la gamme d'étalonnage ([U] < 1000 ng.L⁻¹) avant analyse.

- Echantillons issus du fractionnement subcellulaire :

100, 100 et 200 μL d'acide nitrique concentré (HNO_3 70%) sont ajoutés au broyat, cytosol et culot, respectivement. Les bouchons des flacons en plastique sont vissés fermement puis les échantillons sont digérés pendant 2 h à l'étuve (85°C). Les digestats obtenus sont dilués avec de l'eau Milli-Q afin d'obtenir une masse totale d'environ exactement 3,5 g (concentration finale en acide nitrique légèrement supérieur ou égale à 2%). Les digestats ainsi dilués peuvent être analysés directement. S'ils sont trop concentrés (*e.g.* culot), ils sont dilués 4 à 10 fois avec de l'acide nitrique à 2% pour s'adapter à la gamme d'étalonnage de U, Cu, Fe et Zn.

- Echantillons issus du fractionnement IEF hors-gel :

Un aliquot de 50 μL de chaque fraction IEF hors-gel est repris avec de l'acide nitrique à 2% dans un volume total de 3,0 mL avant analyse par ICP MS.

3.5.2.3 Analyse ICP-MS

Les échantillons sont analysés par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS Agilent 7500 Ce, Agilent, Tokyo, Japon) en utilisant une calibration externe ([U] 0,5-1000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ et [Cu, Zn, Fe] de 0,05 - 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) avec correction par le standard interne (LD pour U: 1 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, Cu et Zn: 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et Fe: 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). L'absence d'effet de matrice a été vérifiée en comparant les résultats avec ceux obtenus par la méthode des ajouts dosés pour neuf échantillons différents (différentes conditions d'exposition et différents types de fraction subcellulaire, données non-présentées). Le **Tableau 12** récapitule les principaux paramètres de l'analyse.

Tableau 12 : Paramètres de l'ICP-MS Agilent 7500 utilisés pour la détermination des concentrations en U, Fe, Cu et Zn totale

<i>Paramètre</i>	<i>Consigne</i>
Chambre de nébulisation	Scott à 2°C
Nébuliseur	microMist
Injecteur	2 mm diamètre interne
Cônes	Nickel
Puissance	1500 W
Gaz de nébulisation (porteur)	1,05 – 1,15 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Gaz d'appoint (make-up)	/
Gaz auxiliaire	0,80 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Gaz de réaction*	H_2 à 4 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

*Dans le cas où seul U est mesuré le gaz de réaction n'est pas utilisé

3.6 Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la spectrométrie de masse à plasma induit et à secteur magnétique (SEC-ICP-SFMS)

Il s'agit ici de séparer les protéines selon leur poids moléculaire (PM), ou plus précisément selon leur rayon hydrodynamique prenant en compte à la fois la masse de la protéine, définie par sa structure primaire (séquence), et sa géométrie, définie par les structures secondaire, tertiaire et quaternaire en conditions natives.

3.6.1 Préparation des éluants

- Acétate d'ammonium 100 mM pH 7,4 (phase mobile) :
7,71 ± 0,01 g d'acétate d'ammonium (NH₄Ac, Aldrich A1542) sont pesés puis dissous dans 999 mL d'eau Milli-Q. Après dissolution complète, 1 mL de solution d'ammoniaque diluée est ajouté puis le pH est vérifié (7,4 ± 0,1) et ajusté si nécessaire par ajout de solution d'ammoniaque diluée. Cet éluant, utilisé à température ambiante, sera préférentiellement préparé le jour même mais pourra être stocké 1 semaine à 4°C.
- Bicarbonate d'ammonium 200 mM / EDTA 2 mM (solution de nettoyage de la colonne) :
7,90 ± 0,01 g de bicarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃, Aldrich 40807) et 292 ± 5 mg d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) sont pesés puis dissous dans 500 mL d'eau Milli-Q. La solution est mélangée vigoureusement jusqu'à dissolution complète puis dégazée 10 min au bain d'ultrasons. Pour la meilleure efficacité, cette solution doit être préparée le jour même et ne doit pas être stockée.
Alternativement, la solution de nettoyage est préparée sans EDTA lorsque seul le suivi de l'uranium seul est envisagé.

3.6.2 Nettoyage et conditionnement de la colonne

Afin de minimiser le bruit de fond en ²³⁸U (≈ 50 - 100 cps), la colonne chromatographique est systématiquement nettoyée selon la procédure suivante:

- (1) Avant toute analyse (la veille), la colonne est rincée avec la solution de nettoyage pendant au moins 2 h à 0,2 mL.min⁻¹ et ensuite conditionnée avec la phase mobile pendant 2 h à 0,5 mL.min⁻¹. Idéalement, le rinçage avec la solution de nettoyage est poursuivi sur une nuit.
- (2) Après chaque injection d'échantillon contenant de l'U (e.g. cytosol, mélange de protéines), un lavage est réalisé par cinq injections consécutives de 200 µL de solution

de nettoyage via un programme d'injection automatique. A la fin de cette procédure, si un retour au bruit de fond initial en ^{238}U de 100 à 200 cps n'a pas été atteint, l'étape (2) est répétée. Si le bruit de fond initial n'est toujours pas retrouvé, l'étape (1) est répétée.

Alternativement, la solution de nettoyage peut être injectée directement (*e.g.* 3 min à $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) via une voie disponible de la pompe de la chaîne chromatographique si la boucle d'injection ne permet pas l'injection de 200 μL ou bien s'il n'est pas possible d'exécuter un programme d'injection.

3.6.3 Paramètres d'éluion et d'injection (SEC)

Les cytosols et fractions IEF hors-gel sont analysés en chromatographie d'exclusion stérique (SEC) à l'aide d'un système chromatographique Agilent 1200 (G1312A BinPump, Waldbronn, Allemagne) ou Agilent 1260 Bioinert (Waldbronn, Allemagne) équipé d'une colonne Superdex 200 (Superdex 200 10/300 GL, 600-10 kDa, 300 x 10, GE Healthcare, Uppsala, Suède). La phase mobile consiste en une solution aqueuse d'acétate d'ammonium (NH_4Ac) à 100 mM, pH 7,4, délivrée à un débit de $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Le volume d'injection est de 100 μL . La durée d'analyse pour un cytosol est généralement fixée à 60 min mais peut être réduite à 50 min.

3.6.4 Paramètres de détection (UV-Vis et ICP-SFMS)

La détection des protéines en ligne est réalisée par un détecteur UV-Visible (Détecteur à Longueurs d'onde Multiples, MWD, Agilent G1365B, Waldbronn, Allemagne) enregistrant simultanément l'absorption à 225 et 280 nm. Un ICP-SFMS (Element XR, ThermoFisher, Brême, Allemagne) permet de la détection élémentaire en ligne. Les paramètres de détection ICP-SFMS sont détaillés dans le **Tableau 13**. L'optimisation de l'ICP-SFMS est réalisée en mode basse résolution avec une solution de Li, In et U à $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans HNO_3 5%. Lorsque la résolution moyenne (MR) est nécessaire, l'appareil est calibré en masse avec une solution multi-élémentaire et la dérive de masse (mass offset) est mesurée pour chaque élément d'intérêt et corrigée dans la méthode d'acquisition quotidiennement.

Tableau 13 : Paramètres de l'ICP-SFMS Thermo Element XR optimisés pour le couplage avec la chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Conditions expérimentales		
Chambre de nébulisation	Scott à 2°C	Valeurs typiques obtenues
Nébuliseur	Conikal (1 mL.min ⁻¹)	
Injecteur	1,75 mm diamètre interne	Li 7.10 ⁵ cps (< 2%RSD)
Cônes	Nickel	In 4.10 ⁶ cps (< 2%RSD)
Puissance	1200 – 1300 W	U 6.10 ⁶ cps (< 2%RSD)
Gaz de nébulisation (sample)	0,960 – 1,050 L.min ⁻¹	Oxydes 10 – 12 %
Gaz auxiliaire	0,80 L.min ⁻¹	
Choix du mode de résolution et éléments accessibles		
Mode basse résolution (LR)	Mode moyenne résolution (MR)	Mode mixte (LR+MR)
^{235,238} U, ^{64,66} Zn, ^{63,65} Cu et ^{54,57} Fe	Idem que LR + ⁵⁶ Fe et ³¹ P	Éléments LR + MR
Forte transmission des hautes masses, sensibilité élevée LD (²³⁸ U) < 0,1 ng.L ⁻¹ sensibilité faible sur Fe peu abondant	Transmission réduite de 90 à 95% par rapport à LR, perte significative de sensibilité sur ²³⁸ U	Cumul de la haute sensibilité pour ²³⁸ U et détection non interférée pour ⁵⁶ Fe et ³¹ P. Mais faible fréquence d'échantillonnage (600 pts/h) car requiert 1 sec de stabilisation lors du changement de mode

Pour la plupart des applications nécessitant la détection de U à l'état de trace (*e.g.* analyse de cytosol en SEC) le mode basse résolution (LR) est préférentiellement choisi en raison de la sensibilité et de la fréquence d'échantillonnage élevée. Lorsqu'une meilleure sensibilité est souhaitée pour Fe et/ou lorsque l'on souhaite détecter P tout en suivant U à l'état de trace, le mode mixte (LR+MR) est choisi (cf. section 4.2) en dépit de la faible fréquence d'échantillonnage pouvant entraîner une perte d'information (pics minoritaires, épaulements). Quelques essais ont été réalisés afin de suivre le signal de Ca lors de l'analyse des cytosols par SEC-ICP-SFMS. Toutefois, l'isotope majoritaire ⁴⁰Ca (96,9%) est fortement interféré par ⁴⁰Ar (99,6%), gaz plasmagène. Cette interférence ne peut pas être levée par l'ICP-SFMS car les masses sont trop proches ($\Delta m = 0,000208$ uma), il est alors nécessaire de suivre des isotopes minoritaires tels que ⁴²Ca (0,6%) ou ⁴⁴Ca (2,1%) avec la faible sensibilité que cela implique.

3.6.5 Etalonnage de la colonne en poids moléculaire

L'étalonnage de la colonne d'exclusion stérique (SEC) est obtenu dans les conditions classiques d'élution (NH_4Ac à 100 mM, pH 7,4, $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) à l'aide de protéines commerciales diluées à environ $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans l'eau Milli-Q (thyroglobuline 670 kDa, ferritine 474 kDa, transferrine 80 kDa, Mn-SOD 40 kDa, myoglobine 16 kDa, Cd-MT2 6,8 kDa et cobalamine 1,3 kDa). Les étalons sont détectés par absorbance UV à 280 nm. L'étalonnage (**Figure 15**) est effectué en traçant le $\log(\text{poids moléculaire}) = f(\text{temps de rétention})$. La calibration a été vérifiée sur la gamme 1,3 – 670 kDa. Le volume mort (exclusion) se situe à environ 12 min alors que le volume d'inclusion totale se trouve au-delà de 30 min.

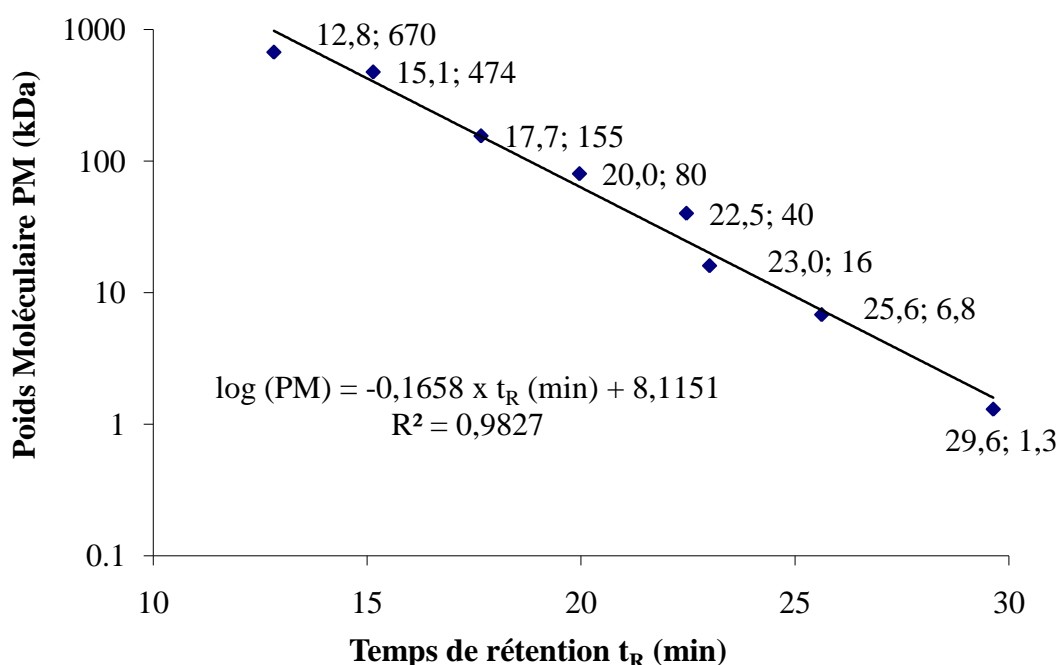


Figure 15 : Droite de calibration de la colonne d'exclusion stérique (Superdex 200) dans les conditions d'élution (0,7 mL/min – $\text{NH}_4\text{Acétate}$ 100 mM pH 7,4)

3.6.6 Taux de recouvrement en uranium

Le taux de recouvrement est évalué sur le système chromatographique entier, en calculant le rapport entre la quantité d'U en sortie de SEC et la quantité d'U injectée (*i.e.* $[\text{U}]_{\text{cytosol}} \times V_{\text{injection}}$). La quantité d'U en sortie de SEC est obtenue par deux méthodes :

1. Par **FIA** lors du couplage SEC-ICP-SFMS, en injectant des solutions étalons d'U (0 – 100 – 500 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ dans HNO_3 2%) en l'absence de colonne chromatographique afin de pouvoir réaliser un étalonnage du type $\text{Aire}(\text{U}) = f(\text{quantité d'U éluee})$. Cet étalonnage

permet alors d'évaluer la quantité d'U élue pour un échantillon analysé par SEC-ICP-SFMS dont l'Aire(U) a été mesurée ;

2. Par **dosage de l'U total élué**, en recueillant la totalité de l'éluat après injection d'un échantillon sur la colonne chromatographique (ICP-MS non couplé), et en dosant l'U dans ce dernier par ICP-MS après une étape de lyophilisation, digestion dans HNO₃ 10% (digiprep 2h à 80°C) et dilution de HNO₃ à 2%.

3.7 Focalisation isoélectrique hors-gel (IEF hors-gel)

Il s'agit ici de séparer les protéines selon leur point isoélectrique (pI) à l'aide d'un gradient de pH formé en milieu liquide dans une chambre cylindrique (**Figure 16**) comportant 10 compartiments séparés l'un de l'autre par une membrane perméable. Sous l'influence d'un champ électrique, les protéines chargées migrent puis s'immobilisent dans le compartiment où le pH est égal à leur pI (protéine globalement neutre).



Figure 16 : Chambre de focalisation et réservoirs anodique/cathodique

L'établissement et la gamme du gradient de pH au sein de la chambre de focalisation du dispositif IEF hors-gel (Bio-Rad Micro-Rotofor) sont non-seulement contrôlés par le type d'ampholytes ajoutés aux échantillons (*e.g.* pH 3-10 ou 4-7) mais aussi par les électrolytes placés dans les compartiments anodiques et cathodiques du dispositif. Ainsi, dans le cas d'un gradient de pH 3-10, il est nécessaire de recourir à l'utilisation de soude (NaOH 0,1M) au compartiment cathodique et d'acide phosphorique (H₃PO₄ 0,1M) au compartiment anodique. Dans le cas d'un gradient de pH restreint à 4-7, l'acide phosphorique est substitué par l'acide acétique (CH₃COOH 0,5M) au niveau du compartiment anodique.

3.7.1 Préparation des électrolytes et équilibrage des membranes

Les électrolytes nécessaires au fonctionnement du système IEF hors-gel ainsi qu'à l'équilibrage des membranes échangeuses d'ions (**Figure 17**) sont préparés de la manière suivante :

- NaOH 0,1M (catholyte)

Une solution commerciale de NaOH à 0,1M (éluant pour chromatographie ionique, Fluka 43617) est directement utilisée.

- H_3PO_4 0,1M (anolyte pour gradient pH 3-10)
685 μL d'acide phosphorique concentré (H_3PO_4 , 85%, d 1,685, Aldrich 345245) sont dilués dans un volume total de 100 mL par ajout d'eau Milli-Q.
- CH_3COOH 0,5M (anolyte pour gradient pH 4-7)
2,86 mL d'acide acétique glacial (CH_3COOH , 100%, d 1,049) sont dilués dans volume total de 100 mL par ajout d'eau Milli-Q.

Les membranes échangeuses d'ions présentes aux interfaces entre l'échantillon dans la chambre de focalisation et les réservoirs d'électrolytes doivent être équilibrées dans l'électrolyte approprié au minimum 12h avant analyse.

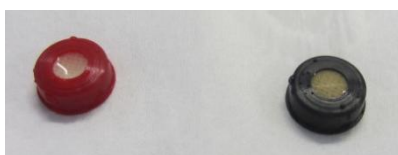


Figure 17 : Membranes échangeuse d'ions anodique (rouge) et cathodique (noire)

La membrane cathodique, repérée par sa couleur noire, est équilibrée dans la soude à 0,1M. La membrane anodique, repérée par sa couleur rouge, est équilibrée soit dans l'acide phosphorique 0,1M, soit dans l'acide acétique 0,5M selon la gamme de pH désirée.

3.7.2 Préparation de la chambre de focalisation

Après avoir rincé les membranes anodique et cathodique à l'eau Milli-Q, ces dernières sont introduites à chaque extrémité de la chambre de focalisation. Les réservoirs anodique et cathodiques sont vissés à l'aide de l'outil plastique sur la chambre de focalisation en prenant bien soin de respecter les polarités (anode rouge et cathode noire) et l'alignement des événements avec les orifices servant à l'introduction de l'échantillon de la chambre de focalisation (**Figure 18**). Les orifices servant à la récolte des fractions sont alors scellés à l'aide d'un morceau de scotch prédécoupé à l'aide de l'outil plastique et l'ensemble est pesé à vide puis placé à 4°C avant introduction de l'échantillon.

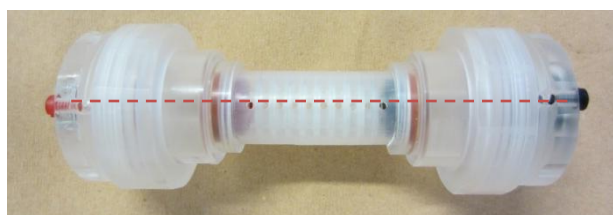


Figure 18 : Chambre de focalisation assemblée montrant l'alignement des orifices de récolte des 10 fractions avec les événements des compartiments anodique (rouge) et cathodique (noir)

3.7.3 Préparation du mélange à fractionner

Le mélange à fractionner est généralement préparé juste avant fractionnement. Un volume total de 3 mL est nécessaire pour faciliter l'étape de remplissage de la chambre de focalisation. Selon le constructeur, la concentration finale en sels et tampons ne doit pas excéder 10 mM afin de ne pas perturber la formation et la reproductibilité du gradient de pH. Il a été choisi de limiter cette concentration à 5 mM dans notre protocole. La procédure standard décrite ci-dessous s'applique à un cytosol extrait dans un tampon 10 mM NH₄Ac pH 7,4 dont la concentration en protéines est de l'ordre de 0,5 à 1 mg.mL⁻¹. Le **Tableau 14** détaille le type et les quantités d'ampholytes à introduire dans le mélange en fonction des conditions souhaitées pour un volume total de 3 mL.

Tableau 14 : Type et volume d'ampholytes porteurs à ajouter à l'échantillon à fractionner (3 mL) en fonction des conditions souhaitées

<i>Condition recherchée</i>		<i>Ampholytes</i>	
Gradient	%Ampholytes	Référence	Volume (µL)
3-10	2%	Bio-Rad 3-10 (40%)	150
3-10	1%	Bio-Rad 3-10 (40%)	75
3-10	0,5%	Bio-Rad 3-10 (40%)	37,5
4-7	0,5%	GE Healthcare 4-7	15

Dans un tube en plastique de 5 mL sont introduits 1,5 mL de l'échantillon à fractionner (cytosol, protéines commerciales), les ampholytes et de l'eau Milli-Q complète le volume total d'échantillon à 3 mL. Le tube est bouché puis le mélange à fractionner est homogénéisé à l'aide d'un vortex à vitesse minimale.

Alternativement, il est possible d'introduire un volume d'échantillon plus faible dans quel cas le volume manquant est complété avec du tampon NH₄Ac 10 mM afin de conserver constante la concentration finale en tampon de 5 mM.

3.7.4 Mise en place et fractionnement

Le générateur électrique ainsi que le Micro-Rotofor préalablement placés en chambre froide (4°C) doivent être allumés au minimum 15 min avant le démarrage du fractionnement. Le Micro-Rotofor est équipé d'un dispositif de régulation de la température de la chambre de focalisation qui peut être désactivé (position 0), en mode non-dénaturant (position I, 4°C en chambre froide) ou en mode dénaturant (position II, 20°C). Il faut bien veiller à ce que

l'interrupteur de refroidissement (Cooling) du Micro-Rotofor soit en position I (non-denaturing).



Figure 19 : Générateur électrique (gauche) et Micro-Rotofor (droite)

Le mélange à fractionner est introduit dans la chambre de focalisation préalablement placée à 4°C à l'aide d'une seringue en plastique de 5 mL non graissée. Idéalement, le remplissage doit être effectué en un seul point (centre du dispositif, compartiment 5 ou 6) en laissant le temps au mélange de se répartir dans les différents compartiments afin d'éviter les bulles. Toutefois, si cela s'avère nécessaire (*e.g.* compartiments extrêmes 1 et 10) l'appoint peut être fait directement en injectant le mélange dans le compartiment concerné. Après remplissage, le dispositif doit être pesé afin de vérifier la quantité d'échantillon introduite (*ca.* 2,5 ± 0,1 g). Les orifices d'introduction sont ensuite scellés avec un morceau de scotch prédécoupé à l'aide de l'outil plastique.

Le Micro-Rotofor est temporairement éteint afin de placer la chambre de focalisation dans l'enceinte refroidie en veillant bien à son orientation (anode rouge à gauche et cathode noire à droite) ainsi qu'au bon contact électrique et mécanique (encoche côté cathode) aux extrémités de la chambre de focalisation. Les réservoirs anodique et cathodique sont remplis avec 6 mL d'électrolyte approprié (H₃PO₄, CH₃COOH ou NaOH). Le capot est mis en place, le Micro-Rotofor est remis en marche et le fractionnement peut-être démarré après avoir contrôlé la libre oscillation de la chambre de focalisation et la position I (non-denaturing) de l'interrupteur de refroidissement (Cooling). Le programme de focalisation utilisé se contente de délivrer une puissance constante de 1 W sans limite de durée mais en limitant la tension à 1000 V maximum. Ainsi, voltage et intensité sont contrôlés par la régulation en puissance et la fin de la focalisation est marquée par une stabilisation de la tension. Une fois le programme démarré, l'évolution de la tension est suivie en notant à minima les valeurs affichées à t₀, t_{5min}, t_{10min} puis toutes les 10 minutes. La focalisation est stoppée environ 30 minutes après le début

de la stabilisation afin de limiter la dégradation de l'échantillon et du gradient de pH. La tension finale ainsi que le nombre de Volt-heures (Vh) sont notés avant l'arrêt du générateur.

3.7.5 Récolte et stockage des fractions

Après avoir stoppé le générateur, le Micro-Rotofor peut être éteint et la chambre de focalisation retirée. La pompe à vide est connectée au système de récolte des fractions puis allumée. Le scotch recouvrant les orifices d'introduction de la chambre de focalisation est délicatement retiré, puis la chambre est positionnée sur le système de récolte en prenant soin de ne pas en inverser le sens (anode rouge gauche et cathode noire droite). En appuyant fermement sur la chambre de focalisation, le scotch recouvrant les 10 orifices de récolte est percé par les 10 aiguilles du système de récolte afin de recueillir simultanément et rapidement les 10 fractions liquides dans le tiroir de récolte compartimenté (**Figure 20**). La fraction 1 correspond ainsi à la fraction la plus acide (anodique) et la fraction 10 correspond à la fraction la plus basique (cathodique).



Figure 20 : Recueil des fractions (gauche) et tiroir de récolte compartimenté (droite)

Les fractions ainsi recueillies sont aliquotées de la manière suivante. 50 μL sont placés dans un flacon de 5 mL afin de réaliser le dosage des métaux (U, Cu, Fe, Zn) par ICP-MS après acidification (2% HNO_3). Le reste des fractions (≈ 150 à $200\mu\text{L}$) est placé dans un tube eppendorf, congelé rapidement dans l'azote liquide et stocké à -80°C pour le dosage ultérieur des protéines, l'analyse en SEC-ICP-SFMS, la digestion tryptique ou encore l'analyse en $\text{RP}(\text{C}_4)$ -ICP/ESI-MS.

Certaines protéines pouvant précipiter lorsque $\text{pH} = \text{pI}$, il peut être nécessaire de tamponner les fractions après récolte et avant stockage à -80°C . A cette fin l'ajout de 10 μL de NH_4Ac 1M dans chaque fraction évite la formation de précipité.

3.7.6 Nettoyage du matériel

L'uranium pouvant s'adsorber facilement sur les surfaces plastiques, il est nécessaire de nettoyer le matériel à l'aide d'un agent de chélation de l'uranium après avoir récolté les fractions. A cette fin il a été choisi d'utiliser les carbonates. Après un premier rinçage à l'eau Milli-Q, les aiguilles, la chambre de focalisation (dépourvue des membranes échangeuses d'ions) ainsi que le tiroir de récolte sont plongés dans une solution de bicarbonate d'ammonium à 200 mM (790 mg pour 100 mL) puis placés au bain d'ultrasons durant 5 à 10 min. Après ce traitement, tout le matériel est rincé abondamment à l'eau Milli-Q. Ce traitement est plus efficace et moins agressif qu'un traitement acide (HNO_3 à 1%) tout en restant moins gênant que le SDS dénaturant dont il est difficile d'éliminer toutes traces.

3.8 *Dosage des protéines dans les fractions IEF hors-gel, cytosols et broyats : méthode BCA microplaque*

Plusieurs kits sont disponibles commercialement pour le dosage des protéines parmi lesquels Bradford, DC protein assay et BCA. Tous trois sont adaptables en microplaque. Bradford est le plus simple et le plus rapide puisqu'il ne fait intervenir qu'un seul réactif (réactif de Bradford) et une courte période d'incubation (15 min, T°_{amb}). Toutefois, ce dernier manque de sensibilité et de spécificité puisqu'il peut être interféré par la présence d'ampholytes notamment. Le kit DC protein assay (Bio-Rad) fait intervenir 2 réactifs et une courte durée d'incubation (15 min, T°_{amb}). Il est plus sensible que Bradford mais est fortement interféré par la présence d'ampholytes en solution. Enfin, le kit BCA fait intervenir 1 seul réactif (mélange de 3 réactifs) mais une durée d'incubation plus longue (2h à 37°C ou 24h à T°_{amb}). La méthode BCA est sensible et n'est pas interférée par la présence d'ampholytes en solution c'est pourquoi elle a été choisie ici pour l'ensemble des analyses à réaliser (cytosols, broyats, fractions IEF hors-gel).

3.8.1 Préparation de la gamme d'étalonnage

- Solution mère de BSA à 50 mg.mL⁻¹ :

Dans un eppendorf de 1,5mL sont pesés environ exactement 50 mg de BSA. 1 mL d'eau Milli-Q est ajouté puis la solution est vortexée jusqu'à dissolution complète de la BSA (coloration légèrement jaune à incolore). La solution obtenue peut être aliquotée et stockée à -20°C (2 mois).

- Préparation de la gamme d'étalonnage (BSA) :

Idéalement la gamme d'étalonnage (**Tableau 15**) est préparée fraîchement à partir de la solution mère de BSA ($50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) chaque fois que le dosage est effectué et dans le même tampon que les échantillons à analyser. Toutefois, la réponse est stable jusqu'à 2 mois avec une gamme conservée à -20°C . Le tampon n'a pas d'influence sur la réponse lorsqu'il s'agit de $10 \text{ mM NH}_4\text{Ac}$. La gamme est préparée dans des tubes eppendorf de $1,5 \text{ mL}$ de la manière suivante :

Tableau 15 : Composition de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines

<i>[BSA] (mg/mL)</i>	0	0,25	0,50	0,60	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
BSA mère (μL)	0	5	10	12	20	40	60	80	100
H₂O (μL)	1000	995	990	988	980	960	940	920	900

- Réactif BCA (pour 25 échantillons) :

$2000 \mu\text{L}$ de réactif A sont préalablement mélangés avec $2000 \mu\text{L}$ de réactif B puis sont ajoutés $80 \mu\text{L}$ de réactif C. Un précipité vert peut alors se former. Le mélange est vortexé jusqu'à disparition du précipité vert et homogénéisation de la coloration verte pâle. Le mélange ainsi obtenu doit être utilisé directement et ne doit pas être conservé.

3.8.2 Protocole du dosage

Dans une microplaque 96 puits à fond plat et transparent à la lumière visible, sont déposés $5 \mu\text{L}$ de la gamme de calibration et des échantillons à doser (fractions IEF hors-gel, cytosols, broyats). Sont ensuite ajoutés $145 \mu\text{L}$ d'eau Milli-Q puis $150 \mu\text{L}$ de réactif BCA. La plaque est ensuite placée dans le lecteur microplaque et agitée 30 secondes avant d'être recouverte d'un parafilm et incubée 2 h à 37°C ou bien 24 h à T°_{amb} .

Après incubation, la microplaque est placée dans le lecteur de microplaque ($\approx 5 \text{ min}$ après retour à T°_{amb} dans le cas de l'incubation à 37°C), agitée 4 secondes puis l'absorbance est lue à 595 nm .

3.8.3 Traitement des résultats

La droite d'étalonnage est tracée avec la gamme de calibration ($\text{Abs}_{(595\text{nm})} = f([\text{BSA}])$). L'équation de régression linéaire est calculée ($\text{Abs}_{(595\text{nm})} = a \cdot [\text{BSA}] + b$) ainsi que le coefficient de corrélation r^2 puis la concentration en protéines des échantillons inconnus est retrouvée par la relation $[\text{protéines}] = (\text{Abs}_{(595\text{nm})} - b)/a$.

3.9 Focalisation isoélectrique in-gel en condition native (ND-IEF)

Le protocole décrit ci-dessous est adapté de Xu *et al.* (2013) et s'applique aux cytosols issus de l'épithélium des branchies de poisson zèbre ([protéines] = 500 à 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 10 mM NH_4Ac). Les bandelettes IEF utilisées (13 cm, pH 4 – 7 ou 3 – 10) sont stockées à -20°C .

3.9.1 Préparation des bandelettes IEF

Les cuvettes de réhydratation (rehydration tray) des bandelettes sont préalablement nettoyées avec un détergent non-ionique puis NH_4HCO_3 200 mM et enfin abondamment rincées à l'eau Milli-Q et séchées afin de minimiser la contamination croisée par U.

La réhydratation des bandelettes est intégralement réalisée en chambre froide à 4°C . Les bandelettes de 13 cm sont chargées avec 200 μL de cytosol sans ajout de réactif supplémentaire. Les bandelettes (gel vers le bas, les inscriptions sont lisibles) sont recouvertes d'huile minérale (IPG cover fluid) et la réhydratation est poursuivie pendant 12 h (généralement sur la nuit).

3.9.2 Focalisation isoélectrique

Le plateau en verre du système IEF supportant les bandelettes lors de la focalisation et assurant le refroidissement de ces dernières est nettoyé comme les cuvettes de réhydratation. Le système de refroidissement est allumé 30 min avant le début de la focalisation afin d'assurer une température inférieure à 10°C au moment du démarrage.

Après réhydratation, les bandelettes sont disposées à intervalle régulier (gel vers le haut, les inscriptions ne sont pas lisibles) sur le plateau en verre préalablement refroidi du système IEF. Les électrodes sont mises en place en assurant le contact électrique gel-électrode à l'aide un petit morceau de papier filtre imbibé d'eau. L'ensemble des bandelettes est recouvert d'huile minérale assurant un bon transfert thermique et limitant la déshydratation des gels. Le programme de tension est alors appliqué en commençant par (i) un plateau à faible voltage (60 V, 30 min) permettant la migration des sels (dessalage) suivi de (ii) l'augmentation progressive de la tension jusqu'à 3000 V en 4 h et terminé par (iii) un plateau à 3000 V pour une durée correspondant à 20 kVh ($\approx 7\text{h}$) permettant la focalisation des protéines. L'ensemble du programme dure environ 11 h. Après focalisation, les bandelettes sont rincées à l'eau Milli-Q, déposées sur un papier filtre et séchées à l'air libre sous hotte à flux laminaire pour minimiser les dépôts de poussières. Elles pourront être analysées par LA-ICP-MS et/ou colorées ultérieurement.

3.9.3 Coloration

Les protéines contenues dans les bandelettes peuvent être colorées par trempage 5 min dans une solution de bleu de coomassie R250 à 0,1% (masse/vol) dans un mélange eau/méthanol/acide acétique 65/25/10 (vol/vol/vol) puis décoloration dans le même mélange dépourvu de bleu de coomassie.

3.9.4 LA-ICP-MS

Les bandelettes sèches de 13 cm (support plastique 14 cm), sont découpées en 4 sections de 3,5 cm et collées (gel vers le haut, les inscriptions ne sont pas lisibles) sur une lame de microscope en verre recouverte d'adhésif double face. La lame ainsi préparée est déposée dans la cellule d'ablation du laser (UP-213, New Wave Research, Fremont, CA), les trajectoires d'ablation sont ajustées (centrage de la piste et extrémités des 4 sections de bandelette) et la mise au point faite. L'ablation est réalisée à pleine puissance du laser Nd:YAG 213 nm (100%) avec une fréquence de tir de 10 Hz, un spot de 250 μm de diamètre et une vitesse de 70 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Le transport de la matière volatilisée par le laser vers l'ICP-MS est assuré par un flux d'hélium à 500 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Les éléments suivis à l'aide de l'ICP-MS (Agilent 7700, mode He 10 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) sont ^{238}U , ^{235}U , ^{64}Zn , ^{63}Cu , ^{56}Fe et ^{13}C .

Dans les conditions décrites ci-dessus, la durée d'analyse d'une bandelette IEF 13 cm est de l'ordre de 30 min.

3.10 Analyse protéomique à partir des bandelettes IEF et des fractions IEF hors-gel (stratégie bottom-up)

L'analyse protéomique concerne essentiellement les fractions protéiques riches en uranium définies soit par LA-ICP-MS dans le cas des bandelettes IEF soit par ICP-MS pour les fractions liquides issues de l'IEF hors-gel.

Le protocole décrit ici, adapté de Pierce in-solution tryptic digestion kit (Thermo Scientific), fait appel à la digestion tryptique des échantillons afin de remonter à l'identité des protéines par le biais de l'identification formelle des peptides qui les composent (bottom-up). Cette méthode est adaptée à des concentrations de protéines en solution de l'ordre de 0,1 à 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ce qui correspond à une quantité de protéines allant de 1,0 à 10 μg .

3.10.1 Préparation des solutions de travail

- Tampon de resuspension de la trypsine (HCl 1 mM) :
8,3 μL de solution de HCl concentré (37%, d 1,19) sont dilués dans 991,7 μL d'eau Milli-Q afin d'obtenir une concentration de 100 mM. 10 μL de cette solution de HCl à 100 mM sont dilués dans 990 μL d'eau Milli-Q afin d'obtenir la concentration finale désirée de 1 mM.
- Solution mère de trypsine (1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) :
Un aliquot de 20 μg de trypsine lyophilisée (SIGMA Proteomics grade T6567) est resuspendu avec 200 μL de solution de HCl à 1 mM. Cette solution peut être stockée à -20°C pour 2 mois.
- Tampon de digestion ($\text{NH}_4\text{HCO}_3 \approx 50 \text{ mM}$) :
40 mg de bicarbonate d'ammonium sont dissous dans 10 mL d'eau Milli-Q afin d'obtenir une concentration finale d'environ 50 mM. Cette solution peut être stockée à 4°C pour 2 mois.
- Tampon de réduction (DTT $\approx 100 \text{ mM}$) :
8 mg de DTT sont dissous dans 500 μL d'eau Milli-Q afin d'obtenir une concentration finale d'environ 100 mM. Cette solution peut être stockée à -20°C pour 2 mois.
- Tampon d'alkylation (Iodoacetamide $\approx 100 \text{ mM}$) :
9 mg de iodoacétamide sont dissous dans 500 μL d'eau Milli-Q afin d'obtenir une concentration finale d'environ 100 mM. Cette solution doit être impérativement protégée de la lumière et utilisée fraîche. L'excédent ne peut pas être stocké.

3.10.2 Préparation des échantillons à digérer

- Fractions liquides IEF hors-gel (fraction $> 10 \text{ kDa}$) :
50 μL de fraction IEF hors-gel sont filtrés sur cut-off à 10 kDa par centrifugation (15 min, 4°C , 14 000 g) afin de retirer un maximum d'ampholytes ($< 10 \text{ kDa}$). Le rétentat concentré (6 à 7 μL) est récupéré par centrifugation inverse (2 min, 4°C , 2 500 g) pour être ultérieurement digéré.
- Bandes de gel des bandelettes IEF :
Les bandes de gels sont repérées puis excisées à l'aide d'un scalpel après réhydratation partielle de la partie d'intérêt avec quelques micro-litres d'eau Milli-Q.

3.10.3 Protocole de digestion

Dans un eppendorf de 500 μL sont déposés 15 μL de tampon de digestion et 1,5 μL de tampon de réduction. L'échantillon est alors ajouté (rétenant concentré IEF hors-gel ou bande de gel réhydratée IEF) et la quantité nécessaire d'eau Milli-Q est ajoutée pour ajuster le volume total à 27 μL . L'échantillon ainsi préparé est incubé 10 min à 95°C (étuve) puis remis à température ambiante. 3 μL de tampon d'alkylation sont ajoutés et l'échantillon est incubé 20 min à température ambiante dans le noir. 1 μL de solution de trypsine est ajouté puis l'échantillon est incubé au bain marie à 37°C durant 3 h. 1 μL supplémentaire de solution de trypsine est ajouté et l'incubation est poursuivie à 37°C durant une nuit. Après incubation l'échantillon est filtré sur cut-off à 10 kDa par centrifugation. Le filtrat ainsi obtenu est analysé en $\mu\text{RP-HPLC-ESI-MS}^2$ ou stocké à 4°C pour analyse ultérieure.

3.10.4 Analyse $\mu\text{RP-HPLC-ESI-MS}^2$

Les filtrats obtenus après le protocole de digestion sont analysés par HPLC en phase inverse (C_{18}) couplée à une détection par spectrométrie de masse moléculaire multidimensionnelle haute résolution (ESI-LTQ-Orbitrap). Le protocole, les paramètres instrumentaux et la procédure de traitement des données utilisés sont ceux décrits par Xu *et al.* (2013) à l'exception de la composition des éluants. Dans notre étude, l'éluant A est constitué d'eau Milli-Q additionnée de 0,1%AFo (%vol) et l'éluant B d'acétonitrile additionné de 0,1%AFo (%vol).

3.11 Analyse protéomique à partir des fractions liquides IEF hors-gel (stratégie top-down)

Il s'agit ici d'identifier des protéines intactes liant U dans les fractions liquides IEF hors-gel en appliquant une 2nd dimension de séparation par UHPLC en phase inverse sur une colonne destinée à la séparation de protéines (C_4 , 300Å, 100 mm \times 1 mm, 1,7 μm , Waters BEH300) en couplage avec la détection élémentaire par ICP-SFMS d'une part et la détection moléculaire haute résolution ESI-FTMS (Orbitrap) d'autre part.

Le **Tableau 16** décrit les deux principaux gradients utilisés au cours de ces travaux et les jeux d'éluants correspondants. Le débit nominal de la colonne est de 100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ mais les analyses ont été effectuées à 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ afin de réduire la pression en tête de colonne et de pouvoir travailler sur une chaîne HPLC classique. L'efficacité de séparation de la colonne

UHPLC utilisée (nombre de plateaux théoriques) est quasiment inchangée $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ selon les données du constructeur (Waters, 2007).

Tableau 16 : Caractéristiques des éluants et gradients utilisés en RP-HPLC (débit $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) avec la colonne Waters BEH300 C₄

	<i>Gradient 1</i>	<i>Gradient 2</i>	
Eluant A (aqueux)	AFo 27 mM (pH 2,6)	NH ₄ Ac 5 mM + AAc 5 mM (pH4,6)	
Eluant B (organique)	ACN + AFo 27 mM	80/20 ACN/Eau + NH ₄ Ac 10mM	
Temps (min)	%ACN = %B (%vol)	%ACN (%vol)	%B (%vol)
0	2%	4%	5%
15	40%	40%	50%
20	80%	80%	100%
25	2%	4%	5%
30	2%	4%	5%

La détection élémentaire est assurée par couplage avec l'ICP-SFMS en mode LR ou MR (cf. section 3.6.4). Le mode mixte LR+MR est proscrit en raison de la trop faible fréquence d'échantillonnage en regard de la finesse théorique des pics obtenus en UHPLC. Techniquement, le couplage à faible débit ($50\text{-}100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) est réalisé à l'aide d'une interface spéciale (IsoMist, Glass Expansion) incluant d'une chambre de nébulisation cyclonique de faible volume (20 mL) refroidie à 2°C et un nébuliseur concentrique faible débit ($50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ nominal). Par ailleurs, les paramètres de l'ICP-SFMS sont adaptés à l'injection de solvant organique dans le plasma. La puissance du plasma est augmentée à 1500 W, un apport de dioxygène est réalisé à hauteur de 5% afin de brûler les solvants organiques, la torche est équipée d'un injecteur de 1 mm de diamètre réduisant la quantité d'échantillon transportée vers le plasma et des cônes en platine sont utilisés. L'optimisation de l'appareil est réalisée de la même manière qu'en section 3.6.4 à la différence que la solution d'optimisation contient 80%vol. d'acétonitrile. La sensibilité de l'appareil est alors de l'ordre de 3.10^6 cps (< 2%RSD) à $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'uranium avec un taux d'oxydes inférieur ou égal à 2%.

La détection moléculaire est assurée par couplage avec l'ESI-FTMS (Orbitrap). La fenêtre de m/z mesurés s'étend de 785 à 1750. Les paramètres principaux optimisés de la source ESI en mode positif sont résumés dans le **Tableau 17**.

Tableau 17 : Paramètres principaux optimisés de la source ESI en mode positif (+)

<i>Paramètre</i>	<i>Consigne</i>
Voltage du capillaire	3,25 kV
Température du capillaire	300°C
Température de source	150°C
Débit de « sheath gas »	20 (unité arbitraire)
Débit de gaz auxiliaire	5 (unité arbitraire)
Débit de « sweep gas »	1 (unité arbitraire)

3.12 Traitement des données et analyse statistique

L'ensemble des données brutes (dosage, chromatogrammes...) ont été traitées à l'aide du tableur Microsoft Excel 2010 (v14.0.7106.5001). Les cartographies 2D à niveaux de couleur ont été obtenues avec SigmaPlot (v10). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le tableur Microsoft Excel 2003 (v11.8302.8221 SP3) implémenté avec le module Grimmersoft Statbox (v7.1.9). En l'absence d'indication contraire, les résultats statistiquement significatifs sont donnés à $p < 0,05$.

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSION
PARTIE 1

4 Résultats et discussion (Partie 1) : Développement des méthodes analytiques

La problématique proposée par cette étude impose certaines contraintes parmi lesquelles (i) un modèle biologique de petite taille dont le choix se justifie notamment par son historique en termes d'études toxicologiques pour l'U et d'autres contaminants ainsi que le séquençage complet de son génome, (ii) des niveaux d'exposition à U bas afin de s'approcher des conditions environnementales et (iii) la nature faible des liaisons U-biomolécules que l'on souhaite conserver intactes afin de caractériser les cibles moléculaires de l'U. Ainsi, plusieurs verrous analytiques ont dû être levés pour mener à bien cette étude et cette première partie aborde les aspects liés au développement et à l'optimisation des outils nécessaires à la préparation des échantillons et leur analyse.

Tout d'abord, un protocole de préparation des cytosols de cellules branchiales rapide et à l'échelle individuelle a été mis au point en prenant soin de respecter certains critères prédéfinis pour le choix du tampon (*e.g.* volatilité, faible interaction avec U, osmolarité). Ce protocole a ensuite été évalué selon plusieurs critères incluant le taux de recouvrement et la répartition subcellulaire de l'U, la quantité de protéines extraites, la distribution de l'U parmi le pool de protéines cytosoliques et la stabilité des échantillons préparés. Dans un second temps, la sensibilité de l'outil de détection et de quantification élémentaire (*e.g.* de U, Fe, P) a été optimisée en choisissant d'utiliser les capacités d'un ICP-MS à haute résolution. Cet instrument nous permet de travailler en couplage avec la chromatographie en phase liquide à l'échelle individuelle et ainsi d'accroître la robustesse des statistiques. Ensuite, la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) ayant été choisie pour son caractère non-dénaturant comme première technique de fractionnement du pool de protéines cytosoliques, les problématiques de rétention des métaux et de taux de recouvrement en U ainsi qu'en protéines de la SEC ont été considérées. Une seconde technique de fractionnement en phase liquide rapide en conditions non-dénaturantes reposant sur la séparation des biomolécules en fonction de leur pI (IEF hors-gel) a ensuite été développée, optimisée et validée comme orthogonale à la SEC. Enfin, la piste de la stratégie « top-down » pour l'identification des complexes U-biomolécule a été explorée en injectant des fractions issues de l'IEF hors-gel sur une colonne de chromatographie en phase inverse (RP) couplée à la détection parallèle par spectrométrie de masse élémentaire et moléculaire.

(Ferrarello *et al.*, 2000; Frelon *et al.*, 2009; Jin et Manabe, 2009a, b; Lobinski *et al.*, 1998; Lobinski et Szpunar, 1999; Ponce De León *et al.*, 2002; Righetti *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2007)

4.1 Optimisation des conditions de préparation des cytosols

Le choix du tampon et de la méthode de lyse cellulaire sont des paramètres très importants. Le tampon retenu pour la préparation des échantillons doit satisfaire à plusieurs critères dont les plus importants sont :

- Une osmolarité proche de celle mesurée dans le milieu intracellulaire chez les poissons d'eau douce, *i.e.* 250 à 300 mOsm (Gilles et Anctil, 2006);
- Une réactivité nulle ou limitée vis-à-vis de l'uranium et de ses complexes avec les biomolécules ;
- Une capacité à tamponner à pH biologique, *i.e.* pH 7,0-7,5 (AppliChem, 2008) ;
- Une compatibilité (*e.g.* volatilité, solubilité) avec les techniques analytiques envisagées (*e.g.* chromatographie liquide, IEF hors-gel, ICP-MS, ESI-MS).

L'osmolarité du tampon est un critère important puisque trop faible elle peut faire éclater les cellules et organites par choc osmotique et trop forte elle peut déshydrater les cellules. L'ajout de sucrose permet d'augmenter l'osmolarité et la densité d'un tampon pour une problématique de séparation des différents

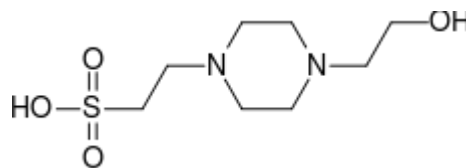


Figure 21 : Molécule d'HEPES

organites (*e.g.* mitochondries, noyau) par centrifugation. Toutefois, un apport en sucrose réduit la volatilité du tampon. Le tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (**Figure 21**) est souvent employé dans l'étude des complexes U-protéine pour sa faible réactivité vis-à-vis de l'uranium et son pouvoir tampon à pH 7,4 (Frelon *et al.*, 2013; Leroy *et al.*; Mirto *et al.*, 1999 2010 ; Scapolan *et al.*, 1998). Additionné de sucrose (HEPES 25 mM, Sucrose 250 mM, pH 7,4, 300 mOsm) le tampon HEPES répond à la quasi-totalité des critères listés précédemment à l'exception de la volatilité. Or, ce dernier critère nous préoccupe pour la caractérisation des biomolécules *in fine* par ESI-MS. Pour cette raison, l'acétate d'ammonium (NH₄Ac) a été testé comme alternative parmi les tampons volatiles ayant une capacité à tamponner à pH voisin de 7-7,5 (AppliChem, 2008; McMaster, 2005). Afin de satisfaire aux critères de choix, NH₄Ac est utilisé à 100 mM correspondant à une osmolarité de 200 mOsm et son pH est ajusté à 7,4 par ajout d'ammoniaque. L'ajout de sucrose ne s'avère pas nécessaire ici car nous avons choisi d'isoler uniquement et directement

la fraction cytosolique lors de la centrifugation différentielle. L'accent est mis sur l'étude des protéines solubles du cytosol à l'échelle individuelle et la récupération des différents organites serait difficile vu la petite taille des branchies. La réactivité de l'acétate avec l'ion uranyle est faible par rapport aux autres contre-ions volatiles (*e.g.* formiate, bicarbonate) (**Tableau 18**) mais elle reste supérieure à celle du groupement sulfonate porté par l'HEPES (Leroy *et al.*, 2001). Par ailleurs, il a été choisi de ne pas ajouter d'inhibiteur chimique de protéases ne connaissant pas leur réactivité vis-à-vis des complexes U-biomolécule. Ceci impose donc de travailler à basse température (4°C) et rapidement afin de limiter l'activité des protéases. En ce sens, la réduction du nombre d'étapes de centrifugation permet une diminution du temps de préparation et donc de minimiser la dénaturation de l'échantillon.

Tableau 18 : Logarithme des constantes de formation des complexes 1:1 entre différents contre-ions volatiles et l'uranyle

<i>Contre-ion</i>	<i>Log de la constante de formation du complexe 1:1 avec l'uranyle (log K)</i>
Acétate	2,9
Formiate	3,1
Bicarbonate	9,7

En ce qui concerne la méthode de lyse cellulaire, celle-ci doit être adaptée à la petite dimension des branchies (6 à 12 mg) et la plus douce possible afin de ne pas détruire les organites et de maintenir au mieux l'intégrité des complexes U-biomolécule. Les critères importants sont donc l'adaptation aux faibles volumes (< mL), la neutralité chimique vis-à-vis de l'échantillon (complexes U-biomolécule) et le contrôle de la température (4°C). Parmi les méthodes présentées dans l'étude bibliographique, le broyeur de type Potter-Elvehjem répond à l'ensemble de ces critères et a été choisi pour cette étude.

Le tampon volatile NH₄Ac (100 mM, pH 7,4, 200 mOsm) et le tampon non volatile HEPES-Sucrose (HEPES 25 mM, Sucrose 250 mM, pH 7,4, 300 mOsm) ont été comparés avec l'utilisation du broyeur à piston PTFE de type Potter-Elvehjem. La comparaison a été effectuée sur la base du fractionnement subcellulaire (répartition U et protéines, taux de recouvrement U) et du profil chromatographique des espèces uranium-biomolécule par SEC-ICP-SFMS. Cette comparaison est l'objet du prochain paragraphe.

4.1.1 Fractionnement subcellulaire

Le **Tableau 19** regroupe certaines caractéristiques moyennes des broyats (lysats) et cytosols obtenus avec les tampons HEPES-sucrose (méthode de référence ici en raison de son utilisation préalable dans notre laboratoire (Frelon *et al.*, 2009; Frelon *et al.*, 2013)) et NH₄Ac (méthode alternative) par lyse cellulaire des branchies au potter puis ultracentrifugation. Il est important de noter que chaque réplicat (n) correspond aux branchies d'un individu unique exposé à l'uranium par voie directe. La comparaison se fait donc sur des échantillons différents et non sur le même échantillon traité par deux tampons différents, et ce du fait de la petitesse des branchies du poisson zèbre. Il aurait été plus aisé de disposer d'un organisme plus gros pour ce type de comparaison. En effet, en supposant que le contaminant soit réparti de manière homogène, nous aurions pu fractionner un seul et même organe par les deux méthodes afin de faciliter la comparaison.

Tableau 19 : Caractéristiques des broyats et cytosols obtenus avec les tampons HEPES-Sucrose (Référence) et NH₄Ac (Alternative) ; Chaque « n » correspond aux branchies d'un individu unique (c₂₀-3j, c₂₀-30j ou c₂₅₀-3j)

<i>Moyenne ± Ecart-type</i>	$\frac{[protéines]_{Broyat}}{(\mu g.mg^{-1} \text{ poids frais de branchie})}$	$\frac{[protéines]_{Cytosol}}{[protéines]_{Broyat}}$ (%)	$\frac{[U]_{Cytosol}}{[U]_{Broyat}}$ (%)	<i>Recouvrement¹ Uranium (%)</i>
HEPES-Sucrose (n = 3)	124 ± 35	66 ± 7	14 ± 3	85 ± 6
NH₄Ac (n = 5)	102 ± 31	68 ± 14	27* ± 10	88 ± 7

*Différence significative avec la moyenne de référence (HEPES-Sucrose) par ANOVA au seuil 5%

¹ $((m_{U-dans-culot} + m_{U-dans-cytosol})/m_{U-dans-branchies})$

La concentration moyenne en protéines extraites dans le broyat est supérieure avec le tampon de référence mais cette différence n'est pas significative et provient certainement de la variabilité interindividuelle. Cette hypothèse est appuyée par l'égalité des rapports entre les concentrations moyennes en protéines dans le cytosol et dans le broyat pour les deux systèmes de tampon. Par ailleurs, l'égalité de ces rapports met en évidence un comportement similaire des protéines lors du fractionnement subcellulaire par ultracentrifugation indépendamment du tampon choisi. Du point de vue de l'uranium, le taux de recouvrement global est équivalent entre les deux tampons à environ 85%. Un taux de recouvrement inférieur à 100% signifie qu'une partie de l'uranium est perdue (*e.g.* adsorption) durant les étapes de lyse et d'ultracentrifugation. Si le pourcentage d'uranium récupéré est indépendant du tampon, on

s'aperçoit qu'après lyse et centrifugation avec le tampon alternatif, une quantité significativement plus importante d'uranium est observée dans la fraction cytosolique. Le pourcentage d'uranium cytosolique est toutefois impacté d'une plus forte variabilité interindividuelle dans le cas du tampon alternatif comparé à la référence. Ce résultat peut s'expliquer par l'affinité supérieure de l'acétate pour l'uranium qui peut entraîner une partie de l'uranium non-lié ou faiblement lié aux organites et débris cellulaires présents dans le broyat. L'osmolarité inférieure du tampon alternatif peut aussi être mise en cause avec la possibilité d'éclatement de certains organites donnant accès à l'uranium qu'ils contiennent. Toutefois, l'éclatement d'organites aurait certainement relargué des biomolécules dans le broyat, or le dosage des protéines dans le broyat ne montre aucune augmentation voire même une diminution non-significative avec le tampon alternatif. La comparaison des profils chromatographiques (espèces U-biomolécule) par SEC-ICP-SFMS des cytosols obtenus avec les deux systèmes de tampon devrait nous apporter des éléments de réponse.

4.1.2 Profil U-biomolécule par SEC-ICP-SFMS

La **Figure 22** présente les chromatogrammes typiques obtenus pour deux cytosols, correspondants chacun à des individus uniques et donc différents, préparés avec la méthode de lyse par potter dans les tampons NH_4Ac et HEPES+Sucrose. Quel que soit le tampon, le signal de l'uranium et des protéines s'étale sur l'ensemble de la gamme de séparation de la colonne (10 à 35 min). Le profil obtenu pour l'uranium (Figure 22 a et b) présente certaines différences d'un tampon à l'autre mais deux pics principaux sont systématiquement présents, l'un entre 15 et 20 min et l'autre vers 30 min ce qui correspond à des masses molaires de l'ordre de 80 à 400 kDa et 5 à 0,1 kDa, respectivement. Du côté des protéines, les profils UV (Figure 22 c et d) ont été enregistrés à 225 nm (longueur d'onde représentative des liaisons peptidiques) et 280 nm (longueur d'onde représentative des cycles aromatiques). Les profils protéiques sont similaires entre les deux conditions de lyse et les apex des pics majoritaires correspondent. Seul un pic intense apparaît uniquement dans la condition HEPES-Sucrose à 28,5 min sur le profil UV à 225 nm (Figure 22d rouge). Ce pic ne provient pas d'un composé présent dans l'échantillon biologique puisque l'injection de tampon HEPES-Sucrose seul produit un pic identique (données non présentées). Le temps de rétention associé à ce pic correspond à une masse molaire de l'ordre de 2 kDa ce qui ne correspond ni à l'HEPES (238 Da) ni au sucrose (342 Da). Toutefois, la précision de la calibration pour les faibles masses molaires (< 5-10 kDa) est discutable sur une colonne théoriquement linéaire sur la gamme 10 – 670 kDa. Quel que soit le tampon, deux pics, particulièrement visibles à 280 nm,

sont observés après le volume total de la colonne (≈ 30 min) et peuvent correspondre à des espèces interagissant avec la phase stationnaire.

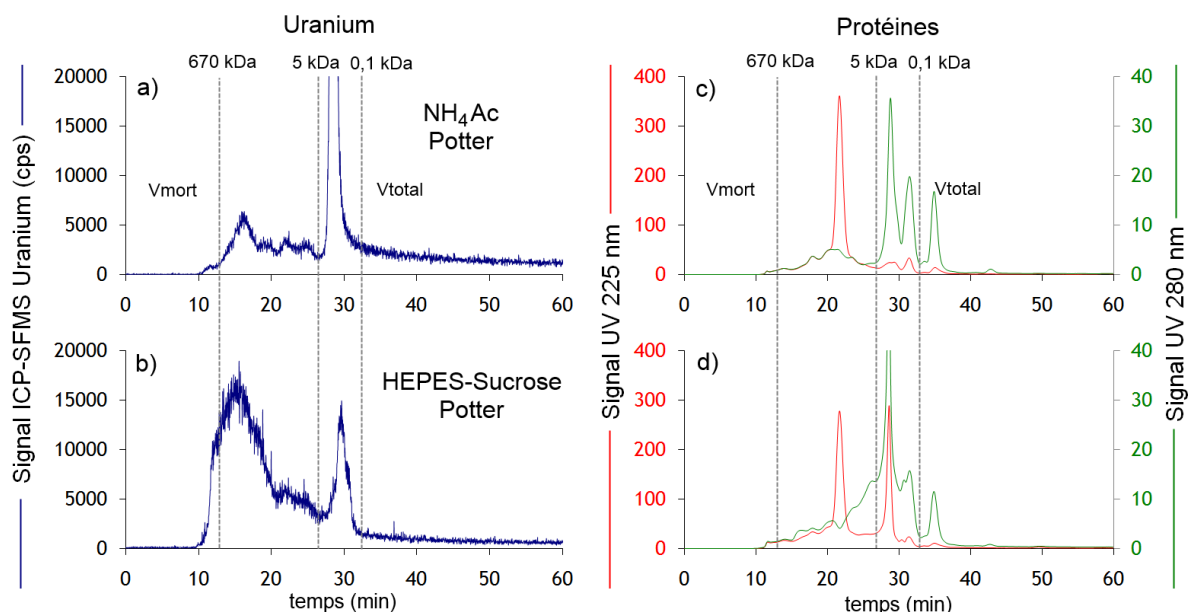


Figure 22 : Profils SEC-ICP-SFMS typiques obtenus pour des échantillons (c₂₀-3j) préparés dans les deux systèmes de tampon avec le signal ²³⁸U (a et b) présenté à gauche et le signal UV à 225 et 280 nm (c et d) correspondant présenté à droite

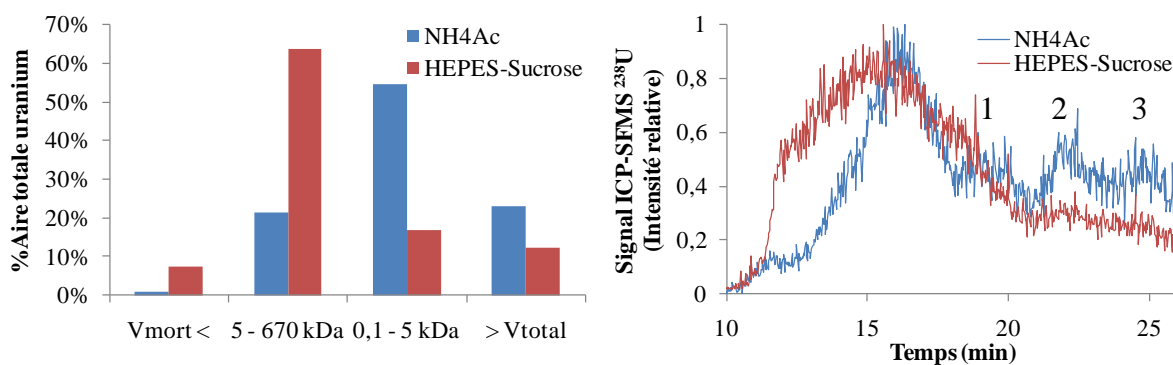


Figure 23 : Répartition de l'aire de l'uranium sur les profils SEC-ICP-SFMS (gauche) et zoom + normalisation (intensité max locale = 1) des profils SEC-ICP-SFMS entre 10 et 26 min (droite)

La répartition de l'aire totale de l'uranium **Figure 23** (gauche) indique que la fraction 5 – 670 kDa mobilise près de 60% de l'uranium élué dans la condition HEPES-Sucrose contre 20% dans la condition NH₄Ac. Par ailleurs, une quantité non-négligeable (9%) d'uranium élué au volume mort dans la condition HEPES-Sucrose. Ce pic au volume mort peut correspondre à des agrégats protéiques. Dans le cas HEPES+Sucrose (Figure 22b), le pic à

15-20 min est plus large et confondu avec un pic au volume mort ($< 12,5$ min). Le pic systématiquement observé vers 30 min (0,1 – 5 kDa) correspond à des complexes de faible poids moléculaire (*e.g.* peptides, acides aminés ou tampon). Il mobilise une plus grande proportion d'uranium avec NH_4Ac qu'avec HEPES-Sucrose comme l'indique la répartition de l'aire totale de l'uranium Figure 23 (gauche). Toutefois, l'injection de tampon NH_4Ac dopé à l'uranium inorganique (nitrate d'uranyle) ne fait apparaître aucun pic d'uranium (données non présentées). Ce pic ne correspond donc pas à un complexe uranium-acétate. Enfin, trois pics intéressants peuvent être observés entre 18 et 26 min. Ces derniers sont plus résolus avec NH_4Ac (Figure 22a) comme le montre le zoom sur les profils d'uranium normalisés ($\text{Intensité}_{\text{max}} = 1$) entre 10 et 26 min (Figure 23 droite).

Rappelons une fois de plus que les différences observées peuvent aussi provenir du fait que les comparaisons sont effectuées sur des échantillons issus d'individus différents. Deux remarques au sujet du tampon HEPES-Sucrose peuvent néanmoins être ajoutées indépendamment de cette différence : (i) Le tampon non volatile HEPES-Sucrose contenu dans l'échantillon perturbe potentiellement l'atomisation et l'ionisation au niveau de la torche de l'ICP-MS provoquant ainsi une atténuation du signal ; (ii) La phase mobile étant constituée du tampon volatile NH_4Ac , l'introduction d'un échantillon préparé dans HEPES-Sucrose peut provoquer une variation de la solubilité des biomolécules lors de l'injection (front de solvant). Ce phénomène est évité dans le cas où l'échantillon est lui-même préparé dans le tampon NH_4Ac .

4.1.3 Stabilité des échantillons à la congélation

La préparation des échantillons nécessite un certain temps (2 à 3 h) et leur analyse ne peut pas toujours être effectuée dans la foulée. Il est aussi parfois nécessaire de répéter une analyse après quelques jours/semaines. Pour ces raisons les échantillons sont généralement stockés à -80°C . Il est alors important de connaître l'impact de la congélation et de la durée de stockage sur l'échantillon. La stabilité des cytosols préparés dans la condition NH_4Ac – Potter a été vérifiée par analyse SEC-ICP-SFMS du même cytosol (individu c_{20-3j}) directement après préparation (sans congélation), après 2 jours à -80°C et après 16 jours à -80°C (**Figure 24**).

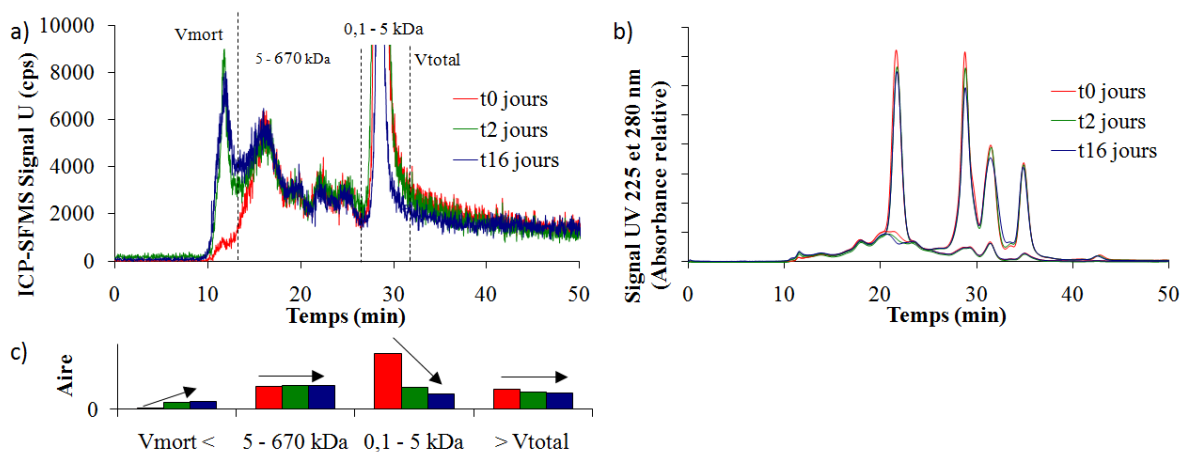


Figure 24 : Profils SEC-ICP-SFMS avec le signal ^{238}U (a) et les signaux UV à 225 et 280 nm (b) obtenus pour un même échantillon c_{20-3j} fraîchement préparé (rouge), après 2 jours de stockage à -80°C (vert) et après 16 jours de stockage à -80°C ; évolution de l'aire de quatre fractions définies sur le profil ^{238}U (c)

La différence majeure observée sur le profil de l'uranium (Figure 24a) après congélation et l'apparition d'un pic au volume mort (> 670 kDa) accompagné d'une diminution (-60%) de l'aire du pic à 28,5 min (0,1 – 5 kDa) (Figure 24c). Le chromatogramme reste inchangé dans la gamme utile de la colonne (5 – 670 kDa). Aucune différence significative n'est observée sur les profils protéiques (Figure 24b). La durée de congélation n'a pas d'impact entre 2 et 16 jours. A la vue de ces résultats, les échantillons seront idéalement tous analysés directement après préparation en évitant l'étape de congélation. Il est toutefois important de noter que la distribution U-biomolécule n'est pas significativement impactée par la congélation dans la gamme 5 – 670 kDa.

En conclusion, en plus des caractéristiques classiques requises pour un tampon et préalablement discutées dans la section 4.1, le tampon NH_4Ac répond au critère de volatilité voulu dans cette étude. Il constitue ainsi une alternative au tampon HEPES-Sucrose sur les plans du fractionnement subcellulaire, du profil U-biomolécules et de la stabilité des échantillons à la congélation même si certaines variations ont été observées dans les résultats. C'est dans ce tampon NH_4Ac que la préparation d'échantillon sera à présent réalisée.

Le développement d'une méthode de préparation des cytosols de cellules branchiales à l'échelle individuelle implique également leur analyse à l'échelle individuelle et donc la détection de très faibles quantités de métaux. Le paragraphe suivant décrit les

possibilités offertes par l'utilisation de l'ICP-MS à haute résolution pour répondre à cette problématique de sensibilité dans le cadre du couplage avec la SEC.

4.2 Pourquoi utiliser un ICP-MS à haute résolution en couplage ?

Comme nous l'avons vu dans la partie 2 de l'étude bibliographique, l'ICP-MS à haute résolution (désigné ici par **ICP-SFMS**) apporte deux avantages par rapport à l'ICP-MS quadripolaire qui sont (i) un gain en sensibilité pour l'analyse des éléments de haute masse molaire en mode basse résolution (LR) et (ii) l'accès à certains éléments interférés (*e.g.* ^{56}Fe , ^{31}P) en mode moyenne résolution (MR) ou haute résolution (HR).

4.2.1 Gain en sensibilité sur la détection de l'uranium en mode basse résolution (LR)

Si le gain en sensibilité estimé par le rapport des limites de détection de l'uranium (cf. section 2.5.1) est de l'ordre de 10 pour l'ICP-SFMS, le gain en sensibilité lors du couplage avec la SEC apparaît encore meilleur comme l'indique la **Figure 25**. En effet, cette figure présente le profil SEC (^{238}U) obtenu pour un même échantillon par couplage avec un ICP-MS quadripolaire classique (ICP-MS Agilent 7500) et avec un ICP-MS haute résolution en mode LR (ICP-SFMS Thermo Element XR). Les paramètres (*e.g.* débits des gaz, puissance du plasma, tensions des lentilles) des deux instruments ont préalablement été optimisés pour la détection de ^{238}U . Le cas présenté sur cette figure est idéal, mais il donne un bon aperçu du potentiel de l'ICP-SFMS pour des échantillons faiblement contaminés avec un gain en intensité et une réduction du rapport signal/bruit (S/B). Afin de matérialiser le gain en sensibilité, des standards d'uranium ont été injectés dans les conditions d'analyse des cytosols sur les deux systèmes couplés SEC-ICP-MS et SEC-ICP-SFMS en l'absence de colonne (FIA). Chaque injection produit un pic dont l'aire est mesurée puis rapportée à la quantité d'uranium injectée. Le **Tableau 20** regroupe les valeurs moyennes de sensibilité données en unité d'aire par picogramme d'uranium injecté ($\text{cps}\cdot\text{min}\cdot\text{pgU}^{-1}$) ainsi que le bruit de fond moyen (BdF_{moy}), l'intensité maximum du pic correspondant à une injection de 50 pg d'uranium (I_{max} à 50 pgU) et le rapport signal sur bruit à 50 pgU (S/B à 50 pgU).

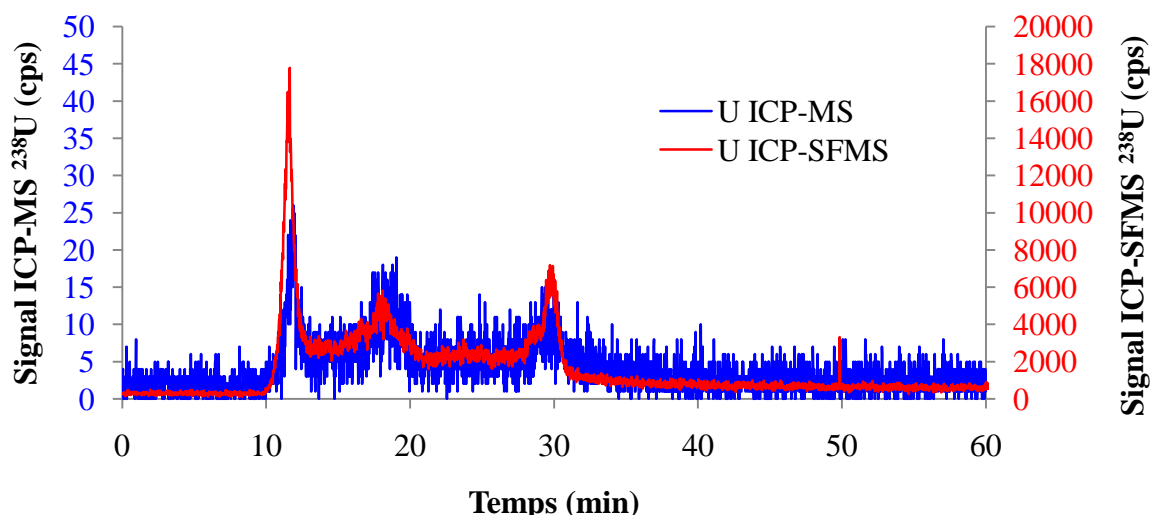


Figure 25 : Comparaison des profils SEC de l'uranium obtenus pour un même échantillon c_{20-30j} avec détection par ICP-MS quadripolaire (Agilent 7500) en bleu et par ICP-SFMS (Thermo Element XR) en rouge

Le gain obtenu avec l'ICP-SFMS a été défini comme le rapport entre la valeur du critère de réponse de l'ICP-SFMS sur celui de l'ICP-MS quadripolaire. Le gain est assorti d'un (+) s'il correspond à un avantage pour l'ICP-SFMS et d'un (-) dans le cas contraire. Ainsi, on constate un gain en sensibilité moyen de 270 pour l'ICP-SFMS en accord avec le gain en intensité maximum (I_{max}) à 50 pgU de 285. Ce gain est près de 30 fois supérieur à celui observé sur les limites de détection en dosage total, *i.e.* environ 10. Enfin, le rapport signal sur bruit (S/B) estimé pour l'injection de 50 pgU est 37 fois supérieur pour l'ICP-SFMS bien que le bruit de fond soit en moyenne 8 fois plus élevé sur l'ICP-SFMS.

Tableau 20 : Comparatif des critères de réponse pour ²³⁸U des ICP-MS quadripolaire et haute résolution (mode LR) en condition de couplage mais sans colonne SEC

<i>Moyenne ± Ecart-type</i>	<i>Sensibilité (cps.min.pgU⁻¹)</i>	<i>BdF_{moy} (cps)</i>	<i>I_{max} à 50 pgU (cps)</i>	<i>S/B à 50 pgU</i>
ICP-QMS	19 ± 1	31 ± 6	6012 (± 5%)	194
ICP-SFMS (LR)	5128 ± 25	237 ± 68	1715782 (± 5%)	7270
Gain* ICP-SFMS (LR)	(+) 270 ± 16	(-) 8 ± 4	(+) 285 ± 29	(+) 37

*Gain = valeur critère ICP-SFMS / valeur critère ICP-QMS

Gain (+) = avantage pour ICP-SFMS

Gain (-) = désavantage pour ICP-SFMS

4.2.2 Suivi de ^{56}Fe et ^{31}P en mode moyenne résolution (MR)

Avec le fer apparaît une problématique de sensibilité liée à la masse de son isotope le plus abondant. En effet, l'isotope le plus abondant du fer est ^{56}Fe (91,75%) mais celui-ci est fortement interféré en ICP-MS par l'espèce polyatomique $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ (99,36%) de masse molaire équivalente. L'ICP-MS quadripolaire ne dispose pas d'une résolution suffisante pour lever cette interférence qui peut être considérée comme majeure puisque Ar est utilisé comme gaz vecteur et plasmagène et O est apporté par la phase mobile aqueuse. Une stratégie a tout de même été développée par les constructeurs afin de minimiser cette interférence par collision de l'espèce polyatomique $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ avec un gaz inerte (He) provoquant ainsi sa dissociation. Cependant, l'injection d'He dans la cellule de collision peut réduire la sensibilité de manière générale et les limites de détection atteintes ne sont pas suffisantes. Les isotopes ^{54}Fe et ^{57}Fe ne sont pas interférés mais leur abondance respective n'est que de 5,85% et 2,12%. Comme le montre la **Figure 26a**, ceci n'empêche pas l'observation d'un signal (ici ^{57}Fe) pour les cytosols notamment grâce à la haute sensibilité de l'ICP-SFMS en mode LR. Toutefois, la question est de savoir si des pics minoritaires ne sont pas noyés dans le bruit de fond élevé ($\approx 4.10^6$ cps). La Figure 26c permet de répondre à cette question grâce au signal de ^{56}Fe . Le suivi de ^{56}Fe est rendu possible par la capacité de l'ICP-SFMS à lever certaines interférences *via* l'augmentation de la résolution. En basse résolution (LR) il n'est pas possible de distinguer les signaux de ^{56}Fe et $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$, mais en moyenne résolution (MR) la précision de masse est suffisante pour distinguer ^{56}Fe de masse molaire 55,93494 g.mol⁻¹ et $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ de masse molaire 55,95798 g.mol⁻¹. Le mode MR comporte néanmoins un désavantage puisqu'il cause une perte significative de transmission des ions de l'ordre de 90 à 95%. La Figure 26 présente ainsi une comparaison entre les signaux ^{57}Fe (LR), ^{57}Fe (MR) et ^{56}Fe (MR) avec un zoom sur la ligne de base pour les signaux MR. Le signal ^{57}Fe (LR) (Figure 26a) ne montre qu'un seul et unique pic sortant du bruit de fond avec un rapport signal sur bruit d'environ 2,2. Bien que moins intense en raison de la faible transmission en mode MR (ici 5%), le signal ^{57}Fe (MR) (Figure 26b) est beaucoup moins bruité que le signal ^{57}Fe (LR). Le rapport signal sur bruit sur le pic majoritaire est d'environ 730. Il est même possible de détecter de nouveaux pics au niveau de la ligne de base (Zoom Figure 26b) même si ceux-ci sont encore bruités. Enfin, le signal ^{56}Fe (MR) (Figure 26c) présente un excellent rapport signal sur bruit sur le pic majoritaire (≈ 1200) et son suivi lève toute ambiguïté sur l'existence de différents pics minoritaires sur la gamme 10 à 30 min. La présence de pics masqués dans le bruit de

fond est donc confirmée, toutefois l'intensité relative de ces pics face au pic majoritaire est faible (1 à 2% de I_{\max}).

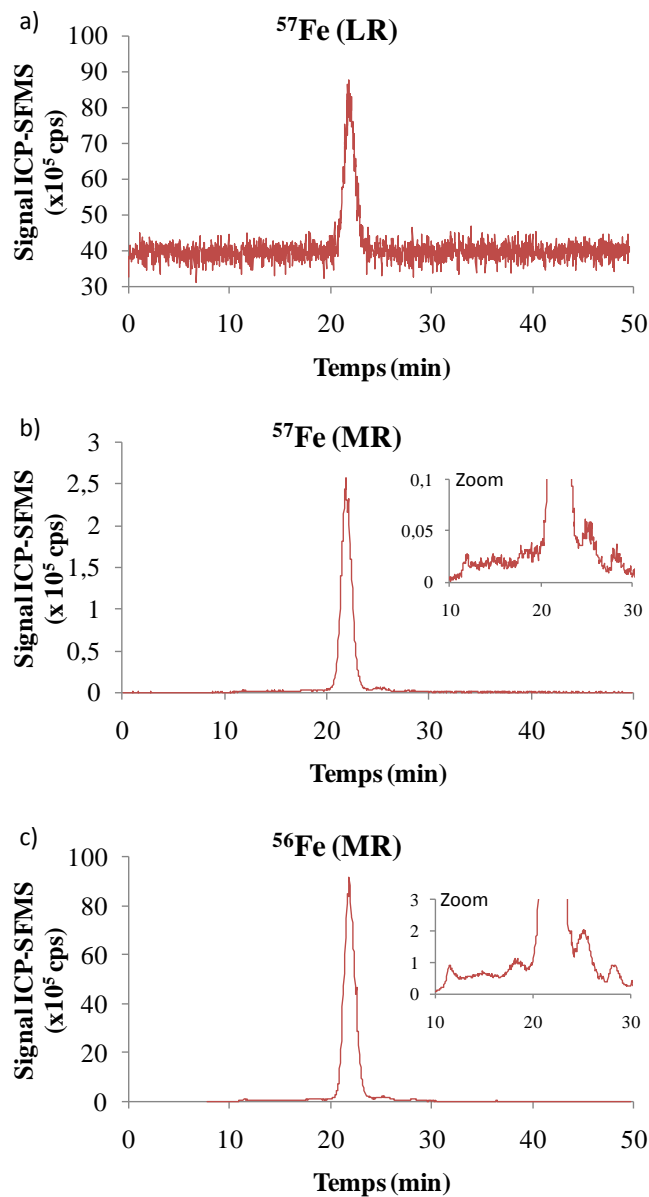


Figure 26 : Profils SEC-ICP-SFMS du fer contenu dans un même échantillon de cytosol avec détection de ⁵⁷Fe en mode basse résolution LR (a), ⁵⁷Fe en mode moyenne résolution MR (b) et ⁵⁶Fe en mode moyenne résolution MR (c)

Si l'utilisation du mode MR permet la mise en évidence de certaines fractions minoritaires du fer *via* la suppression des interférences et l'accès au signal de ⁵⁶Fe, elle permet aussi le suivi d'éléments difficilement ionisables et interférés tel que le phosphore ou le soufre. En effet, l'efficacité d'ionisation de ces éléments étant faible (*i.e.* potentiel d'ionisation élevé $\approx 10,5$ eV), leur suivi à l'état de trace est rendu difficile pour un ICP-MS quadripolaire. Le

phosphore est uniquement présent sous la forme ^{31}P (100%) mais celui-ci est interféré par différentes espèces polyatomiques (*e.g.* $^{16}\text{O}^{14}\text{N}^1\text{H}$ 99,4%) dont l'interférence est levée en mode MR. La **Figure 27** met en évidence l'intérêt lié au suivi de P puisque celui-ci co-élué avec certaines fractions de PM riches en U.

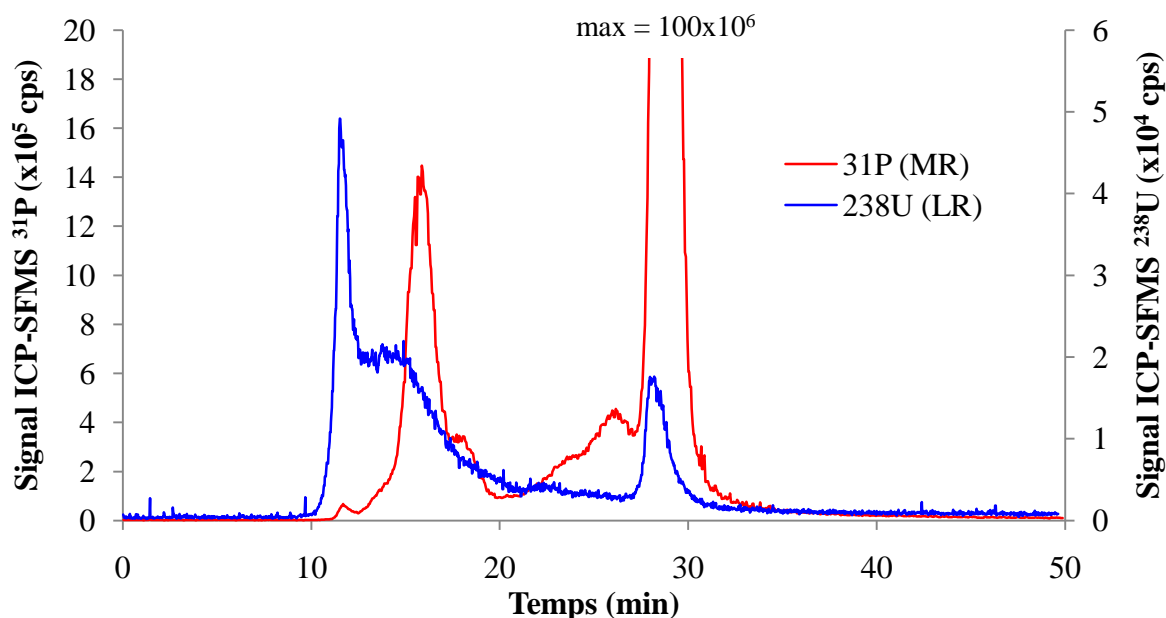


Figure 27 : Profil SEC-ICP-SFMS d'un cytosol c_{250-3j} avec détection de ^{31}P en mode moyenne résolution (rouge) et ^{238}U en basse résolution (bleu)

L'utilisation de l'ICP-SFMS en mode LR en couplage avec la chromatographie en phase liquide permet un gain important en sensibilité sur l'uranium permettant ainsi l'analyse des cytosols à l'échelle individuelle. L'ICP-SFMS en mode MR permet par ailleurs le suivi d'éléments d'intérêt tels que ^{56}Fe ou ^{31}P avec une très bonne sensibilité. Si l'idée de l'analyse en mode mixte LR+MR est attrayante, elle pose un problème de fréquence d'échantillonnage des signaux. En effet, le passage successif LR \leftrightarrow MR nécessite une période de stabilisation de l'instrument. Ceci limite l'acquisition à une dizaine de points par minute, contre 60 ou plus en mode purement LR ou MR. Les pics de faible intensité, trop fins et les épaulements de pics peuvent alors être plus difficiles à discerner. Néanmoins, ce mode mixte LR+MR sera généralement applicable en couplage avec la SEC qui produit des pics relativement large (> 1 minute à la base).

Le gain en sensibilité sur l'uranium a aussi permis de mettre évidence une élévation du bruit de fond en uranium après l'analyse des échantillons contaminés à l'uranium par SEC soulevant les problématiques de contamination de la colonne chromatographique

par les métaux et de taux de recouvrement en uranium. Le paragraphe suivant décrit les optimisations effectuées sur la SEC d'un point de vue quantification et recouvrement lors de l'analyse des cytosols.

4.3 Optimisations de la SEC

Outre sa simplicité de mise en œuvre et son caractère non dénaturant, la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) présente l'avantage de réaliser un fractionnement en solution. Ceci permet un couplage direct, *i.e.* en ligne, avec les méthodes classiques de détection élémentaires (*e.g.* ICP-SFMS) ou une seconde séparation orthogonale en phase liquide. Si la SEC est une technique bien connue et développée dans la littérature et au laboratoire, il est nécessaire d'effectuer certaines vérifications (*e.g.* taux de recouvrement) et optimisations (*e.g.* nettoyage) pour les échantillons d'intérêt.

4.3.1 Nettoyage de la colonne et taux de recouvrement (protéines et U)

Le taux de recouvrement des protéines, estimé par comparaison de l'aire totale du signal UV (225 et 280 nm) mesurée après injection d'un même échantillon biologique avec et sans colonne, est satisfaisant à $110 \pm 12\%$ ($n = 4$).

L'analyse des premiers cytosols de cellules branchiales de poissons zèbre exposés à l'uranium par SEC-ICP-SFMS (Figure 22) met en évidence un bruit de fond (BdF) en uranium élevé après l'élution d'un échantillon contaminé. L'absence de retour au niveau du BdF initial est attribuable à une fraction d'uranium non lié ou faiblement lié dans l'échantillon qui va pouvoir contaminer la phase stationnaire de la colonne. Cet uranium est alors doucement et constamment décroché puis élué par le tampon NH_4Ac . Ce phénomène de traîne (bleeding) en uranium sur la colonne peut être éliminé par une étape de nettoyage avec des ligands forts de l'uranium, *e.g.* les bicarbonates, entre deux échantillons. La **Figure 28** montre l'effet d'un tel nettoyage. L'injection de bicarbonate d'ammonium 200 mM permet de réduire le BdF d'un niveau initial moyen de 1500 cps à moins de 200 cps en 60 min. La gestion du BdF par cette méthodologie de nettoyage permet à présent d'aborder la calibration en uranium et le calcul du taux de recouvrement de la méthode.

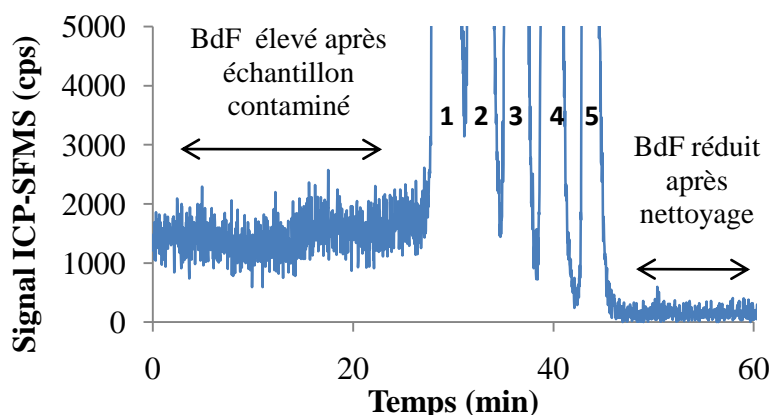


Figure 28 : Chromatogramme SEC-ICP-SFMS ^{238}U d'un « run » de nettoyage composé de 5 injections de 200 μL de bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) 200 mM

Le taux de recouvrement de l'uranium a été évalué par deux méthodes (cf. section 3.6.6) pour trois échantillons d'intérêt préparés selon la méthode NH_4Ac – Potter. Le **Tableau 21** reprend les résultats obtenus pour chaque échantillon. La séquence d'injections complète est la suivante :

Nettoyage 1 → Echantillon 1 → Nettoyage 2 → Echantillon 2 → Nettoyage 3 →
Echantillon 3 → Nettoyage 4

« Nettoyage 1 à 4 » consistent chacun en 5 injections de 200 μL NH_4HCO_3 200 mM (run de 1h) et « Echantillon 1 à 3 » correspondent à l'injection de 100 μL de cytosol (run de 1h, 3 cytosols différents). En considérant que seules les injections des échantillons apportent de l'uranium dans le système, le recueil et le dosage des éluats Nettoyage 2-4 et Echantillon 1-3 permet de calculer le bilan système sur la totalité des injections (« Somme séquence » dans Tableau 21). L'ensemble des résultats est consigné dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Taux de recouvrement de l'uranium sur le système chromatographique (SEC) par FIA et dosage total de l'éluat

	%Recouvrement SEC	
	Dosage de l'U total élué	FIA
Echantillon 1 (c_{20-3j})	92%	48%
Echantillon 2 (c_{20-30j})	45%	58%
Echantillon 3 (c_{250-3j})	10%	13%
Somme séquence	109%	90%

Le taux de recouvrement de l'uranium en sortie de SEC oscille de 10 à 90% selon l'échantillon et la méthode considérée. Cela signifie probablement qu'une quantité variable

d'uranium est libre ou faiblement lié à des biomolécules dans les cytosols suivant les individus et les conditions d'exposition. Les résultats sont comparables entre les méthodes à l'exception de l'échantillon 1, le plus faiblement contaminé du lot étudié. Chaque méthode de dosage possède ses avantages et ses inconvénients. Bien que long et fastidieux, le dosage de l'éluat est certainement le plus juste puisque l'intégralité de l'éluat est concentré dans un faible volume et acidifié à 2% d'acide nitrique pour l'analyse classique de U total par ICP-MS. La méthode FIA est plus simple et rapide à mettre en œuvre. De plus la FIA minimise la consommation d'échantillon puisqu'il est injecté une seule fois en couplage avec l'ICP-SFMS alors que la méthode précédente nécessite une injection « perdue » pour recueillir l'éluat. La calibration est néanmoins plus délicate puisqu'elle est réalisée par injection d'étalons acidifiés à 2% d'acide nitrique dans le système HPLC (colonne shuntée). L'acide nitrique est alors susceptible d'améliorer la nébulisation et donc la sensibilité de l'ICP-SFMS. Ceci peut, *in fine*, augmenter, pour une même quantité d'U injectée, le signal des étalons en comparaison du signal obtenu pour un échantillon séparé en condition de pH neutre (7,4). Des essais de calibration FIA ont été menés sans succès avec des étalons d'uranium préparés dans le tampon d'élution et dans l'eau milli-Q. Il apparaît que l'injection de petites quantités d'uranium inorganique à pH proche de 7 résulte en l'adsorption d'une quantité aléatoire de ce dernier dans le système chromatographique avec pour effet de fausser la calibration. L'adsorption a été confirmée par injection d'acide nitrique à 2% après les étalons « neutres » entraînant ainsi l'uranium adsorbé dans le système. Enfin, si le taux de recouvrement est variable pour un échantillon donné, le taux de recouvrement global sur la séquence (échantillons + nettoyages) est satisfaisant avec une moyenne de 100 ± 10 % sur les deux méthodes d'estimation. Ce résultat appuie l'efficacité et la nécessité des nettoyages par les bicarbonates.

4.3.2 Problématique de contamination de la colonne par Fe, Cu et Zn

De la même façon que pour l'U, l'analyse des métaux essentiels dans les cytosols nécessite un retour du signal à la ligne de base sur ces éléments. La **Figure 29** présente les chromatogrammes typiques obtenus pour Fe, Cu et Zn après injection de 100 μ L de cytosol préparé selon le protocole NH_4Ac – Potter. Dans cette partie, il ne s'agit pas d'explorer la distribution et d'attribuer les différents pics à des fractions protéiques d'intérêt, mais plutôt de montrer l'intérêt d'ajouter une petite quantité d'EDTA à la solution de carbonates permettant le nettoyage de la colonne. En effet, si l'uranium présente une forte affinité pour les carbonates, ce n'est pas le cas pour Cu et Zn qui sont beaucoup mieux complexés par

l'EDTA. Ceci est mis en évidence par les profils ^{64}Zn et ^{63}Cu sur la Figure 29. Les profils noirs sont ceux obtenus après un nettoyage de la colonne par une solution de NH_4HCO_3 200 mM sans EDTA et les profils gris sont ceux obtenus après un nettoyage prolongé de la colonne par la même solution additionnée d'EDTA à 2 mM. Une suppression du signal dans la région comprise entre 40 et 150 kDa apparaît clairement après nettoyage de la colonne par le mélange contenant de l'EDTA. Ainsi, en l'absence d'EDTA, la colonne se charge progressivement en Cu et Zn libre provenant des échantillons. Les échantillons injectés ultérieurement sont alors susceptibles de capter une partie du cuivre et du zinc piégé sur la colonne ce qui résulte en l'apparition d'un pic « fantôme » dans la région de 40 à 150 kDa (Mounicou *et al.*, 2009).

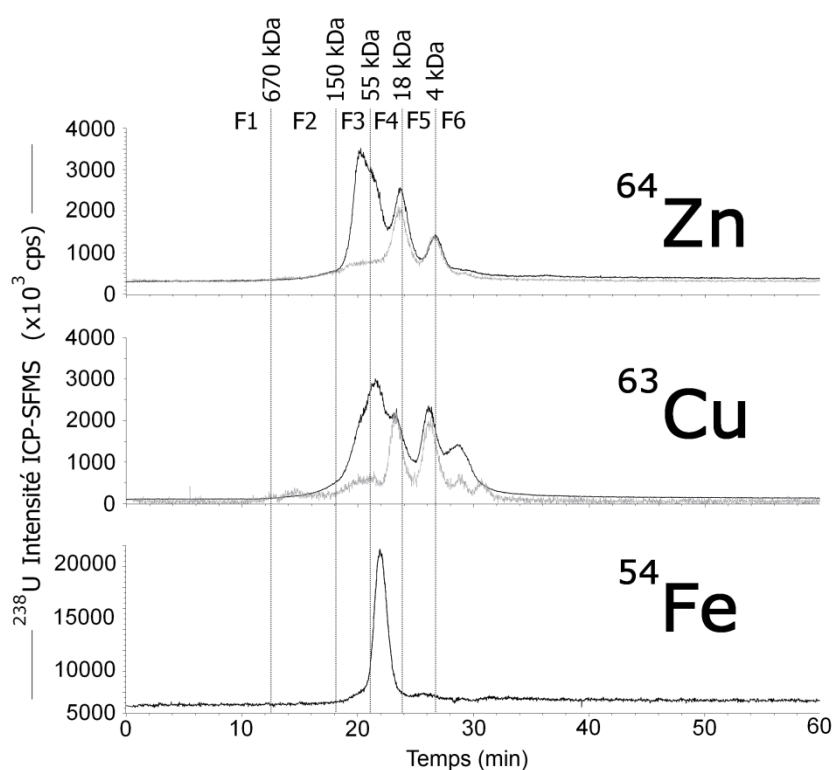


Figure 29 : Profils typiques SEC-ICP-SFMS de Zn, Cu et Fe dans les cytosols avec (gris) et sans (noir) nettoyage de la colonne par l'EDTA

Le fer quant à lui est plutôt bien éliminé par les carbonates et ne nécessite pas forcément de traitement avec EDTA.

Le nettoyage de la colonne chromatographique est essentiel dans la maîtrise du bilan de l'ensemble des éléments étudiés et limite l'apparition de pics « fantômes » sur les signaux du cuivre et du zinc en particulier. La méthode SEC ainsi optimisée et couplée à l'ICP-SFMS permettra l'analyse des cytosols de cellules branchiales à tous niveaux de

contamination mais aussi d'échantillons liquides issus du fractionnement par focalisation isoélectrique hors-gel, objet du prochain paragraphe.

4.4 IEF hors-gel et couplage avec la SEC-ICP-SFMS

L'IEF sur bandelette à gradient de pH immobilisé (IPG) est classiquement utilisée dans les stratégies protéomique « bottom-up » impliquant généralement la séparation des protéines sur gel d'électrophorèse bidimensionnel (2D-GE). Comme nous l'avons vu dans la partie 2 de l'étude bibliographique, le recours aux stratégies analytiques basées sur les gels d'électrophorèse peut être à l'origine d'une perte des complexes U-protéines faibles. Ainsi, l'IEF en phase liquide (IEF hors-gel) pourrait se substituer à l'IEF conventionnelle sur bandelette IPG et s'intégrer dans une stratégie protéomique « bottom-up » voire « top-down » en milieu intégralement liquide (Arrey *et al.*, 2010; Chenau *et al.*, 2008; D'Amici *et al.*, 2008; Heller *et al.*, 2005; Hörth *et al.*, 2006; Lam, 2007; Michel *et al.*, 2003; Pioselli *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 2008; Tomáš *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011).

Une méthode de fractionnement des échantillons biologiques (cytosol) par IEF hors-gel a été développée afin de séparer et d'identifier des fractions protéiques riches en uranium en conditions non-dénaturantes à l'aide d'un système commercialisé (MicroRotofor de Bio-Rad). Le choix s'est porté sur cet instrument en raison de son fonctionnement en milieu 100% liquide, à basse température (4°C), de sa rapidité (≈ 2 h) et de son format adapté aux faibles volumes d'échantillon. Ce dernier point permet de limiter le nombre de branchies à pooler/grouper ($n = 4$) pour obtenir un cytosol de dimension suffisante ($V_{\min} \approx 2,5$ mL) mais non trop dilué pour la détection de U et des protéines. La phase de développement repose sur l'optimisation de la séparation de complexes synthétiques U-BSA ainsi que de cytosols préparés à partir des cellules branchiales de poissons zèbres exposés à l'uranium par voie directe. Cette optimisation de la séparation porte essentiellement sur la quantité (%) et le type d'ampholytes porteurs utilisés en regard de la matrice d'intérêt. Les résultats obtenus par IEF hors-gel sont ensuite comparés à ceux obtenus par IEF sur bandelette à gradient de pH immobilisé en conditions non-dénaturantes. L'IEF soulève aussi une problématique de concentration en sels qui sera discutée en premier lieu.

4.4.1 Problématique de concentration en sels pour l'IEF hors-gel

Les conditions initialement optimisées avec le tampon 100 mM NH_4Ac pour la préparation des cytosols pour la SEC (cf. section 4.1) ne conviennent pas pour l'IEF. En effet, l'IEF hors-gel ne tolère pas plus de 10 mM de sels et tampons tout comme l'IEF sur bandelette IPG

(GEHealthcare, 2004). Or, comme nous l'avons vu en 4.1 le respect de l'osmolarité intracellulaire est un facteur important pour maîtriser la lyse cellulaire. Plusieurs options ont alors été envisagées :

1. La préparation du cytosol dans un tampon hypotonique (*i.e.* osmolarité inférieure au milieu intracellulaire) 10 mM NH₄Ac entraîne un risque d'éclatement des organites et la libération des biomolécules qu'ils contiennent (*e.g.* protéines mitochondriales, ADN) ;
2. La préparation du cytosol dans les conditions optimisées (100 mM NH₄Ac) suivi d'une dilution pour atteindre 10 mM NH₄Ac provoque une dilution trop forte de l'échantillon pour la détection ultérieure de U et des protéines ;
3. La préparation du cytosol dans un tampon 10 mM NH₄Ac additionné d'agents permettant d'augmenter l'osmolarité pose le problème de la volatilité, de la compatibilité IEF et de l'influence des agents sur la spéciation des complexes U-protéine.

En regard des avantages et inconvénients de chaque option, la première solution a été retenue pour sa simplicité avec les incertitudes qu'elle implique. Le **Tableau 22** regroupe une comparaison des caractéristiques moyennes des broyats et cytosols obtenus avec le tampon hypotonique 10 mM NH₄Ac et le tampon de référence optimisé en 4.1, *i.e.* 100 mM NH₄Ac. Aucune différence significative n'apparaît entre les broyats et cytosols préparés avec ces deux tampons à l'exception d'un pourcentage d'uranium cytosolique significativement inférieur pour le tampon hypotonique (plus proche des 14% obtenus avec le tampon HEPES-Sucrose section 4.1.1). L'analyse ultérieure par SEC des cytosols préparés dans le tampon hypotonique permettra d'étudier les éventuels changements au niveau de la distribution cytosolique de l'uranium.

Tableau 22 : Caractéristiques des broyats et cytosols obtenus avec les tampons NH₄Ac 100 mM (Référence) et NH₄Ac 10 mM (Alternative) ; Chaque « n » correspond aux branchies d'un individu ou d'un pool d'individus uniques (toutes conditions d'expositions confondues)

<i>Moyenne ± Ecart-type (concentrations exprimées par mg de poids frais de branchie)</i>	<i>NH₄Ac 100 mM (Référence) n = 5 individus</i>	<i>NH₄Ac 10 mM (Alternative) n = 4 pools de 4 ou 5 individus</i>
[protéines] _{broyat} (µg.mg ⁻¹)	102 ± 31	94 ± 6
[protéines] _{cytosol} (µg.mg ⁻¹)	66 ± 14	62 ± 6
$\frac{[\text{protéines}]_{\text{Cytosol}}}{[\text{protéines}]_{\text{Broyat}}}$ (%)	68 ± 14	66 ± 10
$\frac{[U]_{\text{Cytosol}}}{[U]_{\text{Broyat}}}$ (%)	27 ± 10	9* ± 2
[Fe] _{cytosol} (ng.mg ⁻¹)	65 ± 27 (n = 4)	65 ± 6
[Cu] _{cytosol} (ng.mg ⁻¹)	n.d.	1,6 ± 0,2
[Zn] _{cytosol} (ng.mg ⁻¹)	6,4 ± 0,6 (n = 4)	6,7 ± 0,4

*Différence significative avec la moyenne de référence (NH₄Ac 100 mM) par ANOVA au seuil 5%

n.d. = non disponible

4.4.2 Optimisation de la proportion (%) et du type d'ampholytes porteurs

4.4.2.1 Optimisation de la proportion d'ampholytes porteurs

La **Figure 30** met en évidence l'influence du type d'ampholytes porteurs (**AP**) et de leur proportion sur le profil de pH ainsi que les bornes du gradient de pH d'une part (a), et sur le profil de tension, la tension et le temps de stabilisation d'autre part (b). Pour un même type de AP (*i.e.* pH 3-10), la diminution du pourcentage d'AP (%**AP** vol/vol) de 2 à 0,5% entraîne une restriction des bornes de pH mesurées qui passent de 3,8-9,2 à 4,1-7,9. Le gradient de pH reste quasi linéaire dans les deux cas (Figure 30a) mais une dérive de l'ordre de 0,5 à 1 unité de pH apparaît dans les fractions extrêmes en diminuant le %AP. Cette dérive est connue par le constructeur et attribuée à la proximité des électrolytes de pH plus acide ou basique. La même diminution du %AP a aussi pour effet d'augmenter la tension de stabilisation (+150V) mais le temps de stabilisation est diminué de 30 min en contrepartie (Figure 30b). La documentation technique concernant l'IEF sur bandelettes IPG (GEHealthcare, 2004) appuie cette tendance. Lorsque l'on fixe le pourcentage en AP à 0,5% et que l'on fait varier le type de AP (pH 4-7 vs. 3-10), la résolution la plus fine est obtenue avec les AP restreints à pH 4-7 en raison de bornes de pH plus restreintes (4,1-6,8) et de la bonne linéarité du gradient (Figure

30a). De plus, on observe un nouveau gain de 30 min sur le temps de stabilisation sans augmentation de la tension de stabilisation (Figure 30b).

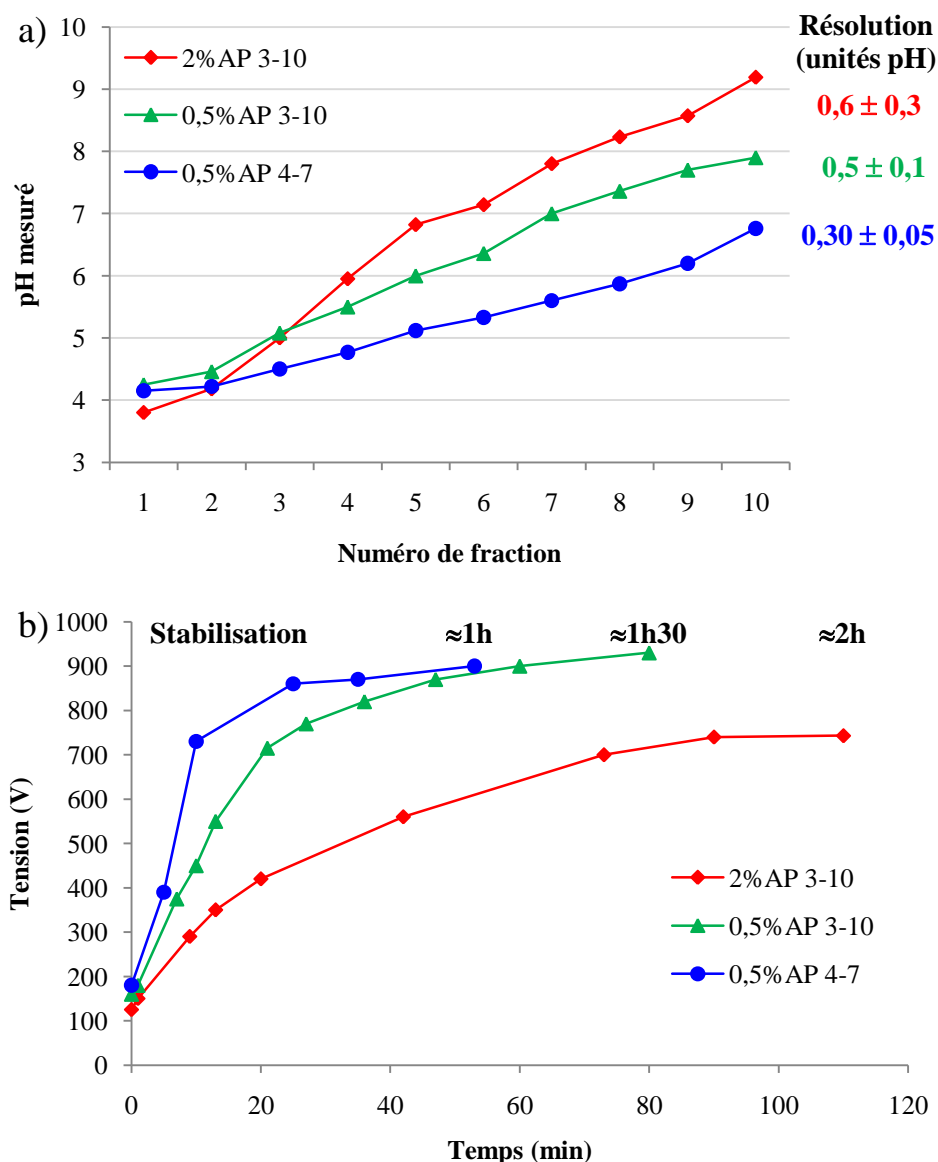


Figure 30 : Gradients de pH (a) et profils de tension (b) obtenus en IEF hors-gel (MicroRotofor) avec différents types et pourcentage d'ampholytes porteurs (AP)

En conclusion, le %AP joue à la fois sur la vitesse et la tension de stabilisation de la focalisation mais aussi sur le gradient de pH. Le type d'AP influe essentiellement sur les bornes du gradient de pH et dans une moindre mesure sur sa linéarité. A partir de ces observations, le choix s'est porté sur l'utilisation du plus faible %AP possible (0,5% vol/vol) pour la suite afin de réduire le temps de focalisation d'une part mais aussi de limiter les interactions potentielles U-protéines-AP d'autre part. Enfin, le %AP doit être réduit car la présence d'AP peut causer des problèmes d'ionisation et être une source de bruit de fond pour

la détection des espèces de rapport m/z inférieur à 1000 Da en spectrométrie de masse moléculaire (ESI-MS) (Staub *et al.*, 2011a).

4.4.2.2 Optimisation de la gamme de pH utile pour les cytosols de cellules branchiales

Après avoir fixé le %AP à 0,5% il s'agit de sélectionner la gamme de pH la plus adaptée à l'échantillon d'intérêt, le cytosol de cellules branchiales. En effet, les AP pH 3-10 permettent d'obtenir une vue d'ensemble sur la répartition U-protéine alors que les AP pH 4-7 permettent de zoomer sur une partie du gradient de pH. Plusieurs pools de cytosols ont été préparés et fractionnés avec 0,5%AP de type pH 3-10 et pH 4-7. De par la littérature, plusieurs métalloprotéines contenant du fer ont été décrites comme pouvant complexer l'uranium, il a donc été choisi de doser ces éléments dans cette phase d'optimisation. Après analyse par ICP-MS des fractions, les profils suivant ont été obtenus pour l'uranium et le fer (Figure 31) avec 0,5%AP pH 3-10 (Figure 31a) et 0,5%AP pH 4-7 (Figure 31b). Par comparaison des profils obtenus dans les deux conditions, il apparaît évident que le choix de la gamme de pH des AP a un fort impact sur la répartition des protéines liant Fe et U dans les 10 fractions du cytosol de cellules branchiales séparé par IEF hors-gel. L'utilisation du pH restreint à 4-7 permet d'isoler la majeure partie ($\geq 80\%$) des protéines liant Fe dans les deux fractions situées à l'extrémité la plus « basique » du dispositif. En croisant les données IEF hors-gel pour ces fractions ($pI \geq 6,2$) et la position du pic majoritaire de Fe en SEC-ICP-SFMS situé entre 40-60 kDa (Figure 29), il s'agit très probablement d'hémoglobine ou de ses sous-unités ($pI_{\text{littérature}} 6,6-8$ (Hempe et Craver, 2000; Koepke *et al.*, 1975), $PM_{\text{sous-unité}} 15-16$ kDa, 4 sous-unités par protéine ≈ 60 kDa). Cette observation est en accord avec le fait que l'hémoglobine soit présente en quantité non-négligeable dans les branchies en dépit de l'opération d'exsanguination lors du sacrifice des poissons. On identifie l'intérêt du gradient de pH restreint à 4-7 qui permet d'isoler une fraction riche en uranium et pauvre en hémoglobine vers pH 5,3 alors que cela n'est pas possible dans le cas du pH large 3-10. Le taux de recouvrement du fer n'est pas impacté par le gradient de pH mais celui de l'uranium est meilleur dans le cas de l'utilisation d'AP pH 3-10 avec toutefois un taux de recouvrement des protéines inchangé.

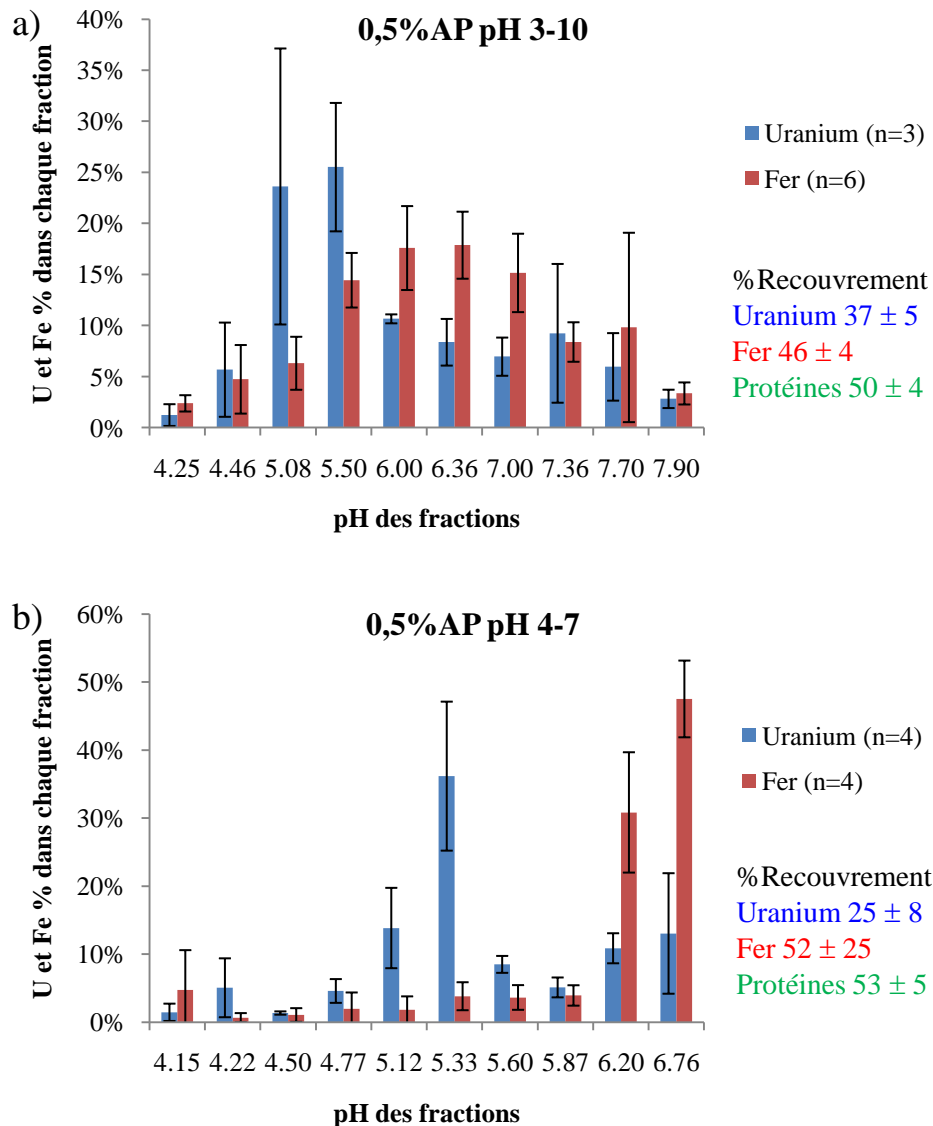


Figure 31 : Distributions moyennes et taux de recouvrement de U et Fe obtenus pour l'ensemble des pool de cytosols analysés par IEF hors-gel avec 0,5%AP pH 3-10 (a) et 0,5%AP pH 4-7 (b)

En conclusion de ces observations, le choix s'est porté sur l'utilisation du pH restreint à 4-7 afin d'améliorer la résolution et l'isolement des protéines abondantes liant Fe vis-à-vis de celles liant U. Le paragraphe suivant présente la validation des conditions choisies (e.g. 0,5%AP pH 4-7) à l'aide d'un complexe synthétique U-BSA d'une part et la comparaison avec l'IEF sur bandelette de gel d'autre part.

4.4.3 Validation de la technique IEF hors-gel

4.4.3.1 Isolement d'un complexe synthétique U-BSA

Un mélange de BSA (Albumine du Sérum Bovin ; 65 kDa) additionnée d'uranium a été fractionné en triplicat dans les conditions préalablement déterminées comme optimales pour les cytosols de cellules branchiales (*i.e.* 0,5%AP pH 4-7, durée < 1 heure). La BSA est majoritairement focalisée dans les fractions de pH 5,12 et 5,33 (**Figure 32**) en accord avec son point isoélectrique compris entre 4,9 et 5,3 (Sigma-Aldrich product information A2058 – 05/02/00). Le taux de recouvrement cumulé en BSA, c'est-à-dire le rapport entre la quantité de BSA récupérée dans l'ensemble des fractions et la quantité de BSA introduite dans le système, est de $75 \pm 10\%$ ($n = 3$). Ce résultat est supérieur à la moyenne obtenue dans les mêmes conditions pour les protéines des pools de cytosols, *i.e.* $53 \pm 5\%$ (Figure 31b), mais en accord avec la valeur de 80% annoncée par le constructeur dans des conditions standards (*i.e.* utilisation d'agents de solubilisation des protéines : tensioactifs, urée). Dans les conditions choisies ici, seule une petite proportion d'AP est ajoutée au mélange à séparer et l'adsorption dans le dispositif, notamment sur les membranes échangeuses d'ions, de certaines protéines présentes dans les échantillons biologiques peut être plus importante.

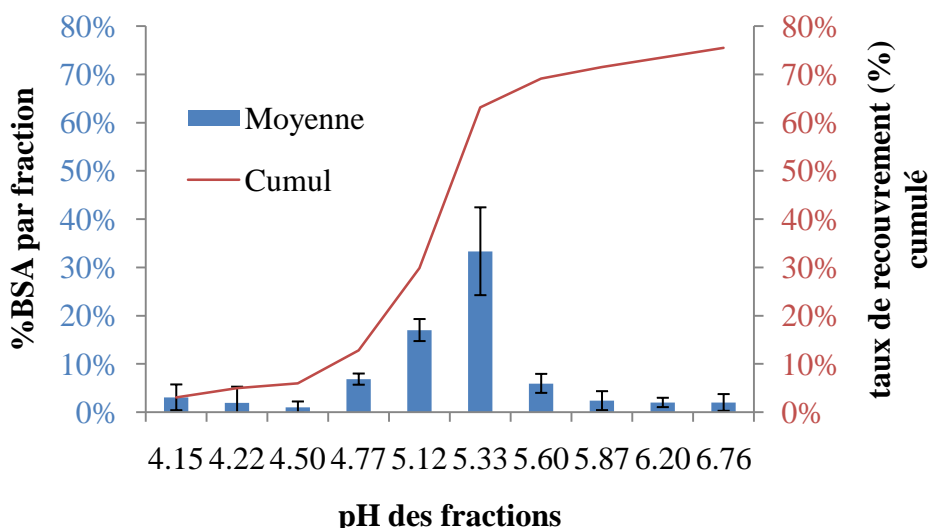


Figure 32 : Distribution de la BSA (n = 3) et taux de recouvrement cumulé après focalisation IEF-hors-gel d'un mélange BSA+U à 0,5%AP pH 4-7

Seule la moyenne de deux répliquats est présentée pour le recouvrement de l'uranium en **Figure 33** en raison d'une contamination manifeste des fractions du troisième répliquat par de l'uranium. Bien que la distribution de l'uranium (Figure 33) atteigne un maximum dans les fractions de pH 5,12 et 5,33 conformément à la position où focalise la BSA, l'uranium est

étalé sur l'ensemble des fractions avec un taux de recouvrement cumulé de $41 \pm 6\%$ ($n = 2$). Cet étalement peut s'expliquer par le mécanisme suivant : les complexes U-BSA, dont la constante de stabilité est relativement faible (Yang *et al.*, 2013), peuvent se dissocier sous l'influence du champ électrique et l'uranium peut alors se redistribuer sur l'ensemble des ampholytes ou s'adsorber dans le système. Etant donné la faible quantité d'uranium (< 200 pg) initialement introduite avec la BSA et même si l'affinité de l'uranium pour les ampholytes n'est que de quelques picogrammes par pourcent, cela peut représenter 2% de l'uranium initialement introduit dans le système avec la BSA par fraction.

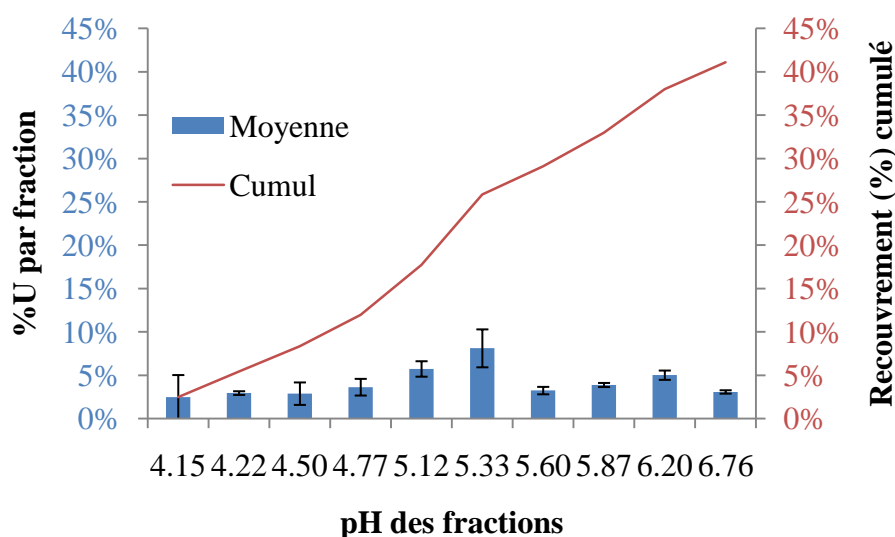


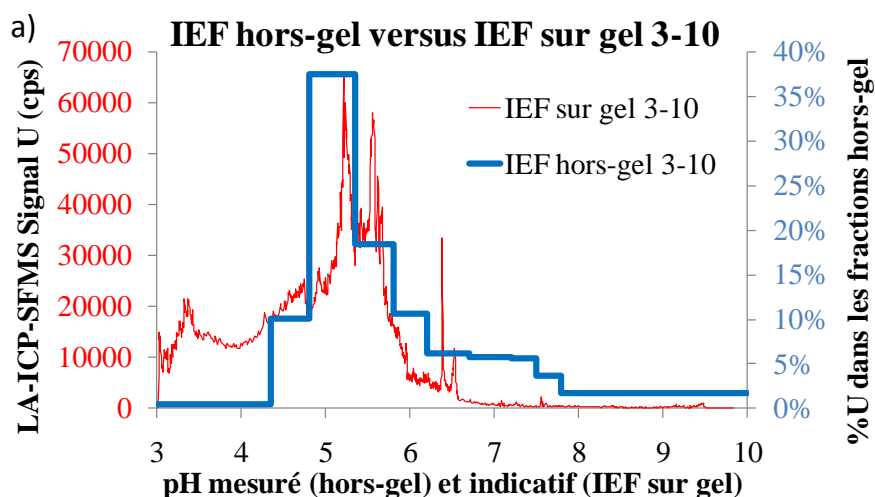
Figure 33 : Distribution de l'uranium ($n = 2$) et taux de recouvrement cumulé après focalisation IEF-hors-gel d'un mélange BSA+U à 0,5%AP pH 4-7

En conclusion, la BSA n'est certainement pas la meilleure candidate du point de vue de la complexation avec l'uranium pour cette validation mais ce choix a reposé sur la disponibilité de cette protéine, sa documentation, son pI intermédiaire sur le gradient 4-7, sa capacité à porter l'uranium observé en IEF non-dénaturante sur bandelette (Xu *et al.*, 2013) et l'utilisation de la même BSA pour préparer la gamme de calibration pour le dosage des protéines (cohérence calibrant-analyte). Bien que l'on observe une perte de BSA (*ca.* 25%) et un étalement de l'uranium, on peut conclure qu'il est possible qu'une partie au moins des complexes U-BSA aient été maintenus même s'ils présentent une faible constante de stabilité. Tout complexe U-protéine dont la constante de stabilité est au moins égale à celle de U-BSA ($\log K = 4,8$ dans les conditions de Yang *et al.* 2013) est susceptible d'être au moins partiellement conservé. La fêtuine (≈ 48 kDa) a récemment été identifiée par Basset *et al.* (2013) comme étant une cible privilégiée de l'uranium dans le sérum humain. Avec une

affinité pour l'uranium près de 1000 fois supérieure à celle de l'albumine ou de la transferrine et un pI théorique de 5,3, cette protéine pourrait permettre une validation plus quantitative de la technique IEF hors-gel en termes de recouvrement de l'uranium mais aussi de tester l'hypothèse selon laquelle un complexe plus stable que U-BSA serait mieux préservé. En première approche, l'utilisation de complexes synthétiques U-BSA relativement faibles reste un bon compromis pour la représentativité d'un échantillon réel.

4.4.3.2 Comparaison avec l'IEF sur bandelette de gel

Plusieurs cytosols ont été analysés à la fois par IEF hors-gel et IEF sur bandelette à gradient de pH immobilisé sur gel en conditions natives (ND-IEF) afin de pouvoir comparer l'alternative en phase liquide avec une méthode classique pour la séparation de protéines. Après analyse des bandelettes de gel IEF par ablation laser (LA) couplée à l'ICP-MS, il est possible de visualiser précisément les sections de gel riches en uranium et d'effectuer une comparaison avec le profil d'uranium obtenu en IEF hors-gel. La **Figure 34** montre une superposition du profil obtenu pour l'uranium sur une bandelette de gel par LA-ICP-MS et du profil obtenu pour le même cytosol en IEF hors-gel sur un gradient large 3-10 (Figure 34a) ou restreint à 4-7 (Figure 34b).



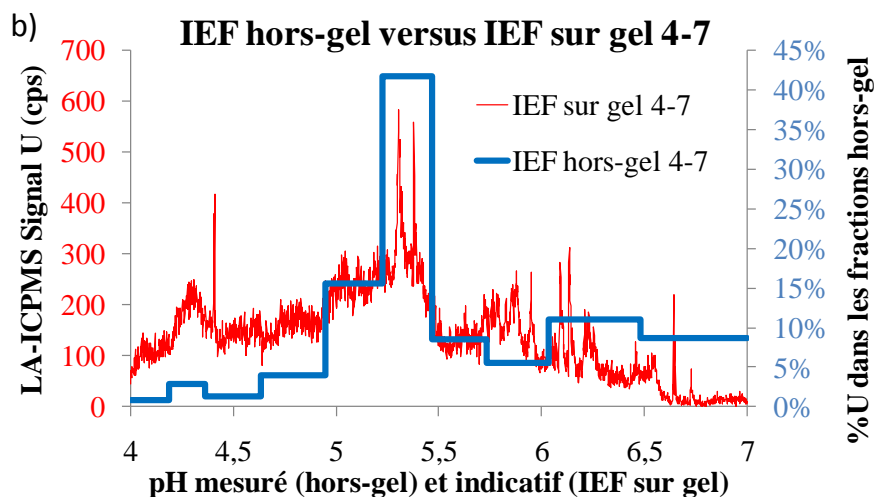


Figure 34 : Superposition des profils U-pH obtenus pour un même pool de cytosols par ND-IEF-LA-ICPMS sur bandelette de gel (rouge) et IEF hors-gel (bleu), avec un gradient de pH large 3-10 (a) et restreint 4-7 (b) ; pH indicatif selon données constructeur

Il y a un bon accord entre les fractions riches en uranium identifiées par IEF sur bandelette de gel et IEF hors-gel, en particulier celle à $\text{pH} \approx 5,3$. Etant donné que le dispositif IEF hors-gel commercialisé (MicroRotofor) est limité par son nombre de fractions (*i.e.* $n = 10$), la résolution est logiquement plus fine sur bandelette en raison du caractère continu du gradient de pH. Le taux de recouvrement en uranium est estimé à $48 \pm 20\%$ (selon le protocole décrit par Xu *et al.* 2013) pour l'IEF sur bandelette de gel. Deux différences intéressantes ont pu être observées entre les profils d'uranium sur bandelette de gel et ceux obtenus après analyse des fractions hors-gel. La première différence est l'absence d'uranium sur bandelette au-delà de pH 6,5, plus particulièrement mise en évidence sur la bandelette à gradient de pH large (Figure 34a) ; alors qu'en milieu liquide, de l'uranium est retrouvé en faible quantité avec des protéines au-delà de ce pH. L'origine de cette différence n'est pas expliquée mais peut provenir des interactions U-immobilines sur gel et U-AP hors-gel ou bien encore de la stabilité des complexes U-biomolécule en regard des différences de tensions, de courants et temps de focalisation entre les deux techniques. Néanmoins, les fractions les plus riches en uranium sont des fractions de pH plutôt acides ($4 < \text{pH} < 7$) ce qui justifie l'utilisation d'un gradient de pH restreint à 4-7 permettant un gain intéressant de résolution par effet de « zoom » (Figure 34b). De manière opposée, la quantité d'uranium retrouvée en IEF hors-gel en dessous de pH 4,5 est très faible (Figure 34b) voire nulle (Figure 34a) alors qu'une quantité significative d'uranium est retrouvée sur les bandelettes IEF entre pH 3 et 4,5. Ceci peut

s'expliquer par une forte mobilité de l'uranium non-lié à pH acide qui peut alors facilement migrer et quitter ces fractions en milieu liquide alors qu'il peut être plus retenu par les immobilines fixées dans le gel des bandelettes IEF. La seconde différence est le temps nécessaire pour réaliser ces fractionnements avec d'un côté 12 h de focalisation pour l'IEF sur bandelette contre seulement 45 min en milieu liquide. Ce gain de temps peut être crucial pour le maintien de l'intégrité des complexes U-protéines sous l'influence d'un courant électrique. Du point de vu des protéines, leur dosage est facilement réalisé dans les fractions liquides de l'IEF hors-gel et ne requiert que 5 µL. La **Figure 35** permet de comparer répartition des protéines à celle de l'uranium dans les conditions optimales 0,5%AP pH 4-7. Les distributions sont relativement similaires à l'exception de la fraction de pH 4,22 particulièrement riche en protéine mais pauvre en uranium.

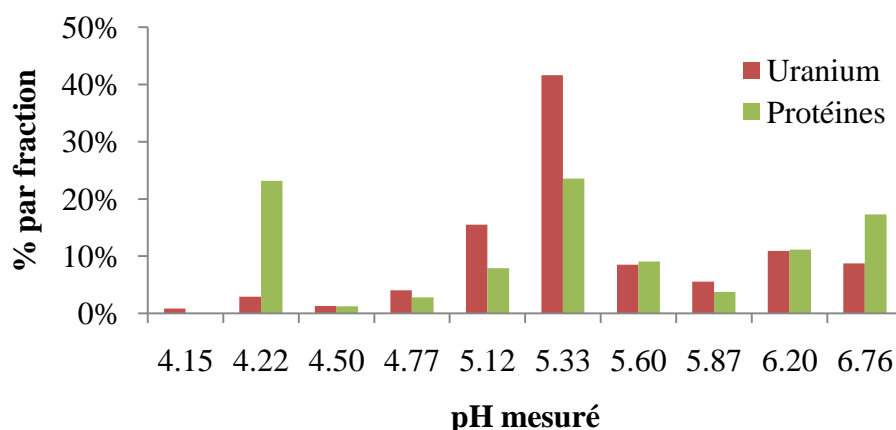


Figure 35 : Répartition de l'uranium et des protéines parmi les 10 fractions de l'IEF hors-gel en condition 0,5%AP pH 4-7

Aucune comparaison n'a pu être faite avec le profil protéique sur les bandelettes de gel en raison de l'absence de coloration de ces bandelettes, probablement due à la trop faible sensibilité du bleu de Coomassie utilisé. La coloration plus sensible au nitrate d'argent n'a pas pu être mise en œuvre dans ces expériences.

Les résultats ND-IEF sur bandelette de gel et IEF hors-gel se recoupent en ce qui concerne la répartition de l'U cytosolique sur le gradient de pH. La répartition des protéines n'a pas pu être vérifiée sur les bandelettes de gel mais elle suit globalement celle de l'U en IEF hors-gel. L'IEF hors-gel donne accès à 10 fractions liquides « faciles » à manipuler et à analyser en dosage total (protéines, uranium) comme en couplage (SEC, RP-LC), objet des prochains paragraphes.

4.4.4 Couplage IEF hors-gel – SEC-ICP-SFMS : possibilités et limitations

Le caractère liquide des fractions obtenues par IEF hors-gel à l'aide du dispositif commercialisé (MicroRotofor) permet l'analyse directe de celles-ci par chromatographie liquide. La colonne SEC utilisée dans notre cas (GE Superdex 200, 10-600 kDa) tolère facilement la présence de petites molécules telles que les sels ou les ampholytes dont la masse molaire est généralement inférieure à 1000 Da (GEHealthcare, 2004). En effet, ces sels et petites molécules se retrouvent particulièrement retenus par la phase stationnaire et éluent au volume total de la colonne permettant ainsi le « dessalage » de l'échantillon. La méthode SEC-ICP-SFMS appliquée est la même que celle décrite en (cf. section 3.6) et permet, après analyse des 10 fractions IEF hors-gel, d'obtenir une cartographie bidimensionnelle : point isoélectrique – poids moléculaire pour chaque échantillon analysé. Ces résultats de cartographie sont présentés en partie 5.6.2 pour l'ensemble des cytosols de cellules branchiales analysés et sont accompagnés d'une discussion sur l'influence des conditions d'exposition contrastées.

Certains inconvénients majeurs ou limitations liés à l'utilisation d'ampholytes apparaissent cependant. En premier lieu, les AP contiennent eux-mêmes des métaux et le **Tableau 23** établit une comparaison entre l'apport en U, Fe, Cu et Zn par les AP et par le cytosol dans le cadre du protocole standard de préparation des échantillons pour l'IEF hors-gel (cf. section 3.7.3). A pourcentage égal (0,5%) les AP pH 3-10 de Bio-Rad apportent une quantité 3 à 10 fois supérieure en Fe, Cu et Zn que les AP pH 4-7 de GE. En fonction du métal considéré, cet apport au mélange à fractionner peut représenter pour les AP pH 3-10 entre 10% (Fe et Zn) et 70% (Cu) de l'apport moyen du cytosol, ce qui est considérable. Cet apport est fortement réduit avec les AP pH 4-7 pour Fe et Zn (1% et 4% de l'apport moyen du cytosol, respectivement) mais reste élevé pour Cu avec 16% de l'apport moyen du cytosol. Ces résultats impliquent principalement que les profils Fe, Cu et Zn obtenus par SEC-ICP-SFMS des fractions IEF hors-gel doivent être interprétés avec précaution. En pratique, les profils de Fe, Cu et Zn sont généralement exploitables avec les AP pH 4-7 mais seul le profil de Fe est exploitable avec les AP pH 3-10. Les profils de Cu et Zn avec les AP pH 3-10 sont inexploitables en raison d'un pic très intense et étalé au niveau du volume total de la colonne, ce qui est cohérent avec la faible masse molaire des AP. Enfin concernant U, l'apport par les deux types d'AP est faible, sensiblement équivalent et du même niveau que la quantité d'U présente dans les cytosols témoins (c_0).

Tableau 23 : Apports en U, Fe, Cu et Zn net et relatif au cytosol des ampholytes porteurs (AP) pour l'IEF hors-gel à 0,5%

<i>Apport net [%Cytosol]</i>	<i>0,5% AP pH 3-10 (Bio-Rad)</i>	<i>0,5% AP pH 4-7 (GE)</i>	<i>Cytosol moyen (n = 6)</i>
<i>Uranium (pg)</i>	115	90	33-200 (c ₀) 1000-1600 (c ₂₀) 4500 (c ₂₅₀)
<i>Fer (ng)</i>	130 [10%]	13 [1%]	1290
<i>Cuivre (ng)</i>	23,4 [70%]	5,4 [16%]	33,6
<i>Zinc (ng)</i>	14,4 [12%]	5,4 [4%]	124,5

Un second inconvénient relatif à l'utilisation des AP, plus gênant, est leur impact éventuel sur la distribution de l'uranium parmi les biomolécules. Afin de visualiser cet effet, un pool de cytosols a été préparé puis analysé par SEC-ICP-SFMS avec et sans ajout de 0,5% AP (**Figure 36**). En parallèle, le profil « moyen » du cytosol après IEF a été obtenu après fractionnement par IEF hors-gel du mélange « Cytosol pool + 0,5%AP », analyse des 10 fractions obtenues par SEC-ICP-SFMS, correction du signal par le volume injecté et somme des 10 chromatogrammes corrigés. L'idée de ce test est de vérifier la distribution cytosolique de l'uranium avant et après IEF.

Un pic d'uranium intense apparaît au volume mort en SEC-ICP-SFMS (Figure 36) lorsque le pool de cytosols est préparé en condition hypotonique (10 mM NH₄Ac). Ce pic correspondant probablement à des agrégats protéiques disparaît en majeure partie (-89%) après addition des AP (**Tableau 24**) lorsque l'on compare les chromatogrammes de « Cytosol pool » et « Cytosol pool + 0,5%AP » (Figure 36). Les AP améliorent la solubilité des protéines (GEHealthcare, 2004). Toutefois, en prenant l'aire totale du chromatogramme du pool de cytosol comme référence pour la quantité d'uranium éluée (Tableau 24), on constate une diminution de 34% de la quantité éluée après ajout des AP accompagnée d'une redistribution (+180%) vers les molécules de faible poids moléculaire (> 14 kDa). Les AP ont visiblement une certaine affinité pour l'uranium comme le montre le profil « U inorganique + 0,5%AP » (Figure 36) et il est donc possible qu'ils dissocient l'uranium le plus faiblement lié aux protéines expliquant ainsi la redistribution vers les faibles masses molaire. Malheureusement, la composition et la forme chimique des ampholytes de la solution commerciale utilisée ne sont pas connues ce qui freine la modélisation de leur interaction avec U. Nous pourrions

cependant envisager une approche du type quenching de fluorescence (Michon *et al.*, 2010), à condition que les AP fluorescent, afin de déterminer un log K apparent pour la formation de complexes U-AP. D'autre part, l'augmentation de la solubilité des protéines et la rupture des agrégats peut libérer une partie de l'uranium qui pourra alors être potentiellement immobilisé sur la colonne expliquant la diminution globale du signal. De la même manière, l'augmentation de la concentration en sels dans l'échantillon en raison de l'ajout des AP pourrait diminuer l'efficacité de nébulisation/ionisation et donc le signal en ICP-MS.

En considérant, le profil « Somme des 10 Fractions IEF » (Figure 36), la quantité d'uranium totale éluée diminue encore et représente 58% de moins que le pool de cytosols initial (Tableau 24). Cette nouvelle diminution peut s'expliquer par les pertes en protéines et en uranium liés à l'étape supplémentaire d'IEF. La perte en uranium se situe essentiellement sur les molécules de haute masse moléculaire (14 – 670 kDa ; -26%) et s'accompagne d'une redistribution (+250%) sur les molécules de faible masse moléculaire (< 14 kDa). En dépit de la diminution globale du signal de l'uranium et de la redistribution d'une fraction d'uranium vers les masses molaires inférieures à 14 kDa, les pics initialement observés entre 14 et 670 kDa dans le pool de cytosol restent toujours observables après ajout de 0,5% AP et même après l'étape d'IEF hors-gel. Ceci est encourageant quant à la possibilité de conserver les complexes U-protéine les plus stables après l'IEF hors-gel et *in fine* dans la perspective d'identification des protéines.

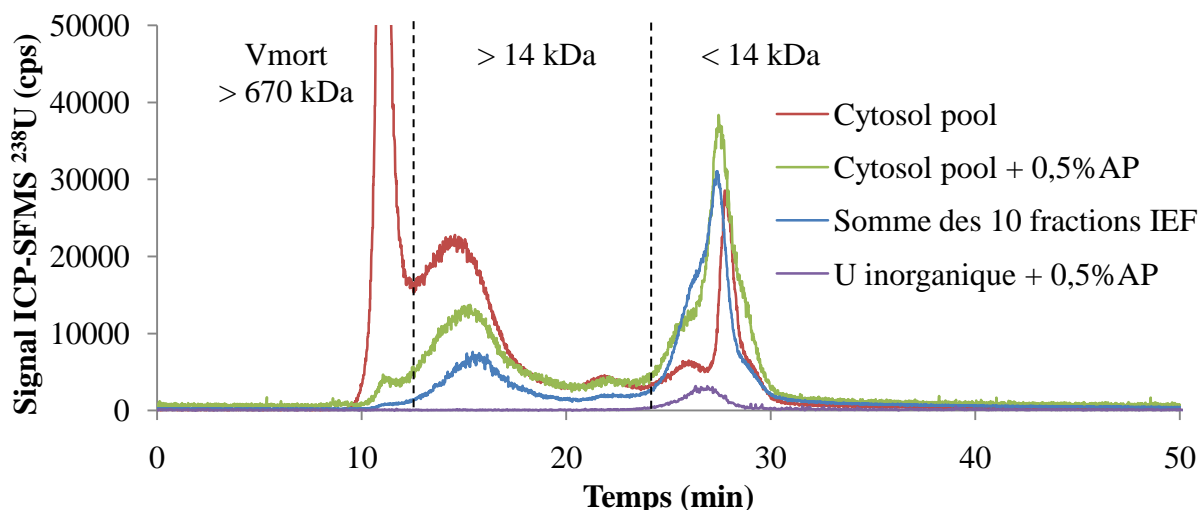


Figure 36 : Comparaison entre les profils SEC-ICP-SFMS d'un pool (n = 5) de cytosols brut, du même pool après ajout de 0,5%AP et du signal obtenu en sommant les profils SEC-ICP-SFMS des 10 fractions IEF hors-gel de ce même pool de cytosols ; le profil « U inorganique + 0,5%AP » est ajouté pour comparaison

Tableau 24 : Distribution moléculaire de l'uranium par SEC-ICP-SFMS pour le pool de cytosol (Référence) et évolution de la distribution de l'uranium par rapport à cette référence

	V_{mort}	> 14 kDa	< 14 kDa	Aire totale	Variation d'aire _{totale}
Cytosol pool (Référence)	37%	45%	19%	252464	-
Cytosol pool + 0,5%AP	-89%	-2%	+180%	167760	-34%
Somme 10 Fractions IEF	-96%	-26%	+250%	106179	-58%

En conclusion, bien qu'il y ait des pertes d'uranium en SEC et en IEF hors-gel, il apparaît possible de conserver des complexes même après couplage de ces deux techniques séparatives (IEF×SEC), probablement les plus forts. L'analyse des fractions IEF par l'approche « top-down » développée dans le prochain paragraphe pourrait aussi permettre de cribler et d'identifier des complexes U-protéines dans les fractions IEF hors-gel.

4.5 Stratégie d'identification des protéines « top-down »

La stratégie d'identification des protéines « top-down » a été envisagée dans cette étude car : (i) l'évolution vers l'utilisation des techniques hors-gel pourrait réduire les risques de dénaturation des complexes U-protéine et simplifier les manipulations ; (ii) elle permet le suivi élémentaire de l'uranium en solution par ICP-MS parallèlement à l'identification des protéines par ESI-MS en choisissant les techniques séparatives adéquates ; (iii) la détection de complexes U-protéine intacts par spectrométrie de masse moléculaire haute résolution pourrait théoriquement permettre de déterminer directement leur stœchiométrie voire la forme chimique de l'uranium lié (*e.g.* uranyle libre, carbonate, hydroxyle).

L'idée est donc de séparer les complexes U-protéine par une première dimension de type IEF hors-gel, suivi d'une technique de chromatographie liquide compatible à la fois avec une détection élémentaire (ICP-MS) et une détection moléculaire (ESI-MS) en ligne, afin de pouvoir théoriquement cribler les protéines liant U ainsi séparées et de les identifier. Si la détection élémentaire par ICP-MS est adaptée sans trop de problèmes de matrice et de sensibilité à la méthode SEC développée précédemment, la détection moléculaire par ESI-MS est plus délicate. En effet, bien que volatile, la teneur en sels NH_4Ac dans la phase mobile SEC est un peu élevée (100 mM) pour une ionisation en source électrospray. De plus, une phase mobile aqueuse dépourvue de modifiant organique réduit la facilité de dessolvation des analytes nécessaire en ESI. Ces facteurs peuvent impacter la sensibilité en ESI-MS d'autant plus que le facteur de dilution de la SEC est important (≈ 100 à 200). L'analyse « hors-ligne » de fractions IEF \times SEC riches en uranium par ESI-MS pourrait être envisagée cependant, elle nécessite un traitement des fractions pouvant nuire à l'intégrité des complexes U-protéine (*e.g.* pré-concentration, lyophilisation, dessalage). La chromatographie liquide en phase inverse (RP) a donc été envisagée comme technique préalable à la caractérisation des fractions issues de l'IEF hors-gel par ICP-MS et ESI-MS. Notre choix s'est porté sur une colonne UHPLC (100 mm x 1 mm d.i., 1,7 μm , support polymérique) adaptée à la séparation de protéines « intactes » par le biais de chaînes courtes (C_4) et d'une porosité de 300Å (Fekete *et al.*, 2012; Staub *et al.*, 2011b).

Les deux paragraphes suivant décrivent le développement et l'optimisation de cette approche RP(C_4)-ICP-MS et RP(C_4)-ESI-MS étant donné les inconnues et limitations subsistantes concernant nos problématiques qui sont (i) la préservation des complexes U-protéine lors de la séparation RP(C_4)-UHPLC, (ii) l'ionisation et la détection des protéines de haute masse moléculaire en ESI-MS Orbitrap ou encore (iii) la stabilité des complexes U-protéine dans la

source ESI et l'analyseur Orbitrap. Il est donc nécessaire d'optimiser les méthodes de séparation et détection pour notre application spécifique aux complexes U-protéines. Ceci a été réalisé ici à l'aide de complexes synthétique U-BSA et U-transferrine.

4.5.1 RP(C₄)-ICP-SFMS

La première partie du développement consiste à réaliser le couplage entre l'UHPLC (C₄) et la détection élémentaire par ICP-SFMS (Thermo Element XR) afin de vérifier la capacité des complexes U-protéine à éluer tout en gardant une phase mobile adaptée à l'identification ESI-MS mais préservant le plus possible les complexes U-protéine. L'ICP-SFMS est utilisé en mode basse résolution (LR) afin d'avoir une bonne sensibilité sur l'uranium et une vitesse d'acquisition maximale en mode multi-élémentaire. Les premiers essais sont réalisés en condition acide avec un gradient eau-acétonitrile additionné de 0,1% d'acide formique (AFo) (≈ 27 mM AFo, pH 2,6) (Everley et Croley, 2008). Les conditions acides favorisent généralement l'élution des protéines intactes en assurant leur solubilité ($\text{pH} < \text{pI}$) et en réduisant les interactions avec la phase stationnaire notamment par effet d'appariement d'ion (anion formiate) sur les nombreux sites positivement chargés des protéines (Fekete *et al.*, 2012; Staub *et al.*, 2011b). La **Figure 37** met en évidence l'élution du complexe synthétique U-BSA à 15,4 min dans ces conditions acides. Le pic traîne légèrement (tailing) mais le signal se détache bien du bruit de fond et le résultat est répétable. Ce phénomène de tailing (Figure 37) a déjà été mis en évidence pour l'albumine sur ce type de colonne (Staub *et al.*, 2011b) et pourrait être dû à des impuretés ou une solubilité partielle. Un pic fin et intense pouvant correspondre à de l'uranium non-lié apparaît aussi au volume mort. Ceci est probablement dû au caractère très acide de la phase mobile susceptible de dissocier une partie des complexes U-BSA voire de dénaturer partiellement la BSA. Enfin, le pic large observé vers 28 min, y compris pour le blanc, correspond au retour rapide (2 min) aux conditions initiales du gradient.

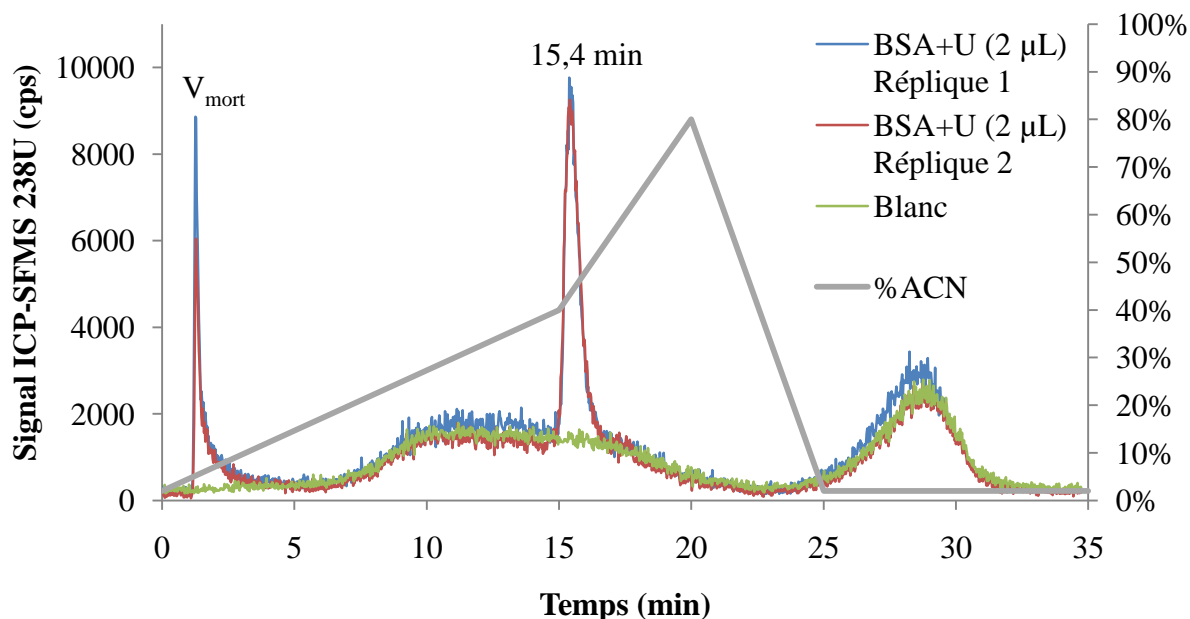


Figure 37 : Profils d'élution de la BSA (1 µg/µl) dopée à l'uranium (2 pg/µl) et du blanc (10 mM NH₄Ac) sur la colonne UHPLC C₄ BEH 300 avec un gradient Eau/Acétonitrile à 0,1% d'acide formique pH 2,6 ; V_{injection} = 2 µL

Afin de tenter de réduire la dissociation des complexes U-protéine, différents essais ont été réalisés en conditions moins acides en utilisant l'acétate d'ammonium (NH₄Ac) à 5 mM pH 6,8 au lieu de 27 mM AFo pH 2,6 en première approche. L'affinité de l'uranyle pour l'acétate (log K = 2,9) légèrement inférieure à celle du formiate (log K = 3,1) et la moindre concentration en sels peuvent contribuer à réduire la dissociation des complexes U-protéine. Malheureusement les premiers essais à pH 6,8 n'aboutissent à aucune élution de complexes U-BSA du point de vue du suivi de l'uranium, la détection UV n'étant pas disponible. Ceci s'explique probablement par le pH de la phase mobile supérieur au pI de la BSA (4,7–5,3) impliquant une charge globale négative sur la BSA et donc l'impossibilité de réaliser l'appariement d'ion dans ces conditions (absence d'agent d'appariement cationique). La phase mobile a été progressivement acidifiée avec de l'acide acétique (AAc) jusqu'à ce que l'élution de U-BSA soit constatée et reproductible. Cela correspond à un pH de 4,6 équivalent à un ajout de 5 mM AAc (**Figure 38**) et donc à une concentration totale en anions acétate de 10 mM avec les 5 mM déjà apportés par NH₄Ac. Dans ces conditions, le pic de U-BSA se détache bien du bruit de fond à 16,6 min, l'injection est reproductible et aucun pic n'est observé au volume mort. Le pic est toutefois plus étalé et donc moins intense que dans la condition acide (27 mM AFo) ce qui est probablement lié à une capacité d'appariement d'ions des anions acétates inférieure à celle des formiates. Pour un même volume injecté, l'aire totale

des pics calculée par différence entre l'aire totale du chromatogramme de U-BSA et celui du blanc (tampon NH_4Ac) n'est pas significativement différente avec 9100 ± 400 et 8200 ± 700 cps.min pour les conditions 27 mM AFo et 10 mM « Acétate », respectivement. En faisant l'hypothèse que le rendement d'ionisation dans le plasma de l'ICP est équivalent dans les deux conditions, ce résultat suggère que le recouvrement global en uranium serait proche.

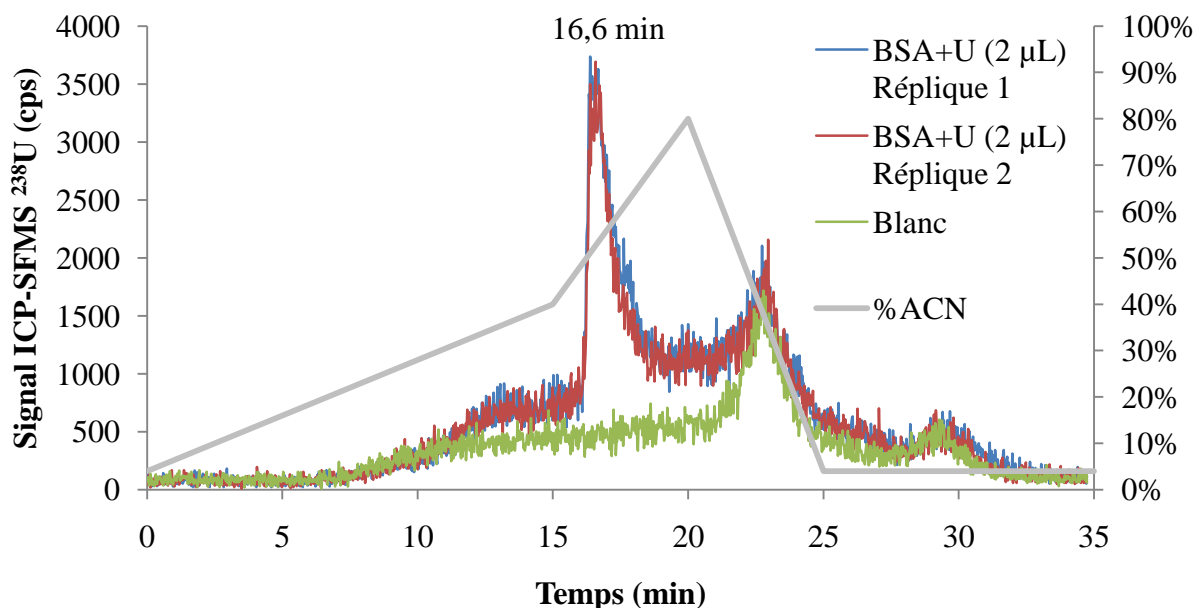


Figure 38 : Profils d'élution de la BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dopée à l'uranium (2 $\text{pg}/\mu\text{l}$) et du blanc (10 mM NH_4Ac) sur la colonne UHPLC C₄ BEH 300 avec un gradient Eau/Acétonitrile à 10 mM d'acétate (5mM NH_4Ac + 5 mM AAC) pH 4,6 ; $V_{\text{injection}} = 2 \mu\text{L}$

Afin de confirmer l'élution de complexes U-protéine, un second essai a été réalisé dans les conditions 10 mM « Acétate » pH 4,6 avec un complexe synthétique U-Transferrine en suivant à la fois les signaux du fer et de l'uranium par ICP-SFMS en mode LR (**Figure 39**). On note dans un premier temps la dérive importante de la ligne de base du signal du fer au cours du temps, causée par la variation de l'efficacité d'ionisation, fonction du pourcentage d'acétonitrile. Un pic se détache tout de même du bruit de fond sur le signal du fer à 16,6 min et correspond à l'élution de la transferrine au même temps de rétention que la BSA. La co-élution de ce pic avec un pic d'uranium confirme l'élution du complexe U-transferrine.

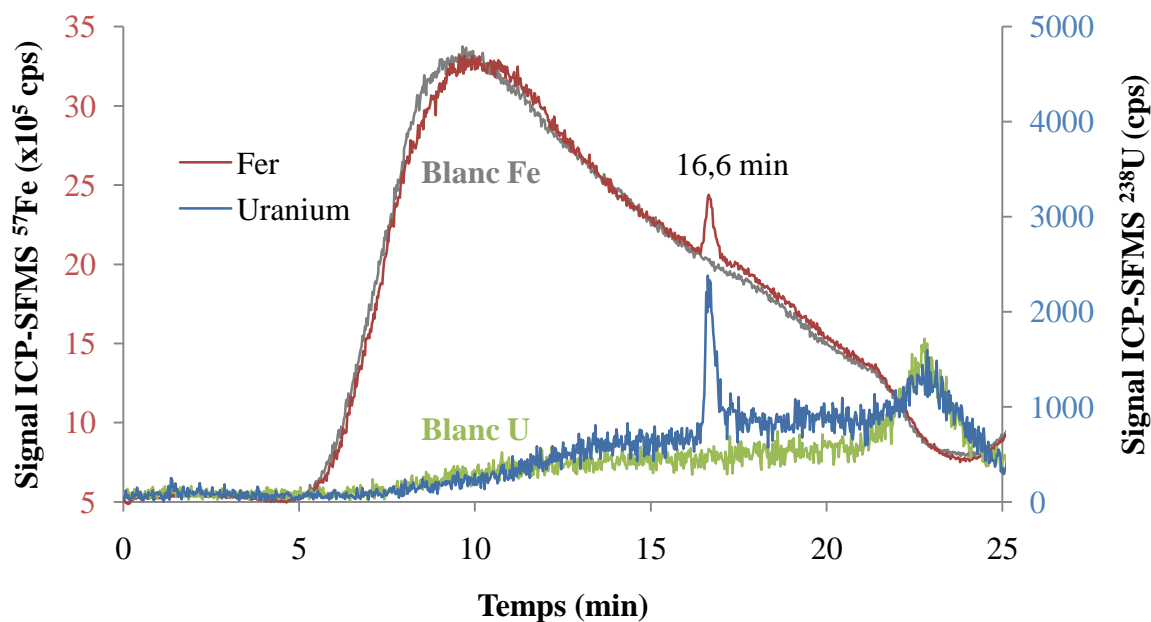
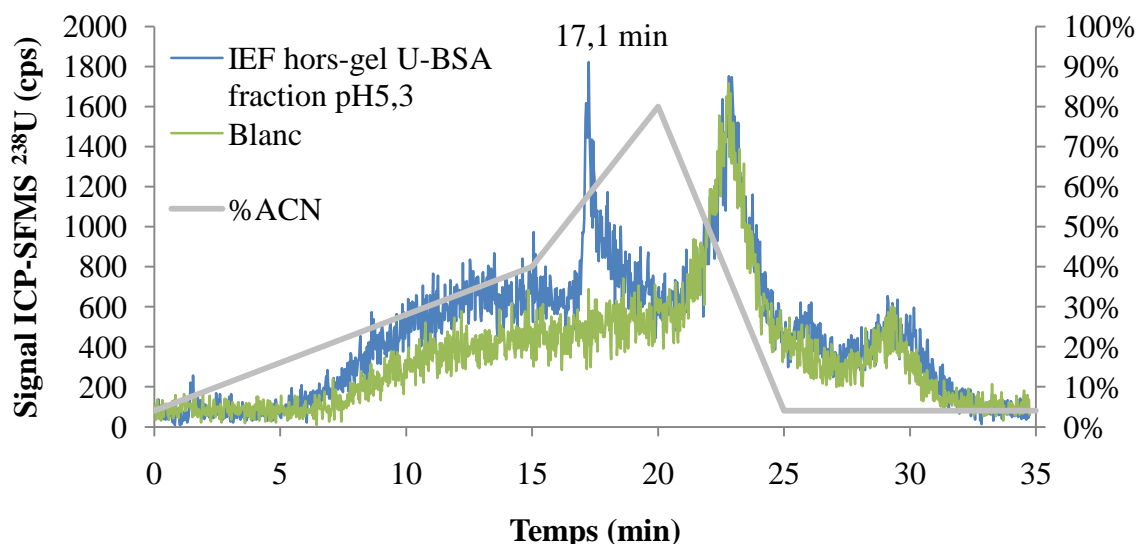


Figure 39 : Profils d'élution de la transferrine (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dopée à l'uranium (2 $\text{pg}/\mu\text{l}$) et du blanc (10 mM NH_4Ac) sur la colonne UHPLC C_4 BEH 300 avec un gradient Eau/Acétonitrile à 10 mM d'acétate (5mM NH_4Ac + 5 mM AAc) pH 4,6 ; $V_{\text{injection}} = 4 \mu\text{L}$

Enfin un troisième essai a été réalisé sur une fraction issue d'un fractionnement IEF hors-gel du complexe synthétique U-BSA. Le choix s'est porté sur la fraction de pH 5,33 (riche en U et BSA cf. section 4.4.3.1) et le résultat est présenté en **Figure 40**. Un pic d'uranium est observé à 17,1 min mais ce temps de rétention est 30 secondes plus long que le temps de rétention de 16,6 min précédemment observé pour la BSA (Figure 38). Ce décalage peut provenir de la présence résiduelle d'ampholytes dans la fraction IEF hors-gel en dépit d'une filtration sur cut-off 10 kDa visant à retirer les ampholytes (≤ 1 kDa) avant injection sur la colonne RP(C_4). Cette hypothèse pourrait être simplement vérifiée en injectant un mélange BSA+AP. D'autre part, les analyses en question n'ont pas été réalisées le même jour et l'UHPLC est très sensible aux variations de composition et de température de l'éluant (Staub *et al.*, 2011b). Il peut donc tout de même s'agir de la BSA et l'ESI-MS permettra de vérifier cette hypothèse.



**Figure 40 : Profils d'élution de la fraction pH 5,33 issue de l'IEF hors-gel du mélange U-BSA et du blanc (10 mM NH₄Ac) sur la colonne UHPLC C₄ BEH 300 (Waters) avec un gradient Eau/Acétonitrile à 10 mM d'acétate (5mM NH₄Ac + 5 mM AAc) pH 4,6 ;
V_{injection} = 4 μL**

4.5.2 RP(C₄)-ESI-MS

Après avoir vérifié la possibilité d'éluer des complexes U-protéine en suivant le signal de l'uranium et du fer par ICP-SFMS, il s'agit de voir s'il est possible d'identifier les protéines voire des complexes U-protéine à l'aide du couplage avec la spectrométrie de masse moléculaire (ESI-FT-MS Thermo LTQ-Orbitrap Velos).

La pompe HPLC couplée à l'ESI-FT-MS est différente de celle utilisée précédemment, cependant, les mêmes conditions d'élution ont été appliquées pour l'analyse de la fraction IEF hors-gel pH 5,33 issue du fractionnement du mélange U-BSA par couplage RP(C₄)-ESI-MS (Figure 41).

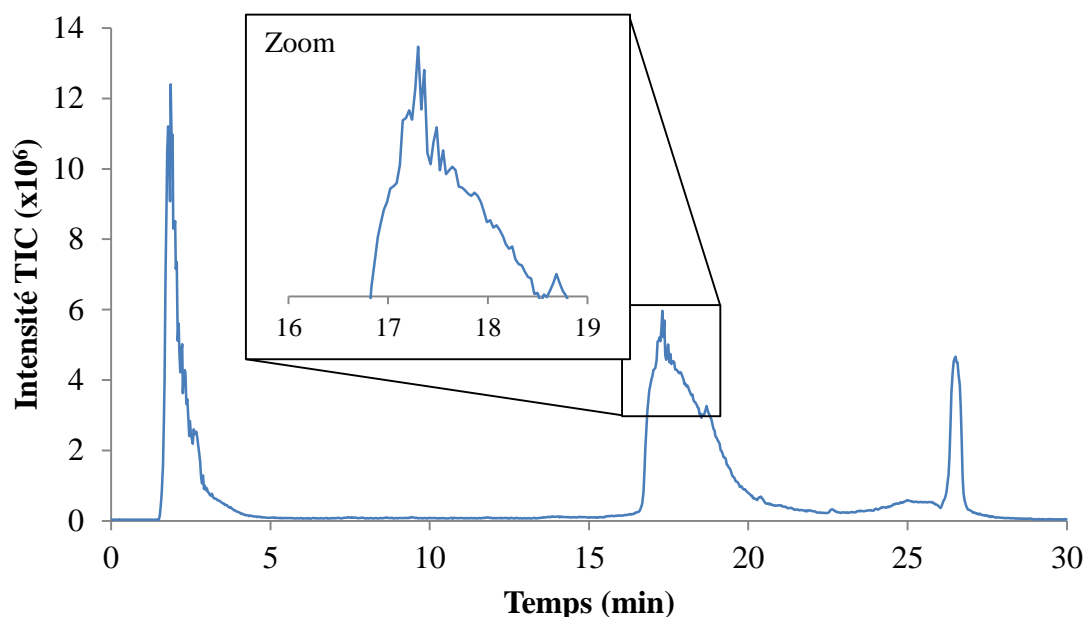


Figure 41 : Courant ionique total (TIC) de la fraction pH 5,33 de l'IEF hors-gel du mélange U-BSA obtenu par couplage RP(C₄)-ESI-MS ; gradient Eau/Acétonitrile à 10 mM d'acétate (5mM NH₄Ac + 5 mM AAc) pH 4,6 ; V_{injection} = 4 µL

Sur le courant ionique total (TIC) présenté en Figure 41 apparaissent trois pics dont un premier au volume mort, un second étalé entre 16 et 20 min et un dernier vers 26 min correspondant au retour du gradient aux conditions initiales. Le massif étalé entre 16 et 20 min présente un apex à 17,3 min correspondant au pic supposé de U-BSA détecté lors du couplage RP(C₄)-ICP-SFMS (Figure 40). Sur ce massif, la moyenne des spectres MS accumulés entre 17 et 18 min donne le spectre moyen présenté en **Figure 42** sur lequel on observe des pics correspondant à une espèce multichargée. La déconvolution spectrale donne pour cette espèce une masse molaire moyenne de 66421 ± 12 Da correspondant à une charge +39 pour l'ion de m/z 1704,2388. Cette masse molaire est en accord avec la valeur de 66430 Da proposée par Hirayama *et al.* (1990) pour la BSA et confirme sa présence sous le pic d'uranium observé à 17,1 min (Figure 40). En revanche, cela signifie que l'espèce observée en ESI-MS ne porte pas d'uranium, sans quoi la masse serait décalée. Ce résultat ne permet toutefois pas d'exclure la présence de complexes U-BSA car il se peut simplement que ceux-là soient minoritaires et masqués par l'abondance de BSA ne portant pas d'uranium ou bien encore qu'il y ait une dissociation de l'uranium entre la sortie de la colonne et l'analyseur MS (*e.g.* dissociation dans l'électrospray).

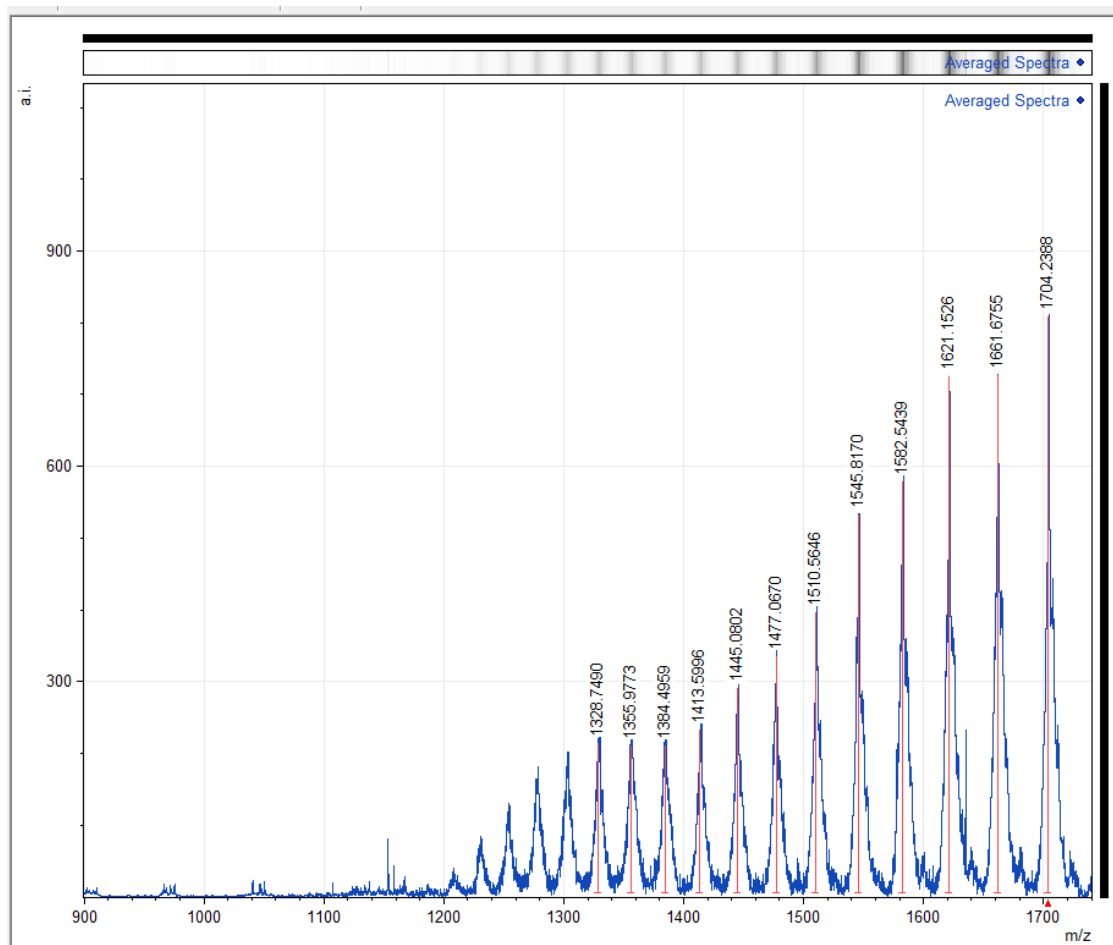


Figure 42 : Spectre de masse moyenné entre 17 et 18 min extrait du TIC de la fraction pH 5,33 de l'IEF hors-gel de U-BSA

Bien qu'il n'ait pas été possible de visualiser directement un complexe U-BSA par ESI-MS, ces résultats préliminaires et l'approche complémentaire de détection par ICP-SFMS et ESI-MS sont prometteurs pour l'identification de protéines cibles de l'uranium dans les fractions IEF hors-gel par approche « top-down ».

L'ensemble des méthodologies analytiques développées dans cette première partie ainsi que d'autres techniques (*e.g.* IEF sur bandelette, dosage multi-élémentaire total, dosage de protéines) seront mises en application dans la partie suivante pour l'analyse des échantillons biologiques en vue de l'obtention d'informations permettant de répondre à des problématiques d'écotoxicologie.

RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE 2

5 Résultats et discussion (Partie 2) : Application des méthodes analytiques et interprétations en écotoxicologie

La création d'une banque d'échantillons constitue la première étape de cette étude. Elle repose sur un contrôle rigoureux de l'exposition des poissons zèbre à l'uranium. Cette dernière sera présentée en préambule de cette partie.

Une fois la banque d'échantillons constituée, les conditions d'expositions caractérisées et les outils analytiques nécessaires optimisés, l'étape suivante consiste en l'analyse des échantillons biologiques et enfin l'interprétation des résultats en écotoxicologie en regard des conditions d'exposition contrastées appliquées.

En premier lieu, l'organotropisme de l'uranium a été étudié après les différentes expositions, puis un focus sur les branchies et la fraction cytosolique des cellules branchiales a été réalisé : répartition de l'uranium dans les compartiments sensibles ou non aux métaux, analyse MET-EDX pour la recherche de granules. De plus, l'histologie des tissus branchiaux a été réalisée afin d'avoir un marqueur biologique de l'exposition. Dans un second temps, les cibles moléculaires de l'uranium dans cette fraction cytosolique ont été étudiées :

1. En réalisant un screening de la distribution de l'uranium parmi le pool des protéines cytosoliques en fonction du poids moléculaire (PM) des biomolécules par SEC-ICP-SFMS pour chaque condition d'exposition. En parallèle, l'influence de l'exposition à l'uranium sur la quantité et la distribution de certains métaux essentiels dans les branchies et dans la fraction cytosolique des cellules branchiales a été examinée (effet toxique potentiel par perturbation de la régulation de métaux essentiels mais aussi indication sur la nature des biomolécules liant l'uranium)
2. En réalisant une cartographie bidimensionnelle plus résolutive avec une première dimension de séparation des espèces U-biomolécule en fonction du point isoélectrique (pI) des biomolécules par IEF hors-gel et une seconde dimension effectuée par SEC-ICP-SFMS (séparation en fonction du PM).
3. En criblant les cibles moléculaires de l'U dans les fractions enrichies en U de cytosol des cellules branchiales par les approches « bottom-up » et « top-down ».

5.1 Exposition des poissons à l'uranium

La connaissance et la régulation des conditions d'exposition sont nécessaires afin de pouvoir *in fine* comparer entre eux les résultats obtenus dans différentes conditions d'exposition (*e.g.* chronique/aigüe, long/court terme). Les données concernant le suivi d'exposition (*e.g.* pH, concentrations en cations majeurs, concentrations en uranium total, dissous et labile) sont présentées et discutées dans ce chapitre après un focus sur l'effet de l'activité biologique des poissons sur le pH de l'eau.

5.1.1 Effet de l'activité biologique des poissons sur le pH (étude préliminaire)

Les poissons vivent, respirent et se nourrissent dans l'eau. A cet effet ils réalisent de nombreux échanges chimiques avec celle-ci. Une incidence possible de ces échanges en milieu « fermé » est la variation d'un paramètre majeur gouvernant la spéciation chimique de l'uranium : le pH du milieu. En effet, les poissons rejettent des composés acides (*e.g.* acide carbonique) et basiques (*e.g.* composés azotés) notamment au niveau des branchies et des reins (Wilkie, 2002). Une expérience préliminaire pour évaluer cette incidence a été réalisée dans cette optique afin de déterminer l'effet la densité de poissons, *i.e.* nombre de poissons par litre d'eau, sur le pH de l'eau en l'absence de renouvellement continu ou périodique du milieu. A notre connaissance, ce paramètre est rarement étudié. D'autre part, la densité de poissons n'est pas toujours clairement définie dans la littérature. Nous nous sommes basés sur une valeur maximum empirique de 1 g de tissu par litre d'eau.

La **Figure 43** présente la variation du pH de l'eau en fonction du temps relatif à l'introduction des poissons et de la densité de poissons exprimée en poissons par litre d'eau (P/L). De manière générale, l'introduction des poissons dans l'eau douce reconstituée artificiellement et dénommée « eau LRE » (cf. section 3.1.1) à pH 6,5 provoque une augmentation du pH de l'eau significative dès 24 h. Plus la densité de poissons est grande, plus l'impact sur le pH est marqué. Quatre jours après introduction des poissons, l'élévation du pH varie de 0,3 à 0,7 unité de pH pour les densités minimum et maximum, respectivement. Notons ici que l'impact observé sur le pH est directement lié à la composition ionique de l'eau qui en fait un milieu faiblement tamponné.

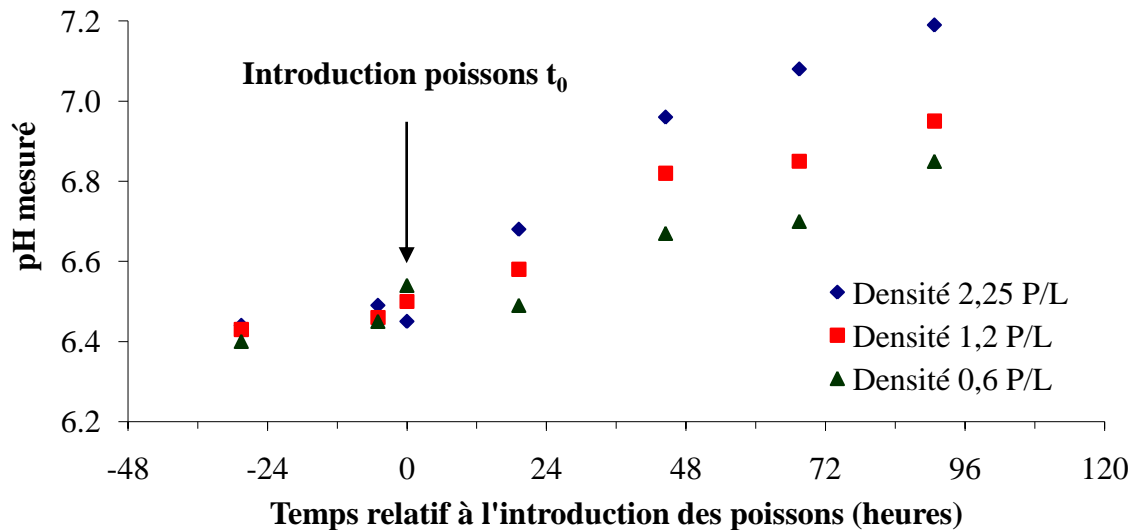


Figure 43 : Evolution du pH dans le milieu d'exposition après introduction des poissons

Cette augmentation du pH est susceptible de causer une variation non souhaitée de la spéciation, *i.e.* distribution des différentes espèces chimiques de l'uranium et donc de la biodisponibilité de l'uranium lorsque celui-ci est ajouté au milieu. La régulation du pH est de ce fait nécessaire afin de (i) garantir le bien être des poissons et (ii) de maintenir constante et équivalente la spéciation et donc de la biodisponibilité de l'uranium dans chaque condition d'exposition au cours du temps. Les modalités de cette régulation doivent prendre en compte le design expérimental (biomasse introduite dans le système) pour garantir son efficacité. Cette régulation est réalisée par le biais du renouvellement de l'eau d'une part et de l'apport automatique d'acide dilué en cas de dérive ponctuelle du pH au-delà de la consigne de 6,5 d'autre part. Au cours de nos expériences d'exposition, il a été choisi de renouveler l'eau en continu et à hauteur de 50% du volume total par jour par le biais d'un système de pompes péristaltiques afin d'automatiser une partie de la maintenance. L'acide nitrique a été choisi pour la rectification du pH car les nitrates (NO_3^-) ne sont généralement pas toxiques pour les poissons et leur influence sur la spéciation de l'uranium est négligeable (Lawrence, 2007). La concentration de 1 mM HNO_3 a été choisie après plusieurs essais car elle apparaît comme la concentration optimale avec laquelle le retour au pH de consigne nécessite généralement un faible volume d'ajout (suffisamment concentré) sans entraîner de brusques fluctuations de pH (suffisamment dilué). En effet, une concentration trop faible (*e.g.* 0,1 mM) ne permettait pas une compensation rapide de la dérive de pH alors qu'une concentration trop élevée (*e.g.* 10 mM) provoquait des pics d'acidité dans le milieu.

Après avoir défini et optimisé les moyens de maintien de la chimie de l'eau, les paragraphes suivants présentent les résultats du suivi de l'exposition des poissons zèbre à l'uranium.

5.1.2 Evolution du pH durant la période d'exposition

Les **Figure 44**, **Figure 45** et **Figure 46** décrivent l'évolution du pH mesuré et moyen dans les dispositifs expérimentaux au cours du temps après le début de l'exposition ainsi que la concentration en nitrites mesurée périodiquement. Le pH moyen représenté par une ligne continue orange est calculé par intégration entre t_0 et $t_{x\text{-jours}}$. Les poissons excrètent des déchets azotés, généralement sous forme d'ammoniaque (NH_3), qui sont très toxiques pour ces derniers (*e.g.* au-delà de 0,02 ppm NH_3 (Lawrence, 2007)). Certains microorganismes se développant dans l'eau permettent l'oxydation de l'ammoniaque ($\text{N}^{(-III)}\text{H}_3$) en nitrites ($\text{N}^{(III)}\text{O}_2^-$) puis en nitrates ($\text{N}^{(V)}\text{O}_3^-$) dont la toxicité vis-à-vis des poissons est très faible (*e.g.* au-delà de 100-200 ppm NO_3^- (Lawrence, 2007)) comparée aux nitrites et à l'ammoniaque. Les nitrites sont donc le produit de l'oxydation partielle des excréments azotés, leur augmentation dans le milieu est toxique (*e.g.* au-delà de 1 ppm NO_2^- (Lawrence, 2007)) pour les poissons et peut être le signe d'un dérèglement de la population de microorganismes dénitrifiant.

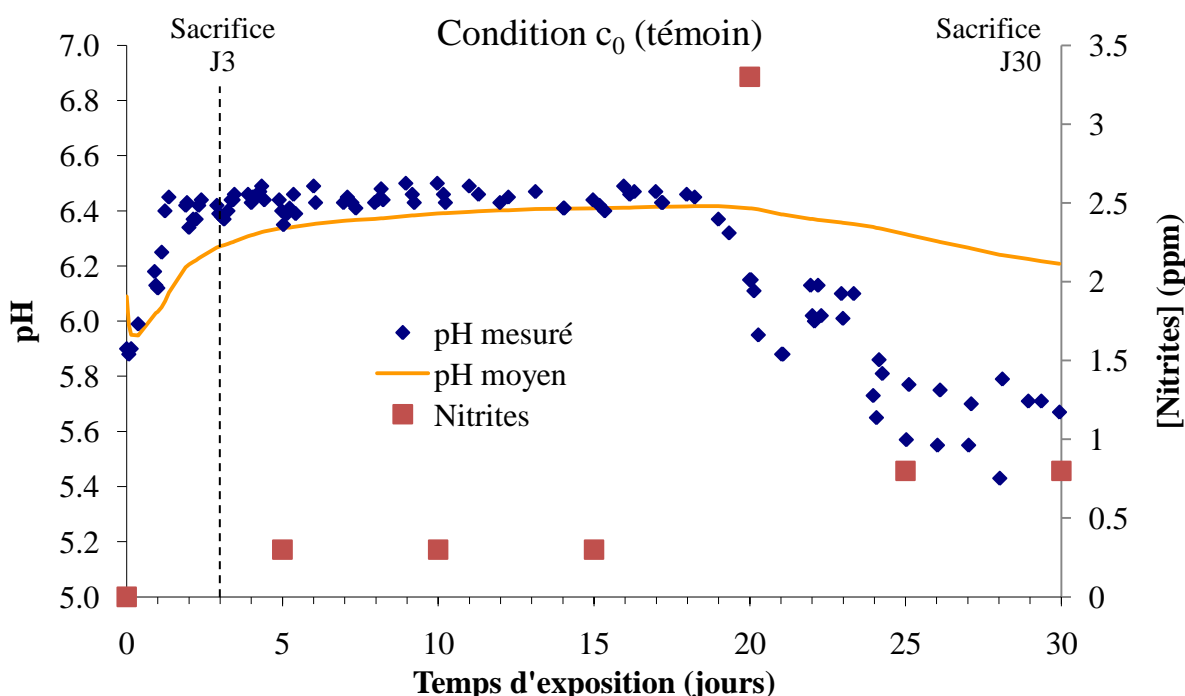


Figure 44 : Evolution du pH et niveau de nitrites dans le milieu d'exposition c_0 (témoin) sur les 30 jours d'exposition

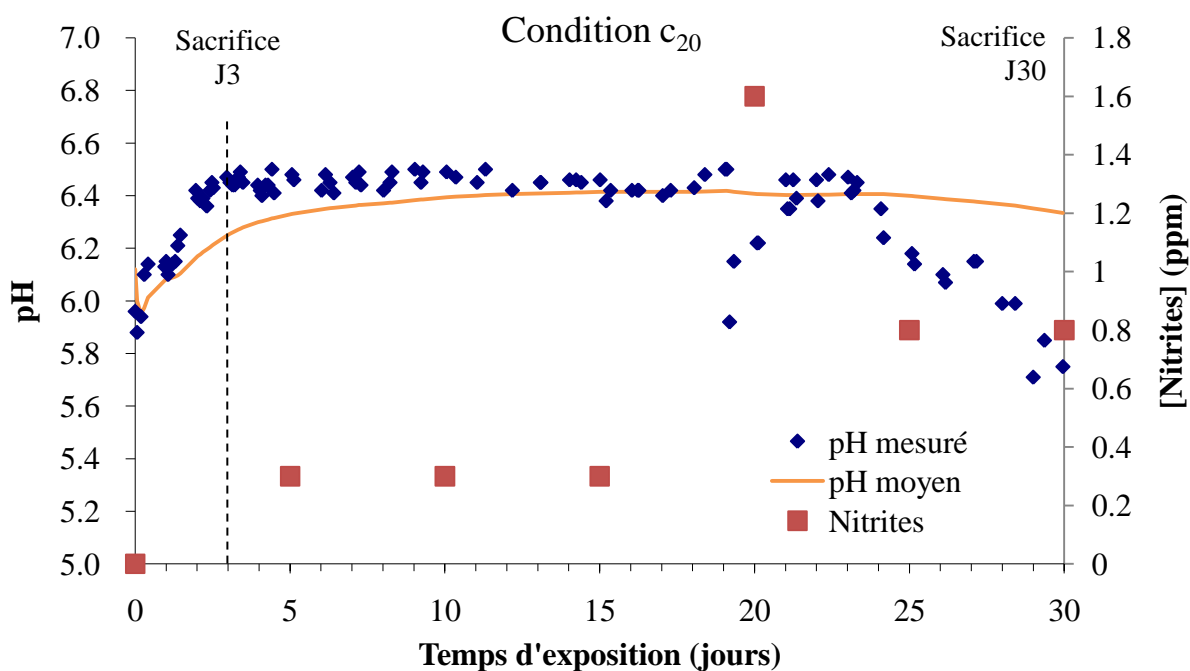


Figure 45 : Evolution du pH et niveau de nitrites dans le milieu d'exposition c_{20} sur les 30 jours d'exposition

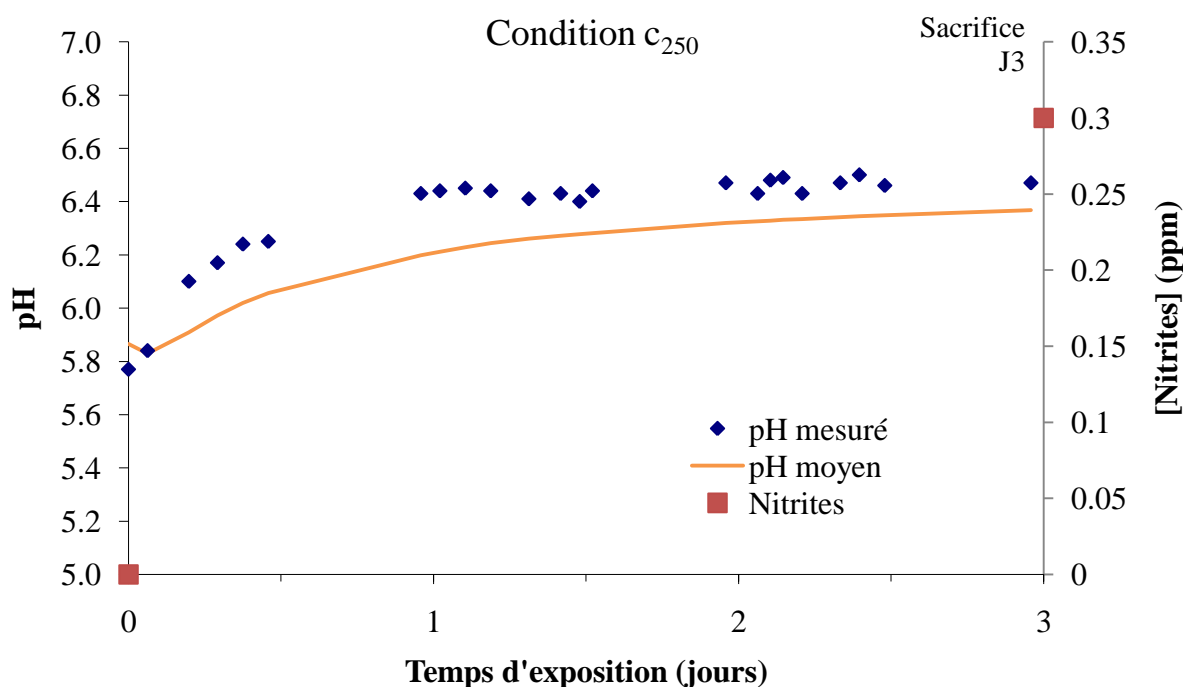


Figure 46 : Evolution du pH et niveau de nitrites dans le milieu d'exposition c_{250} sur les 3 jours d'exposition

Quelle que soit la condition d'exposition le pH lors de l'introduction des poissons (t_0) est de l'ordre de 5,9 puis il remonte rapidement (24-48 h) au niveau de la consigne fixée à 6,5 du fait de l'activité biologique des poissons. Le pH oscille ensuite régulièrement autour de 6,4

jusqu'au 20^{ème} jour d'exposition pour les conditions c_0 et c_{20} et jusqu'au 3^{ème} et dernier jour pour la condition c_{250} . A partir du 20^{ème} jour les deux conditions c_0 et c_{20} subissent une perturbation résultant en une baisse du pH jusqu'à 5,6 à 30 jours pour la condition c_0 . Cette dérégulation du pH coïncide avec (i) une opération de nettoyage des dispositifs expérimentaux et (ii) une augmentation des nitrites dans le milieu. Il est très probable que l'opération de nettoyage ait provoqué une réduction importante de la population de microorganismes causant ainsi un déséquilibre dans le cycle d'oxydation des rejets azotés et sur le maintien du pH. D'autre part, le stress lié au nettoyage peut provoquer chez les poissons des rejets acides aux niveaux des branchies. Playle *et al.* (1982 et 1992) ont mesuré une diminution de 0,5 unité de pH dans l'eau expirée par la truite arc-en-ciel et le poisson tête de boule lorsqu'ils sont exposés à une eau à pH 6,5 (Playle *et al.*, 1992; Playle et Wood, 1989). Ces variations de pH peuvent significativement modifier la spéciation de l'uranium en solution dans le milieu d'exposition (**Figure 47**) ainsi qu'à l'interface eau/branchie avec un impact possible sur la biodisponibilité de ce dernier (Playle, 1998). En effet, certains complexes non-biodisponibles de l'uranium peuvent se dissocier dans des conditions acides et devenir biodisponibles. La Figure 47 décrit la spéciation de l'uranium dans l'eau LRE sur la gamme de pH 5,5 à 7,5 et pour une concentration nominale en uranium de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les espèces majoritaires dans la gamme de pH d'intérêt comprise entre 6 et 6,5 sont UO_2OH^+ , $\text{UO}_2(\text{OH})_2$, UO_2CO_3 et $(\text{UO}_2)_2\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$. L'ion uranyle (UO_2^{2+}) ne représente pas plus de 10% de l'uranium total à pH 6 et seulement 2% à pH 6,5. La majorité de l'uranium biodisponible est donc celui sous la forme UO_2OH^+ , $\text{UO}_2(\text{OH})_2$ et UO_2CO_3 . Des calculs de spéciation ont mis en évidence que les espèces susceptibles d'être biodisponibles, incluant UO_2^{2+} , UO_2OH^+ , $\text{UO}_2(\text{OH})_2$ et UO_2CO_3 (Beaugelin-Seiller *et al.*, 2009; Fortin *et al.*, 2007; Markich, 2002), diminuent de 50 à 25% suite à une augmentation de pH de 6,0 à 6,5 pour la condition c_{250} . De la même manière, une diminution de pH de 6,5 à 6,0 dans la condition c_{20} provoque une augmentation de la quantité d'espèces susceptibles d'être biodisponibles de 63 à 90%. Il est intéressant de noter que la nature de la spéciation ne change pas et les espèces présentes sont identiques sur cette gamme de pH dans les deux conditions. Ces résultats indiquent en revanche l'importance de la régulation du pH pour le maintien de la biodisponibilité. A cet effet, le pH moyen a été maintenu à $6,3 \pm 0,2$ indépendamment de la condition d'exposition, couvrant la gamme de tolérance du poisson zèbre (6,0 – 9,5) (Lawrence, 2007).

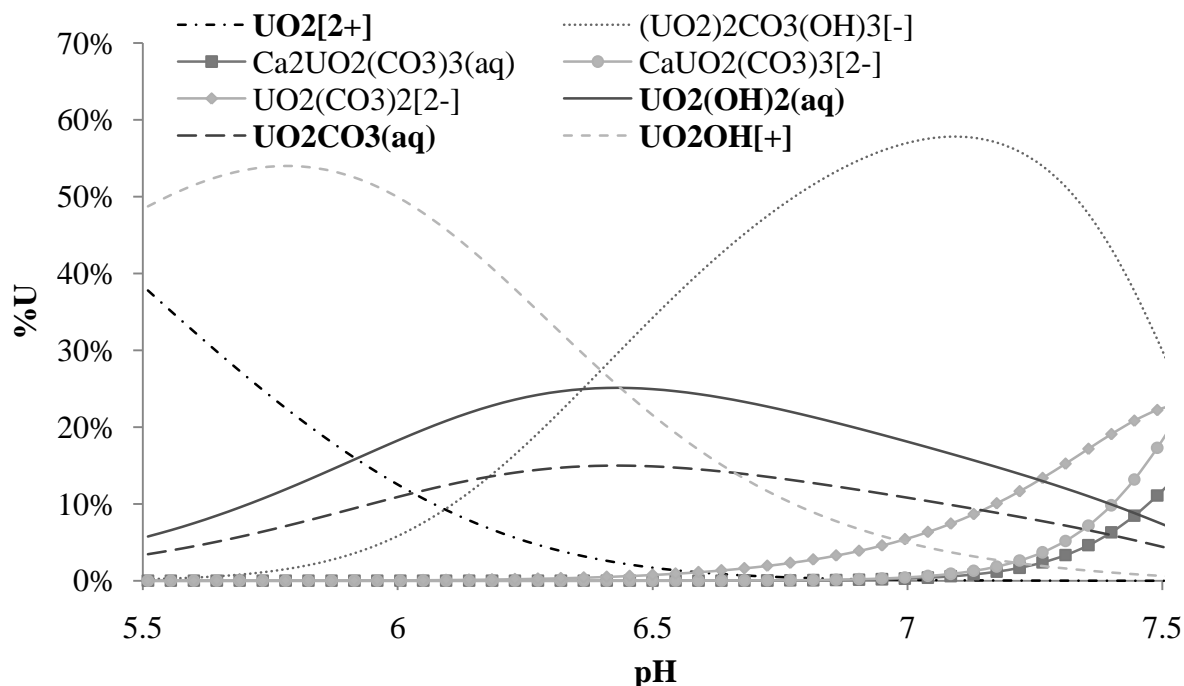


Figure 47 : Spéciation de l'uranium ($20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) à l'équilibre thermodynamique dans l'eau LRE (Simulation CHESS, BDT IRSN LRE v6) en fonction du pH

Aucune différence significative de pH n'a été observée entre les différentes conditions d'exposition au cours du temps. Ceci permet la comparaison des résultats obtenus en fonction de la durée et du niveau d'exposition indépendamment de l'influence du pH sur la biodisponibilité de l'uranium.

5.1.3 Suivi des cations majeurs durant la période d'exposition

Le **Tableau 25** résume les concentrations moyennes en Ca, K, Mg et Na mesurées par ICP-AES sur les périodes de 3 (c_{250}) ou 30 jours (c_0 et c_{20}) dans les 3 conditions d'exposition. Pour ces quatre éléments présents sous forme de cations mono- ou divalents dans le milieu d'exposition, les concentrations sont en accord entre les différentes conditions avec une faible variation temporelle. Les concentrations moyennes en Ca et Mg (cations divalents) sont en parfait accord avec les caractéristiques recherchées pour l'eau LRE (Tableau 25). Les concentrations moyennes en K et Na (cations monovalents) sont environ 20% supérieures aux caractéristiques recherchées (eau LRE) mais l'incertitude de mesure est aussi de l'ordre de 15% sur ces éléments. La nourriture dispensée aux poissons représente une source éventuelle d'apport de sels au milieu d'exposition pouvant expliquer cette différence. Néanmoins, l'ensemble de ces concentrations restent dans une gamme convenable pour le maintien du poisson zèbre (Lawrence, 2007) et de la spéciation de l'uranium.

Tableau 25: Concentrations moyennes en éléments majeurs (Ca, K, Mg et Na) sur la durée d'exposition (30 jours pour c_0 et c_{20} et 3 jours pour c_{250})

$mg.L^{-1}$ (Moyenne \pm Ecart-type)	[Ca]	[K]	[Mg]	[Na]
c_0 (n=13)	12,3 \pm 1,5	7,1 \pm 1,1	4,6 \pm 0,3	8,5 \pm 1,1
c_{20} (n=41)	12,0 \pm 1,1	7,7 \pm 1,2	4,7 \pm 0,4	8,7 \pm 1,1
c_{250} (n=15)	12,1 \pm 0,7	7,4 \pm 1,4	4,7 \pm 0,3	8,5 \pm 0,8
Eau LRE théorique	11,6	5,9	4,7	7,4

5.1.4 Suivi de la pression de contamination durant la période d'exposition

5.1.4.1 Suivi des concentrations en uranium total et dissous

La pression de contamination a été régulièrement suivie et corrigée durant l'ensemble de la durée d'exposition des poissons. Les **Figure 48** et **Figure 49** regroupent les valeurs de la concentration totale en uranium, la concentration totale moyenne (par intégration entre t_0 et $t_{x-jours}$) et la fraction dissoute ($< 0,2 \mu m$) sur l'ensemble de la durée d'exposition. Les résultats ne sont pas détaillés pour la condition c_0 (témoin) puisque cette dernière n'est pas contaminée. Toutefois, des mesures de $[U]_{total}$ ont été réalisées ponctuellement pour cette condition témoin afin de vérifier l'absence de contamination ($[U]_{total} < 0,1 \mu g.L^{-1}$). La concentration basale mesurée est liée à la présence d'uranium naturel dans les sels utilisés pour la fabrication de l'eau.

La concentration totale en uranium oscille de manière plus ou moins importante autour des valeurs consignées de 20 et 250 $\mu g.L^{-1}$ sur la période d'exposition, en particulier pour la condition la plus faible c_{20} . Ces variations s'expliquent par des phénomènes d'adsorption ou de relargage au niveau des parois, des biofilms et de la peau (écailles) des poissons. Suite à l'introduction des poissons (t_0) le pourcentage d'uranium dissous ($[U]_{dissous}/[U]_{total}$) chute rapidement d'une valeur de l'ordre de 80-90% à 60-70% à 3 jours puis se stabilise ensuite pour atteindre 50% à 30 jours (c_{20}). Cette diminution de la fraction dissoute d'uranium peut s'expliquer par l'adsorption de ce dernier sur de la matière organique particulaire en suspension (e.g. biofilms, fèces). Ainsi, 30 à 50% de l'uranium peut être lié à de la matière particulaire et ne pas être biodisponible par voie directe (Cheng *et al.*, 2010; Trenfield *et al.*, 2011). On notera que pour la concentration d'exposition la plus faible (c_{20}), le pourcentage d'uranium dissous est inférieur à celui de la plus forte (c_{250}). La baisse du pourcentage dissous au cours du temps montre qu'en dépit de l'apport régulier d'uranium, le système produit de nombreux ligands (fèces, biofilm) contribuant à la baisse de $[U]_{dissous}$. Pour cette raison, le

suivi de la fraction d'uranium dissous voire labile peut apporter une meilleure indication de la fraction biodisponible (Balistrieri *et al.*, 2012).

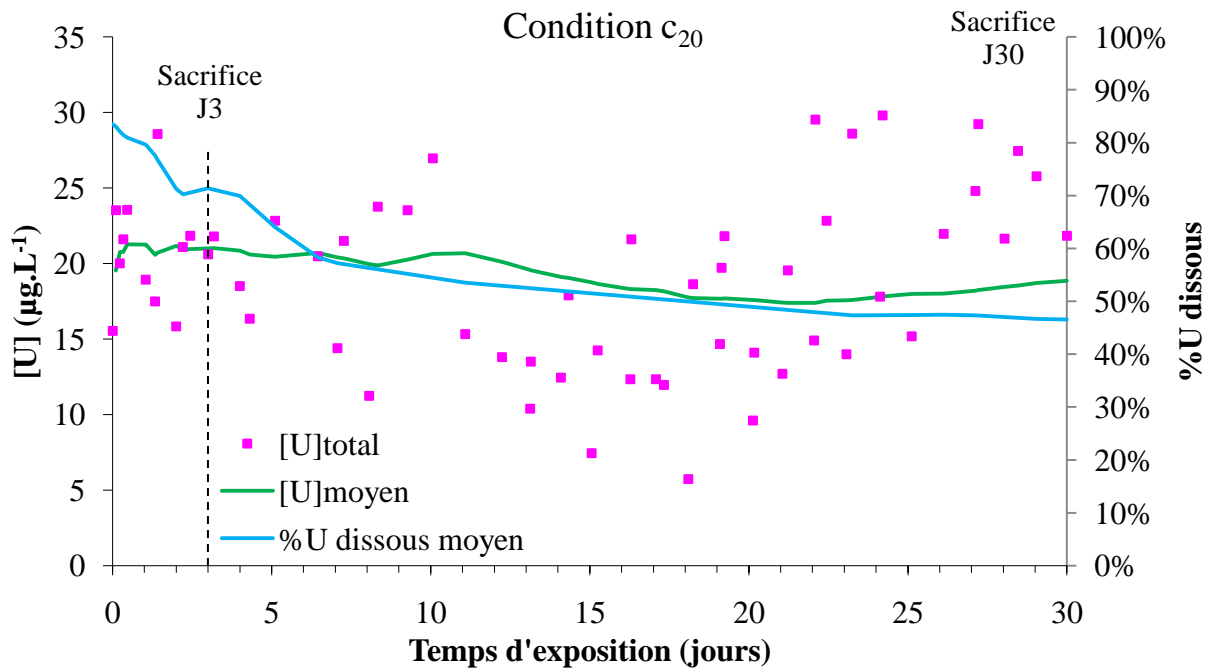


Figure 48 : Evolution de la concentration en uranium total et de la fraction dissoute dans le milieu d'exposition c_{20} sur les 30 jours d'exposition

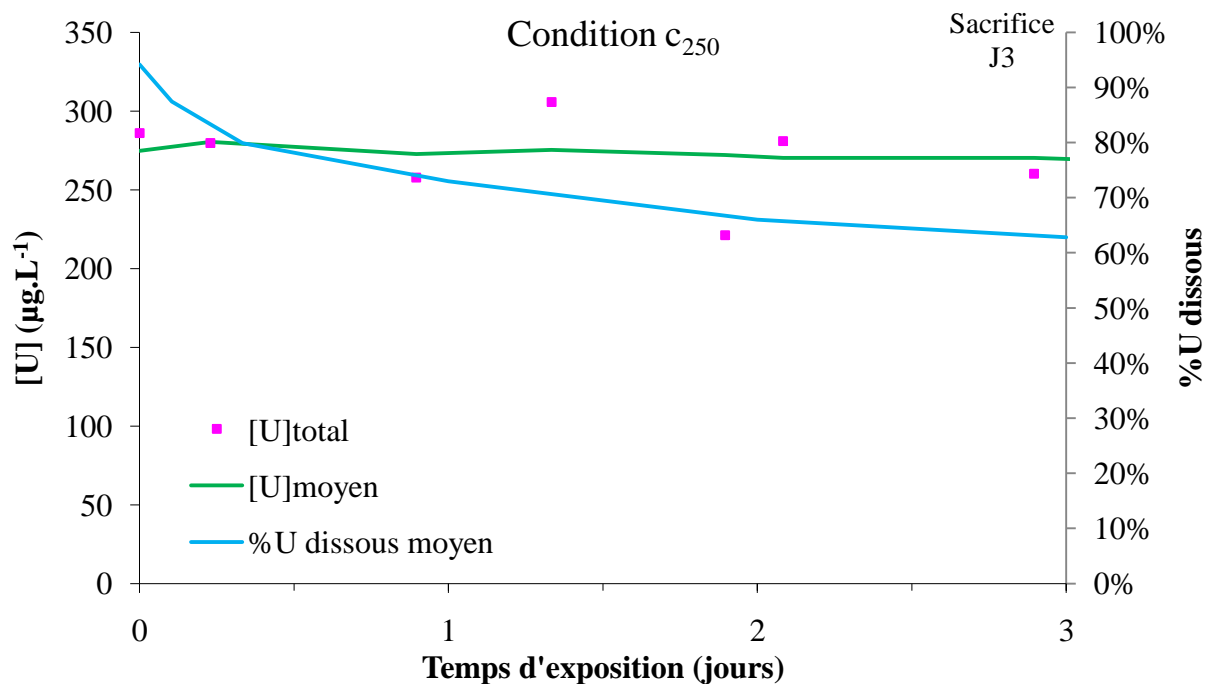


Figure 49 : Evolution de la concentration en uranium total et de la fraction dissoute dans le milieu d'exposition c_{250} sur les 3 jours d'exposition

5.1.4.2 Suivi de la concentration en uranium labile par DGT

Dans cette étude, le suivi des concentrations en uranium total et dissous au cours de l'exposition a été complété par le suivi de l'uranium labile par DGT. Les dispositifs DGT utilisés permettent en effet l'accumulation sélective des ions libres et des complexes ayant une constante de stabilité faible ou une cinétique de dissociation rapide (Davison et Zhang, 2012; Zhang et Davison, 1995, 2000). Ils fournissent en outre une concentration intégrée sur le temps d'exposition susceptible d'être représentative de l'exposition directe des organismes aquatiques (Apte *et al.*, 2005; Balistreri et Blank, 2008; Jordan *et al.*, 2008; Warnken *et al.*, 2008; Warnken *et al.*, 2007). En effet, la DGT a permis la prédiction de l'accumulation de Al et Cu par les branchies des truites brune et arc-en-ciel, respectivement (Luider *et al.*, 2004; Røyset *et al.*, 2005) mais cet outil n'a pas encore été validé pour l'uranium.

En première approche, la concentration moyenne en uranium labile ($[U]_{\text{labile}}$) a été mise en regard de la concentration en uranium théoriquement biodisponible ($[U]_{\text{biodisponible}}$), *i.e.* la fraction de la concentration d'uranium dissous représentée par les espèces supposées biodisponibles. Ainsi, $[U]_{\text{labile}}$ se rapproche de $[U]_{\text{biodisponible}}$ pour c_{20} mais est nettement supérieure pour c_{250} (**Tableau 26**). Ces résultats montrent que $[U]_{\text{labile}}$ ne semble pas entièrement expliquée par la somme des espèces biodisponibles et d'autres espèces sont peut-être à prendre en considération. Le pourcentage d'uranium labile calculée par rapport à l'uranium dissous ($[U]_{\text{labile}}/[U]_{\text{dissous}}$) s'étend de 64 à 68% pour la condition c_{20} et augmente jusqu'à 84% pour la condition c_{250} (Tableau 26). De tels pourcentages ont déjà été mis en évidence par Balistreri *et al.* (2008 et 2012) ainsi que Warnken *et al.* (2009) et peuvent être expliqués par la présence de complexes inorganiques (*e.g.* UO_2^{2+} , UO_2OH^+ , $UO_2(OH)_2$, UO_2CO_3 et $(UO_2)_2CO_3(OH)_3^-$) facilement dissociés ($[U]_{\text{inorganique}}$) et de complexes U-MOD ($[U]_{\text{MOD}}$) diffusant doucement à travers l'hydrogel de la DGT. Si l'on considère que ces complexes organiques U-MOD sont parfaitement labiles, la quantité d'U accumulée par la DGT est proportionnelle à la somme des quantités de chaque espèce de l'U multipliée par leur coefficient de diffusion respectif (Davison et Zhang, 2012; Warnken *et al.*, 2009). Ainsi la valeur théorique de $[U]_{\text{labile}}$ (notée $[U]_{\text{max}}^{\text{dyn}}$) peut être calculée avec l'**Équation 5** suivante :

$$[U]_{\text{max}}^{\text{dyn}} = [U]_{\text{inorganique}} + \frac{D_{U-MOD}^{\text{gel}}}{D_U^{\text{gel}}} \times [U]_{\text{MOD}} \quad \text{Équation 5}$$

Où $D_{U-MOD}^{\text{gel}}/D_U^{\text{gel}}$ est supposé égal à 0,2 (Scally *et al.*, 2006) en considérant que les acides fulviques sont représentatifs de la MOD, $[U]_{\text{inorganique}}$ et $[U]_{\text{MOD}}$ sont obtenues après

simulation à l'aide de Visual MINTEQ à partir de $[U]_{\text{dissous}}$ et du pH mesurés dans chaque condition. En dépit du renouvellement continu de l'eau, une quantité non négligeable de carbone organique dissous doit être présente dans notre dispositif expérimental. Les simulations Visual MINTEQ ont été réalisées avec une concentration en carbone organique dissous (COD) arbitraire de $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ car nous n'avons malheureusement pas pu mesurer le COD dans les prélèvements d'eau. Cette valeur est peut-être en deçà des valeurs réelles minimales qui sont de l'ordre de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ dans l'eau de mer et 1 mg.L^{-1} dans les eaux de pluie ou souterraines (Petitjean *et al.*, 2004). Cependant, les résultats réunis dans le Tableau 26 montrent une bonne concordance entre $[U]_{\text{max}}^{\text{dyn}}$ et la valeur mesurée de $[U]_{\text{labile}}$ dans toutes les conditions. Ces résultats suggèrent qu'au-delà des complexes inorganiques décrits dans la littérature, des complexes U-MOD doivent être pris en considération dans notre expérience afin d'expliquer la valeur de la concentration d'espèces labiles et donc théoriquement biodisponibles. De plus la DGT fournit une concentration intégrée sur la durée d'exposition alors que le calcul de $[U]_{\text{biodisponible}}$ est réalisé sur la base de valeurs moyennes de $[U]_{\text{dissous}}$ et du pH à un temps donné. $[U]_{\text{labile}}$ prend ainsi en considération les variations de pH ponctuelles ayant pu privilégier les espèces labiles.

Tableau 26 : Expérimental : pH et concentrations moyennes en uranium total, dissous et labile pour les différentes conditions et durées d'exposition ; Simulation : concentrations en uranium biodisponible, labile, lié à des ligands inorganiques et lié à de la matière organique dissoute estimées par simulation Visual MINTEQ à partir des données expérimentales ([U]_{dissous} et pH)

		<i>3 jours</i>			<i>30 jours</i>	
		C₀	C₂₀	C₂₅₀	C₀	C₂₀
Expérimental	pH	6,3 ± 0,2	6,3 ± 0,2	6,4 ± 0,2	6,3 ± 0,3	6,3 ± 0,2
	[U]_{total} (µg.L⁻¹)	0,034 ± 0,003	20,8 ± 1,5	265 ± 20	0,12 ± 0,01	18,6 ± 1,4
	[U]_{dissous} (µg.L⁻¹)	n.a.	14,3 ± 1,1	174 ± 13	n.a.	9,7 ± 0,8
	[U]_{labile} (µg.L⁻¹)	n.a.	9,7 ± 0,5	147 ± 5	n.a.	6,2 ± 0,3
Simulation	[U]_{biodisponible}* (µg.L⁻¹)	n.a.	11,8	78,3	n.a.	8,4
	[U]_{max}^{dyn}** (µg.L⁻¹)	n.a.	9,8	161,5	n.a.	6,1
	[U]_{inorganique}† (µg.L⁻¹)	n.a.	8,6	158,3	n.a.	5,2
	[U]_{MOD}† (µg.L⁻¹)	n.a.	5,7	15,6	n.a.	4,5

n.a. : non applicable, défaut de mesures ou incertitude sur le calcul de la DBL pour le calcul de la concentration labile

*Concentration théorique en uranium cumulée des espèces UO_2^{2+} , UO_2OH^+ , $UO_2(OH)_2$, UO_2CO_3 en l'absence de MOD et au pH expérimental

**Concentration labile théorique incluant la contribution des complexes U-MOD dissous (où MOD ~ acides fulviques)

† $[U]_{inorganique} + [U]_{MOD} = [U]_{dissous}$

En conclusion, l'étude de l'exposition montre la nécessité de prendre en compte de nombreux paramètres physico-chimiques pour maintenir la spéciation chimique de l'uranium et le bien-être des poissons. De plus, elle insiste sur le rôle des conditions d'exposition (e.g. densité de poissons, quantité du biofilm, modalité de régulation) choisies par l'expérimentateur pour maintenir constantes les modalités de contamination. L'ensemble des concentrations en uranium expérimentales ont été affinées par les différentes concentrations simulées, consignées dans le Tableau 26. La spéciation et donc la biodisponibilité de l'uranium sont essentiellement gouvernées par le pH dans nos conditions. Ainsi, le maintien du pH dans les trois conditions d'exposition et sur l'ensemble de la durée d'exposition nous permet d'obtenir une spéciation comparable et autorise donc la comparaison des résultats présentés dans les chapitres suivants entre chaque condition. Le premier critère étudié est la bioaccumulation de l'uranium par le poisson zèbre, objet du prochain chapitre.

5.2 Bioaccumulation de l'uranium

Bien que la concentration en uranium mesurée à un temps donné dans chaque organe corresponde à un équilibre entre accumulation et élimination. L'étude de la bioaccumulation et de l'organotropisme de l'uranium permet de donner un aperçu du rôle et du comportement des différents organes face à l'exposition. La place des branchies, voie d'entrée de l'uranium par voie directe, est examinée plus en détail.

5.2.1 Organotropisme

Le **Tableau 27** regroupe les concentrations moyennes en uranium mesurées dans les différents organes des poissons zèbres exposés à l'uranium. A titre de comparaison, les données de bioaccumulation initialement obtenues sur les organes frais pour l'épithélium branchial (détails en section 5.2.2) et les reins (projet ST MALO) ont été ajoutées en respectant le même système d'unité (ngU.mg^{-1} poids sec) et d'incertitude (écart type réduit). Les concentrations les plus élevées en uranium sont trouvées dans le reste des corps qui inclut notamment la peau (écailles), le squelette et le système digestif. Ces concentrations dans le reste de corps sont essentiellement liées au niveau d'exposition puisque l'on observe une augmentation concomitante avec l'augmentation de la concentration d'exposition $c_0 \rightarrow c_{20} \rightarrow c_{250}$. Toutefois, cette augmentation n'est pas proportionnelle et il n'y a que peu de variation entre la concentration moyenne à 3 et 30 jours pour la condition c_{20} . L'adsorption sur les écailles et l'absorption par le squelette représentent probablement une part importante de cette concentration. Néanmoins, le tube digestif peut aussi contenir de l'eau contaminée ingérée par le poisson et contribuer ainsi à la concentration élevée en uranium dans le reste des corps. Le facteur de transfert trophique est cependant faible (Simon *et al.*, 2011b). Les autres organes étudiés présentent des concentrations plus faibles en uranium mais de manière générale, l'ordre d'accumulation est le suivant : foie \approx rein $>$ gonades $>$ muscles et la concentration la plus forte dans ces organes est mesurée pour le niveau d'exposition le plus élevé (c_{250}). Dans la littérature, le foie et les branchies sont des cibles privilégiées de l'uranium chez le poisson zèbre (Barillet, 2007; Lerebours, 2009). Il est important de noter qu'en dépit d'une concentration faible en uranium, les muscles qui représentent une grande fraction de la masse corporelle totale (*ca.* 30%) contiennent une fraction non-négligeable de l'uranium accumulé. Cette quantité pourra être transférée au niveau trophique supérieur.

La concentration en uranium dans les muscles augmente à la fois avec le temps d'exposition (c_{20-3j} vs. c_{20-30j}) et le niveau d'exposition (c_{20-3j} vs. c_{250-3j}). Cette observation est en accord avec la littérature (Lerebours *et al.*, 2009) et reflète peut-être une mise en place des

mécanismes d'élimination assez lente face à l'accumulation dans cet organe. En effet, l'étude de la dépurabilité effectuée par Lerebours *et al.* (2009) sur 8 jours ne montre pas de diminution significative de la charge en uranium dans les muscles.

La concentration en uranium dans les gonades mâles est peu influencée par le temps d'exposition avec une concentration équivalente après 3 et 30 jours d'exposition dans la condition c_{20} . Seul le niveau d'exposition augmente non-significativement la concentration en uranium dans les gonades (c_{20-3j} vs. c_{250-3j}).

Le foie présente une diminution non-significative de la concentration en uranium accompagnée d'une diminution de l'écart type interindividuel à 30 jours (c_{20}). Ce résultat est le signe d'une éventuelle prépondérance des mécanismes de détoxication dans cet organe au temps le plus long. En effet, Lerebours *et al.* (2009) ont mis en évidence une accumulation irrégulière dans le temps (*i.e.* absence de tendance significative) de l'uranium dans le foie suivie d'une dépurabilité efficace (*e.g.* facteur 6-7 en 8 jours).

Selon les données du projet ST MALO, l'accumulation dans le rein est à la fois fonction du niveau et du temps d'exposition. Elle est relativement faible après 3 jours d'exposition dans la condition la plus basse c_{20} mais dix fois plus forte aux mêmes temps d'exposition dans la condition c_{250} . De la même manière, l'accumulation dans le rein est environ dix fois plus importante après 30 jours d'exposition dans la condition c_{20} en comparaison de l'accumulation c_{20-3j} . Ainsi, l'accumulation de l'uranium dans le rein est sensiblement égale dans les conditions c_{20-30j} et c_{250-3j} . Ce dernier résultat est important puisqu'il appuie le choix des conditions d'exposition. En effet, les conditions c_{20-3j} et c_{250-3j} ont non seulement été choisies pour être représentatives des études écotoxicologiques précédentes mais aussi pour obtenir un niveau de bioaccumulation équivalent dans le rein, organe de stockage de l'uranium, et ne pas induire une toxicité biaisant notre analyse de spéciation ultérieure.

Enfin, concernant l'épithélium branchial, l'accumulation de l'uranium est *a priori* fortement dépendante du niveau d'exposition et les concentrations mesurées sont assez élevées. Elles s'approchent de celles observées dans le reste de corps pour les deux conditions c_{20} (3 et 30 jours) et est supérieure pour la condition c_{250-3j} . La masse de l'organe reste cependant faible (< 2% m/m) face au reste de corps. Ces résultats seront discutés plus en détail dans une partie dédiée (cf. section 5.2.2).

Tableau 27 : Concentrations moyennes en uranium (ngU.mg^{-1} poids sec) mesurées dans les gonades, les muscles, le foie, les branchies, le rein et le reste du corps des poissons zèbre en fonction de la condition d'exposition

<i>Concentration moyenne ± écart type réduit (ngU.mg^{-1} poids sec)</i>	Reste Corps	Gonades Mâle	Muscles	Foie	Epithélium branchial[†] (n = 4-5)	Rein^{†*} (n = 3)
c₀-3j (n = 10)	0,2 ± 0,2	0,025 ± 0,003	0,04 ± 0,04	0,07 ± 0,07	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01
c₂₀-3j (n = 8)	3,9 ± 2,0	0,5 ± 0,3	0,15 ± 0,06	1,6 ± 1,1	2,8 ± 0,5	0,14 ± 0,05
c₂₅₀-3j (n = 9)	7,3 ± 3,7	1,1 ± 0,5	0,4 ± 0,2	1,9 ± 1,5	36 ± 12	1,6 ± 0,6
c₀-30j (n = 10)	0,13 ± 0,02	0,022 ± 0,007	0,018 ± 0,004	0,10 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,02
c₂₀-30j (n = 9)	3,6 ± 0,5	0,4 ± 0,2	0,44 ± 0,04	0,9 ± 0,3	3,7 ± 0,3	1,7 ± 0,2
Masse moyenne des organes secs (n = 46)	76 ± 33	1,6 ± 1,0	29 ± 12	1,2 ± 0,9	1,3 ± 0,3 (n = 23)	1,0 ± 0,3 (n = 15)

[†]Concentrations mesurés sur broyat de l'organe frais et recalculée par mg de poids sec avec le ratio : poids sec/poids frais = 0,15

*Données issues du projet ST MALO (Sandrine Frelon et Sandra Mounicou)

Les graphiques en camemberts (**Figure 50**) sont une représentation de la quantité relative moyenne d'uranium présent dans différents organes des poissons. Les résultats présentés incluent la contribution de l'épithélium branchial (*i.e.* arc branchial exclu) et des reins. Le reste des corps représente la majeure partie de l'uranium accumulé par les poissons, *i.e.* 85 à 95%, quelle que soit la condition d'exposition. Parmi les 5 à 15% restant, une grande partie de l'uranium est retrouvée dans les muscles (2,5 à 8,1%) puis l'épithélium branchial (0,3 à 9,7%). Gonades et foie représentent chacun moins de 0,1 à 0,7% de l'uranium corporel. Toutefois, la présence d'uranium dans les gonades peut avoir un impact majeur sur une fonction très importante pour l'espèce qu'est la reproduction. La fraction d'uranium corporel portée par les branchies est fonction de la concentration d'exposition avec moins de 1% pour c₀, environ 2% pour c₂₀ et jusqu'à 10% pour c₂₅₀ mais elle est peu affectée par la durée l'exposition. Ce résultat est à garder en mémoire et sera discuté dans la partie concernant l'accumulation par les branchies. Enfin, en dépit de sa qualité d'organe de stockage pour l'uranium, le rein du poisson zèbre ne concentre pas plus de 0,1 à 0,6% de l'uranium corporel.

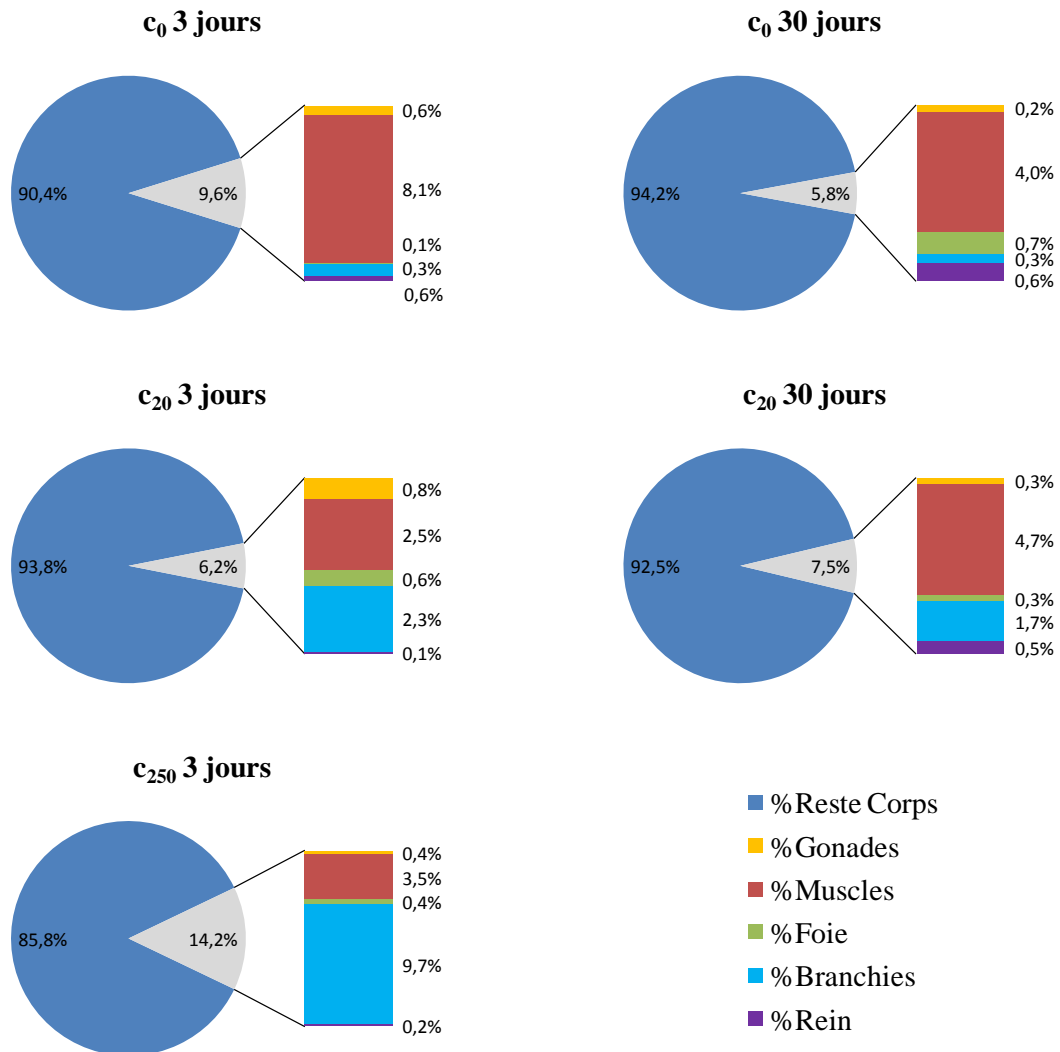


Figure 50 : Répartition relative (%) moyenne de l'uranium dans les organes du poisson zèbre en fonction des modalités (niveau et durée) d'exposition

5.2.2 Répartition au sein des branchies

5.2.2.1 Dans l'organe

Le **Tableau 28** montre les valeurs individuelles ainsi que les moyennes des concentrations en uranium mesurées dans l'épithélium branchial des poissons après exposition par voie directe. Rappelons en effet qu'un effort particulier a été réalisé afin de séparer l'épithélium branchial de l'arc branchial lors de la dissection. Ces valeurs mettent en évidence l'accumulation significative d'uranium dans cet organe dès 3 jours d'exposition, y compris dans la condition la plus faible (c_{20} -3j). Par ailleurs, l'accumulation à 3 jours augmente avec la concentration d'exposition et la quantité accumulée représente une fraction croissante de l'uranium total accumulé dans le corps des poissons à ce même temps d'exposition (Figure 50). En revanche,

pour la concentration d'exposition c_{20} , bien que la concentration branchiale en uranium soit légèrement supérieure à 30 jours (*vs.* 3 jours), cette différence n'est pas significative et les moyennes à 3 et 30 jours sont statistiquement équivalentes. Dans nos conditions, les concentrations mesurées dans les branchies ne sont pas fonction de la durée d'exposition. Ainsi, cet organe peut être utilisé comme marqueur d'exposition. De la même manière, la fraction d'uranium portée par les branchies vis-à-vis du corps entier est du même ordre de grandeur à 3 et 30 jours (Figure 50). Seule la variabilité inter-individu, représentée par l'écart type, diminue à 30 jours. Les données de bioaccumulation présentées par Lerebours *et al.* (2009) montrent une augmentation significative de la charge branchiale en uranium entre 3 et 21 jours chez le poisson zèbre exposé à $20 \mu\text{g.L}^{-1}$. Ce résultat est *a priori* en désaccord avec nos observations cependant, les auteurs notent que la présence de l'arc branchial est susceptible de concentrer de l'uranium par échange éventuel avec le calcium (Lerebours *et al.*, 2009). Ceci constitue une différence majeure avec notre étude puisque seul l'épithélium branchial a été analysé ; cette forme de stockage n'est donc pas envisageable. Le phénomène d'accumulation rapide observé pour les branchies dans la présente étude est en accord avec le positionnement des branchies en tant que première barrière biologique faisant face à une contamination par voie directe et avec l'hypothèse selon laquelle les branchies vont s'équilibrer rapidement après le début de l'exposition aux caractéristiques de l'environnement auquel elles sont exposées (McGeer *et al.*, 2000). Conformément aux prévisions du BLM (Paquin *et al.*, 2002), l'accumulation branchiale de l'uranium dépend essentiellement du niveau plutôt que de la durée d'exposition. On notera toutefois que le ratio entre la concentration branchiale moyenne et la concentration dissoute en uranium dans le milieu d'exposition (facteur d'accumulation) à 3 jours est sensiblement identique pour c_{20} et c_{250} avec 29 et 31, respectivement, indiquant que le niveau d'exposition n'a pas d'influence sur l'efficacité de transfert. En considérant que le taux d'accumulation est constant sur la durée d'exposition, l'absence d'effet temps sur l'accumulation de l'uranium par les branchies entre 3 et 30 jours à c_{20} peut indiquer l'atteinte d'un plateau entre la prise en charge et l'élimination de l'uranium. Ce phénomène a déjà été observé pour Cu et Cd après exposition chronique sublétales sur 65 jours de la truite arc-en-ciel (McGeer *et al.*, 2000). D'autre part, les résultats de Lerebours *et al.* (2009) n'indiquent aucune variation significative sur la bioaccumulation de l'uranium dans les branchies de poissons zèbre exposés cette fois à $130 \mu\text{g.L}^{-1}$ durant 28 jours. La variabilité inter-individu concernant la concentration branchiale en uranium à 3 jours est importante et le ratio entre l'accumulation des individus c_{250-3j} et c_{20-3j} varie de 3 à 50 avec une valeur moyenne de 13. Ce ratio moyen de 13 est comparable au ratio de 12,2

calculé entre les concentrations en uranium dissous dans les milieux d'exposition respectifs ($[U]_{\text{dissous}}$ 174 et $14,3 \mu\text{g L}^{-1}$) montrant ainsi que l'accumulation branchiale est corrélée proportionnellement à la concentration dissoute. Néanmoins, cette corrélation est uniquement observée pour les valeurs moyennes alors que l'accumulation est très individu-dépendante pour cette courte durée d'exposition.

Tableau 28 : Concentrations individuelles et moyennes en uranium ($\text{pgU}\cdot\text{mg}^{-1}$ poids frais) dans les branchies du poisson zèbre en fonction de la condition d'exposition

<i>pgU.mg⁻¹ poids frais</i>	<i>3 jours</i>			<i>30 jours</i>	
	c₀ (n = 4)	c₂₀ (n = 5)	c₂₅₀ (n = 5)	c₀ (n = 4)	c₂₀ (n = 5)
Valeurs individuelles de [U]_{Branchies} triées dans l'ordre croissant	4,0	206	1984	2,9	426
	4,9	363	2648	4,2	484
	5,1	377	3307	4,5	558
	7,8	432	8040	5,7	624
		689	10917		674
Moyenne	5,5^a	413^b	5379^c	4,3^a	553^b
Ecart type	1,6	176	3906	1,2	101

Les lettres (a, b ou c) en exposant indiquent l'équivalence statistique de deux moyennes (ANOVA seuil critique $\alpha = 5\%$).

5.2.2.2 Répartition subcellulaire

La distribution subcellulaire de l'uranium a été mesurée à l'échelle de l'individu dans toutes les conditions avec un taux de recouvrement de l'uranium moyen ($(m_{\text{U-dans-culot}} + m_{\text{U-dans-cytosol}})/m_{\text{U-dans-branchies}}$) de $92 \pm 8\%$. La concentration moyenne en uranium dans la fraction cytosolique de l'épithélium branchial est de 105, 149 et $1613 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ de branchie fraîche pour les conditions c_{20-3j} , c_{20-30j} et c_{250-3j} , respectivement. L'augmentation de la concentration cytosolique en uranium est rapide et suit l'augmentation de la concentration d'exposition. Cette augmentation avec la concentration d'exposition est en accord avec des données concernant l'accumulation de Zn et Cd dans les branchies de la truite arc-en-ciel (Sappal *et al.*, 2009). La quantité d'uranium présente dans la fraction cytosolique est significativement corrélée ($R^2 > 0,97$) à la quantité d'uranium totale mesurée dans les branchies (**Figure 51**). Ce type de corrélation linéaire a déjà été mis en évidence pour Cd, Cu et Zn dans le foie et les reins de la carpe de Prusse (*Carassius gibelio*) (Van Campenhout *et al.*, 2010). Les pentes des droites de régression (Figure 51) indiquent que $24 \pm 2\%$ et

32,0 ± 0,6% d'uranium sont présents dans la fraction cytosolique pour les individus c_{20} et c_{250} , respectivement. La fraction d'uranium cytosolique reportée par Simon *et al.* (2011) dans les branchies du bivalve *Corbicula fluminea* après une exposition comparable à c_{20} (e.g. 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ – 10 jours) est du même ordre de grandeur avec environ 20%. En revanche, dans une condition comparable à c_{250} (e.g. 100 et 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ – 10 jours), la fraction cytosolique de *Corbicula fluminea* ne représente que 10% de l'uranium branchiale contre 32% pour le poisson zèbre. Cette différence peut s'expliquer par le fait que le bivalve a été exposé 10 jours et, comme les mécanismes d'excrétion sont plus rapide que chez le poisson (Labrot *et al.*, 1999) ils peuvent être prédominant à l'assimilation après 10 jours. Par ailleurs, contrairement au poisson, le bivalve possède la capacité de se fermer pour une période prolongée lorsque qu'il est soumis à un stress ce qui résulte en une moindre quantité d'eau filtrée et une accumulation réduite de l'uranium (Tran *et al.*, 2004). Dans cette étude, la plus forte concentration branchiale en uranium, ainsi que la plus grande fraction d'uranium cytosolique (+8%) dans les cellules branchiales dans le cas c_{250} par rapport à c_{20} , peuvent indiquer une plus grande proportion d'uranium métaboliquement accessible et potentiellement toxique à c_{250} . Néanmoins, le cytosol contient aussi de nombreuses protéines dédiées à la détoxification des métaux, détoxification qui se produit généralement par association avec des biomolécules capables de séquestrer, stocker et/ou transporter les métaux. Ainsi, il apparaît indispensable d'identifier ces biomolécules en question afin de comprendre le devenir et la toxicité de l'uranium dans les branchies.

Toujours d'un point de vue compartimentalisation, la concentration moyenne en uranium dans les culots est de 280, 370 et 3301 pg.mg^{-1} de branchie fraîche pour les conditions c_{20} -3j, c_{20} -30j et c_{250} -3j, respectivement, ce qui représente en moyenne 68 à 75% de l'uranium branchial. Cette quantité importante d'uranium peut être présente dans différents compartiments sensibles de la cellule tels que le noyau et les mitochondries (Al Kaddissi *et al.*, 2011; Barillet *et al.*, 2011) ainsi que des compartiments dédiés à la détoxification tels que les lysosomes dans le cas d'une exposition très forte (Pereira *et al.*, 2012) ou les granules riches en métaux dans le cas d'une exposition environnementale (Simon *et al.*, 2011a).

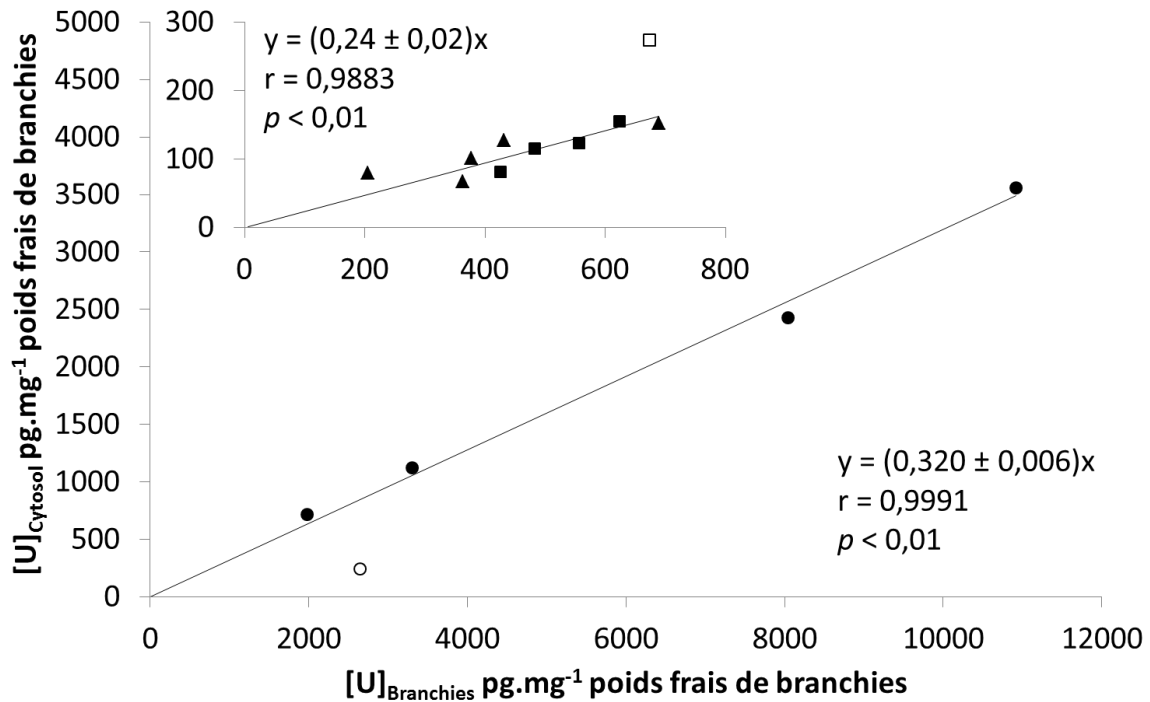


Figure 51: Relation linéaire entre les concentrations en uranium dans l'épithélium branchial et le cytosol pour les échantillons c_{250-3j} (cercles), c_{20-3j} (triangles) et c_{20-30j} (carrés) ; les symboles creux représentent des valeurs définies comme aberrantes par un Q-Test au seuil 90% ; la pente représente la fraction d'uranium cytosolique

Si la majorité de l'uranium est trouvée dans le compartiment regroupant le squelette, la peau (écailles) et le système digestif, les branchies présentent des concentrations élevées en uranium en raison de leur positionnement comme voie d'entrée lors de la contamination par voie directe. Dans cette étude, le niveau de contamination de la branchie ainsi que le pourcentage d'uranium cytosolique sont essentiellement fonction de la pression de contamination plutôt que de la durée d'exposition. Le prochain paragraphe s'attache à l'étude de l'influence de l'exposition à l'uranium sur l'intégrité des tissus branchiaux ainsi qu'à l'éventuelle présence de granules d'uranium.

5.3 Etude histologique et MET-EDX des tissus branchiaux

Dans une étude parue en 2010, Barillet *et al.* ont mis en évidence des atteintes histologiques au niveau des tissus branchiaux du poisson zèbre suite à une exposition par voie directe à l'uranium appauvri à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ durant 20 jours dans l'eau LRE (pH 6,5). Les effets observés sont des œdèmes des cellules épithéliales et une hyperplasie des cellules à chlorures. Il a aussi été montré que ces effets sont plus prononcés dans le cas d'une exposition à un mélange d'uranium appauvri dopé à l'uranium 233 (*ca.* 7% massique) avec un effondrement important de la structure branchiale (Barillet *et al.*, 2010). La **Figure 52** regroupe les images issues de l'observation des tissus branchiaux au microscope optique dans nos cinq conditions d'exposition.

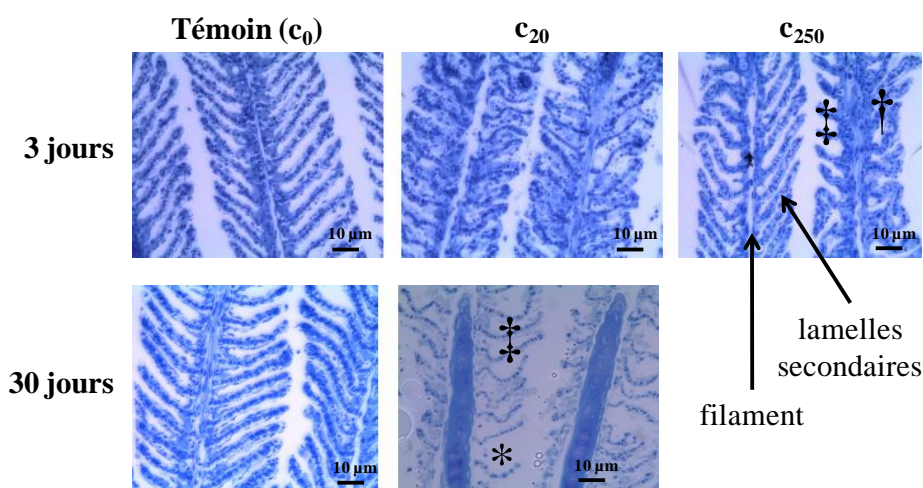


Figure 52 : Observation de coupes des tissus branchiaux au microscope optique (zoom 40x) dans chaque condition d'exposition († = gain de mucus, ‡ = perte de mucus et * = absence de lamelle)

Les témoins à 3 et 30 jours présentent un aspect normal des filaments et lamelles secondaires avec un arrangement rectiligne et homogène. Ce résultat indique que les variations ponctuelles de pH et de concentration en nitrites durant l'exposition n'ont pas causé de dommages sévères au niveau tissulaire. La condition c_{20} à 3 jours ne montre pas d'atteinte particulière à l'exception d'une irrégularité de la disposition des lamelles. En revanche, la condition c_{250} à 3 jours fait apparaître un espacement et une orientation hétérogène des lamelles accompagnés d'une perte (‡) ou d'un gain de mucus (†). Enfin, la condition c_{20} à 30 jours présente les altérations les plus importantes. Ces altérations ressemblent à celles observées par Barillet *et al.* (2010) lors de l'exposition au mélange d'uranium appauvri dopé à

l'uranium 233. Les tissus sont plus lâches et abîmés avec une perte de mucus (‡) et l'absence de certaines lamelles (*). L'ensemble de ces atteintes histologiques, et en particulier celles observées à 30 jours dans la condition c_{20} , peuvent impacter le fonctionnement normal de l'organe.

Dans une problématique d'étude de la compartimentalisation de l'uranium après exposition et d'analyse d'une fraction de métal biologiquement inactive (BIM), les mêmes échantillons ont été préparés et analysés par microscopie électronique à transmission (MET) couplée à la détection élémentaire par spectroscopie des rayons X à dispersion en énergie (EDX) à la recherche de granules, précipités ou agrégats intracellulaire d'uranium. En effet, la formation de granules riches en métaux (MRG) fait partie des moyens mis en œuvre par les organismes pour la détoxification des métaux (Geffard *et al.*, 2010; Vijver *et al.*, 2004). Ces MRG ont déjà été mis en évidence par MET pour l'uranium dans les branchies du bivalve *Corbicula fluminea* après exposition aiguë ($500 \mu\text{g.L}^{-1}$ – 10 jours) et chronique ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$ – 90 jours) (Simon *et al.*, 2011a). Chez le poisson, des granules d'uranium ont uniquement été observés dans les branchies de *Danio rerio* lors d'une exposition à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ durant 20 jours à un mélange d'uranium appauvri dopé à l'uranium 233 (*ca.* 20% massique). Dans notre étude, quelle que soit la condition d'exposition aucun précipité, agrégat ou granule d'uranium n'a été observé dans les parties explorées des branchies. Ce résultat indique probablement une contamination diffuse des compartiments sensibles de la cellule. Cependant, il est possible que des granules existent dans des parties inexplorées ou bien encore que la sensibilité de l'EDX, dont la limite de détection est estimée à 10 ng.mg^{-1} , n'ait pas été suffisante dans notre cas.

Des altérations histologiques des tissus branchiaux ont été observées dès 3 jours d'exposition à la concentration la plus forte (c_{250}). Les altérations sont plus importantes à 30 jours pour la condition c_{20} et peuvent nuire au fonctionnement normal de l'organe. D'autre part, nous n'avons aucun indice en faveur de la détoxification de l'uranium par la formation de granules dans les tissus branchiaux dans nos conditions d'exposition au stade actuel de l'étude MET-EDX. Rappelons cependant que dans le cas de l'uranium, la formation de MRG ne résoudrait pas le problème de la toxicité radiologique. Le chapitre suivant s'attache à l'étude d'un autre compartiment d'intérêt toxicologique représenté par le cytosol.

5.4 Etude de la distribution cytosolique de l'uranium par SEC-ICP-SFMS

Afin d'identifier les fractions protéiques d'intérêt, *i.e.* celles liant l'uranium, en fonction des conditions d'exposition, l'exploration de l'uranium cytosolique des cellules branchiales (*i.e.* 24 à 32% de l'uranium branchial) a été réalisé par SEC-ICP-SFMS.

La **Figure 53** montre les chromatogrammes typiques ICP-SFMS de ^{238}U et UV à 280 nm obtenus pour les cytosols dans chaque condition d'exposition. Seule l'absorbance à 280 nm, représentative des acides aminés aromatiques contenus dans les protéines, est représentée ici. L'absorbance à 225 nm, représentative des liaisons peptidiques dans les protéines, donne un profil identique. Cependant, l'élution d'un ou plusieurs composés, absorbant à cette longueur d'onde, forme un pic très intense, centré vers 55 kDa, qui cache certains pics mineurs intéressants par la suite pour l'analyse multiélémentaire. La concentration cytosolique en protéines est équivalente entre les différents individus et les différentes conditions avec en moyenne $76 \pm 12 \mu\text{g}$ de protéines. mg^{-1} poids frais de branchies et les protéines sont quantitativement éluées en SEC (taux de recouvrement = $110 \pm 12\%$; $n = 4$). Les protéines sont distribuées sur l'ensemble de la gamme de séparation (1 – 670 kDa) de la colonne d'exclusion stérique. Les pourcentages d'aire sous chaque pic UV, rapporté à l'aire totale du chromatogramme, ne varient pas significativement entre les conditions d'exposition à l'U et les individus. Les profils protéiques sont donc identiques entre les différentes conditions d'exposition. Le signal des protéines ne se superpose pas directement avec le signal de l'uranium et deux pics UV, non co-élués avec l'uranium, sont systématiquement détectés après le volume total de la colonne à 31 et 35 min.

La distribution de l'uranium 235 est identique à celle de l'uranium 238 avec un rapport d'intensité conforme à l'isotopie de l'uranium appauvri. Le taux de recouvrement de l'uranium varie de 10 à 90%, le plus faible étant mesuré pour les échantillons c_{250} (cf. section 4.3.1). Ce faible taux de recouvrement indique qu'une grande partie de l'uranium est piégé sur la colonne. Il est possible qu'une partie plus importante de l'uranium accumulé dans le cytosol soit sous forme libre ou lié très faiblement à des biomolécules pour la condition de haute accumulation c_{250-3j} . Il peut aussi s'agir de complexes U-biomolécule dont la constante de stabilité est plus faible que l'affinité de l'uranium pour la phase stationnaire constituée d'un polymère réticulé d'agarose-dextran (polysaccharides). Le cation uranyle peut aussi lier un ou deux anions acétate (CH_3COO^-) de la phase mobile, toutefois, les constantes de formation de ces espèces sont faibles (Ray *et al.*, 2010).

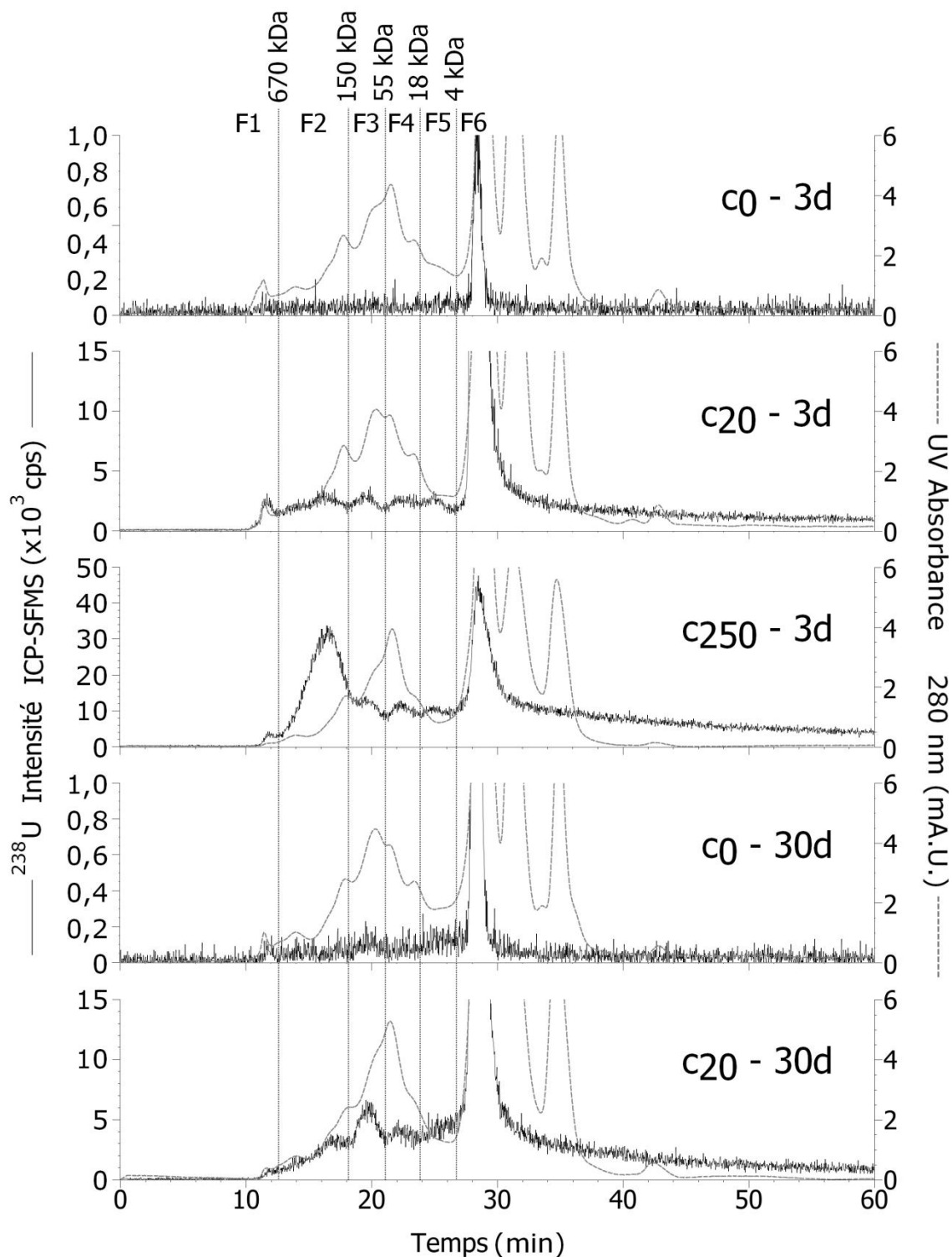


Figure 53 : Profils SEC-ICP-SFMS typiques obtenus pour les cytosols de chaque condition d'exposition avec le signal ^{238}U (trait plein noir) et le signal UV 280 nm (trait pointillé gris) ; les six fractions identifiées sont délimitées par des traits pointillés verticaux et le marquage des poids moléculaires est obtenu à partir de la calibration de la colonne SEC

A partir des chromatogrammes (Figure 53), six fractions, couvrant l'ensemble de la gamme de séparation de la colonne, ont été définies indépendamment de la condition d'exposition. La première fraction (F1) contient peu d'uranium et correspond au volume d'exclusion (ou volume mort) de la colonne. Il s'agit essentiellement de complexes ou d'agrégats protéiques dont la masse molaire est supérieure à environ 670 kDa. La seconde fraction (F2) couvre une large gamme de masse comprise entre 150 et 670 kDa. Les trois fractions suivantes (F3 à F5) comprennent les espèces de masse molaire comprise entre 55-150, 18-55 et 4-18 kDa, respectivement. Enfin, la dernière fraction (F6) est généralement observée sous forme d'un pic fin et intense et correspond à de l'uranium lié à des composés de moins de 4 kDa tels que des acides aminés, des peptides ou des métabolites de petite taille. L'injection d'uranium inorganique sous forme de carbonates produit un pic différent de F6 qui élué 40 secondes plus tard (données non présentées). L'hétérogénéité de la distribution de l'uranium laisse présager des interactions non spécifiques entre l'uranium et les protéines mais aussi d'une affinité différentielle selon la nature des biomolécules.

La **Figure 54** montre, pour chaque condition, la distribution relative de l'uranium parmi les six fractions définies précédemment en termes de pourcentage d'aire représenté par chaque fraction par rapport à l'aire totale du chromatogramme. La distribution de l'uranium dans les échantillons c_{20} est similaire à celle des témoins (c_0) quelle que soit la durée d'exposition (3 ou 30 jours). La majeure partie de l'uranium (70 à 80%) est présente dans la fraction inférieure à 4 kDa (F6) alors que le reste de l'uranium est également réparti entre 4 et 670 kDa. La fraction exclue (F1) représente moins de 3% de l'uranium total alors que les fractions F3 à F5 (4 à 150 kDa) en contiennent 15% pour la condition c_{20} .

La distribution de l'uranium est différente dans le cas de la contamination la plus forte c_{250} , indiquant ainsi un schéma de prise en charge de l'uranium par les protéines cytosoliques potentiellement différent en fonction du niveau d'exposition. En effet, une fraction équivalente d'uranium (*ca.* 40%) est trouvée dans les fractions 150 à 670 kDa (F2) et celle inférieure à 4 kDa (F6) alors que la proportion entre ces deux fractions est de l'ordre de 10 et 70%, respectivement dans la condition c_{20} . Les fractions F3 à F5 représentent, comme pour c_{20} , environ 15% de l'uranium total. Sur le plan quantitatif, les 40% d'uranium trouvés dans la fraction F6 de c_{250} correspondent à 0,8 à 6 fois la quantité d'uranium trouvée dans la même fraction F6 de c_{20} selon les individus considérés (*e.g.* $Aire_{\min}\text{-F6-}c_{250}/ Aire_{\max}\text{-F6-}c_{20} = 0,8$; $Aire_{\max}\text{-F6-}c_{250}/ Aire_{\min}\text{-F6-}c_{20} = 6$). De la même manière, la quantité d'uranium trouvée dans la fraction F2 de c_{250} est 3 à 30 fois supérieure à celle trouvée dans F2 de c_{20} à l'exception d'un échantillon $c_{20}\text{-3j}$ qui présente un profil de type c_{250} (*i.e.* 40% d'uranium en F2 et F6).

La quantité significative ($\approx 15\%$) d'uranium retrouvée dans les fractions F3 à F5, quels que soient le niveau et la durée d'exposition, revêt une importance au sens toxicologique puisque d'après De Souza *et al.* (2009), les fractions couvrant la gamme allant de 4 à 150 kDa (F2 à F5) incluent des protéines impliquées dans les fonctions respiratoires (F4 et F5) ainsi que dans l'homéostasie des ions, des acides et des bases (F2 à F4). La présence d'un métal non-essentiel dans ces fractions pourrait alors altérer ces fonctions essentielles.

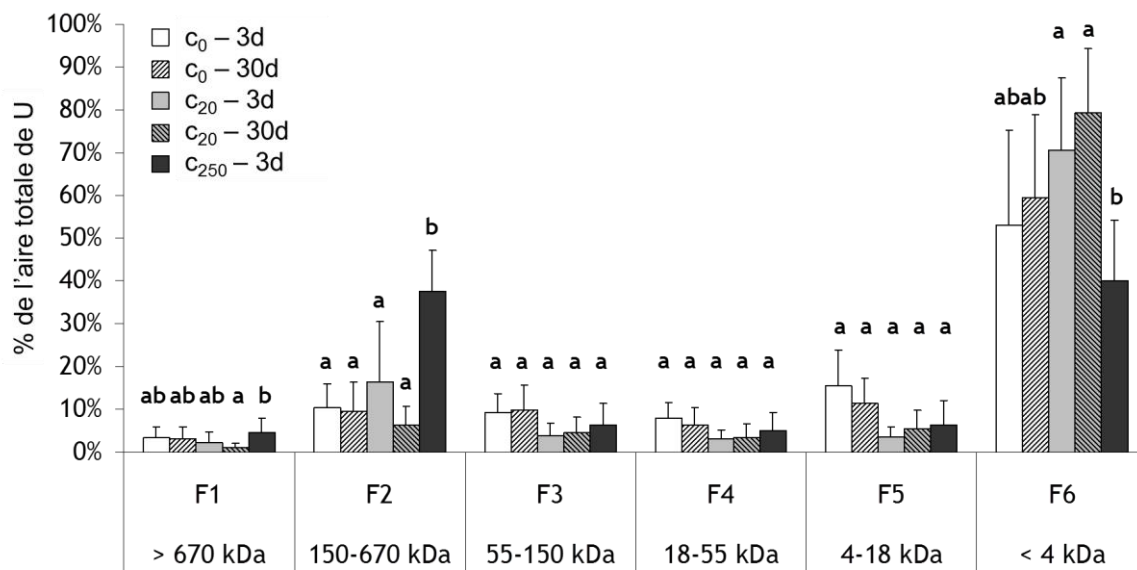


Figure 54 : Distribution de l'uranium parmi les six fractions définies dans les chromatogrammes (aire de chaque fraction rapportée à l'aire totale du chromatogramme) ; n = 4 (c₀) et n = 5 (c₂₀ et c₂₅₀) ; les lettres a et b définissent des groupes statistiquement différents (Test de Mann-Whitney au seuil $\alpha = 5\%$)

Dans la condition d'exposition la plus forte (c₂₅₀), la grande proportion d'uranium présente dans la fraction (F2) peut rendre compte d'un mécanisme permettant à un excès d'uranium de complexer des protéines de haut poids moléculaire (HPM) différentes de celles impliquées dans la condition c₂₀. En effet, la quantité d'uranium présente dans le cytosol peut avoir été assez élevée pour saturer les capacités de détoxication des molécules de bas poids moléculaire (BPM) avec pour effet la complexation de l'uranium par des molécules de HPM. Ces protéines peuvent potentiellement prendre part dans des mécanismes de détoxication comparables à celui mettant en jeu les MRP (Multi-drug Resistance Proteins, 175 kDa) dans la prise en charge présumée des métaux lourds après *primo* complexation de ces derniers avec la GSH (Long *et al.*, 2011a; Long *et al.*, 2011b; Long *et al.*, 2011c). Il faut toutefois noter que

la complexation du cation dur uranyle avec le groupement mou thiol porté par la GSH n'est pas favorisée. Bien que l'approche puisse être considérée comme simpliste (Frelon *et al.*, 2013; Sappal *et al.*, 2009), l'apparition soudaine de métal dans une fraction de HPM a été introduite comme le phénomène de « débordement » cellulaire ou « spillover » (Cain et Luoma, 1998; Maret, 2010; Wright et Welbourn, 2002). Dans tous les cas, la présence d'uranium dans les fractions F2 et F3 (55-670 kDa) peut aussi s'avérer toxique puisque ces fractions contiennent des protéines dont l'activité biologique est sensible à la présence de métaux non-essentiels (Wright et Welbourn, 2002).

Enfin, les 70-80% d'uranium présents dans la fraction de BPM F6 dans la condition c_{20} peuvent être considérés comme majoritairement détoxifiés vue la capacité généralement attribuée aux fractions de BPM telles que F5 et F6 (1,8 à 18 kDa) de détoxifier les métaux notamment par le biais des protéines de la famille des métallothionéines (MT) (Geffard *et al.*, 2010). En effet, les MT (≈ 7 kDa) sont connues pour être impliquées dans la détoxification des métaux (Amiard *et al.*, 2006; Wright et Welbourn, 2002), toutefois, l'affinité de l'uranium pour les groupements thiol des métallothionéines est plutôt faible (Cooley *et al.*, 2000; Michon *et al.*, 2010). En outre, l'expression de la MT mesurée dans différents organes d'écrevisses exposées à l'uranium est modifiée de manière aléatoire (Al Kaddissi *et al.*, 2011). Enfin, ces fractions de BPM peuvent inclure des protéines susceptibles de lier l'uranium autres que celles impliquées dans la détoxification. On peut notamment citer la calmoduline (16,8 kDa) (Pardoux *et al.*, 2012), une protéine liant Ca^{2+} et ayant un rôle dans certains processus enzymatiques (Fujisawa, 2001; Hook et Means, 2001).

10 à 90% de l'uranium cytosolique total sont élués de la SEC. La distribution de l'uranium parmi le pool protéique des cytosols des cellules branchiales est probablement représentative des complexes U-biomolécule les plus forts. L'influence du niveau d'exposition sur cette distribution a été mise en évidence. Près de 80% de l'uranium est pris en charge dans la fraction de BPM (≤ 4 kDa) potentiellement détoxifiante pour la condition c_{20} contre seulement 40% pour la condition c_{250} . Le reste de l'uranium est réparti sur l'ensemble des autres fractions (4 – 670 kDa) pour c_{20} . En revanche, c_{250} concentre environ 40% de l'uranium sur la fraction de HPM (150 – 670 kDa) potentiellement plus sensible à la présence de métaux non-essentiels. Les différences observées en termes de distribution de l'uranium peuvent être en lien avec les altérations histologiques des tissus branchiaux précédemment décrites (cf. section 0).

Cependant, ces altérations n'entraînent pas de différence sur les fonctions d'accumulation de la branchie et il faut rester prudent sur les conclusions.

Si le niveau d'exposition à l'uranium peut avoir une influence sur sa prise en charge par les biomolécules du cytosol des cellules branchiales, il peut éventuellement avoir une influence sur la prise en charge des métaux essentiels. Le paragraphe suivant s'intéresse à l'étude de Fe, Cu et Zn dans les branchies en regard de l'exposition à l'uranium.

5.5 Influence de l'exposition à l'uranium sur certains métaux essentiels (Fe, Cu et Zn) dans les branchies

Le suivi des niveaux ainsi que de la distribution des métaux essentiels que sont le fer, le cuivre et le zinc est motivé par plusieurs raisons. Tout d'abord, des perturbations de l'ionorégulation de certains métaux essentiels, tel que l'inhibition du transport branchial du fer (Bury et Grosell, 2003), ont été mises en évidence après une exposition chronique ou aiguë par voie directe à des métaux toxiques parmi lesquels Pb, Cd, Ag, As et Al (Farrell *et al.*, 2011). De tels effets pourraient potentiellement apparaître avec l'exposition à l'uranium. D'autre part, Fe, Cu et Zn sont des métaux habituellement rencontrés à l'état de trace dans les milieux biologiques. Ils partagent le même état de charge avec le cation uranyle (M^{2+}) et présentent parfois une affinité pour les mêmes protéines (Dedieu *et al.*, 2009; Frelon *et al.*, 2013; Michon *et al.*, 2010).

5.5.1 Niveaux de Fe, Cu et Zn dans l'épithélium branchial et le cytosol

Le **Tableau 29** regroupe les concentrations en Fe, Cu et Zn mesurées dans l'épithélium branchial ainsi que dans la fraction cytosolique pour l'ensemble des conditions d'exposition. Les taux de recouvrement pour Fe, Cu et Zn lors du fractionnement subcellulaire ($(m_{M\text{-dans-culot}} + m_{M\text{-dans-cytosol}})/m_{M\text{-dans-branchies}}$) sont de $114 \pm 36\%$, $108 \pm 12\%$ et $99 \pm 4\%$, respectivement. Les écarts observés sur ces bilans peuvent être attribués à des pertes durant la préparation des échantillons et aux incertitudes analytiques. Les niveaux mesurés pour ces trois métaux dans l'épithélium branchial (arc branchial exclu) sont équivalents entre les différents niveaux d'exposition et sont en accord avec les données de la littérature correspondant à la condition témoin (c_0) (Craig *et al.*, 2009; Johnston *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). Seule la condition de plus forte exposition (c_{250}) se démarque avec une forte variabilité inter-individu. La concentration en Fe dans le cytosol n'est pas affectée par l'exposition à l'uranium avec une moyenne de 63 ng.mg^{-1} de poids frais de branchies sur l'ensemble des conditions ($n = 10$). En revanche, la concentration cytosolique en Zn augmente sensiblement

mais non-significativement avec l'exposition à l'uranium en passant en moyenne de 6 à 11 ng.mg⁻¹ de poids frais de branchies. Cette variation de Zn peut s'avérer toxique pour la cellule. Elle est en accord avec certaines études montrant que le niveau de Zn peut fluctuer dans les branchies de la truite après exposition à un milieu contaminé par des métaux (Pellerin et Amiard, 2009; Van Campenhout *et al.*, 2010). Enfin, la concentration en Cu cytosolique est soit égale ou inférieure à la limite de détection de cet élément dans les conditions actuelles de préparation des échantillons, *i.e.* optimisées pour le dosage de l'uranium. La concentration en cuivre est généralement bien régulée par les protéines cytoprotectrices parmi lesquelles les métallothionéines (Federici *et al.*, 2007; Van Campenhout *et al.*, 2004).

Tableau 29 : Concentrations moyennes en Fe, Cu et Zn (ng.mg⁻¹ poids frais de branchie) dans l'épithélium branchial et la fraction cytosolique des poissons zèbre en fonction de l'exposition (n = 2)

<i>ng.mg⁻¹ poids frais de branchie</i>		Fe	Zn	Cu
<i>Epithélium branchial</i>	c₀ - 3j	87 ± 16	16,2 ± 0,8	1,8 ± 0,1
	c₂₀ - 3j	91 ± 49	13,2 ± 2,5	1,1 ± 1,8
	c₂₅₀ - 3j	127 ± 65	40 ± 26	4,0 ± 1,6
	c₀ - 30j	71 ± 10	16,4 ± 6,4	1,5 ± 0,4
	c₂₀ - 30j	68 ± 11	18,8 ± 2,5	0,9 ± 0,8
	Littérature	60^a ± 15	45^c ± 5 21^b ± 4	1,0^a ± 0,1 4^b ± 2
<i>Cytosol</i>	c₀ - 3j	60 ± 6	6,1 ± 0,5	0,3 ± 0,1
	c₂₀ - 3j	60 ± n.a.	12,5 ± 1,3	n.a.
	c₂₅₀ - 3j	63 ± 2	10,7 ± 0,5	n.a.
	c₀ - 30j	70 ± 46	6,6 ± 0,7	0,3 ± 0,2
	c₂₀ - 30j	59 ± 24	9,6 ± 2,4	n.a.

n.a. : inférieur aux limites de détection (LD estimée en ng.mg⁻¹ poids frais de branchie : Fe = 6,0 ; Zn = 1,0 ; Cu = 0,3) ou nombre insuffisant de réplicats

^a Craig *et al.* (2009) (*Danio rerio*)

^b Liu *et al.* (2012) (*Ctenopharyngodon idellus*)

^c Johnston *et al.* (2010) (*Danio rerio*)

5.5.2 Distribution de Fe, Cu et Zn sur les biomolécules cytosoliques par SEC-ICP-SFMS

La **Figure 55** présente les chromatogrammes typiques obtenus pour Fe, Cu et Zn en SEC-ICP-SFMS indépendamment des conditions d'exposition et mis en regard de celui de l'uranium.

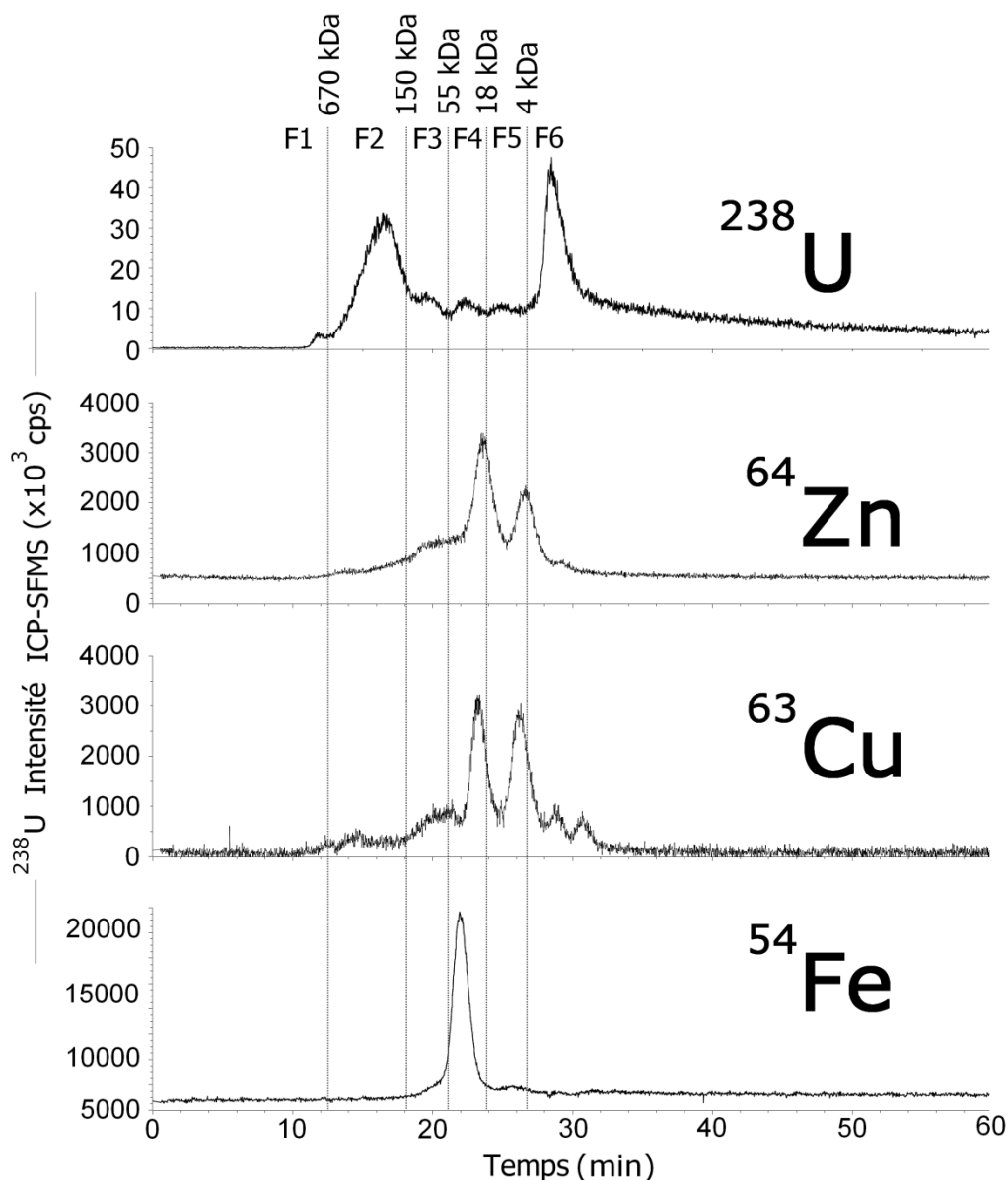


Figure 55 : Profils typiques de Fe, Cu et Zn d'un cytosol (c₂₅₀-3j) en SEC-ICP-SFMS mis en regard du profil U correspondant

Zn et Cu co-éluent avec U sur l'ensemble de la gamme de séparation comprise entre 150 kDa et le volume total de la colonne (≈ 30 min) sans toutefois qu'il y ait une correspondance évidente entre l'apex des pics majoritaires de Zn, Cu et U. Les deux pics majoritaires de Zn et Cu sont centrés vers 7 et 35 kDa. Près de 50% du cuivre est présent sous le pic à 7 kDa et co-élué avec le standard Cd-MT2 (6,8 kDa), ce qui est en accord avec la forte affinité connue entre Cu et MT (Hamer, 1986; Wepener *et al.*, 2001). L'autre moitié du cuivre est présente sous le pic à 35 kDa et correspond probablement à Cu-Zn-SOD (32,5 kDa) (Arredondo et Núñez, 2005). Le profil de Zn est similaire à celui de Cu mais la répartition est un peu

différente avec moins de Zn présent dans la fraction correspondant à MT par rapport au Zn dans la fraction attribuée à SOD ou à l'anhydrase carbonique (29 kDa) ce qui est en accord avec l'affinité inférieure de Zn pour MT (Hamer, 1986). Une part non-négligeable de Zn est impliquée dans des fractions de HPM notamment sous forme de doigts de zinc (zinc-fingers) (De Souza *et al.*, 2009). Fe n'est présent que dans un pic majoritaire centré vers 50 kDa et correspondant à un pic minoritaire sur le profil de l'uranium (F4 < 10% de l'uranium cytosolique). Cette fraction riche en fer, comprise entre 40 et 80 kDa, peut correspondre à des sous-unités de l'hémoglobine (en dépit de l'exsanguination). Ceci suppose que l'uranium peut remplacer le fer dans certaines protéines dédiées au transport et au stockage de ce dernier comme cela est décrit par Frelon *et al.* (2013). Aucune modification significative des profils de Fe, Cu et Zn n'a été observée après exposition à l'uranium.

A l'exception de quelques fluctuations non-significatives observées sur les niveaux de Fe, Cu et Zn dans les branchies lors de l'exposition la plus forte (c₂₅₀) et de Zn dans le cytosol pour les expositions c₂₀ et c₂₅₀, aucune influence majeure de l'exposition à l'U sur ces métaux n'a été observée. Toutefois, certaines métallobiomolécules et en particulier celles contenant Fe co-éluent avec U pouvant indiquer une affinité pour les mêmes biomolécules. La SEC seule étant peu résolutive, l'affinité de U pour différentes métallobiomolécules pourrait être appuyée par son observation *via* d'autres techniques de fractionnement du pool protéique du cytosol. Dans cette optique, le paragraphe suivant décrit les résultats obtenus pour le fractionnement de différents pools cytosoliques par IEF hors-gel seule et couplée à la SEC-ICP-SFMS.

5.6 Etude de la distribution cytosolique de l'uranium par IEF hors-gel et couplage hors ligne avec l'analyse SEC-ICP-SFMS

La mise en place d'une technique de préfractionnement IEF de l'échantillon en amont de l'analyse par SEC-ICP-SFMS permet de produire une cartographie à deux dimensions en fonction du pI et du poids moléculaire des complexes uranium-protéine du fait de l'orthogonalité des méthodes. En plus d'un gain en résolution ceci apporte une nouvelle source d'informations permettant de caractériser ces complexes à savoir leur caractère acide ou basique. Malheureusement, cette technique nécessite un volume d'échantillon 30 fois plus important que celui nécessaire pour la SEC. Ceci impose la mise en place d'une stratégie de regroupement des individus en « pools » afin de limiter la dilution de l'échantillon. Le travail avec des pools d'échantillons va lisser les écarts liés à la variabilité inter-individus observée préalablement, par exemple, sur les niveaux de bioaccumulation. L'analyse de pools reflète donc une réponse moyenne pour une condition d'exposition donnée et l'information interindividuelle est perdue. La méthode appliquée à ces pools de cytosols des cellules branchiales de 4 ou 5 individus est une séparation IEF hors-gel sur un gradient de pH restreint à 4-7.

5.6.1 Préfractionnement des cytosols par IEF hors-gel

Afin de représenter la répartition de l'uranium parmi les 10 fractions du système IEF hors-gel (**Figure 56a**), la quantité d'uranium présente dans chaque fraction est normalisée par rapport à la quantité totale d'uranium trouvée dans les 10 fractions. Bien qu'elle ne rende pas compte des quantités, cette représentation relative permet une comparaison aisée entre des échantillons dont le niveau de contamination est variable. Le même procédé a été appliqué à Fe, Cu, Zn, P et aux protéines (Figure 56b-f). De la même manière qu'en SEC-ICP-SFMS, l'uranium est distribué sur l'ensemble de la gamme de séparation de la technique (*e.g.* pH 4-7) quelle que soit la condition d'exposition (Figure 56a). A l'exception des fractions de pH 4,22, 5,33 et 6,76, U est réparti de manière similaire dans les deux conditions présentées (*e.g.* c_{20-30j} et c_{250-3j}).

La fraction de pH 4,22 mobilise 10% de l'uranium dans la condition c_{20-30j} contre seulement 3% dans la condition c_{250-3j}. Cependant, la répartition des protéines (Figure 56f) indique l'absence de protéines dans cette fraction dans la condition c_{20-30j}. Plusieurs raisons sont envisageables pour expliquer les résultats obtenus pour la fraction de pH 4,22 dans la condition c_{20-30j} parmi lesquelles (i) un problème lors du dosage des protéines, (ii) une

contamination en uranium, (iii) la complexation de l'uranium par un ligand non-délectable par un dosage de protéines ; voire une combinaison de (i), (ii) et/ou (iii). Malheureusement, la quantité restante de cette fraction était insuffisante pour réaliser une contre-analyse.

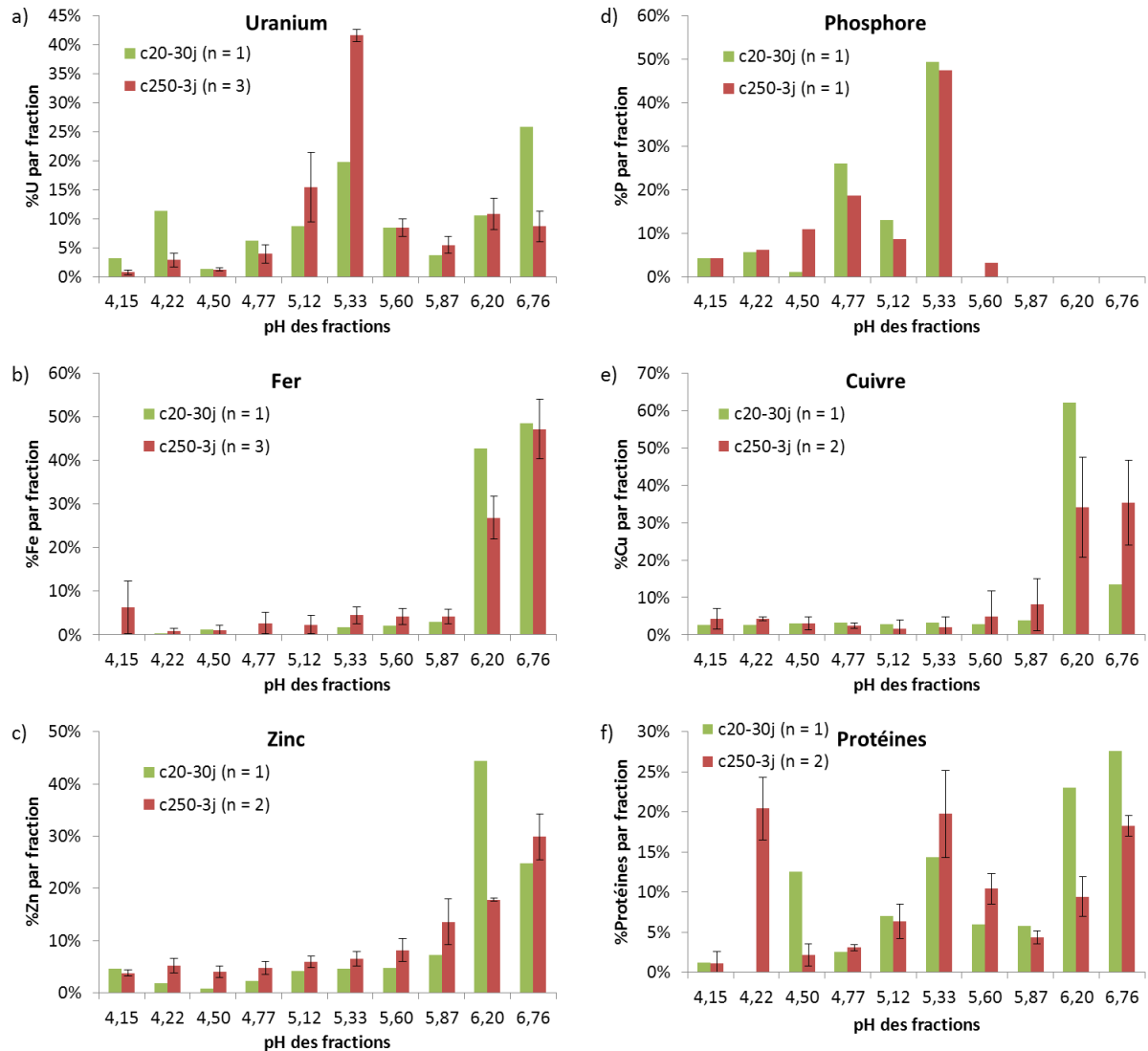


Figure 56 : Distribution de U, Fe, Zn, P, Cu et des protéines obtenues après fractionnement de différents pools de cytosols par IEF hors-gel sur gradient 4-7

La fraction de pH 5,33 contient à elle seule 42% et 20% de l'uranium (Figure 56a) pour les conditions c_{250-3j} et c_{20-30j}, respectivement. Cette fraction est particulièrement riche en phosphore (≈ 50% du total ; Figure 56d) et en protéines (≈ 20-25% du total ; Figure 56f) indépendamment de la condition d'exposition. La formation d'un précipité est observée lorsque cette fraction est conservée plus de 2 heures à 4°C. Il s'agit probablement de la précipitation des protéines à pH = pI. Ce phénomène est empêché par ajout d'une petite

quantité de tampon (cf. section 3.7.5) permettant de déplacer légèrement le pH de la fraction et d'augmenter la stabilité des protéines par augmentation de la force ionique.

La fraction de pH 6,76 est également enrichie en uranium avec 26% de l'uranium total pour c_{20-30j} contre 9% pour c_{250-3j} . Les fractions de pH 6,22 et 6,76 sont visuellement très colorées (rose-rouge) et correspondent à des fractions riches en fer (Figure 56b), en cuivre (Figure 56c), en zinc (Figure 56e) et en protéines (Figure 56f) mais dépourvues de phosphore (Figure 56d) quelle que soit la condition d'exposition. Les protéines présentes dans ces fractions ne précipitent pas après plusieurs heures à 4°C. L'absence de précipitation peut provenir du fait que certaines protéines majoritaires présentes dans les fractions extrêmes peuvent avoir un pI inférieur ou supérieur aux bornes de pH fixées expérimentalement par le choix du couple ampholyte/électrolytes. C'est le cas par exemple de l'hémoglobine dont le pI oscille autour de 7,0 alors qu'elle se retrouve dans des fractions de pH compris entre 6,22 et 6,76.

La répartition de Fe, Cu, Zn, P et des protéines sur la gamme de pH 4-7 est similaire pour les pools cytosoliques des cellules branchiales issus des conditions c_{20-30j} et c_{250-3j} . Ce résultat est en accord avec les observations réalisées lors de l'étude des cytosols de cellules branchiales à l'échelle individuelle par SEC-ICP-SFMS (cf. section 5.5.2). Quelques différences apparaissent en revanche au niveau de la répartition de l'uranium. En effet, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent la fraction de pH 5,33 mobilise un plus grand pourcentage d'uranium cytosolique dans la condition c_{250-3j} que dans la condition c_{20-30j} (e.g. 42% vs. 20%) et inversement pour la fraction de pH 6,76 (e.g. 9% vs. 26%). D'un point de vue quantitatif, en moyenne la fraction de pH 6,76 mobilise environ la même quantité d'uranium dans les deux conditions d'exposition (≈ 110 pg) alors que la fraction de pH 5,33 mobilise une quantité 6,5 fois supérieure dans la condition c_{250-3j} (≈ 585 pg) par rapport à c_{20-30j} (≈ 90 pg). Ce résultat rappelle l'hypothèse selon laquelle un excès d'uranium dans la fraction cytosolique puisse (i) saturer les protéines impliquées un premier mécanisme de prise en charge/détoxification (fraction de pH 6,76 ?) et (ii) entraîner la prise en charge par d'autres protéines (fraction de pH 5,33 ?). L'ensemble de ces résultats manquent d'appui statistique en raison du faible nombre de pools analysés ($n = 1$ à 3), cependant chaque pool représente quatre individus ce qui permet de lisser les différences interindividuelles au sein d'un groupe et donc les différences inter-pool comme l'indique l'étroitesse des barres d'erreur (**Figure 56a**).

Après analyse de la distribution des éléments mesurée en IEF hors-gel (Figure 56), Fe, Cu et Zn sont essentiellement présents dans les fractions de pH > 6,0, quelle que soit la condition d'exposition. De la même manière, P est majoritairement présent dans les fractions de pH < 6,0. Enfin, U ainsi que les protéines sont distribués sur l'ensemble de la gamme de pH et co-éluent avec Fe, Cu, Zn et P appuyant les observations effectuées après analyse des cytosols de cellules branchiales par SEC-ICP-SFMS. La différence de répartition de l'uranium potentiellement mise en évidence entre les deux conditions d'exposition très contrastées appuie l'idée d'une prise en charge de l'uranium par le pool de protéines cytosoliques des cellules branchiales différente en fonction des concentrations d'exposition. Une fois encore, aucune influence significative de l'exposition à U sur Fe, Cu et Zn n'a été mise en évidence.

5.6.2 Analyse des fractions IEF hors-gel par SEC-ICP-SFMS : cartographie pI-PM

Les fractions récoltées en IEF hors-gel sont directement soumises à l'analyse par SEC-ICP-SFMS dans les mêmes conditions que les cytosols individuels (cf. section 0). Il en résulte une cartographie bidimensionnelle (2D) avec le pH des fractions IEF en abscisse et le poids moléculaire (PM) en ordonnée (**Figure 57** et **Figure 58**). L'intensité du signal ICP-SFMS de chaque élément (a-e) ou UV à 280 nm pour les protéines (f) est donnée par une échelle de couleur allant du bruit de fond (bleu foncé) à la valeur maximale (rouge).

Les protéines présentes dans la fraction de pH 5,33, identifiée comme étant riche en uranium (Figure 56a), se distribuent sur l'ensemble de la gamme de poids moléculaires en SEC (1-670 kDa), mais deux régions plus intenses en uranium se démarquent vers 1-18 kDa et 100-300 kDa dans les deux conditions d'exposition (Figure 57a et Figure 58a). Ces deux régions apparaissaient déjà comme particulièrement intéressantes lors de l'étude des cytosols individuels par SEC-ICP-SFMS (cf. section 0). En considérant les 6 fractions de PM précédemment définies en section 0 et en appliquant la même méthodologie d'interprétation dans le cas des fractions IEF hors-gel pH 5,33 analysées par SEC-ICP-SFMS, la distribution de l'uranium apparaît similaire ici pour les conditions c_{20-30j} et c_{250-3j}. Environ 50% de l'uranium est mobilisé dans la fraction de PM compris entre 1 et 18 kDa, 15% entre 18 et 150 kDa, 25% entre 150 et 670 kDa et 2% dans le volume mort. L'uranium présent dans la fraction 1-18 kDa, potentiellement complexé par des protéines de détoxication (Geffard *et al.*, 2010), est réparti équitablement entre des espèces de PM compris entre 4 et 18 kDa et des espèces de PM inférieur à 4 kDa. Le reste de l'uranium est réparti dans des fractions de

PM supérieur à 18 kDa avec notamment un maximum d'intensité vers 150 kDa. Rappelons que ces fractions sont potentiellement plus sensibles à la présence d'uranium puisqu'elles incluent des protéines impliquées dans les fonctions respiratoires ainsi que dans l'homéostasie des ions, des acides et des bases (De Souza *et al.*, 2009; Wright et Welbourn, 2002). Enfin, une information importante est apportée ici puisque la cartographie de l'uranium autour de pH 5,3 est corrélée à celle du phosphore (Figure 57c et Figure 58c). L'idée selon laquelle l'uranium aurait une affinité particulière pour les protéines phosphorylées (Dedieu *et al.*, 2009; Pardoux *et al.*, 2012) est donc appuyée *in vivo* sur des échantillons biologiques issus de poissons exposés à l'uranium par voie directe.

Les protéines des fractions de pH > 6, riches en U, Fe, Cu et Zn, se distribuent essentiellement entre 60 kDa et le volume total de la colonne chromatographique (faible PM) (Figure 57 et Figure 58 ; a, b, d et e). Un peu d'uranium ($\approx 4\%$ pour la fraction de pH 6,76 de c_{250-3j}) est élué dans une fraction très riche en fer dont les protéines ont un PM compris entre 30 et 60 kDa. Ceci correspondrait à l'hémoglobine (≈ 60 kDa) visualisée par la coloration rose de ces fractions. 80% de l'uranium présent dans ces fractions de pH > 6 est cependant lié à des molécules de 1 à 18 kDa et co-élué avec le cuivre, le zinc et une fraction du fer (sous unités de l'hémoglobine et myoglobine 15-16 kDa).

Contrairement aux observations réalisées lors de l'analyse des cytosols en SEC-ICP-SFMS (Figure 54) ainsi qu'en IEF hors-gel (Figure 56), il n'y a pas de différence notable entre les cartographies 2D de l'uranium entre les conditions c_{20-30j} (Figure 57a) et c_{250-3j} (Figure 58a). Seule l'intensité du signal de l'uranium est globalement plus forte pour la condition c_{250-3j} sans qu'il y ait un changement de distribution par rapport à c_{20-30j}. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de cette absence de différence. En premier lieu, la modification des conditions de préparation des cytosols (*e.g.* pool + tampon hypotonique) pour l'IEF provoque une diminution de la quantité d'U extrait dans la fraction cytosolique (de 27% à 9% en moyenne, cf. section 4.4.1). Cette diminution peut correspondre à une première source de perte d'information entre les différentes conditions d'exposition avant l'analyse par SEC. Ensuite, la présence d'ampholytes porteurs dans les fractions IEF hors-gel peut provoquer une remobilisation d'une certaine quantité d'U vers des fractions < 18 kDa sans forcément entraîner une modification de la spéciation entre 18 et 670 kDa (cf. section 4.4.4). Enfin, une partie de l'explication peut aussi provenir du taux de recouvrement de chaque méthode. En effet, si l'on croise les 30% de recouvrement de l'uranium sur l'IEF hors-gel avec 50% moyen de recouvrement sur la SEC, le taux de recouvrement global sur les deux dimensions de séparation est de l'ordre de 15%. Il est donc très probable dans ces conditions que seuls les

complexes uranium-protéines les plus stables soient conservés et que les différences plus fines entre les conditions soient lissées. Qualitativement, la cartographie de P, Fe, Cu, Zn et des protéines (Figure 57 et Figure 58 ; b-f) est identique entre les deux conditions d'exposition et seule l'intensité globale du signal varie.

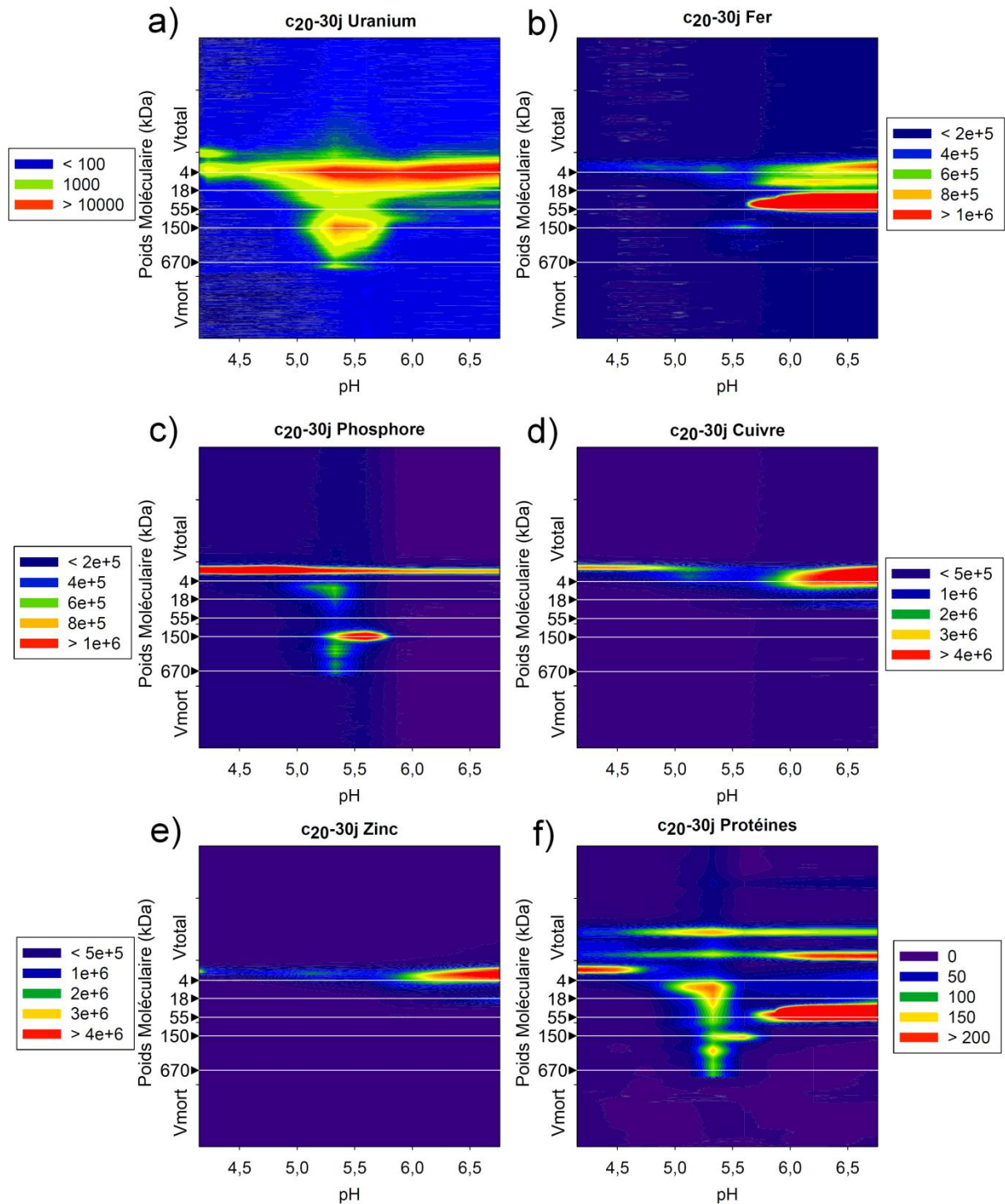


Figure 57 : Cartographie 2D (IEFxSEC) d'un pool de cytosols c20-30j ; échelle de couleur : (a-e) intensité ICP-SFMS (cps), (f) absorbance UV à 280 nm (mU.A.)

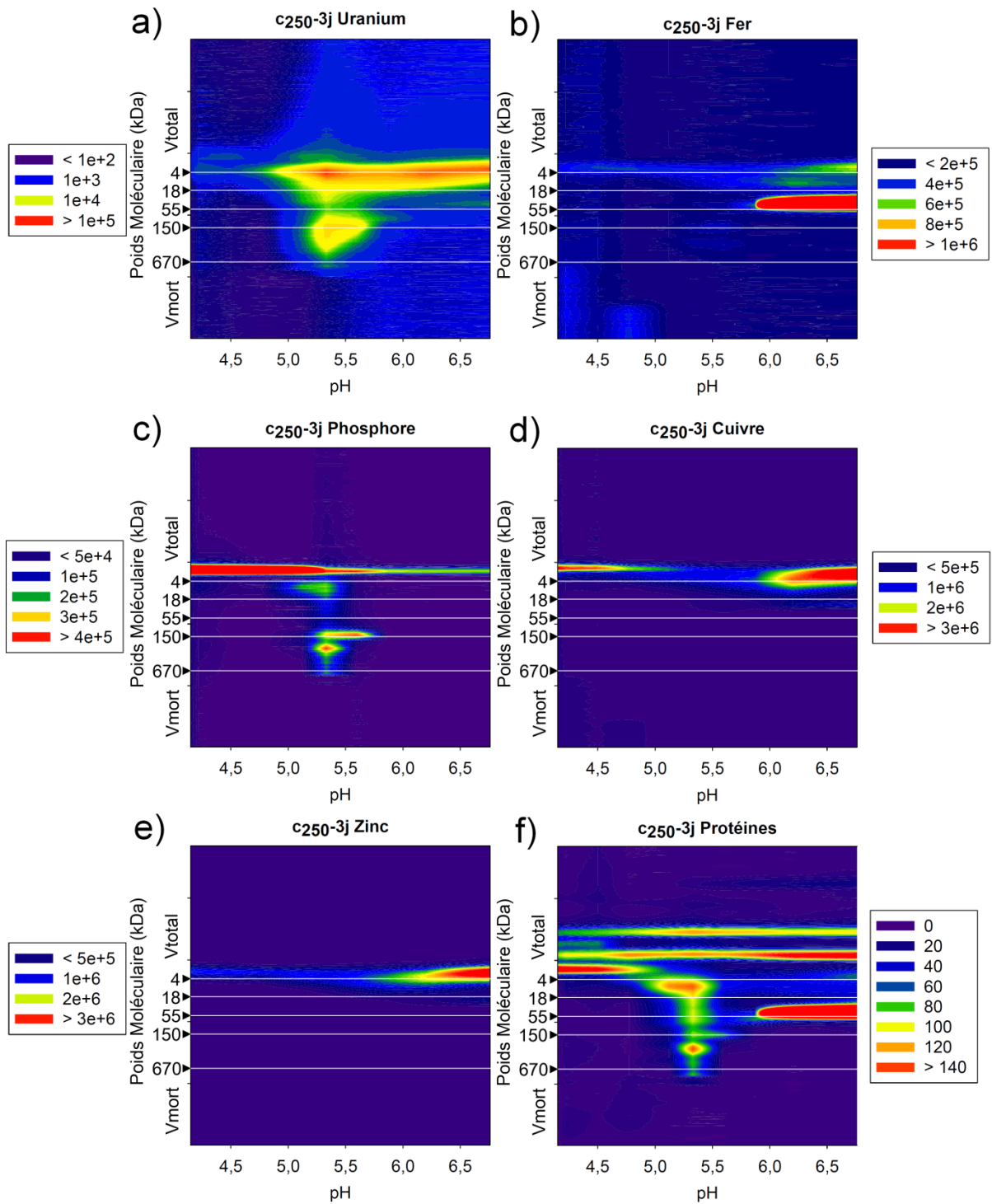


Figure 58 : Cartographie 2D (IEFxSEC) d'un pool de cytosols c_{250-3j} ; échelle de couleur : (a-e) intensité ICP-SFMS (cps), (f) absorbance UV à 280 nm (mU.A.)

L'IEF hors-gel et son couplage avec la SEC-ICP-SFMS confirment une certaine affinité de U pour des métallobiomolécules portant Fe, Cu et Zn. U est généralement présent dans toutes les fractions de pH compris entre 4 et 7 avec un maximum à pH 5,33. D'autre part, le suivi de P met en évidence une corrélation *in vivo* entre les biomolécules de HPM ($\approx 100-200$ kDa) liant U et cet élément, marqueur potentiel de phosphorylation ou à minima de biomolécules contenant une forme libre ou complexée de P. Ainsi, après avoir identifié des fractions (*e.g.* pI et/ou PM) d'intérêt, le dernier paragraphe s'intéresse à l'identification des biomolécules liant U dans ces fractions par les approches protéomiques « bottom-up » et « top-down ».

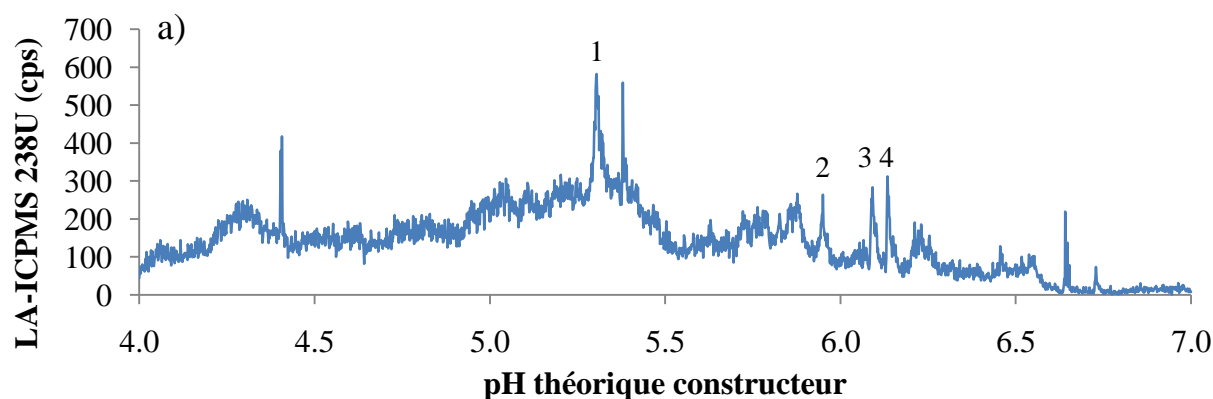
5.7 Identification de cibles protéiques de l'uranium

5.7.1 Approche bottom-up à partir de fractions de l'IEF sur bandelette et de l'IEF hors-gel

Afin d'identifier des cibles protéiques potentielles de l'uranium, une stratégie d'identification bottom-up (cf. section 2.1) a été appliquée à des fractions IEF hors-gel ainsi qu'à des fractions de bandelettes IEF riches en uranium. La stratégie bottom-up repose sur la digestion enzymatique des protéines de l'échantillon suivie de l'identification des peptides ainsi produits par μ RP-HPLC-ESI-MS/MS. L'identification de plusieurs peptides appartenant à une protéine, et en particulier les peptides dits uniques (*i.e.* appartenant à une seule protéine), permet ensuite de remonter à l'identité de cette dernière par recherche dans une base de données (*e.g.* UniProt). Cette approche permet l'identification des protéines dans une fraction riche en uranium mais ne prouve pas nécessairement la présence du complexe U-protéine. La pertinence des protéines trouvées sera ensuite discutée en fonction de leur fonction biologique et de leur affinité pour d'autres métaux. Le **Tableau 30** présente les caractéristiques des différentes portions de bandelettes IEF (**Figure 59**) ainsi que les fractions IEF hors-gel (Figure 56) sélectionnées pour l'identification des protéines par approche bottom-up.

Tableau 30 : Identification et pH des fractions digérées pour l'approche bottom-up

<i>ID digestat</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	F05	F06	F09	F10
<i>pH</i>	5,3	5,95	6,1	6,15	4,95	5,05	5,15	5,4	5,9	5,95	5,12	5,33	6,2	6,76
<i>Condition</i>	c ₂₅₀ -3j				c ₂₀ -3j						c ₂₅₀ -3j			
<i>Méthode</i>	IEF bandelette				IEF bandelette						IEF hors-gel			



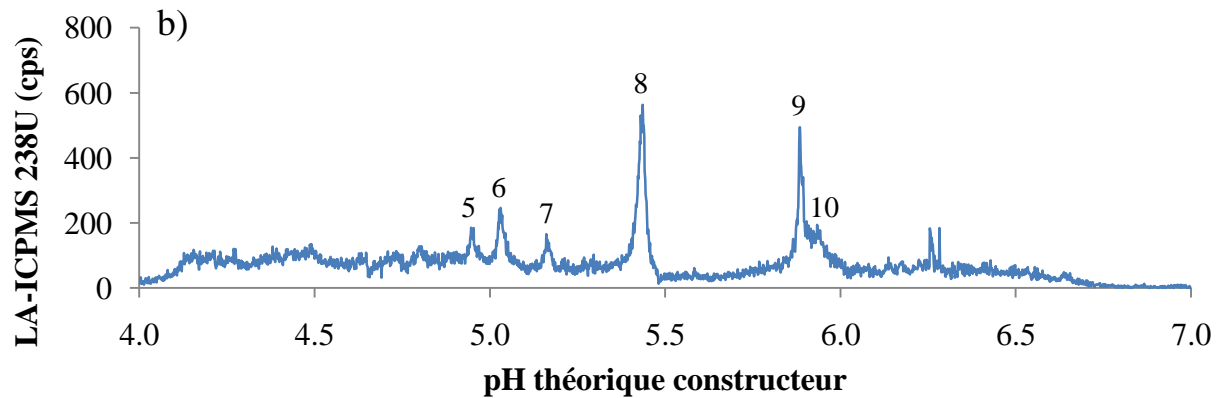


Figure 59 : Profils U-pH obtenus par ND-IEF-LA-ICPMS pour un pool de cytosols c_{250-3j} (a) et un pool de cytosols c_{20-3j} (b) fractionnés sur des bandelettes de gel IEF pH 4-7 de 13 cm ; Les numéros de 1 à 10 (cf. Tableau 30) correspondent aux parties de gel excisées pour l'identification des protéines par approche bottom-up

24 protéines candidates pour lier l'uranium ont été identifiées toutes techniques et conditions d'exposition confondues (**Tableau 31**). Parmi ces 24 protéines, 12 ont été identifiées à la fois à partir de l'IEF bandelette et hors-gel, 7 à partir de l'IEF hors-gel uniquement et 5 à partir de l'IEF bandelette uniquement. Certaines protéines ont été détectées dans plusieurs fractions de pH différent, en particulier pour les fractions IEF bandelette. Le pH indiqué dans le Tableau 31 correspond soit au pH mesuré des fractions IEF hors-gel dans lesquelles ont été identifiées les protéines, soit lorsque la protéine n'est identifiée que sur bandelette, au pH théorique de la portion de bandelette pour laquelle le meilleur taux de recouvrement de la séquence protéique est obtenu. Dans le cas où une protéine a été détectée dans différents échantillons ou fractions, les scores, recouvrements de séquence et nombres de peptides identifiés présentés dans le Tableau 31 sont les meilleurs résultats obtenus. Dans tous les cas, l'identification n'a été validée que lorsqu'au moins un peptide unique est trouvé et que le score ($-10\lg P$) est supérieur à 20 ce qui correspond à une P-value de 1%.

Tableau 31 : Protéines identifiées par analyse des digestats tryptiques des fractions ND-IEF et/ou IEF hors-gel par μ RP-ESI-MS/MS

Technique	Fraction pH ¹	Accession	Score ²	Sequence coverage (%)	Peptides	Unique peptides	Protein MW (Da)	pI _{theo} ³	Description
Off-Gel IEF and Strip IEF	5,12 – 5,33	ACTB1 / ACTB2_BRARE	146	34	11	11	41753	5,3	(Q7ZVI7 / Q7ZVF9) Beta-actin-1 / Beta-actin-2
	5,12 – 6,76	HBB1_BRARE	147	89	13	13	16258	7,7	(Q90486) Hemoglobin beta-1 subunit
	5,33	HSP7C_BRARE	128	18	11	1	70974	5,2	(Q90473) HSP70 (Heat shock cognate 71 kDa protein)
	5,12 – 6,76	HBA_BRARE	150	55	9	3	15391	8,0	(Q90487) Hemoglobin alpha subunit
	5,12	143AB / 143 BB_BRARE	102	33	8	3	27647	4,7	(Q7T356 / Q5PRD0) 14-3-3 protein beta/alpha-A / B
	6,20	LDHB_BRARE	29	6	2	2	36112	6,4	(Q9PVK4) L-lactate dehydrogenase B chain
	5,33	MYG_BRARE	109	49	7	7	15452	7,0	(Q6VN46) Myoglobin
	5,33	K2C8_BRARE	48	5	3	3	57760	5,1	(Q6NWF6) Keratin, type II cytoskeletal 8
	5,33	TPM1_BRARE	66	15	5	1	32723	4,7	(P13104) Tropomyosin 1 alpha chain
	5,33	PLSL_BRARE	38	4	2	2	69900	5,3	(Q6P698) Plastin-2
	5,12 – 5,33	APOA1_BRARE	139	56	16	15	30256	5,1	(O42363) Apolipoprotein A-I precursor
5,12 – 5,33	H2AX_BRARE	62	28	3	3	14870	10,7	(Q7ZUY3) Histone H2A.x	
Off-Gel IEF	5,12	ST1S1_BRARE	58	15	3	3	35035	5,7	(Q6PH37) Cytosolic sulfotransferase 1
	5,33	H2AV_BRARE	50	13	2	1	13377	10,6	(Q71PD7) Histone H2AV
	5,12 – 5,33	AN32A_BRARE	54	10	3	3	29091	4,0	(Q7ZUP0) Anp32 (Acidic leucine-rich phosphoprotein 32A)
	6,76	LDHA_BRARE	53	5	2	2	36115	6,4	(Q9PVK5) L-lactate dehydrogenase A chain
	5,12	PRV7_BRARE	26	13	2	2	11897	4,7	(Q804W2) Parvalbumin-7
	6,20 – 6,76	SODC_BRARE	106	44	4	4	15953	6,1	(O73872) Superoxide dismutase [Cu-Zn]
	6,20 – 6,76	CAHZ_BRARE	98	40	8	8	28677	7,1	(Q92051) Carbonic anhydrase
Strip IEF	6,0	HBB2_BRARE	131	86	12	2	16258	7,7	(Q90485) Hemoglobin beta-2 subunit
	5,4	1433G_BRARE	55	12	4	1	28235	4,9	(Q6PC29) 14-3-3 protein gamma
	5,4	LDHA_BRARE	66	9	3	1	36115	6,4	(Q9PVK5) L-lactate dehydrogenase A chain
	5,4	TCTP_BRARE	26	5	1	1	19025	4,5	(Q9DQK4) Translationally-controlled tumor protein
	5,0	TAXB1_BRARE	21	1	1	1	93215	5,0	(Q6P132) Tax1-binding protein 1 homolog

¹ Measured Off-gel IEF fraction pH in which the protein is detected otherwise estimated Strip pH at which the best sequence coverage was obtained

² The score is a p-value on an increasing scale, a greater than 20 score is of relatively high confidence

³ Theoretical isoelectric point (pI) given by ExPASy tool http://web.expasy.org/compute_pi/

Les premières protéines identifiées après 1D IEF (sur- et hors-gel) et présentées dans le Tableau 31 donnent un aperçu des candidates possibles pour lier l'uranium dans le cytosol des cellules branchiales de *Danio rerio* après exposition par voie directe. Parmi ces protéines se trouvent certaines particulièrement intéressantes dont nous allons discuter le potentiel de complexation de l'uranium. Notons cependant qu'un pic ou une fraction IEF peut contenir plusieurs protéines (cf. cartographie 2D pI-PM section 5.6.2) et la liaison U-protéine n'a pas été formellement confirmée pour les candidates identifiées.

L'hémoglobine a été proposée comme candidate pour lier l'uranium suite à l'observation de la co-élution U-Fe en SEC-ICP-SFMS (cf. section 5.5.2) et en IEF hors-gel × SEC-ICP-SFMS (cf. section 5.6.2). L'identification des protéines permet par approche bottom-up permet de confirmer la présence des sous-unités de l'hémoglobine dans le cytosol et en particulier dans les fractions IEF hors-gel extrêmes de pH 6,20 et 6,76 pour lesquelles le taux de recouvrement des séquences protéiques peut atteindre 90%. Ce résultat est en accord avec la quantité importante de fer présente dans ces fractions, la coloration rose et les pI théoriques et expérimentaux de l'hémoglobine et de ses sous unités qui s'étalent entre 6,6 et 8 (Hempe et Craver, 2000; Koepke *et al.*, 1975). Sur le même principe, la myoglobine et l'albumine avaient été évoquées comme candidates pour la liaison de l'uranium dans les fractions riches en fer. Or, ici la myoglobine (15 kDa) de pI théorique 7,0 a seulement été identifiée dans une fraction de pH 5,33 relativement pauvre en fer mais tout de même riche en uranium dans la gamme de faible poids moléculaire ce qui n'exclue donc pas son interaction avec l'uranium. De la même manière, une protéine de la famille de l'albumine, *i.e.* parvalbumine-7, a été identifiée dans cette même fraction de pH 5,33 en accord avec son pI théorique de 4,7. Cette protéine de 12 kDa est intéressante car elle est impliquée dans l'homéostasie du calcium et partage une forte similitude avec la calmoduline (Permyakov, 2006), déjà identifiée comme cible de l'uranium (Pardoux *et al.*, 2012). Une autre protéine impliquée dans différentes voies de communication cellulaire faisant intervenir Ca²⁺ et la calmoduline a été identifiée dans la fraction de pH 5,12. Il s'agit de la protéine 14-3-3 dont l'expression dans les cellules rénales humaines peut être altérée par l'exposition à l'uranium (Prat *et al.*, 2005). Enfin, la plastine est capable de lier des métaux parmi lesquels se trouve le calcium (Jones *et al.*, 1998) et peut à ce titre être une candidate pour lier U comme la parvalbumine. Cependant, dans cette étude aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre Ca et U sur des biomolécules de plus de 4 kDa en SEC. En effet, lors de l'analyse de cytosols par SEC-ICP-SFMS, le suivi de Ca (mode LR, n = 3 cytosols) donne deux pics de faible intensité relative au bruit de fond (S/B < 3) : le premier co-élue avec U en F6 (< 4 kDa), et le second élue seul après le volume

total de la colonne chromatographique (données non présentées). Cependant, les capacités de détection de Ca à l'état de trace par ICP-MS peuvent être mises en cause (cf. section 3.6.4) et il n'est pas possible d'exclure toute corrélation Ca-U.

Suivant la corrélation U-P observée en section 5.6.2, on trouve ici la phosphoprotéine Anp32 qui peut être une candidate pour lier U. Cependant la phosphorylation n'est pas l'unique piste liée au phosphore. Il est envisageable que des complexes inorganiques (*e.g.* U-phosphate) ou avec de petites biomolécules (*e.g.* U-ATP) forment des complexes ternaires avec des protéines. En effet, la bêta-actine est une autre protéine identifiée dans les fractions de pH 5,12 et 5,33 conformément à son pI théorique de 5,3. Il s'agit d'une protéine cytoplasmique de 41,7 kDa ayant de nombreuses fonctions biologiques en lien avec la motilité⁶ et la structure des cellules. Ces fonctions reposent sur la formation de polymères composés de plusieurs sous-unités d'actine liées par des molécules d'ADP et adoptant la forme de microfilaments. A cet effet, l'actine dispose d'un site de fixation de l'ATP et cette dernière est hydrolysée en ADP lors de la polymérisation. Ce dernier point est important puisque l'uranium est connu pour sa grande affinité vis-à-vis des phosphates et notamment ceux composant l'ATP (De Stefano *et al.*, 2005). On peut ainsi proposer un mécanisme de complexation de l'uranium par l'ATP préalablement fixée sur l'actine. Sachant que l'actine peut former des polymères de PM compris entre 42 kDa et plusieurs centaines de kDa, elle pourrait faire partie des complexes U-protéine de haut poids moléculaire (*e.g.* 100-300 kDa) observés par IEF hors-gel × SEC-ICP-SFMS et co-éluant avec du phosphore (cf. section 5.6.2). Toujours dans la fraction de pH 5,33 se trouve une protéine de la famille HSP70 de masse molaire 71 kDa et de pI théorique 5,2. Ces protéines sont principalement impliquées dans la protection des protéines durant leur synthèse, leur transport transmembranaire ou bien encore en cas de stress oxydatif ou thermique (Wegele *et al.*, 2004). Ces fonctions nécessitent la fixation préalable d'ATP sur HSP70 qui peut donc, comme l'actine, potentiellement lier l'uranium par le biais de cette dernière. En outre, une étude montre que l'expression de HSP70 peut être induite par l'exposition à certains métaux (*e.g.* Cd, Cu, Ni) (Deane et Woo, 2006) et en particulier U (Miller *et al.*, 2004).

Enfin, les fractions de pH 6,20 et 6,76 issues de l'IEF hors-gel ont permis de confirmer la présence de la superoxyde dismutase (SOD) et de l'anhydrase carbonique dans le cytosol comme cela été supposé dans la section 5.5.2. Toutefois, par SEC-ICP-SFMS aucun indice de

⁶ Contraction et déplacement des cellules ainsi que mouvement des organites au sein de la cellule

co-élution Zn-Cu-U ne permet d'affirmer que ces protéines lient U, le suivi de Mn aurait pu apporter des informations sur Mn-SOD.

5.7.2 Approche top-down par RP(C₄)-ICP-SFMS et RP(C₄)-ESI-MS à partir de l'IEF hors-gel

Toutes les protéines identifiées par la stratégie bottom-up font probablement partie des protéines majoritaires du cytosol dans les fractions IEF analysées, toutefois, de par leurs caractéristiques, certaines sont de bonnes candidates pour lier l'uranium. L'identification formelle des protéines liant l'uranium nécessite une approche plus résolutive permettant idéalement l'isolement des complexes U-protéine, leur criblage *via* la détection de U par ICP-MS et enfin leur identification par ESI-MSⁿ. Avec la concordance d'un pic d'uranium et l'identification de la BSA, les premiers essais menés sur les complexes U-BSA (cf. section 0) sont prometteurs même si la visualisation de complexes U-BSA intacts par ESI-MS n'a pas abouti. La même stratégie a donc été appliquée à des fractions IEF hors-gel riches en uranium issues du fractionnement d'un pool de protéines cytosoliques de cellules branchiales d'un individu c_{250-3j} afin de tenter une identification directe des complexes U-protéine.

La détection du soufre permet de suivre l'élution des protéines contenant de la méthionine ou de la cystéine en l'absence de détection par UV. La **Figure 60a** montre le profil d'élution RP(C₄) de l'uranium et du soufre d'une fraction IEF hors-gel de pH 6,76 (F10) provenant du fractionnement d'un pool de cytosols c_{250-3j}. Cette fraction a été choisie afin d'essayer de confirmer la présence de certaines protéines identifiées par approche bottom-up et une co-élution U-protéine. Concernant l'uranium, un double pic intense apparaît au volume mort puis le reste du profil est semblable à celui d'un blanc (cf. Figure 38) à l'exception d'un pic de faible intensité qui apparaît vers 19,2 min et qui co-élue avec un pic de soufre. Le TIC en ESI-MS correspondant (**Figure 60b**) fait apparaître un pic dont l'apex se situe à 19,5 min et dont le spectre MS présente plusieurs espèce multichargée qui après déconvolution correspondent aux poids moléculaires consignés dans le **Tableau 32**. L'espèce de 16257 ± 1 Da correspondrait à la sous-unité bêta-1 de l'hémoglobine (16258 Da) identifiée dans cette même fraction par la stratégie bottom-up (Tableau 31). Cette sous-unité de l'hémoglobine contient 10 atomes de soufre ce qui peut expliquer la co-élution de U et S.

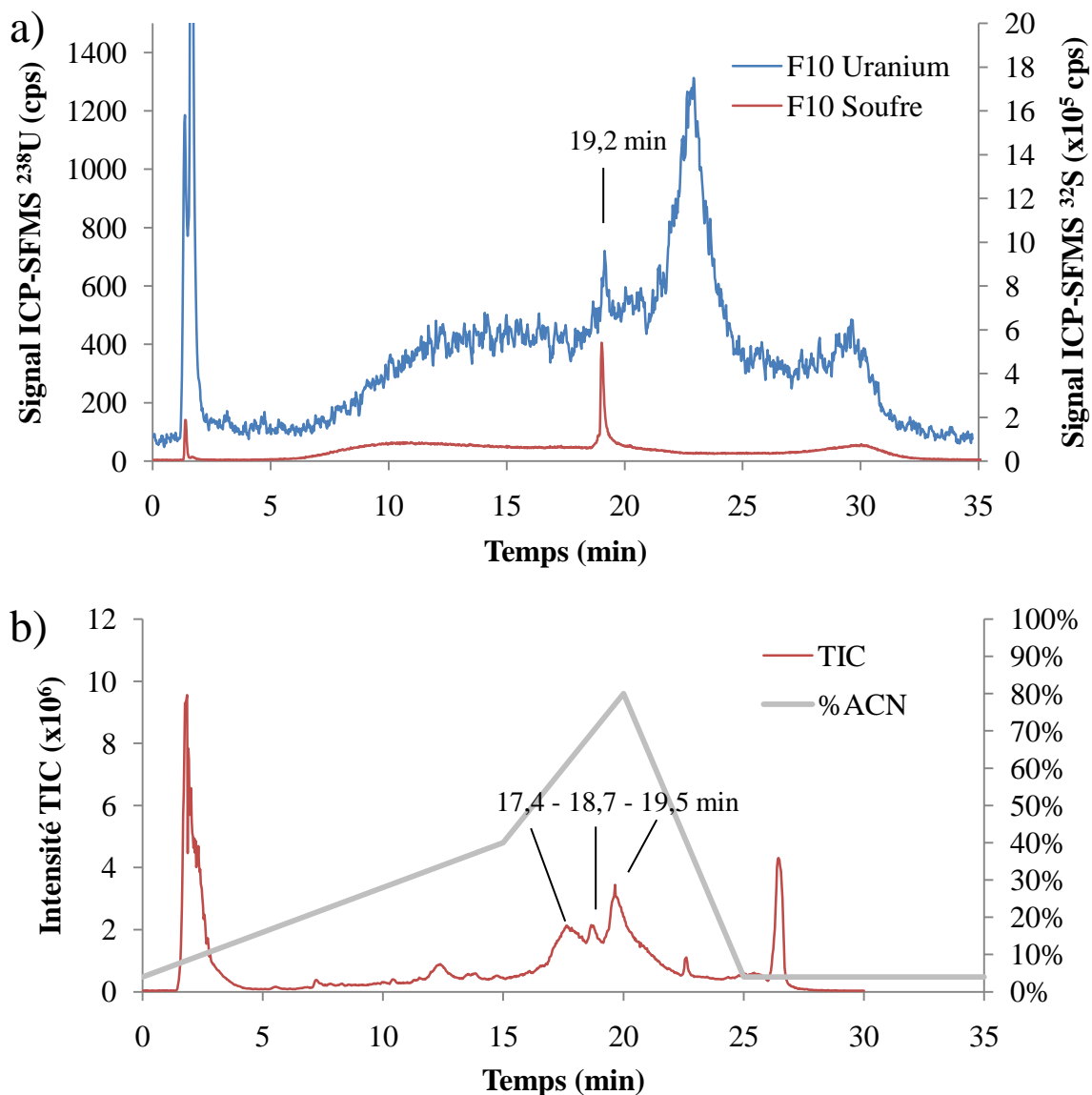


Figure 60 : (a) Profil d'élution RP(C4)- ICP-MS et (b) courant ionique total (TIC) RP(C4)-ESI-MS de la fraction IEF hors-gel (F10) de pH 6,76 issue d'un pool de cytosol c_{250-3j} ; gradient Eau/ACN 10 mM « Acétate » pH 4,6 - 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

Tableau 32 : Déconvolution des spectres MS de F10

<i>Temps de rétention (min)</i>	<i>Poids moléculaire (Da)</i>	<i>Correspondance possible (d'après approche bottom-up)</i>
17,4	29025 ± 2	Anhydrase carbonique
18,7	16257 ± 1	Sous-unité bêta-1 de l'hémoglobine
19,5	16257 ± 1	Sous-unités bêta-1 et alpha de l'hémoglobine
	15422 ± 7	
	15434 ± 1	
	15476 ± 1	

Dans la fraction IEF hors-gel (F05) pH 5,12 riche en uranium, une élévation globale du signal en uranium est observée par rapport au blanc sans toutefois qu'un pic se dégage (**Figure 61**). Seul un pic étalé est observé entre 17 et 20 min. L'exploitation du TIC et des spectres MS correspondant ne permet pas d'identifier des espèces dans cette zone comprise entre 17 et 20 min.

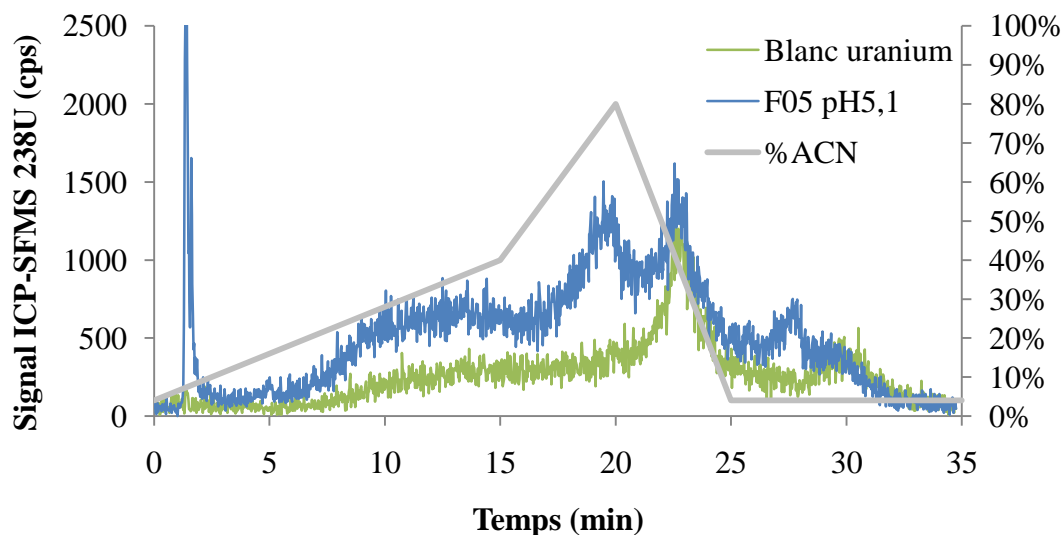


Figure 61 : Profil d'élution RP(C4)-ICP-MS de la fraction IEF hors-gel (F05) de pH 5,12 issue d'un pool de cytosol c₂₅₀-3j ; gradient Eau/ACN 10 mM « Acétate » pH 4,6 – 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

En conclusion, 24 protéines ont pu être identifiées, avec un bon niveau de confiance, par approche bottom-up à partir de fractions 1D IEF riches en U. Ces protéines constituent donc d'éventuelles candidates pour lier U. La cartographie bidimensionnelle (pI-PM) multi-élémentaire présentée dans la partie précédente nous a par ailleurs permis de discuter et d'émettre certaines hypothèses quant à la pertinence des protéines identifiées par la stratégie bottom-up, telles que l'éventuelle formation de complexes ternaires U-ATP-protéine. Cependant, en l'état cette stratégie ne permet pas d'affirmer formellement que ces candidates complexent U, notamment car plusieurs protéines coexistent dans chaque fraction IEF. L'application de la stratégie top-down de séparation et d'identification des complexes U-biomolécule intacts devait permettre de lever cette ambiguïté grâce à une dimension séparative supplémentaire (RP(C₄)) et la double détection élémentaire et moléculaire. En pratique, la séparation et la détection de biomolécules intacts s'avèrent relativement difficiles. A ce stade, le maintien de complexes U-biomolécule n'a pas pu être directement confirmé par la mesure du PM

apparent par ESI-MS. Toutefois, l'observation de la co-élution d'hémoglobine avec U dans une fraction IEF hors-gel de pH 6,76 laisse entrevoir des perspectives pour cette stratégie. Enfin, la pertinence et la réalisation d'une étape supplémentaire de pré-concentration des échantillons restent à évaluer.

SYNTHESE

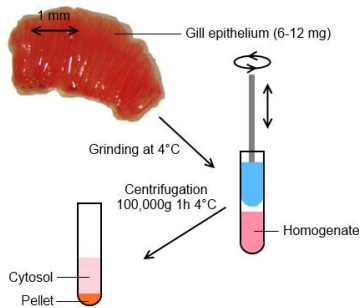
SYNTHESE : Développement analytique

Echelle d'étude

Problématique

Résultats / Conclusions

Conditions de préparation des échantillons



Conservation des interactions U-biomolécules non-covalentes avec un tampon de lyse volatile ?

Stabilité des cytosols lors de la congélation à -80°C pour stockage ?

Tampon NH_4Ac 100 mM (vs. réf. HEPES-Sucrose) :
pH ✓, osmolarité ✓ et volatilité ✓

[protéines]_{cytosol&broyat} et taux de recouvrement $U \cong$ ✓
Faible complexation de U : % $U_{\text{cytosol}} \nearrow$ (~2x) ✗
Profil SEC (U & protéines) \cong sur 5-670 kDa ✓

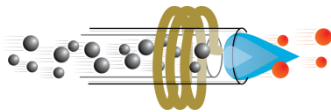
Stockage à -80°C 2 & 16 jours (vs. réf. non-congelé) :

Profil SEC (U & protéines) \cong sur 5-670 kDa ✓
 $U \nearrow$ au V_{mort} et sur 0,1-5 kDa ✗ mais 2 j \cong 16 j ✓

⇒ **Alternative NH_4Ac acceptable, stockage à éviter**

Détection multi-élémentaire

Sensibilité U pour échantillons faiblement contaminés (en couplage) ?



Suivi de ^{56}Fe et ^{31}P ?

ICP-SFMS (vs. ICP-QMS) en couplage avec la SEC :

Mode LR sensibilité U \nearrow (~270x) ✓ et S/B \nearrow (~37x) ✓

Mode MR accès ^{56}Fe et ^{31}P ✓

^{56}Fe S/B \nearrow (~500x) (vs. ^{57}Fe mode LR) ✓

Mode LR+MR avantages combinés ✓ mais fréquence d'échantillonnage \searrow (~10 pts.min⁻¹) ✗

⇒ **Gain significatif en sensibilité sur U**

SEC

Rétention métaux sur colonne et nettoyage ?



Taux de recouvrements U et protéines ?

BdF U élevé après analyse d'un cytosol contaminé ✗

Nettoyage NH_4HCO_3 → retour au BdF U initial ✓

Rétention Cu et Zn et élution de pics « fantômes » ✗

Nettoyage NH_4HCO_3 + EDTA → élimine Cu/Zn ✓

Taux de recouvrement U : 10 à 90% / cytosol ✗ et

100 ± 10% / séquence (cytosols + nettoyages) ✓

Taux de recouvrement protéines : 110 ± 12% ✓

⇒ **Nettoyage efficace et obligatoire**

⇒ **Screening U-biomolécules à l'échelle individuelle**

IEF hors-gel

Développement et optimisation sur pool de cytosols ?

Taux de recouvrements U et protéines ?

Validation de la méthode ?



Conditions IEF optimisées (%AP, gradient pH...) ✓

Nécessite \searrow sels : NH_4Ac 10 mM ✗

Taux de recouvrement U : 25 ± 8% ✗

Taux de recouvrement protéines : 50 ± 5% ✗

Distribution U = f(pI) accord avec IEF sur bandelette ✓,

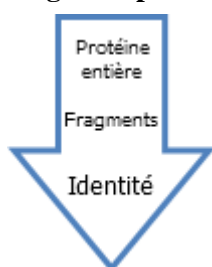
temps réduit (~12x) ✓ mais résolution inférieure ✗

Isolement U-BSA : $pI_{\text{exp}} = pI_{\text{théo}}$ ✓, U et BSA co-focalisés ✓

⇒ **Taux de recouvrement et résolution modérés mais maintien possible de complexes U-biomolécule**

⇒ **Couplage avec SEC aisé (cartographie pI_xPM)**

Stratégie « top-down »



Développement et optimisation sur système modèle (complexes synthétiques U-protéine) ?

Faisabilité à partir de l'IEF hors-gel ?

RP(C₄)-UHPLC optimisée (éluants, gradient...) :

Double détection élémentaire et moléculaire ✓

Elution de U-BSA et U-transferrine possible ✓

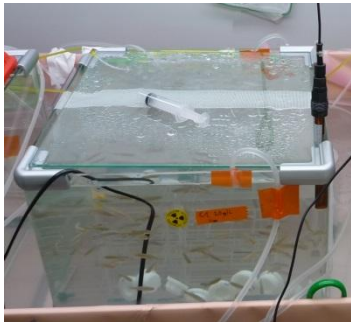

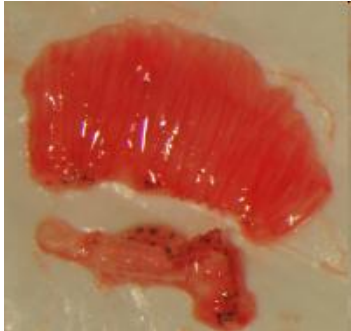
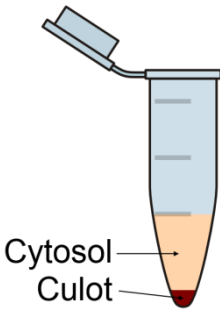
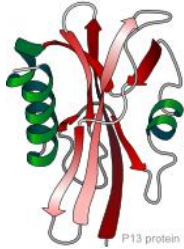
Analyse d'une fraction IEF hors-gel contenant U-BSA

Détection de U ✓ et identification de BSA ✓ mais pas d'évidence de complexes U-BSA intacts en ESI-MS à ce stade ✗

⇒ **Approche à améliorer mais résultats prometteurs**

Légende : (✓) avantage, (✗) inconvénient, (≡) équivalent, (≅) environ équivalent, (~) environ

SYNTHESE : Résultats écotoxicologiques

<i>Echelle d'étude</i>	<i>Problématique</i>	<i>Résultats / Conclusions</i>
Milieu d'exposition 	<p>Conditions contrastées ?</p> <p>Biodisponibilité maintenue et équivalente de U ?</p>	<p>Conditions c_0, c_{20} et c_{250} bien contrastées d'après $[U]_{total}$, $[U]_{dissous}$, $[U]_{labile}$ suivies sur 3 et 30 jours</p> <p>Biodisponibilité = $f(\text{Spéciation}) = f(\text{pH})$ pH régulé et équivalent \forall condition et temps</p> <p>\Rightarrow Comparaison de résultats possible entre conditions d'exposition</p>
Poisson 	<p>Organotropisme de U ? (n = 8-10)</p> <p>Place des branchies ? (n = 4-5)</p> <p>Influence de la condition d'exposition ?</p>	<p>Peau/écailles + squelette + système digestif = 85 à 95% de l'U corporel total (\forall condition et temps)</p> <p>Branchies ~ 0,3% (c_0), 2% (c_{20}) et 10% (c_{250}) de l'U corporel total</p> <p>$\Rightarrow [U]_{branchies} = f([U]_{exposition})$ mais $\neq f(t_{exposition})$</p>
Branchie 	<p>Histologie ? (n = 5)</p> <p>Répartition subcellulaire de U ? (n = 4-5)</p> <p>Granules d'U ? (n = 5)</p> <p>Influence de U sur métaux endogènes ? (n = 2)</p>	<p>Altérations histologiques observées : c_0-3/30j (\emptyset), c_{20}-3j ($\sim\emptyset$), c_{250}-3j (+) et c_{20}-30j (++)</p> <p>$\%U_{cytosol} = 24 \pm 2\%$ (c_{20}) vs. $32,0 \pm 0,6\%$ (c_{250}) $\Rightarrow \%U_{cytosol} = f([U]_{exposition})$ mais $\neq f(t_{exposition})$</p> <p>Absence de granules ou précipités d'U $\Rightarrow A priori$ pas de détoxification <i>via</i> granules</p> <p>\Rightarrow Pas d'influence significative sur niveaux Cu, Zn et Fe</p>
Cytosol 	<p>Distribution de U sur les biomolécules cytosoliques (selon PM, pI et pIxPM) ? (n = 4-5 pour PM) (1-3 pool de 4 individus pour pI)</p> <p>Influence de U sur métaux endogènes ?</p>	<p>Distribution U = $f([U]_{exposition})$ selon PM et pI HPM/BPM = 20/80 (c_0, c_{20}) vs. 50/50 (c_{250}) HPM ~ U toxique / BPM ~ U détoxiqué Fractions riches en U : pI 5,3 et 6,8 (c_{20}) vs. pI 5,3 (c_{250}) \Rightarrow Mécanismes tox/détox différents selon $[U]_{exposition}$</p> <p>\Rightarrow Corrélation U-P sur cartographie pIxPM \Rightarrow Pas d'influence significative sur distribution de Cu, Zn et Fe mais \exists co-élutions U avec Cu, Zn, Fe</p>
Biomolécules 	<p>Caractéristiques et identité des cibles moléculaires de U ? (4 fractions IEF hors-gel et 10 sections IEF sur bandelette riches en U)</p>	<p>24 protéines candidates identifiées <i>in vivo</i> (actine, parvalbumine, apolipoprotéine...)</p> <p>\Rightarrow Affinité U pour protéines à caractère acide et/ou contenant P (phosphorylation, ATP...) \Rightarrow Affinité U pour metalloprotéines (hémoglobine...)</p>

Légende : (\emptyset) absence d'effet, (+) effet léger, (++) effet important, (\sim) environ, (n) nombre d'individus analysés par condition d'exposition

CONCLUSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis de contribuer à la compréhension globale du devenir de l'uranium chez une espèce aquatique modèle, *i.e.* le poisson zèbre, et plus particulièrement dans un organe cible, *i.e.* les branchies, après expositions par voie directe en conditions contrastées (aigüe vs. chronique, 20 et 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). L'étude a porté sur différents niveaux d'organisation biologique (*e.g.* corps entier, organes, fractions subcellulaires, biomolécules) avec pour objectif principal l'analyse de la compartimentalisation cellulaire et de la prise en charge de l'uranium par les protéines cytosoliques des cellules branchiales. L'utilisation de techniques analytiques de pointe (*e.g.* SEC-ICP-SFMS, IEF hors-gel, RP(C₄)-ICP/ESI-MS, ICP-MS/AES, microscopie optique et MET-EDX, μ RP-HPLC-ESI-MS²) a rendu possible cette étude multi-échelle de la contamination du poisson zèbre par l'uranium, du milieu d'exposition jusqu'aux complexes U-biomolécule présents dans les branchies.

Le suivi du milieu d'exposition a mis en évidence la nécessité d'optimiser et de prendre en compte de nombreux paramètres physico-chimiques tels le pH, la dureté, ainsi que les modalités d'exposition (*e.g.* densité de poissons, modalité de régulation), afin de maintenir le bien-être des poissons et de stabiliser la spéciation chimique de l'uranium dans le milieu d'exposition, en lien avec sa biodisponibilité. Dans notre cas, le maintien du pH dans les trois conditions d'exposition (c_0 , c_{20} et c_{250}), et sur l'ensemble de la durée d'exposition, nous a permis d'obtenir une spéciation permettant la comparaison des résultats écotoxicologiques obtenus sur les poissons.

L'investigation de l'organotropisme de l'uranium à l'échelle du poisson entier a montré que l'essentiel de la charge corporelle en uranium (85 à 95%) est présente dans l'ensemble formé par la peau (écailles), le squelette et le système digestif. Cependant, elle a aussi confirmé la place de l'épithélium branchial en tant qu'organe accumulateur et ce, significativement dès 3 jours d'exposition dans la condition la plus faible c_{20} , en comparaison de la condition témoin c_0 . A l'échelle de l'organe entier et de la fraction cytosolique des cellules le composant, la concentration en uranium est essentiellement fonction de la concentration d'exposition et non du temps d'exposition. Au contraire, les altérations histologiques plus ou moins prononcées observées dans cette étude sont fonction du niveau et du temps d'exposition. Toutefois, aucune forme de « détoxification » *via* des granules riches en uranium n'a été observée par MET-EDX.

La fraction cytosolique des cellules branchiales a fait l'objet d'une étude plus poussée puisqu'elle concentre un grand nombre de biomolécules solubles, susceptibles de lier l'uranium. La nature non-covalente des espèces U-biomolécule ainsi que leur faible concentration en milieu biologique complexe ont nécessité le développement de

méthodologies analytiques non-dénaturantes et sensibles, de la préparation des échantillons jusqu'à l'identification des biomolécules cibles de l'uranium, en favorisant l'analyse à l'échelle de l'individu (préservation maximale de l'information interindividuelle).

L'utilisation de techniques séparatives en phase liquide a été privilégiée afin de maintenir autant que possible la spéciation initiale des complexes U-biomolécules en milieu liquide (moindre interaction vis-à-vis des métallobiomolécules que les séparations sur gel), et de faciliter leur couplage (séparation 2D) et la caractérisation moléculaire des complexes présents. Par ailleurs, il a été montré dans cette étude que le couplage de la chromatographie en phase liquide (SEC, RP...) avec la détection multi-élémentaire par ICP-SFMS offre un gain important en sensibilité sur l'uranium, permettant d'appréhender des niveaux de contamination bas (*e.g.* quelques pgU.mg^{-1} de branchie fraîche). La résolution de ce détecteur a également rendu possible le suivi d'éléments majeurs interférés en ICP-MS quadripolaire, tels que ^{56}Fe et ^{31}P , avec une bonne sensibilité. Ainsi, la méthode SEC-ICP-SFMS mise en place nous a permis d'étudier la distribution de l'uranium parmi le pool de biomolécules cytosoliques en fonction de leur poids moléculaire, à l'échelle individuelle. En parallèle, une méthode combinant l'IEF hors-gel avec la détection par ICP-MS a été développée afin d'explorer la distribution de l'uranium en fonction du point isoélectrique des protéines. Enfin, une approche RP(C₄)-ICP/ESI-MS a pu être développée et a montré des résultats prometteurs pour la séparation et l'identification de complexes U-protéine.

Toutefois, la recherche de conditions non-dénaturantes a généralement un coût en termes de résolution de la séparation et de stabilité des conditions de séparation. De plus, le travail en milieu natif ne résout pas l'ensemble des problèmes d'adsorption et de taux de recouvrement en biomolécules et en métaux. En effet, des pertes en uranium, parfois importantes, ont été mesurées lors de l'analyse des cytosols par SEC ou IEF voire, dans une moindre mesure, lors du fractionnement subcellulaire. Les complexes U-biomolécules détectés sont probablement représentatifs des espèces les plus abondantes et/ou ayant les constantes d'affinité les plus élevées. Des stratégies de nettoyage efficaces ont été mises en place pour éliminer l'uranium retenu par adsorption au sein des systèmes séparatifs. En effet, ce nettoyage est indispensable afin d'éviter toute contamination croisée lors de l'analyse d'échantillons représentatifs d'une contamination environnementale. Enfin, prises individuellement, ces techniques ne sont pas assez résolutes pour isoler et *in fine* identifier formellement une biomolécule cible de l'uranium dans une matrice complexe. Le couplage des méthodes s'avère alors obligatoire afin d'obtenir une cartographie plus fine des échantillons. Comme illustré par les résultats IEF hors-gel \times SEC-ICP-SFMS et

IEF hors-gel × RP(C₄)-ICP/ESI-MS de notre étude, le préfractionnement par IEF hors-gel est une première dimension de séparation simple à coupler (hors-ligne), rapide et peu dénaturante.

Ainsi, l'exploration de l'uranium cytosolique des cellules branchiales (*i.e.* 24 à 32% de l'uranium branchial) a montré que la distribution de l'uranium en fonction du poids moléculaire ou du point isoélectrique des protéines cytosoliques est influencée par le niveau d'exposition. Ce résultat indique une prise en charge de l'uranium différente (*e.g.* U toxique vs. U détoxiqué) en fonction de la pression de contamination. En effet, pour la conditions c₂₀, près de 80% de l'uranium est pris en charge dans la fraction de BPM (≤ 4 kDa) potentiellement détoxifiante, alors que c₂₅₀ concentre autant d'uranium dans cette fraction de BPM que dans une fraction de HPM (150 – 670 kDa), éventuellement plus sensible à la présence de métaux non-essentiels. De manière plus globale, la distribution de l'uranium parmi les protéines en fonction du PM, du pI voire de la combinaison pI×PM, donne des indications sur la nature des protéines cibles de l'uranium *in vivo*. Ainsi, l'uranium présente une affinité préférentielle pour les protéines acides (pH 5-6) et en particulier celles contenant du phosphore (*e.g.* phosphorylation, ATP...). D'autre part, en dépit de l'absence d'influence de l'exposition à l'uranium sur les niveaux et la distribution de Fe, Cu et Zn parmi le pool de protéines cytosoliques, une affinité apparaît entre U et les biomolécules portant ces métaux.

A l'échelle moléculaire, 24 protéines ont été identifiées comme cibles potentielles de l'uranium dans des fractions IEF hors-gel riches en uranium. Parmi ces candidates, certaines sont particulièrement intéressantes en raison de leur relation avec le phosphore (*e.g.* actine, phosphorotéine Anp32, HSP70), le calcium (*e.g.* parvalbumine, protéine 14-3-3, plastine) ou le fer (*e.g.* hémoglobine, myoglobine). En outre, certaines ont un rôle identifié dans la respiration (*e.g.* hémoglobine, superoxyde dismutase, myoglobine), l'homéostasie des ions/acides/bases (*e.g.* anhydrase carbonique, parvalbumine), le métabolisme des acides aminés/sucres (*e.g.* anhydrase carbonique, lactate déshydrogénase) ou le maintien de la structure cellulaire (*e.g.* actine). Cependant, la formation effective des complexes U-protéine reste à prouver. A ce stade, seule la co-élution de l'uranium avec l'hémoglobine (n'appartenant pas spécifiquement à la branchie mais reliquat après exsanguination lors du sacrifice) a pu être appuyée par l'approche RP(C₄)-ICP/ESI-MS développée au cours de cette thèse.

Si l'étude *in vivo* de la spéciation chimique de l'uranium en milieu biologique représente une étape clé pour la compréhension des mécanismes de toxicité de cet élément, ce projet révèle aussi certaines limitations techniques dans sa réalisation. Ainsi, tout en veillant à la maîtrise du bilan de matière en uranium (*e.g.* taux de recouvrement, nettoyage) ainsi qu'à l'optimisation du pouvoir résolutif des techniques séparatives en conditions non-dénaturantes, les axes d'amélioration principaux portent sur : (i) la poursuite du développement de l'approche top-down par RP(C₄)-ICP/ESI-MS et/ou l'intégration de nouvelles méthodes permettant la caractérisation des complexes non-covalents U-biomolécules intacts, (ii) l'utilisation d'un évaporateur centrifuge thermostaté à basse température (*e.g.* CentriVap) pour la pré-concentration des échantillons en conditions non-dénaturantes (chauffe et congélation évitées) entre différentes étapes séparatives (2D) et, (iii) la disponibilité de complexes U-biomolécule étalons voire idéalement de tissus de « référence » pour le développement ainsi que la validation des méthodes analytiques. Concernant ce dernier point d'amélioration, le complexe U-féтуine ayant une bonne stabilité ($K_d = 30$ nM) et un PM moyen (≈ 48 kDa), peut représenter un bon candidat en première approche. Cependant, la littérature a aussi démontré les possibilités offertes par l'ingénierie moléculaire afin d'augmenter l'affinité d'une biomolécule pour l'uranium. C'est peut-être là, la clé pour l'obtention d'un complexe U-biomolécule étalon. Par ailleurs, la disponibilité d'un tissu de « référence » constituerait une aide précieuse au développement méthodologique. A cet effet, l'étude d'un organisme aquatique modèle de dimension supérieure à celle de *Danio rerio* s'avère indispensable afin de disposer d'une quantité plus importante de matériel biologique et de pouvoir réaliser des comparaisons robustes entre les méthodes. Sur le plan du développement de l'approche top-down, un effort d'optimisation des paramètres de détection ESI-MS (débits de gaz, températures, voltages), lors du couplage avec RP(C₄), doit encore être effectué pour la détection de complexes non-covalents. De plus, le travail en conditions non-dénaturantes (pH modérément acide) ne favorise pas les états de charge élevés en électrospray et l'utilisation d'un analyseur TOF donnerait accès à une gamme de m/z plus large que l'Orbitrap (Potier *et al.*, 2005). Un essai d'identification des complexes U-biomolécule intacts pourrait aussi être envisagé par MALDI-TOF-MS (Beck *et al.*, 2001; Meija *et al.*, 2006) à partir de fractions IEF hors-gel \times SEC. Cette technique hors-ligne est une alternative à l'ESI-MS pour l'analyse de biomolécules intactes. Elle peut bénéficier d'une meilleure sensibilité que l'ESI-MS (absence d'adduits de solvant), mais nécessite de déposer et sécher les fractions liquides, additionnées d'une matrice promouvant l'ionisation, sur un support spécifique. Cette étape présente l'avantage de pré-concentrer les échantillons

(compense la forte dilution en SEC), mais l'inconvénient de provoquer une incertitude sur la représentativité de la spéciation en solution (phase solide, ajout de matrice). Enfin, bien qu'adaptée à la séparation de biomolécules, la colonne chromatographique RP(C₄)-UHPLC choisie pour cette étude pourrait éventuellement être substituée par une colonne RP capillaire monolithique pouvant réduire les interactions analyte-phase stationnaire et réduisant significativement la pression de travail.

Sur le plan écotoxicologique, les perspectives à court ou moyen terme de ces travaux sur le poisson zèbre incluent : (i) la poursuite de l'identification des biomolécules cibles de l'uranium dans les branchies après différentes conditions d'exposition et, (ii) la mise en regard du rôle biologique de ces biomolécules avec les effets observés dans les études précédentes, à la recherche d'éventuels liens de causalité. Notons qu'une étude similaire sur les reins, cible privilégiée et organe de stockage de l'uranium, est actuellement menée dans le cadre du projet ST MALO (ANR-10-JCJC-0713). Plus précisément concernant le premier point, la complexation de l'uranium par les protéines identifiées à ce jour dans les fractions IEF hors-gel riches en uranium doit être confirmée par une approche top-down du type RP(C₄)-ICP/ESI-MS. La spectrométrie de masse moléculaire pourra aussi théoriquement nous apporter des informations utiles sur le niveau de phosphorylation des protéines liant l'uranium. D'autre part, les fractions en question sont complexes et d'autres espèces U-biomolécule sont susceptibles d'être identifiées, notamment avec les améliorations techniques discutées précédemment. De la même manière, l'influence des conditions d'exposition sur le type de biomolécules prenant en charge l'uranium pourrait être approfondie en poursuivant le travail initié sur la caractérisation expérimentale ($[U]_{\text{dissous/labile}}$) et théorique (simulations Visual MINTEQ/CHESS) de l'exposition. Des expériences complémentaires pourraient être réalisées en faisant varier la biodisponibilité de l'uranium dans le milieu d'exposition, notamment par addition contrôlée de MOD, et en observant l'impact sur l'accumulation et la spéciation de l'uranium à l'échelle du cytosol. L'ensemble de ces travaux pourrait aboutir, à plus long terme, à une meilleure connaissance des mécanismes d'incorporation, de transport, de stockage et d'excrétion de l'uranium au sein des organismes aquatiques en regard des conditions d'exposition. Par ailleurs, certains marqueurs moléculaires de contamination ou de toxicité pourraient être identifiés, en particulier dans le cadre d'une exposition chronique. Il serait ensuite particulièrement intéressant d'étudier la sensibilité de ces marqueurs sur des individus exposés à des concentrations encore inférieures à 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, voire *in fine* de pouvoir s'intéresser à des cas plus complexes tels que celui des individus exposés en milieu naturel (problématique multi-pollution...). Enfin, l'aspect dépuratif n'a pas été abordé dans cette

étude, or ce paramètre est important à prendre en compte dans les modèles de toxicité, et il serait justifié d'étudier la prise en charge moléculaire de l'uranium dans ces conditions.

Pour conclure, au vue des résultats de ce travail, les pistes de recherche et d'applications possibles s'avèrent être nombreuses. Dans ce contexte, de nouveaux programmes d'étude pourront voir le jour afin de contribuer au contexte global d'évaluation des risques chroniques après exposition d'organismes aux radionucléides.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications

- **“Different uranium distribution patterns in cytosolic protein pool of zebrafish gills after chronic and acute waterborne exposures”**
G. Bucher, S. Mounicou, O. Simon, M. Floriani, R. Lobinski, S. Frelon
Soumise au journal « Chemosphere » et présentée en annexe
- **“Development of non-denaturing off-gel fractionation techniques for the separation of intact uranium-protein complexes in biological samples”**
G. Bucher, S. Frelon, O. Simon, R. Lobinski, S. Mounicou
En cours de préparation pour publication sous forme de « note technique »

Communications orales

- **“Influence of exposure conditions on uranium distribution among biomolecules in cytosolic fraction of zebrafish (*Danio rerio*) gills by SEC-ICP-HR-MS”**
G. Bucher, S. Mounicou, O. Simon, R. Lobinski, S. Frelon
Workshop on Bioinorganic Analytical Chemistry 2012, Gijon, Espagne
- **“Performance of DGT to characterize the exposure of aquatic organisms to uranium”**
L. Février, S. Guigues, G. Bucher, S. Frelon, R. Gilbin (Présenté par L. Février)
Conference on DGT and the Environment 2013, Lancaster, Royaume-Uni
- **“Uranium distribution among cytosolic proteins of *Danio rerio* gills after different exposure conditions”**
G. Bucher, S. Mounicou, O. Simon, L. Février, R. Lobinski, S. Frelon
SETAC Europe Annual Meeting 2013, Glasgow, Royaume-Uni
- **« Application de la focalisation isoélectrique in- et off-gel pour l'étude de la distribution protéique de l'uranium dans un cytosol de branchies de poisson zèbre après exposition aiguë et chronique – Avantages et inconvénients de chaque approche »**
G. Bucher, S. Frelon, O. Simon, R. Lobinski, S. Mounicou
Séminaire ToxNuc 2013, Paris, France

Communications affichées (Poster)

- **“Uranium distribution and speciation in environmental aquatic species”**
S. Mounicou, G. Bucher, M. Floriani, L. Ouerdane, O. Simon, R. Lobinski, R. Gilbin, S. Frelon
Séminaire ToxNuc 2010, Paris, France
- **“Development of non-denaturing off-gel fractionation techniques for the separation of intact uranium-protein complexes in biological samples”**
G. Bucher, S. Frelon, O. Simon, R. Lobinski, S. Mounicou
Metallomics 2013, Oviedo, Espagne

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, W.J., Blust, R., Borgmann, U., Brix, K.V., DeForest, D.K., Green, A.S., Meyer, J.S., McGeer, J.C., Paquin, P.R., Rainbow, P.S., *et al.* (2011). Utility of tissue residues for predicting effects of metals on aquatic organisms. *Integrated Environmental Assessment and Management* 7, 75-98.
- AgilentTechnology (2010). Agilent 3100 OFFGEL Fractionator (Rapport 5990-5596EN) (<http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5990-5596EN.pdf>)
- Ahamed, T., Nfor, B.K., Verhaert, P.D.E.M., van Dedem, G.W.K., van der Wielen, L.A.M., Eppink, M.H.M., van de Sandt, E.J.A.X., et Ottens, M. (2007). pH-gradient ion-exchange chromatography: An analytical tool for design and optimization of protein separations. *Journal of Chromatography A* 1164, 181-188.
- AIEA Depleted Uranium : Questions and Answers.
- Al Kaddissi, S., Frelon, S., Elia, A.-C., Legeay, A., Gonzalez, P., Coppin, F., Orjollet, D., Camilleri, V., Beaugelin-Seiller, K., Gilbin, R., *et al.* (2012). Are antioxidant and transcriptional responses useful for discriminating between chemo- and radiotoxicity of uranium in the crayfish *Procambarus clarkii*? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 266-272.
- Al Kaddissi, S., Legeay, A., Gonzalez, P., Floriani, M., Camilleri, V., Gilbin, R., et 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.
- Amersham (1998). Guide to Isoelectric Focusing (Rapport APB, RW 5/5/98)
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., et Rainbow, P.S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160-202.
- Andón, B., Barbosa, J., et Sanz-Nebot, V. (2006). Separation and characterization of rabbit liver apothioneins by capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis* 27, 3661-3670.
- Ansoborlo, E., Prat, O., Moisy, P., Den Auwer, C., Guilbaud, P., Carriere, M., Gouget, B., Duffield, J., Doizi, D., Vercouter, T., *et al.* (2006). Actinide speciation in relation to biological processes. *Biochimie* 88, 1605-1618.
- AppliChem (2008). Biological Buffers (Rapport (<http://www.applichem.com/en/literature/brochures/biological-buffers/>))
- Apte, S.C., Batley, G.E., Bowles, K.C., Brown, P.L., Creighton, N., Hales, L.T., Hyne, R.V., Julli, M., Markich, S.J., Pablo, F., *et al.* (2005). A Comparison of Copper Speciation Measurements with the Toxic Responses of Three Sensitive Freshwater Organisms. *Environmental Chemistry* 2, 320-330.
- Arredondo, M., et Núñez, M.T. (2005). Iron and copper metabolism. *Molecular Aspects of Medicine* 26, 313-327.
- Arrey, T.N., Rietschel, B., Papatotrlou, D.G., Bornemann, S., Baeumllsberger, D., Karas, M., et Meyer, B. (2010). Approaching the complexity of elastase-digested membrane proteomes using off-gel ief/ nlc-maldi-ms/ms. *Analytical Chemistry* 82, 2145-2149.
- ATSDR (1999). Toxicological Profile for Uranium, Health Effects (Rapport ATSDR (2004). INTERACTION PROFILE FOR: CYANIDE, FLUORIDE, NITRATE, AND URANIUM (Rapport ip09)
- Augustine, S. (2012). Thèse de doctorat: Metabolic programming of zebrafish, *Danio rerio* uncovered.
- Physiological performance as explained by Dynamic Energy Budget Theory and life-cycle consequences of uranium induced perturbations. (Aix-Marseille 1)

- Averseng, O., Hagège, A., Taran, F., et Vidaud, C. (2010). Surface plasmon resonance for rapid screening of uranyl affine proteins. *Analytical Chemistry* 82, 9797-9802.
- Balistrieri, L.S., et Blank, R.G. (2008). Dissolved and labile concentrations of Cd, Cu, Pb, and Zn in the South Fork Coeur d'Alene River, Idaho: Comparisons among chemical equilibrium models and implications for biotic ligand models. *Applied Geochemistry* 23, 3355-3371.
- Balistrieri, L.S., Nimick, D.A., et Mebane, C.A. (2012). Assessing time-integrated dissolved concentrations and predicting toxicity of metals during diel cycling in streams. *Science of The Total Environment* 425, 155-168.
- Barillet, S. (2007). Thèse de doctorat: Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Université Paul Verlaine de Metz)
- Barillet, S., Adam-Guillermin, C., Palluel, O., Porcher, J.-M., et 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., et 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.
- Basset, C., Averseng, O., Ferron, P.-J., Richaud, N., Hagège, A., Pible, O., et Vidaud, C. (2013). Revision of the Biodistribution of Uranyl in Serum: Is Fetuin-A the Major Protein Target? *Chemical Research in Toxicology* 26, 645-653.
- Basset, C., Dedieu, A., Guérin, P., Quéméneur, E., Meyer, D., et Vidaud, C. (2008). Specific capture of uranyl protein targets by metal affinity chromatography. *Journal of Chromatography A* 1185, 233-240.
- Beaugelin-Seiller, K., Garnier-Laplace, J., Gilbin, R., et Février, L. (2009). Prise en compte de l'influence de la spéciation chimique de l'uranium dans l'analyse de ses effets écotoxiques en eau douce. (Rapport 2009-038)
- Beck, J.L., Colgrave, M.L., Ralph, S.F., et Sheil, M.M. (2001). Electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotide complexes with drugs, metals, and proteins. *Mass Spectrometry Reviews* 20, 61-87.
- Becker, J.S., Mounicou, S., Zoriy, M.V., Becker, J.S., et Lobinski, R. (2008). Analysis of metal-binding proteins separated by non-denaturing gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta* 76, 1183-1188.
- Becker, J.S., Zoriy, M., Becker, J.S., Pickhardt, C., Damoc, E., Juhacz, G., Palkovits, M., et Przybylski, M. (2005). Determination of Phosphorus-, Copper-, and Zinc-Containing Human Brain Proteins by LA-ICPMS and MALDI-FTICR-MS. *Analytical Chemistry* 77, 5851-5860.
- Bio-Rad (2005). MicroRotofor Liquid-Phase IEF Cell (Rapport 5294) (http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5294.pdf)
- Bleise, A., Danesi, P.R., et Burkart, W. (2003). Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *Journal of Environmental Radioactivity* 64, 93-112.
- Bol, E. (2007). Thèse de doctorat: Biochemistry of Tungstoenzymes from *Pyrococcus furiosus* (Technische Universiteit Delft)
- Bonin, B., et Blanc, P.L. (2001). L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine. In *L'uranium, de l'environnement à l'homme*, E.S. Ed, ed. (Métivier H, IRSN Collection).
- Bourrachot, S. (2009). Thèse de doctorat: Etude des effets biologiques de l'exposition à l'uranium chez le poisson zèbre (*D. Rerio*) : impact sur les stades de vie (Aix-Marseille 1)

- Bourrachot, S., Simon, O., et 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.
- Bresson, C., Ansoborlo, E., et Vidaud, C. (2011). Radionuclide speciation: A key point in the field of nuclear toxicology studies. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26, 593-601.
- Bury, N.R., et Grosell, M. (2003). Waterborne iron acquisition by a freshwater teleost fish, zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Experimental Biology* 206, 3529-3535.
- Cain, D.J., et Luoma, S.N. (1998). Metal exposures to native populations of the caddisfly *Hydropsyche* (Trichoptera: Hydropsychidae) determined from cytosolic and whole body metal concentrations. *Hydrobiologia* 386, 103-117.
- Campbell, P.G.C. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. 45-102.
- Campbell, P.G.C., Pelletier, E., et Denizeau, F. (2004). *Ecotoxicologie Moléculaire: Principes Fondamentaux et Perspectives de Développement* (Presses de l'Université du Québec).
- CarlRoth (2012). Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) (Technical Note) (Rapport
- Causon, T.J., Nordborg, A., Shellie, R.A., et Hilder, E.F. (2010). High temperature liquid chromatography of intact proteins using organic polymer monoliths and alternative solvent systems. *Journal of Chromatography A* 1217, 3519-3524.
- Chaumande, B. (2011). Thèse de doctorat: Apport des analyses protéomique et métallogprotéomique pour l'étude de la géophagie (Université de Strasbourg)
- Chenau, J., Michelland, S., Sidibe, J., et Seve, M. (2008). Peptides OFFGEL electrophoresis: a suitable pre-analytical step for complex eukaryotic samples fractionation compatible with quantitative iTRAQ labeling. *Proteome Sci* 6, 9.
- Cheng, K.L., Hogan, A.C., Parry, D.L., Markich, S.J., Harford, A.J., et van Dam, R.A. (2010). Uranium toxicity and speciation during chronic exposure to the tropical freshwater fish, *Mogurnda mogurnda*. *Chemosphere* 79, 547-554.
- Chevari, S., et Likhner, D. (1968). Complex formation of natural uranium in blood. *Kompleksoobrazovanie estestvennogo urana v krvi* 13, 53-57.
- Chevreur, S., Roudeau, S., Fraysse, A., Carmona, A., Deves, G., Solari, P.L., Weng, T.C., et Ortega, R. (2008). Direct speciation of metals in copper-zinc superoxide dismutase isoforms on electrophoresis gels using X-ray absorption near edge structure. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 23, 1117-1120.
- Claveranne-Lamolère, C., Lespes, G., Dubascoux, S., Aupiais, J., Pointurier, F., et Potin-Gautier, M. (2009). Colloidal transport of uranium in soil: Size fractionation and characterization by field-flow fractionation multi-detection. *Journal of Chromatography A* 1216, 9113-9119.
- Cooley, H.M., Evans, R.E., et Klaverkamp, J.F. (2000). Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* 48, 495-515.
- Craig, P.M., Galus, M., Wood, C.M., et McClelland, G.B. (2009). Dietary iron alters waterborne copper-induced gene expression in soft water acclimated zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 296, R362-R373.
- D'Amici, G.M., Timperio, A.M., et Zolla, L. (2008). Coupling of Native Liquid Phase Isoelectrofocusing and Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis: A Potent Tool for Native Membrane Multiprotein Complex Separation. *Journal of Proteome Research* 7, 1326-1340.
- Davison, W., et Zhang, H. (2012). Progress in understanding the use of diffusive gradients in thin films (DGT) back to basics. *Environmental Chemistry* 9, 1-13.

- De Souza, A.G., MacCormack, T.J., Wang, N., Li, L., et Goss, G.G. (2009). Large-scale proteome profile of the zebrafish (*Danio rerio*) gill for physiological and biomarker discovery studies. *Zebrafish* 6, 229-238.
- De Stefano, C., Gianguzza, A., Pettignano, A., et Sammartano, S. (2005). Interaction of UO_2^{2+} with ATP in aqueous ionic media. *Biophysical Chemistry* 117, 147-153.
- Deane, E.E., et Woo, N.Y.S. (2006). Impact of heavy metals and organochlorines on hsp70 and hsc70 gene expression in black sea bream fibroblasts. *Aquatic Toxicology* 79, 9-15.
- Dedieu, A., Bérenguer, F., Basset, C., Prat, O., Quéméneur, E., Pible, O., et Vidaud, C. (2009). Identification of uranyl binding proteins from human kidney-2 cell extracts by immobilized uranyl affinity chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 5365-5376.
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., et Santore, R.C. (2001). Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical Basis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2383-2396.
- Doker, S., Mounicou, S., Dogan, M., et Lobinski, R. (2010). Probing the metal-homeostasis effects of the administration of chromium(vi) to mice by ICP MS and size-exclusion chromatography-ICP MS. *Metallomics* 2, 549-555.
- Domingo, J.L., Llobet, J.M., Tomás, J.M., et Corbella, J. (1987). Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 168-174.
- Donnadieu-Claraz, M., Bonnehogne, M., Dhieux, B., Maubert, C., Cheynet, M., Paquet, F., et Gourmelon, P. (2007). Chronic exposure to uranium leads to iron accumulation in rat kidney cells. *Radiation Research* 167, 454-464.
- Duffus, J.H., Nordberg, M., et Templeton, D.M. (2007). Glossary of terms used in toxicology, 2nd edition (IUPAC Recommendations 2007). *Pure and Applied Chemistry* 79, 1153-1344.
- Everley, R.A., et Croley, T.R. (2008). Ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry of intact proteins. *Journal of Chromatography A* 1192, 239-247.
- Eyckmans, M., Blust, R., et De Boeck, G. (2012). Subcellular differences in handling Cu excess in three freshwater fish species contributes greatly to their differences in sensitivity to Cu. *Aquatic Toxicology* 118-119, 97-107.
- Farrell, A.P., Brauner, C.J., et Wood, C.M. (2011). *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals*, Vol Volume 31, Part B (Elsevier Science).
- Federici, G., Shaw, B.J., et Handy, R.D. (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* 84, 415-430.
- Fekete, S., Berky, R., Fekete, J., Veuthey, J.-L., et Guillarme, D. (2012). Evaluation of recent very efficient wide-pore stationary phases for the reversed-phase separation of proteins. *Journal of Chromatography A* 1252, 90-103.
- Ferrarello, C.N., Fernández de la Campa, M.D.R., Muñiz, C.S., et Sanz-Medel, A. (2000). Metal distribution patterns in the mussel *Mytilus edulis* cytosols using size-exclusion chromatography and double focusing ICP-MS detection. *Analyst* 125, 2223-2229.
- Fitzgerald, A., et Walsh, B.J. (2010). New method for prefractionation of plasma for proteomic analysis. *Electrophoresis* 31, 3580-3585.
- Fortin, C., Denison, F.H., et 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.
- Frelon, S., Guipaud, O., Mounicou, S., Lobinski, R., Delissen, O., et Paquet, F. (2009). In vivo screening of proteins likely to bind uranium in exposed rat kidney. *Radiochimica Acta* 97, 367-373.

- Frelon, S., Mounicou, S., Lobinski, R., Gilbin, R., et Simon, O. (2013). Subcellular fractionation and chemical speciation of uranium to elucidate its fate in gills and hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii*. *Chemosphere*.
- Frey, D.D., Narahari, C.R., et Bates, R.C. (2001). Chromatofocusing. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Fujisawa, H. (2001). Regulation of the Activities of Multifunctional Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinases. *Journal of Biochemistry* 129, 193-199.
- Garcia, J.S., De Magalhães, C.S., et Arruda, M.A.Z. (2006). Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta* 69, 1-15.
- Geffard, A., Sartelet, H., Garric, J., Biagianti-Risbourg, S., Delahaut, L., et Geffard, O. (2010). Subcellular compartmentalization of cadmium, nickel, and lead in *Gammarus fossarum*: Comparison of methods. *Chemosphere* 78, 822-829.
- GEHealthcare (2004). 2-D Electrophoresis: Principles and Methods (Rapport 80-6429-60AC)
- Giddings, J.C. (1966). New separation concept based on a coupling of concentration and flow non-uniformities. *Separation Science*, 123-125.
- Giguère, A., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Perceval, O., Hare, L., Pinel-Alloul, B., et Pellerin, J. (2003). Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 64, 185-200.
- Gilles, R., et Anctil, M. (2006). *Physiologie animale (De Boeck Supérieur)*.
- Glynn, A.W. (1996). The concentration dependency of branchial intracellular cadmium distribution and influx in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Aquatic Toxicology* 35, 47-58.
- Goulet, R.R., Fortin, C., Spry, D.J., Chris M. Wood, A.P.F., et Colin, J.B. (2011). 8 - Uranium. In *Fish Physiology (Academic Press)*, pp. 391-428.
- Hamer, D.H. (1986). Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* VOL. 55, 913-951.
- Heller, M., Michel, P.E., Morier, P., Crettaz, D., Wenz, C., Tissot, J.-D., Reymond, F., et Rossier, J.S. (2005). Two-stage Off-Gel™ isoelectric focusing: Protein followed by peptide fractionation and application to proteome analysis of human plasma. *ELECTROPHORESIS* 26, 1174-1188.
- Hémadi, M., Ha-Duong, N.t.-T., et El Hage Chahine, J.-M. (2011). Can Uranium Be Transported by the Iron-Acquisition Pathway? Ur Uptake by Transferrin. *The Journal of Physical Chemistry B* 115, 4206-4215.
- Hempe, J.M., et Craver, R.D. (2000). Separation of hemoglobin variants with similar charge by capillary isoelectric focusing: Value of isoelectric point for identification of common and uncommon hemoglobin variants. *Electrophoresis* 21, 743-748.
- Heroult, J., Havard, T., et Goenaga Infante, H. (2012). Asymmetric Flow Field Flow Fractionation Coupled with ICP-MS for Speciation Analysis of Plasma Proteins (http://digital.findanalytichem.com/nxtbooks/advanstaruk/thecolumn080212_v2/#/12)
Dernier accès: 12/09/13
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., et Peterson, R.E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences* 86, 6-19.
- Hook, S.S., et Means, A.R. (2001). Ca²⁺/CaM-DEPENDENT KINASES: From Activation to Function. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41, 471-505.
- Hörth, P., Miller, C.A., Preckel, T., et Wenz, C. (2006). Efficient Fractionation and Improved Protein Identification by Peptide OFFGEL Electrophoresis. *Molecular & Cellular Proteomics* 5, 1968-1974.
- Horvatovich, P., Hoekman, B., Govorukhina, N., et Bischoff, R. (2010). Multidimensional chromatography coupled to mass spectrometry in analysing complex proteomics samples. *Journal of Separation Science* 33, 1421-1437.

- Hwang, P.P. (2009). Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Biology* 212, 1745-1752.
- Invitrogen (2010). ZOOM® IEF Fractionator: For fractionating complex protein samples using solution phase IEF (Rapport 25-0536) (http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/zoomieffractionator_man.pdf)
- IRSN (2004-2012). Programme ENVIRHOM (<http://www.irsn.fr/FR/Larecherche/Organisation/Programmes/ENVIRHOM/Pages/Programme-ENVIRHOM.aspx>) Dernier accès: 12/09/2013
- Issaq, H.J., Conrads, T.P., Janini, G.M., et Veenstra, T.D. (2002). Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. *ELECTROPHORESIS* 23, 3048-3061.
- Jandera, P. (2006). Column selectivity for two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 29, 1763-1783.
- Jin, Y., et Manabe, T. (2009a). Analysis of PEG-fractionated high-molecular-mass proteins in human plasma by non-denaturing micro 2-DE and MALDI-MS PMF. *ELECTROPHORESIS* 30, 3613-3621.
- Jin, Y., et Manabe, T. (2009b). Performance of agarose IEF gels as the first dimension support for non-denaturing micro-2-DE in the separation of high-molecular-mass plasma proteins and protein complexes. *ELECTROPHORESIS* 30, 939-948.
- Johnston, B.D., Scown, T.M., Moger, J., Cumberland, S.A., Baalousha, M., Linge, K., Van Aerle, R., Jarvis, K., Lead, J.R., et Tyler, C.R. (2010). Bioavailability of nanoscale metal oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to fish. *Environmental Science and Technology* 44, 1144-1151.
- Jones, S.L., Wang, J., Turck, C.W., et Brown, E.J. (1998). A role for the actin-bundling protein I-plastin in the regulation of leukocyte integrin function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 9331-9336.
- Jordan, M.A., Teasdale, P.R., Dunn, R.J.K., et Lee, S.Y. (2008). Modelling copper uptake by *Saccostrea glomerata* with diffusive gradients in a thin film measurements. *Environmental Chemistry* 5, 274-280.
- Kamunde, C., Clayton, C., et Wood, C.M. (2002). Waterborne vs. dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 283, R69-R78.
- Kang, X., et Frey, D.D. (2003). High-performance cation-exchange chromatofocusing of proteins. *Journal of Chromatography A* 991, 117-128.
- Kim, H., et Lubman, D.M. (2008). Micro-proteome analysis using micro-chromatofocusing in intact protein separations. *Journal of Chromatography A* 1194, 3-10.
- Kim, K.H., et Moon, M.H. (2011). Chip-Type Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channel Coupled with Mass Spectrometry for Top-Down Protein Identification. *Analytical Chemistry* 83, 8652-8658.
- Kingdon, K.H. (1923). A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures. *Physical Review* 21, 408-418.
- Klinck, J.S., Green, W.W., Mirza, R.S., Nadella, S.R., Chowdhury, M.J., Wood, C.M., et Pyle, G.G. (2007). Branchial cadmium and copper binding and intestinal cadmium uptake in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated lakes. *Aquatic Toxicology* 84, 198-207.
- Koepke, J.A., Thoma, J.F., et Schmidt, R.M. (1975). Identification of Human Hemoglobins by Use of Isoelectric Focusing in Gel. *Clinical Chemistry* 21, 1953-1955.
- Kowal-Fouchard, A., Drot, R., Simoni, E., et Ehrhardt, J.J. (2004). Use of Spectroscopic Techniques for Uranium(VI)/Montmorillonite Interaction Modeling. *Environmental Science & Technology* 38, 1399-1407.

- Krasnići, N., Dragun, Z., Erk, M., et Raspor, B. (2013). Distribution of selected essential (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, and Zn) and nonessential (Cd, Pb) trace elements among protein fractions from hepatic cytosol of European chub (*Squalius cephalus* L.). *Environmental Science and Pollution Research* 20, 2340-2351.
- Labrot, F., Narbonne, J.F., Ville, P., Saint Denis, M., et 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.
- Lam, H.-T. (2007). Thèse de doctorat: Of gels, offgel and off with the gel : development of isoelectric focusing tools for proteomics (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne)
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269, 1-20.
- Leggett, R.W., et Pellmar, T.C. (2003). The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *Journal of Environmental Radioactivity* 64, 205-225.
- Lerebours, A. (2009). Thèse de doctorat: Caractérisation des effets de l'uranium chez le poisson zèbre *Danio rerio* : mécanisme de stress, neurotoxicité et métabolisme mitochondrial (Aix-Marseille 1)
- Lerebours, A., Adam-Guillermin, C., Brèthes, D., Frelon, S., Floriani, M., Camilleri, V., Garnier-Laplace, J., et Bourdineaud, J.-P. (2010). 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., Gonzalez, P., Adam, C., Camilleri, V., Bourdineaud, J.-P., et 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.
- Leroy, D., Martinot, L., Jérôme, C., et Jérôme, R. (2001). Determination of the stability constants of uranyl/polymer complexes by differential pulse polarography. *Polymer* 42, 4589-4596.
- Li, B., Raff, J., Barkleit, A., Bernhard, G., et Foerstendorf, H. (2010). Complexation of U(VI) with highly phosphorylated protein, phosvitin: A vibrational spectroscopic approach. *Journal of Inorganic Biochemistry* 104, 718-725.
- Liu, F., Ni, H.G., Chen, F., Luo, Z.X., Shen, H., Liu, L., et Wu, P. (2012). Metal accumulation in the tissues of grass carps (*Ctenopharyngodon idellus*) from fresh water around a copper mine in Southeast China. *Environmental Monitoring and Assessment* 184, 4289-4299.
- Lobinski, R., Becker, J.S., Haraguchi, H., et Sarkar, B. (2010). Metallomics: Guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry* 82, 493-504.
- Lobinski, R., Chassaing, H., et Szpunar, J. (1998). Analysis for metallothioneins using coupled techniques. *Talanta* 46, 271-289.
- Lobinski, R., et Szpunar, J. (1999). Biochemical speciation analysis by hyphenated techniques. *Analytica Chimica Acta* 400, 321-332.
- Long, Y., Li, Q., et Cui, Z. (2011a). Molecular analysis and heavy metal detoxification of ABCC1/MRP1 in zebrafish. *Molecular Biology Reports* 38, 1703-1711.
- Long, Y., Li, Q., Li, J., et Cui, Z. (2011b). Molecular analysis, developmental function and heavy metal-induced expression of ABCC5 in zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 158, 46-55.
- Long, Y., Li, Q., Wang, Y., et Cui, Z. (2011c). MRP proteins as potential mediators of heavy metal resistance in zebrafish cells. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 153, 310-317.

- Luider, C.D., Crusius, J., Playle, R.C., et Curtis, P.J. (2004). Influence of Natural Organic Matter Source on Copper Speciation As Demonstrated by Cu Binding to Fish Gills, by Ion Selective Electrode, and by DGT Gel Sampler. *Environmental Science & Technology* 38, 2865-2872.
- Luoma, S.N. (1983). Bioavailability of trace metals to aquatic organisms — A review. *Science of The Total Environment* 28, 1-22.
- Madic, C., et Genet, M. (2001). Propriétés physiques et chimiques de l'uranium (Chapitre 2). In *L'uranium de l'environnement à l'homme*, E. science, ed., pp. 43-82.
- Magalhães, I., Ledrich, M.L., Pihan, J.C., et Falla, J. (2004). One-step, non-denaturing purification method of carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 799, 87-93.
- Manabe, T., et Jin, Y. (2010). Analysis of *E. coli* soluble proteins by non-denaturing micro 2-DE/3-DE and MALDI-MS-PMF. *ELECTROPHORESIS* 31, 2740-2748.
- Maret, W. (2010). Metalloproteomics, metalloproteomes, and the annotation of metalloproteins. *Metallomics* 2, 117-125.
- 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., et 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.
- Mathews, T., Beaugelin-Seiller, K., Garnier-Laplace, J., Gilbin, R., Adam, C., et Della-Vedova, C. (2009). A Probabilistic Assessment of the Chemical and Radiological Risks of Chronic Exposure to Uranium in Freshwater Ecosystems. *Environmental Science and Technology* 43, 6684-6690.
- McGeer, J.C., Szedbedinszky, C., Gordon McDonald, D., et Wood, C.M. (2000). Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: Tissue specific metal accumulation. *Aquatic Toxicology* 50, 245-256.
- McMaster, M.C. (2005). Appendix B: Solvents and Volatile Buffers for LC/MS. In *LC/MS* (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 139-142.
- Meador, J.P., Adams, W.J., Escher, B.I., McCarty, L.S., McElroy, A.E., et Sappington, K.G. (2011). The tissue residue approach for toxicity assessment: Findings and critical reviews from a Society of Environmental Toxicology and Chemistry Pellston Workshop. *Integrated Environmental Assessment and Management* 7, 2-6.
- Meija, J., Montes-Bayón, M., Caruso, J.A., et Sanz-Medel, A. (2006). Integrated mass spectrometry in (semi-)metal speciation and its potential in phytochemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 25, 44-51.
- Mena, M.L., Moreno-Gordaliza, E., Moraleja, I., Cañas, B., et Gómez-Gómez, M.M. (2011). OFFGEL isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis separation of platinum-binding proteins. *Journal of Chromatography A* 1218, 1281-1290.
- Michel, P.E., Reymond, F., Arnaud, I.L., Josserand, J., Girault, H.H., et Rossier, J.S. (2003). Protein fractionation in a multicompartiment device using Off-Gel™ isoelectric focusing. *ELECTROPHORESIS* 24, 3-11.
- Michon, J., Frelon, S., Garnier, C., et 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.
- Miller, A., Brooks, K., Smith, J., et Page, N. (2004). Effect of the militarily-relevant heavy metals, depleted uranium and heavy metal tungsten-alloy on gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). *Mol Cell Biochem* 255, 247-256.

- Mirto, H., Hengé-Napoli, M.H., Gibert, R., Ansoborlo, E., Fournier, M., et Cambar, J. (1999). Intracellular behaviour of uranium(VI) on renal epithelial cell in culture (LLC-PK1): influence of uranium speciation. *Toxicology Letters* *104*, 249-256.
- Montavon, G., Apostolidis, C., Bruchertseifer, F., Repinc, U., et Morgenstern, A. (2009). Spectroscopic study of the interaction of U(VI) with transferrin and albumin for speciation of U(VI) under blood serum conditions. *Journal of Inorganic Biochemistry* *103*, 1609-1616.
- Morel, F. (1983). *Principles of aquatic chemistry* (J. Wiley).
- Mounicou, S., Shah, M., Meija, J., Caruso, J.A., Vonderheide, A.P., et Shann, J. (2006). Localization and speciation of selenium and mercury in *Brassica juncea*-implications for Se-Hg antagonism. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* *21*, 404-412.
- Mounicou, S., Szpunar, J., et Lobinski, R. (2009). *Metallomics: the concept and methodology*. *Chemical Society Reviews* *38*, 1119-1138.
- Paquet, F., Houpert, P., Blanchardon, E., Delissen, O., Maubert, C., Dhieux, B., Moreels, A.M., Frelon, S., et Gourmelon, P. (2006). Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health physics* *90*, 139-147.
- Paquin, P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., Campbell, P.G.C., Delos, C.G., Di Toro, D.M., Dwyer, R.L., Galvez, F., *et al.* (2002). The biotic ligand model: A historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* *133*, 3-35.
- Pardoux, R., Sauge-Merle, S., Lemaire, D., Delangle, P., Guilloureau, L., Adriano, J.M., et Berthomieu, C. (2012). Modulating Uranium binding affinity in engineered calmodulin EF-hand peptides: Effect of phosphorylation. *PLoS ONE* *7*.
- Peijnenburg, W.J., et Vijver, M.G. (2007). Metal-specific interactions at the interface of chemistry and biology. *Pure and Applied Chemistry* *79*, 2351-2366.
- Pellerin, J., et Amiard, J.-C. (2009). Comparison of bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in two marine bivalves (*Mytilus edulis* and *Mya arenaria*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* *150*, 186-195.
- Pelletier, É., et Campbell, P.G.C. (2008). *Aquatic ecotoxicology - Comparison between organic micropollutants and metals: Current situation and future perspectives*. *L'écotoxicologie aquatique - Comparaison entre les micropolluants organiques et les métaux: Constats actuels et défis pour l'avenir* *21*, 173-197.
- Perceval, O., Couillard, Y., Pinel-Alloul, B., et 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.
- Pereira, S., Camilleri, V., Floriani, M., Cavalié, I., Garnier-Laplace, J., et Adam-Guillermin, C. (2012). Genotoxicity of uranium contamination in embryonic zebrafish cells. *Aquatic Toxicology* *109*, 11-16.
- Permyakov, E.A. (2006). *Parvalbumin* (Nova Science Pub Incorporated).
- Perry, S.F. (2008). A first look at how fish gills work. *Journal of Experimental Biology* *211*, 3519-3521.
- Petitjean, P., Henin, O., et Gruau, G. (2004). *Dosage du carbone organique dissous dans les eaux douces naturelles (Rapport Cahier technique n°3)*
- Pioselli, B., Munro, C., Raab, A., Deitrich, C.L., Songsrirote, K., Feldmann, J., et Thomas-Oates, J. (2009). Denaturing and non-denaturing microsolution isoelectric focussing to mine the metalloproteome. *Metallomics* *1*, 501-510.
- Pizarro, I., Gomez, M., Camara, C., Palacios, M.A., et Roman-Silva, D.A. (2004). Evaluation of arsenic species-protein binding in cardiovascular tissues by bidimensional

- chromatography with ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* *19*, 292-296.
- Playle, R.C. (1998). Modelling metal interactions at fish gills. *Science of The Total Environment* *219*, 147-163.
- Playle, R.C., Gensemer, R.W., et Dixon, D.G. (1992). Copper accumulation on gills of fathead minnows: Influence of water hardness, complexation and pH of the gill micro-environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* *11*, 381-391.
- Playle, R.C., et Wood, C.M. (1989). Water chemistry changes in the gill micro-environment of rainbow trout: experimental observations and theory. *Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* *159*, 527-537.
- Polec-Pawlak, K., Ruzik, R., et Lipiec, E. (2007). Investigation of Cd(II), Pb(II) and Cu(I) complexation by glutathione and its component amino acids by ESI-MS and size exclusion chromatography coupled to ICP-MS and ESI-MS. *Talanta* *72*, 1564-1572.
- Ponce De León, C.A., Montes-Bayón, M., et Caruso, J.A. (2002). Elemental speciation by chromatographic separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* *974*, 1-21.
- Potier, N., Rogniaux, H., Chevreux, G., et Van Dorselaer, A. (2005). Ligand–Metal Ion Binding to Proteins: Investigation by ESI Mass Spectrometry. In *Methods in Enzymology*, A.L. Burlingame, ed. (Academic Press), pp. 361-389.
- Prat, O., Berenguer, F., Malard, V., Tavan, E., Sage, N., Steinmetz, G., et Quemeneur, E. (2005). Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity. *Proteomics* *5*, 297-306.
- Priest, N., Howells, G., Green, D., et Haines, J. (1982). Uranium in bone: metabolic and autoradiographic studies in the rat. *Human Toxicology* *1*, 97-114.
- Rainbow, P.S. (2007). Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. *Environment International* *33*, 576-582.
- Ratanathanawongs Williams, S.K., et Lee, D. (2006). Field-flow fractionation of proteins, polysaccharides, synthetic polymers, and supramolecular assemblies. *Journal of Separation Science* *29*, 1720-1732.
- Ray, R.S., Krüger, S., et Rösch, N. (2010). Ternary uranyl hydroxo acetate complexes: A computational study of structure, energetics, and stability constants. *Inorganica Chimica Acta* *363*, 263-269.
- Reschiglian, P., et Moon, M.H. (2008). Flow field-flow fractionation: A pre-analytical method for proteomics. *Journal of Proteomics* *71*, 265-276.
- Richardson, M.R., Liu, S., Ringham, H.N., Chan, V., et Witzmann, F.A. (2008). Sample complexity reduction for two-dimensional electrophoresis using solution isoelectric focusing prefractionation. *ELECTROPHORESIS* *29*, 2637-2644.
- Righetti, P.G., Castagna, A., Herbert, B., Reymond, F., et Rossier, J.S. (2003). Prefractionation techniques in proteome analysis. *PROTEOMICS* *3*, 1397-1407.
- Røyset, O., Rosseland, B.O., Kristensen, T., Kroglund, F., Garmo, Ø.A., et Steinnes, E. (2005). Diffusive gradients in thin films sampler predicts stress in brown trout (*Salmo trutta* L.) exposed to aluminum in acid fresh waters. *Environmental Science and Technology* *39*, 1167-1174.
- Safi, S., Creff, G., Jeanson, A., Qi, L., Basset, C., Roques, J., Solari, P.L., Simoni, E., Vidaud, C., et Den Auwer, C. (2013). Osteopontin: A Uranium Phosphorylated Binding-Site Characterization. *Chemistry – A European Journal*, n/a-n/a.
- Salonen, L. (1994). ²³⁸U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock. *Future groundwater resources at risk*, 71-84.

- Sappal, R., Burka, J., Dawson, S., et Kamunde, C. (2009). Bioaccumulation and subcellular partitioning of zinc in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Cross-talk between waterborne and dietary uptake. *Aquatic Toxicology* 91, 281-290.
- Satori, C.P., Kostal, V., et Arriaga, E.A. (2012). Review on recent advances in the analysis of isolated organelles. *Analytica Chimica Acta* 753, 8-18.
- Scally, S., Davison, W., et Zhang, H. (2006). Diffusion coefficients of metals and metal complexes in hydrogels used in diffusive gradients in thin films. *Analytica Chimica Acta* 558, 222-229.
- Scapolan, S., Ansoborlo, E., Moulin, C., et Madic, C. (1998). Uranium (VI)-transferrin system studied by time-resolved laser-induced fluorescence. *Radiation Protection Dosimetry* 79, 505-508.
- Schägger, H., et von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 199, 223-231.
- Schaumlöffel, D., Prange, A., Marx, G., Heumann, K., et Brätter, P. (2002). Characterization and quantification of metallothionein isoforms by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-isotope-dilution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 372, 155-163.
- Schmidt, A.-C., Fahlbusch, B., et Otto, M. (2009). Size exclusion chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry for analysis and quantitative characterization of arsenic interactions with peptides and proteins. *Journal of Mass Spectrometry* 44, 898-910.
- Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., von Gunten, U., et Wehrli, B. (2006). The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science* 313, 1072-1077.
- Scopes, R.K. (1994). *Protein Purification, Principles and Practice* 3rd ed. (Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg).
- Shan, L., Hribar, J.A., Zhou, X., et Anderson, D.J. (2008). Gradient Chromatofocusing-Mass Spectrometry: A New Technique in Protein Analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19, 1132-1137.
- Shen, M.L., Benson, L.M., Johnson, K.L., Lipsky, J.J., et Naylor, S. (2001). Effect of enzyme inhibitors on protein quaternary structure determined by on-line size exclusion chromatography-microelectrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 12, 97-104.
- Sheppard, S.C., Sheppard, M.I., Gallerand, M.-O., et Sanipelli, B. (2005). Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity* 79, 55-83.
- Shimazaki, Y., Shimizu, K., et Masaoka, S. (2010). Enzyme separation and isozyme heterogeneity analysis using non-denaturing two-dimensional electrophoresis. *Talanta* 82, 1063-1067.
- Simon, O. (2013 (Unpublished)). Exploring the value of fish bioassays for evaluating uranium toxicity: Effects of uranium on the reproductive performance of *Danio rerio*.
- Simon, O., Floriani, M., Cavalie, I., Camilleri, V., Adam, C., Gilbin, R., et Garnier-Laplace, J. (2011a). Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages in the chronically exposed bivalve *Corbicula fluminea*. *Journal of Environmental Radioactivity* 102, 766-773.
- Simon, O., Mottin, E., Geffroy, B., et Hinton, T. (2011b). Effects of dietary uranium on reproductive endpoints-fecundity, survival, reproductive success-of the fish *Danio rerio*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 220-225.
- Siripinyanond, A., et M. Barnes, R. (1999). Flow field-flow fractionation-inductively coupled plasma mass spectrometry and metal speciation in proteins: A feasibility study. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14, 1527-1531.

- Souidi, M., Tissandie, E., Racine, R., Ben Soussan, H., Rouas, C., Grignard, E., Dublineau, I., Gourmelon, P., Lestaevel, P., et Gueguen, Y. (2009). Uranium : propriétés et effets biologiques après contamination interne. *Annales de Biologie Clinique* 67, 23-28.
- Staub, A., Guillaume, D., Schappler, J., Veuthey, J.-L., et Rudaz, S. (2011a). Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55, 810-822.
- Staub, A., Zurlino, D., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., et Guillaume, D. (2011b). Analysis of peptides and proteins using sub-2- μm fully porous and sub 3- μm shell particles. *Journal of Chromatography A* 1218, 8903-8914.
- Strege, M.A., et Lagu, A.L. (2004). *Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptides* (Humana Press).
- Susanne Becker, J., Lobinski, R., et Sabine Becker, J. (2009). Metal imaging in non-denaturing 2D electrophoresis gels by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for the detection of metalloproteins. *Metallomics* 1, 312-316.
- Sutton, M., et Burastero, S.R. (2004). Uranium(VI) Solubility and Speciation in Simulated Elemental Human Biological Fluids. *Chemical Research in Toxicology* 17, 1468-1480.
- Szpunar, J. (2004). Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 54-56.
- Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Muntau, H., Leeuwen, H.P.v., et Lobinski, R. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry* 72, 1453-1470.
- Tetaz, T., Detzner, S., Friedlein, A., Molitor, B., et Mary, J.L. (2011). Hydrophilic interaction chromatography of intact, soluble proteins. *Journal of Chromatography A* 1218, 5892-5896.
- Tomáš, R., Klepárník, K., et Foret, F. (2008). Multidimensional liquid phase separations for mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 31, 1964-1979.
- Tomáš, R., Yan, L., Křenková, J., et Foret, F. (2007). Autofocusing and ESI-MS analysis of protein digests in a miniaturized multicompartement electrolyzer. *ELECTROPHORESIS* 28, 2283-2290.
- Tran, D., Fournier, E., Durrieu, G., et Massabuau, J.-C. (2004). Copper detection in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: optimum valve closure response. *Aquatic Toxicology* 66, 333-343.
- Trenfield, M.A., Ng, J.C., Noller, B.N., Markich, S.J., et Dam, R.A.v. (2011). Dissolved Organic Carbon Reduces Uranium Bioavailability and Toxicity. 2. Uranium[VI] Speciation and Toxicity to Three Tropical Freshwater Organisms. *Environmental Science & Technology* 45, 3082-3089.
- Van Campenhout, K., Goenaga Infante, H., Hoff, P.T., Moens, L., Goemans, G., Belpaire, C., Adams, F., Blust, R., et Bervoets, L. (2010). Cytosolic distribution of Cd, Cu and Zn, and metallothionein levels in relation to physiological changes in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) from metal-impacted habitats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 296-305.
- Van Campenhout, K., Infante, H.G., Adams, F., et Blust, R. (2004). Induction and binding of Cd, Cu, and Zn to metallothionein in carp (*cyprinus carpio*) using HPLC-ICP-TOFMS. *Toxicological Sciences* 80, 276-287.
- Van Horn, J.D., et Huang, H. (2006). Uranium(VI) bio-coordination chemistry from biochemical, solution and protein structural data. *Coordination Chemistry Reviews* 250, 765-775.

- Vidaud, C., Dedieu, A., Basset, C., Plantevin, S., Dany, I., Pible, O., et Quéméneur, E. (2005). Screening of human serum proteins for uranium binding. *Chemical Research in Toxicology* 18, 946-953.
- Vidaud, C., Gourion-Arsiquaud, S., Rollin-Genetet, F., Torne-Celer, C., Plantevin, S., Pible, O., Berthomieu, C., et Quéméneur, E. (2007). Structural consequences of binding of UO₂²⁺ to apotransferrin: Can this protein account for entry of uranium into human cells? *Biochemistry* 46, 2215-2226.
- Vijver, M.G., Van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., Van Straalen, N.M., et Peijnenburg, W.J.G.M. (2004). Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: A review. *Environmental Science and Technology* 38, 4705-4712.
- Villavicencio, G., Urrestarazu, P., Arbildua, J., et Rodriguez, P.H. (2011). Application of an acute biotic ligand model to predict chronic copper toxicity to *Daphnia magna* in natural waters of Chile and reconstituted synthetic waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2319-2325.
- Wallace, R.A., et Selman, K. (1981). Cellular and Dynamic Aspects of Oocyte Growth in Teleosts. *American Zoologist* 21, 325-343.
- Wallace, W.G., Lee, B.G., et Luoma, S.N. (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series* 249, 183-197.
- Wang, D., Couillard, Y., Campbell, G.C., et Jolicoeur, P. (1999). Changes in subcellular metal partitioning in the gills of freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*) living along an environmental cadmium gradient. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 774-784.
- Wang, Y., Hancock, W.S., Weber, G., Eckerskorn, C., et Palmer-Toy, D. (2004). Free flow electrophoresis coupled with liquid chromatography–mass spectrometry for a proteomic study of the human cell line (K562/CR3). *Journal of Chromatography A* 1053, 269-278.
- Wang, Y., Wu, R., Cho, K.R., Shedden, K.A., Barder, T.J., et Lubman, D.M. (2006). Classification of Cancer Cell Lines Using an Automated Two-dimensional Liquid Mapping Method with Hierarchical Clustering Techniques. *Molecular & Cellular Proteomics* 5, 43-52.
- Warnken, K.W., Davison, W., et Zhang, H. (2008). Interpretation of in situ speciation measurements of inorganic and organically complexed trace metals in freshwater by DGT. *Environmental Science and Technology* 42, 6903-6909.
- Warnken, K.W., Davison, W., Zhang, H., Galceran, J., et Puy, J. (2007). In situ measurements of metal complex exchange kinetics in freshwater. *Environmental Science and Technology* 41, 3179-3185.
- Warnken, K.W., Lawlor, A.J., Lofts, S., Tipping, E., Davison, W., et Zhang, H. (2009). In situ speciation measurements of trace metals in headwater streams. *Environmental Science and Technology* 43, 7230-7236.
- Waters (2007). An introduction to UPLC technology: improve productivity and data quality.
- Weber, G., et Wildgruber, R.M. (2004). A Versatile Free-Flow Electrophoresis System for Proteomics Applications (Rapport
- Wegele, H., Müller, L., et Buchner, J. (2004). Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1-44.
- Wepener, V., Van Vuren, J.H.J., et Du Preez, H.H. (2001). Uptake and distribution of a copper, iron and zinc mixture in gill, liver and plasma of a freshwater teleost, *Tilapia sparrmanii*. *Water SA* 27, 99-108.
- WHO (2001). Depleted uranium: sources, exposure and health effects. (Rapport WHO/SDE/PHE/01.1)

- WHO (2011). Uranium in Drinking-water (Rapport WHO/SDE/WSH/03.04/118/Rev/1)
- Wilkie, M.P. (2002). Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges. *Journal of Experimental Zoology* 293, 284-301.
- Wittig, I., Karas, M., et Schägger, H. (2007). High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 1215-1225.
- Wittig, I., et Schägger, H. (2005). Advantages and limitations of clear-native PAGE. *PROTEOMICS* 5, 4338-4346.
- Wolf, C., Wenda, N., Richter, A., et Kyriakopoulos, A. (2007). Alteration of biological samples in speciation analysis of metalloproteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 799-810.
- Wouters, B., Vaast, A., Treumann, A., Usrem, M., Ho, J., Hornshaw, M., Raes, M., Terrtn, H., et Sebastiaan, E. (2012). The potential of polymeric monolithic capillary columns for the LC-MS analysis of intact proteins. *LC-GC Europe* 25, 1-6.
- Wright, D.A., et Welbourn, P. (2002). *Environmental Toxicology* (Cambridge University Press).
- Wrobel, K., Gonzalez, E.B., Wrobel, K., et Sanz-Medel, A. (1995). Aluminium and silicon speciation in human serum by ion-exchange high-performance liquid chromatography-electrothermal atomic absorption spectrometry and gel electrophoresis. *Analyst* 120, 809-815.
- Xu, M., Frelon, S., Simon, O., Lobinski, R., et Mounicou, S. (2013). Non-denaturing isoelectric focusing gel electrophoresis for uranium–protein complexes quantitative analysis with LA-ICP MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-10.
- Yang, Y., Feng, Y., Wang, Y., Wang, L., et Shi, W. (2013). Interactions between U(VI) and bovine serum albumin. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 1-6.
- Yang, Y., Qiang, X., Owsiany, K., Zhang, S., Thannhauser, T.W., et Li, L. (2011). Evaluation of different multidimensional LC-MS/MS pipelines for isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ)-based proteomic analysis of potato tubers in response to cold storage. *Journal of Proteome Research* 10, 4647-4660.
- Yuan, D., Shen, Z., Liu, R., Chi, Z., et Zhu, J. (2011). Study on the binding of cerium to bovine serum albumin. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 25, 263-268.
- Zhang, H., et Davison, W. (1995). Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurement of trace metals in aqueous solution. *Analytical Chemistry* 67, 3391-3400.
- Zhang, H., et Davison, W. (2000). Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films. *Analytical Chemistry* 72, 4447-4457.

ANNEXE

Publication :

"Different uranium distribution patterns in cytosolic protein pool of zebrafish gills after chronic and acute waterborne exposures"

Version préparée et soumise au journal « Chemosphere »

(manuscrit + documents supplémentaires (ESI))

Different uranium distribution patterns in cytosolic protein pool of zebrafish gills after chronic and acute waterborne exposures

Guillaume Bucher ^{a,b}, Sandra Mounicou ^b, Olivier Simon ^a, Magali Floriani ^a, Ryszard Lobinski ^b, Sandrine Frelon ^a

^a IRSN/PRP-ENV/SERIS - Laboratoire de Biogéochimie, Biodisponibilité et Transferts des radionucléides - BP3 - 13115 St Paul lez Durance Cedex - FRANCE

^b LCABIE - UMR5254, Technopôle HélioParc Pau Pyrénées, 2 avenue du Président Angot, 64053 Pau Cedex 09 – FRANCE

Corresponding author: Sandrine Frelon

E-mail address: sandrine.frelon@irsn.fr

Phone number: +33(0)442 19 94 71

Abstract

The toxicity of uranium (U) to aquatic organisms depends notably on its compartmentalization in organs, tissues, cells as well as on its distribution among biomolecules. In order to contribute to the understanding of U accumulation and associated toxicity mechanisms in case of waterborne exposure, this study focused on U fate in the gills epithelia, uptake pathway, of the fish model *Danio rerio* (zebrafish). U distribution among cytosolic biomolecules was investigated after no addition ($c_0 - 0 \mu\text{g L}^{-1} - 3$ and 30 days), chronic ($c_{20} - 20 \mu\text{g L}^{-1} - 30$ days) and acute ($c_{20} - 20 \mu\text{g L}^{-1}$ and $c_{250} - 250 \mu\text{g L}^{-1} - 3$ days) exposures to depleted U. Cytosolic U accounted for an average of 24 to 32% of gills burden for c_{20} and c_{250} , respectively. Size Exclusion Chromatography (SEC) coupled with Inductively Coupled Plasma - Sector Field Mass Spectrometry (ICP-SFMS) allowed identification of ecotoxicologically relevant U-containing fractions among cytosolic biomolecules as a function of exposure conditions. In c_0 and c_{20} samples, most U (*ca.* 80%) was found in the Low Molecular Weight fraction (LMW, <18 kDa), often considered as detoxifying one. In c_{250} exposed fish, U was equally distributed between LMW (40%) and High Molecular Weight (HMW, 150-670 kDa; 40%) fractions, the latter including sensitive metalloproteins. Uranium-biomolecules were co-eluted with endogenous essential metal (Fe, Cu and Zn)

species, however, no major influence on their cytosolic concentration and distribution pattern among cytosolic proteins was found.

Keywords

Zebrafish, gills, uranium speciation, SEC-ICP-SFMS, cytosolic distribution

1. Introduction

Various approaches have been developed to assess metal toxicity in aquatic living organisms over many years (Campbell *et al.*, 2004). The Critical Body Residue (CBR), which proposes to link the toxicity of a metal to its bioaccumulation within organisms, suggests that organisms are able to distribute the metal burden among metabolically available (*e.g.* cytosol, organelles) and detoxified (*e.g.* metal-rich granules) cell compartments (Vijver *et al.*, 2004; Adams *et al.*, 2011). Thus, the determination of metal compartmentalization at the organ and subcellular levels is necessary (i) to better understand the kinetic of metal distribution into a biological cell or tissue and (ii) to better define the relationship between metal bioaccumulation and its biological effect. Within this compartmentalization, the cytosol of cells is of significant importance in the identification of toxic metal fractions as this compartment is known to have an important role in the toxicokinetics and toxicodynamics of metals (Amiard *et al.*, 2006; Perceval *et al.*, 2006; Geffard *et al.*, 2010). It contains several proteins dedicated to detoxification, the latter occurring mainly *via* an association between proteins or other organic molecules and metals. Potential transporters should then be studied to explain metal distribution and understand their fate and toxicity in organs (Szpunar, 2004).

Among the non-essential elements, uranium (U) is naturally occurring and exhibits both radio- and chemo-toxicity. It is found in freshwater ecosystems worldwide at concentrations ranging from 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$ to 12.4 mg L^{-1} (Salonen, 1994; WHO, 2011). Its speciation in aquatic organisms remains poorly described (Bresson *et al.*, 2011) despite significant knowledge on coordination chemistry and affinity for proteins (Ansoborlo *et al.*, 2006; Michon *et al.*, 2010). Previous studies showed that U was mainly bound to acidic proteins in exposed rat kidney (Frelon *et al.*, 2009) and that hard Lewis cation (*i.e.* Ca^{2+} , Zn^{2+}) binding proteins as well as phosphorylated proteins were likely to complex uranyl (Dedieu *et al.*, 2009; Pardoux *et al.*, 2012). One major issue of this complexation is the possible perturbation of essential metal metabolic pathways as reported for Fe in rat (Donnadieu-Claraz *et al.*, 2007).

The zebrafish is a model organism for aquatic vertebrates that has been extensively studied to assess the biological effects of different contaminants (Hill *et al.*, 2005). Studies on zebrafish exposed to U are increasingly described (Goulet *et al.*, 2011), however, mechanisms of toxicity are not well understood. Gill epithelia are the entry pathway following waterborne exposure to U, and the corresponding cytosolic fraction which contains soluble biomolecules are prone to undergo intra-cellular exchanges as well as metal detoxification.

Therefore, the objective of this study was to investigate the compartmentalization of U in zebrafish gills epithelia following different waterborne exposure conditions chosen to be representative of previous ecotoxicological studies. U compartmentalization was then studied at both the subcellular and the cytosolic protein levels to identify the ecotoxicologically relevant U fraction in this organ. Finally, the influence of this distribution on endogenous essential metals was also studied at both organization levels.

2. Materials and methods

2.1. *Experimental workflow*

Details on chemicals and reagents used in this study are given in supplemental Document 1. Adult male zebrafish (fresh weight 400 ± 50 mg) were separated into three groups (2.75 fish L^{-1}) and exposed to waterborne U: $0 \mu g L^{-1}$ (control, c_0) for 3 and 30 days; $20 \mu g L^{-1}$ (c_{20}) for 3 and 30 days; $250 \mu g L^{-1}$ (c_{250}) for 3 days. No mortality was observed throughout the experiment. The pH (set at 6.5 ± 1.0), temperature (set at $26 \pm 1^\circ C$), major cation concentrations, total ($[U]_{total}$) and dissolved ($[U]_{dissolved}$) concentrations of U in water were monitored daily. On days 3 (3d) and 30 (30d), gills were collected after fish exsanguination. The epithelium was dissected, discarding the branchial arch, quick-frozen in liquid nitrogen and stored at $-80^\circ C$ prior to sample preparation and analysis. 10 fish per exposure condition were randomly selected for bioaccumulation assessment and 5 gills were collected and prepared as described by Barillet *et al.* (2010) for U microlocalization by TEM-EDX imaging. Details about fish exposure can be found in Supplemental Document 1.

Fresh gill epithelium (6-12 mg) stored at $-80^\circ C$ was thawed and homogenized in 600 μL ice cold 100 mM ammonium acetate buffer “B” (pH 7.4) using a 4 mL Potter-Elvehjem grinder (Dutscher, France; 2 x 1.5 min grinding, 30 s pause). Cytosol from gill epithelium was then obtained after centrifugation (Himac CS 120GX, Hitachi, Japan) of the homogenate at 100,000 g for 1 h at $4^\circ C$. Aliquots of homogenate, cytosol and pellet were kept for further

protein and/or U, Fe, Cu and Zn quantification. Further details can be found in Supplemental Document 1.

2.2. Fractionation of uranium- and metal–biomolecule complexes by SEC coupled to ICP-SFMS detection

Freshly prepared cytosol were directly analyzed using a size exclusion chromatography (SEC) column (Superdex 200 10/300 GL, 600–10 kDa, 300 x 10, GE Healthcare, Sweden) connected to an Agilent 1200 series HPLC system (BinPump G1312A, Germany). The mobile phase was buffer “B” delivered at 0.7 mL min^{-1} and the injection volume was $100 \text{ }\mu\text{L}$. Calibration of the SEC column was performed using protein standards (thyroglobulin 670 kDa, ferritin 474 kDa, transferrin 80 kDa, Mn-SOD 40 kDa, myoglobin 16 kDa, Cd-MT2 6.8 kDa and cobalamin 1.3 kDa). Detection was achieved on-line by both a MWD (Multiple Wavelength Detector Agilent G1365B, Germany) recording the absorbance at 280 nm (aromatic aminoacids) and an ICP-SFMS (Element XR, ThermoFisher, Germany; Scott chamber, 1 mL min^{-1} conical nebulizer and 2 mm i.d. injector) for highly sensitive elemental detection (^{235}U , ^{238}U , ^{64}Zn , ^{63}Cu , ^{54}Fe). Tuning and optimization of the ICP-SFMS signal was carried out daily using a tuning solution composed of $1 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Li, In and U in 2% HNO_3 ($\text{LOD} \leq 0.1 \text{ ng(U) L}^{-1}$).

To ensure the lowest ^{238}U background ($\approx 100 \text{ cps}$), the column was systematically cleaned using the following procedure: (1) the column was first flushed with a mixture “M” of 200 mM NH_4HCO_3 and 2 mM EDTA for at least 2 h at 0.2 mL min^{-1} and conditioned with “B” for 2 h at 0.5 mL min^{-1} ; (2) between each cytosol injection a wash run consisting of five $200 \text{ }\mu\text{L}$ injections of “M”.

Protein recovery from biological samples was assessed by injecting different cytosols with and without column and comparing the UV signal areas at 225 nm.

The U recovery was assessed by comparing U amount in the whole eluate (*ca.* 42 mL) and the corresponding amount in the $100 \text{ }\mu\text{L}$ of cytosol injected.

2.3. Data processing and statistical analysis

Chromatographic and ICP-MS data processing and statistical analysis were carried out using Microsoft Excel 2003 (v11.8302.8221 SP3) with Grimmersoft Statbox (v7.1.9). Unless otherwise stated, statistically significant results are given at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Uranium monitoring in exposure media

Irrespective of exposure condition and duration, the pH was maintained at 6.3 ± 0.2 and so within the set point of 6.5 ± 1.0 .

The mean total U concentrations in water were 0.034, 0.12, 20.8, 18.6 and 265 $\mu\text{g L}^{-1}$ for c_0 -3d, c_0 -30d, c_{20} -3d, c_{20} -30d and c_{250} -3d, respectively and were close to the nominal concentrations. The $[\text{U}]_{\text{dissolved}}/[\text{U}]_{\text{total}}$ ratio was similar for c_{20} -3d and c_{250} -3d but decreased from 69% to 52% for c_{20} -30d. Detailed data on exposure conditions are presented in supplemental Table S1.

3.2. Uranium compartmentalization in zebrafish gills

The mean U concentrations in gill epithelia were 5.5, 4.3, 413, 553 and 5379 pg mg^{-1} wet wt. for c_0 -3d, c_0 -30d, c_{20} -3d, c_{20} -30d and c_{250} -3d, respectively. Detailed gills epithelia bioaccumulation data are presented in supplemental Table S2. U accumulation in the gills of exposed fish was significantly different from control (c_0) even after 3 d exposure at the lowest concentration (c_{20} -3d). The amount of U in gill epithelia accounted for 0.6 (c_0), 2.2 (c_{20}) and up to 10% (c_{250}) of the whole body U burden of fish at 3 d (data not shown). No significant difference between U accumulation at c_{20} -3d and c_{20} -30d was observed and inter-individual differences in terms of U bioaccumulation in gills were smoothed at 30 d.

The subcellular distribution of U was assessed in all treatment conditions with a recovery ($(m_{\text{U-in-pellet}} + m_{\text{U-in-cytosol}})/m_{\text{U-in-whole-gill}}$) of $92 \pm 8\%$. The mean concentrations of U in the cytosol of gill epithelia were 105, 149 and 1613 pg mg^{-1} wet wt. gills for c_{20} -3d, c_{20} -30d and c_{250} -3d, respectively and corresponded to $24 \pm 2\%$ and $32.0 \pm 0.6\%$ of the whole gill epithelium U content for the c_{20} and c_{250} samples, respectively (correlation $R^2 > 0.97$ shown in supplemental Fig. S1). The mean concentrations of U in pellets of gill epithelia were 280, 370 and 3301 pg mg^{-1} wet wt. gills for c_{20} -3d, c_{20} -30d and c_{250} -3d, respectively.

Finally, the presence of U granules was investigated in this study by TEM-EDX but no U aggregates (*e.g.* precipitates, granules) were observed (data not shown).

3.3. Uranium distribution among cytosolic biomolecules

In order to probe for U target biomolecules after different exposure conditions and bioaccumulation, the cytosolic U was analyzed by SEC-ICP-SFMS.

Proteins were quantitatively recovered from the column with a mean recovery of $110 \pm 12\%$ ($n = 4$). In the cytosolic fractions similar protein concentrations ($76 \pm 12 \mu\text{g protein mg}^{-1}$ wet wt. of gills), protein profiles (supplemental Fig. S2) and protein distributions (% peak area) were obtained regardless of U exposure conditions. However, protein profiles did not fully overlap with the U signal since two U-free UV peaks were detected after the total volume of the column.

^{235}U distribution (data not shown) was the same as ^{238}U distribution in each cytosol, following the depleted U isotopic abundance. U recovery ranged between 10% and 50%. Six major U-containing fractions were defined regardless of exposure conditions (supplemental Fig. S2). Little uranium was present in the void fraction (F1) > 670 kDa probably containing protein complexes and aggregates. The second fraction (F2) covered a wide mass range from 150 to ~ 670 kDa. The following three fractions (F3 to F5) ranged from 55 to 150, 18 to 55 and 4 to 18 kDa, respectively. The major fraction (F6) was generally observed as an intense and thin peak. This corresponded to U bound to sub 4 kDa biomolecules as its elution time differed (of 40 s) from that of inorganic U bound to carbonates (data not shown).

Fig. 1 shows the relative distribution of U in each defined fraction in terms of U area percentage (over the total U area) for the different exposure conditions. The distribution of U in c_{20} exposed samples was fairly similar to that of control (c_0) samples regardless of exposure duration (3d and 30d). Most U (70-80%) was present in the sub 4 kDa fraction (F6), whereas the remainder was fairly equally distributed between 4 and 670 kDa. The void volume fraction (> 670 kDa) accounted for less than 3% of the total U. In addition, for the c_{20} condition, less than 15% of U was found in the 4 to 150 kDa fractions (F3 to F5).

U partitioned differently in c_{250} exposed cytosols than in c_0 and c_{20} cytosols. Indeed an equal U fraction (*ca.* 40%) was found in the 150 to 670 kDa and < 4 kDa fractions, against 10 and 70% in the c_{20} condition. Quantitatively, 40% of U found in the < 4 kDa fraction in the c_{250} condition corresponded to 0.8 to 6 times the amount found in the same fraction in the c_{20} condition (*i.e.* representing 70-80% of cytosolic U). The amount of U found in the 150 to 670 kDa fraction in the c_{250} condition was always at least 3 times and up to 30 times higher than that found in the c_{20} condition except for one c_{20} -3d sample which exhibited a c_{250} -like profile.

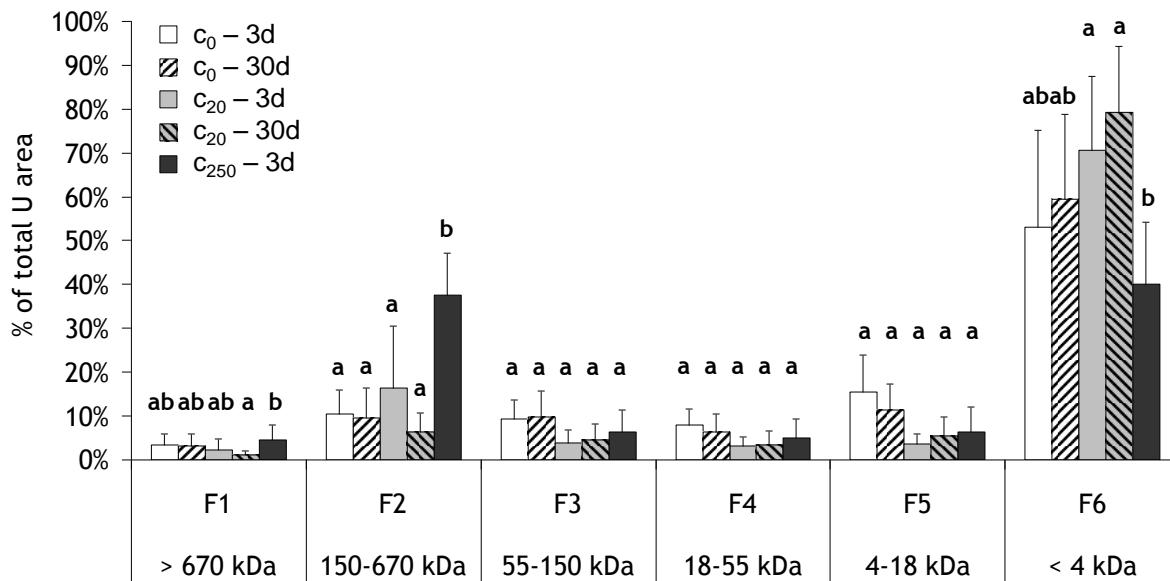


Figure 1: Repartition of U among the six defined fractions of gills cytosols (mean U percentage of the total U area in each fraction \pm SD ; n=4 for control (c₀) samples and n=5 for exposed (c₂₀ & c₂₅₀) samples). Anotation (a, b) denotes significant differences (Mann-Whitney multiple comparison at critical treshold $\alpha = 5\%$).

3.4. Fe, Cu and Zn in gills after U exposure

The U bioaccumulation study was completed by the determination of three endogenous essential metals amount in whole gills and cytosols. Subcellular fractionation recoveries for Fe, Cu and Zn were $114 \pm 36\%$, $108 \pm 12\%$ and $99 \pm 4\%$, respectively. Amounts in whole gills were found to be quite similar regardless of U exposure with an average (n = 10) of 89, 2.1 and 21 ng mg⁻¹ wet wt. for Fe, Cu and Zn, respectively. Fe cytosolic burden, *i.e.* 63 ng mg⁻¹ wet wt., was not impacted by U exposure, while that of Zn increased noticeably with U exposure *i.e.* 6.4 to 11 ng mg⁻¹ wet wt. Cytosolic Cu was either below or equal to the limit of detection *i.e.* 0.3 ng mg⁻¹ wet wt. Detailed results are given in supplemental Table S3.

Fig. 2 shows the typical size exclusion chromatography distribution patterns of Zn, Cu and Fe among the cytosolic biomolecules. Zn and Cu were co-eluting with U over the whole sub 150 kDa range without perfect overlapping of the two major peak apexes centred around 7 and 35 kDa. Fe was present in a single peak centred between 40 and 80 kDa, and overlapping a minor U-containing fraction (F3 < 10% cytosolic U). No apparent modification of Fe, Cu or Zn chromatograms was observed after U exposure (data not shown).

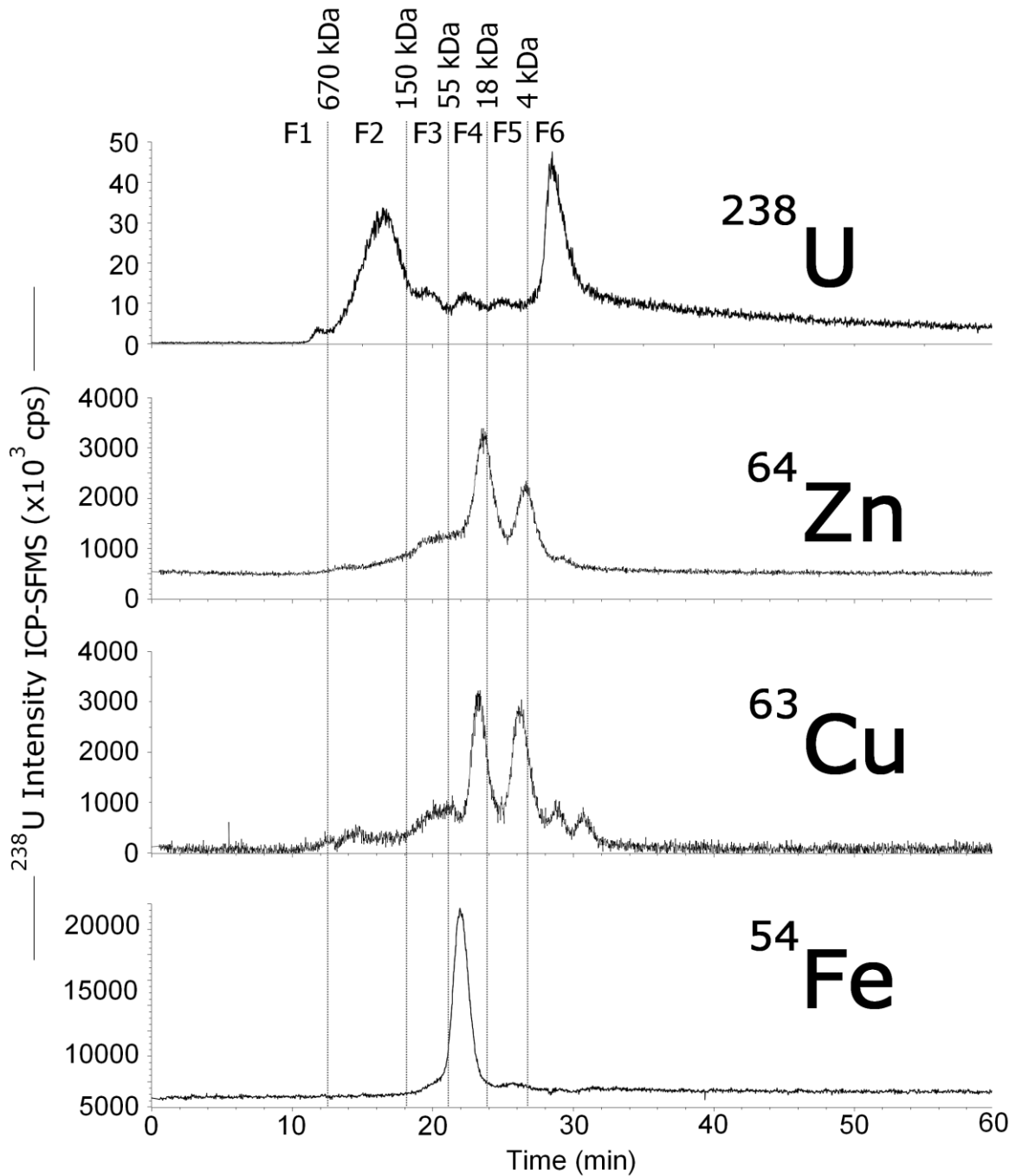


Figure 2: Typical ^{238}U , ^{64}Zn , ^{63}Cu and ^{54}Fe SEC chromatograms of gill epithelium cytosols (c_{250} -3d sample). The vertical dotted lines delimit the six U fractions.

4. Discussion

Water pH maintenance is a crucial parameter as it directly impacts U chemical speciation and, then bioavailability. In this experiment, pH remained similar regardless of exposure conditions, within the range of tolerance for zebrafish (*ca.* 6.0-9.5) (Lawrence, 2007) with variations similar than the one found in gills microenvironment (Playle, 1998). U chemical species distribution can then be considered as equivalent between exposure conditions.

From the $[U]_{\text{dissolved}}/[U]_{\text{total}}$ ratio it could be inferred that nearly 30% for c_{20-3d} and c_{250-3d} to 50% for c_{20-30d} of U may be bound to particulate organic matter or biofilm present in the experimental units and thus unlikely to be bioavailable for fish gill uptake (Trenfield *et al.*, 2011).

4.1. Uranium compartmentalization in zebrafish gills

Fast U accumulation in gills epithelia observed in this study is in agreement with the function of gills as first barriers of waterborne pollution in freshwaters and with the hypothesis that gill tissues may take on the characteristics of the surrounding environment shortly after exposure (McGeer *et al.*, 2000). The accumulation factor in gill epithelia at 3d, calculated with $[U]_{\text{gills}}/[U]_{\text{dissolved}}$, was similar regardless of the exposure levels, *e.g.* 31 for c_{250-3d} and 29 for c_{20-3d} . Moreover, the mean c_{20-3d} and c_{250-3d} U bioaccumulation in gill epithelia is proportionally correlated to $[U]_{\text{dissolved}}$, *i.e.* 14.3 to 174 $\mu\text{g L}^{-1}$. Nevertheless, this correlation suffered from a large spread of U uptake values at this short exposure time. Indeed, reduced inter-individual differences, explained by the homogenization of absorption kinetics and ventilation rates over time, were observed in U bioaccumulation at 30 d. The highly individual-dependant U bioaccumulation at 3 d emphasized the need to refine the cytosolic fraction in order to find a good marker of exposure at an individual level, especially for this short exposure time.

Subcellular fractionation of U showed an increase in the cytosolic U fraction concomitant with higher waterborne exposure. U accumulation in the cytosol was rapid and was not time dependent. However, the difference in cytosol distribution (24% versus 32%) could indicate that high exposure level favored the accumulation of U in the cytosol. This phenomenon has previously been reported for Zn and Cd in rainbow trout gills (Sappal *et al.*, 2009), while linear relationships between metal burden in the cytosol and whole organ were observed for Cd, Cu and Zn in gibel carp liver and kidney (Van Campenhout *et al.*, 2010). The cytosolic

fraction of U reported by Simon *et al.* (2011) in the bivalve *Corbicula fluminea* gills after U exposure, comparable to c_{20} condition, was similar (*ca.* 20%). However, the slight difference can be explained by different physiology and behavior of fish and bivalves (Tran *et al.*, 2004). In this study, the higher U level in gills epithelia and the larger amount of U accessible to cytosolic biomolecules in the c_{250} compared to the c_{20} exposure condition (+8%) may indicate a larger metabolically available fraction of U, likely to be toxic, in the case of c_{250} exposure.

Finally, U found in the pellet could be present in toxically relevant cell compartments, *i.e.* nuclei and mitochondria, and in detoxifying compartments such as metal-rich granules (Simon *et al.*, 2011). However, such U aggregates were not observed here either due to diffuse contamination or to insufficient sensitivity of the EDX elemental detection technique *i.e.* 10 ng mg^{-1} . Such observation of U granules in fish gills was at $100 \mu\text{g L}^{-1}$ with a mixture Depleted Uranium and ^{233}U (Barillet *et al.*, 2010).

4.2. Uranium distribution among cytosolic biomolecules

SEC analysis of cytosols showed poor recovery of U (10-50%). A large amount of U was trapped on the column and may correspond to either unbound cytosolic U or U-biomolecule complexes with a weaker stability constant than the one of U-stationary phase. Uranyl can also complex with acetate anions (CH_3COO^-) from the mobile phase, but the constants are weak (Ray *et al.*, 2010).

In this study, heterogeneous distribution of U over the mass range implied potential unspecific interactions of U with proteins, and also differential affinity depending on the nature of the biomolecules.

Irrespective of the exposure level, a significant amount of U (< 15%) was found in fractions F3 to F5, which may contain proteins involved in respiration (mainly 4 - 55 kDa) and ion-acid-base homeostasis (mainly 18 - 150 kDa) (De Souza *et al.*, 2009) and in which the presence of non-essential metals can be toxic. Indeed, the presence of U in F2-F3 (55-670 kDa) fractions could be crucial as they may contain some metal-sensitive proteins which may lose or alter their biological activity in the presence of non-essential metals (Wright and Welbourn, 2002).

At high U exposure (c_{250}), the large proportion in the F2 fraction may reflect a mechanism allowing excess U uptake to complex with higher MW proteins in the cytosol different from the proteins already involved in c_{20} exposure; these protein could be possibly detoxification proteins such as the one involving multi-drug resistance proteins (175 kDa)

presumed to take part in heavy metal detoxification after *primo* complexation to GSH (Long *et al.*, 2011). Indeed, the amount of U in the gills in the c_{250} condition may have been so high that it increased the cytosolic U concentration and exceeded the potential detoxifying capabilities of LMW proteins leading to complexation of U with higher MW molecules. Even if considered as too simplistic (Sappal *et al.*, 2009; Frelon *et al.*, 2013), amounts of metal suddenly involved in HMW fractions have been introduced as the “spillover” model (Wright and Welbourn, 2002).

Finally, in the c_{20} condition 70-80% of U was in the F6 LMW fraction, and can be considered mainly detoxified. Indeed, the Low Molecular Weight (LMW) F5-F6 fractions (1.8-18 kDa) contain notably metal-sensitive enzymes and MetalloThionein Like Proteins (MTLPs) (Geffard *et al.*, 2010). These latter proteins are known to be involved in metal detoxification (Amiard *et al.*, 2006) nevertheless, the affinity of U for thiol groups contained in metallothioneins is quite low (Michon *et al.*, 2010) and the MT expression in several organs of U-exposed crayfish was randomly modified (Cooley *et al.*, 2000; Al Kaddissi *et al.*, 2011). Finally, these F5-F6 fractions could also include proteins other than the detoxifying proteins, likely to bind U, for example calmodulin (16.8 kDa) (Pardoux *et al.*, 2012), a Ca^{2+} binding protein which could be a good candidate to complex U.

4.3. Fe, Cu and Zn in gills after U exposure

The study of Fe, Zn and Cu content in gills was investigated as (i) ionoregulation disturbances of essential elements were emphasized when fish were exposed to waterborne toxic metals (*i.e.* Pb, Cd, Ag, As and Al) (Bury and Grosell, 2003; Farrell *et al.*, 2011) and (ii) ions of such metals are usually M^{2+} as UO_2^{2+} in biological media) and have similar affinity for proteins (Michon *et al.*, 2010; Frelon *et al.*, 2013). U exposure had no drastic impact on Fe, Cu and Zn content in whole gill epithelia which were similar to values previously published for c_0 -like conditions (Craig *et al.*, 2009; Johnston *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012).

Variations in cytosolic Zn content were in agreement with some previously published studies showing that the amount of Zn in trout gills can fluctuate on exposure to metal-contaminated environments (Van Campenhout *et al.*, 2010). Imbalanced metal (Cu, Zn and Fe) recoveries upon subcellular fractionation were attributed to losses during sample preparation and to analytical uncertainties.

Competition or interaction of U with essential metal (*e.g.* Zn, Cu, Fe) target biomolecules was also studied at the cytosolic level in order to enable the refinement of the U complexing molecule nature. Indeed, co-elution of essential metals with U peaks suggests competition for the same biomolecules. After the SEC distribution study, different fractions were identified for these essential elements. Iron was co-eluted with U in a fraction which could correspond to subunits of hemoglobin (traces of blood despite exsanguination) or albumin. This showed that U may bind to iron transport and storage proteins as previously shown by Frelon *et al.* (2013). However, this binding should mainly be non-specific as no change in iron distribution patterns was observed whatever the U exposure concentration. Cu and Zn exhibited a similar chromatographic pattern involving peaks in the MT (≈ 7 kDa) and SOD (≈ 35 kDa) MW ranges, and a significant amount of Zn associated with higher MW proteins possibly in zinc-fingers (De Souza *et al.*, 2009). As no U peaks overlapped perfectly with the major Cu and Zn peaks and as no changes in Cu and Zn distribution patterns between different U exposures were observed, MT themselves did not seem to be involved in U chelation. This is consistent with previous data (Michon *et al.*, 2010) that showed a weak complexation constant between U and MT. Nevertheless, U co-elutes with minor Cu and Zn peaks and non-specific U binding with Cu and Zn containing proteins cannot be ignored.

5. Conclusion

This study showed the influence of different waterborne U exposure levels (20 vs. $250 \mu\text{g L}^{-1}$) on the compartmentalization of U at both the subcellular level and within the cytosolic protein pool of *Danio rerio* gill epithelia. As expected, U bioaccumulation in fish gills epithelia was more exposure concentration-dependant than duration-dependant. The distribution between the cytosolic fraction and the rest of the cells showed that a larger amount of U was accessible to cytosolic biomolecules in the case of c_{250} exposure (32%) in comparison to c_{20} exposure (24%) and may indicate a larger metabolically available fraction of U, likely to be toxic, in the case of c_{250} exposure. Potential transporters or chelating molecules have been studied *via* the cytosolic U molecular size distribution assessment. U was found in all fractions independently of U exposure level and duration, thus necessarily inducing toxic fractions. The distribution of U between Low- (<18 kDa) and High- (150-670 kDa) MW proteins, *i.e.* detoxifying and sensitive biomolecules, was in the order of 80/20 for c_{20} and 50/50 for c_{250} , respectively. This might reflect the saturation of potential detoxifying capabilities of LMW proteins then allowing a mechanism of U uptake by higher MW proteins

in the cytosol. In addition, this study showed no evidence of altered Fe or Cu burden following U exposure, while the amount of cytosolic Zn varied noticeably in the case of c_{250} U exposure. Finally, U can bind non-specifically to essential metal-containing proteins and further investigations will be carried out to formally identify the biomolecules involved in U binding.

Acknowledgments

Authors would like to thank V. Camilleri for ICP-AES analyses, R. Gilbin and L. Février for proof reading.

This work was partly financed by ANR ST MALO - 2010 JCJC 713 1 project, Aquitaine Region (CRA) and Institute of Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN).

References

- Adams, W.J., Blust, R., Borgmann, U., Brix, K.V., DeForest, D.K., Green, A.S., Meyer, J.S., McGeer, J.C., Paquin, P.R., Rainbow, P.S., Woody, C.M., 2011. Utility of tissue residues for predicting effects of metals on aquatic organisms. *Integrated Environmental Assessment and Management* 7, 75-98.
- 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, 1800-1807.
- 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.
- Ansoborlo, E., Prat, O., Moisy, P., Den Auwer, C., Guilbaud, P., Carriere, M., Gouget, B., Duffield, J., Doizi, D., Vercouter, T., Moulin, C., Moulin, V., 2006. Actinide speciation in relation to biological processes. *Biochimie* 88, 1605-1618.
- 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.
- Bresson, C., Ansoborlo, E., Vidaud, C., 2011. Radionuclide speciation: A key point in the field of nuclear toxicology studies. *J. Anal. At. Spectrom.* 26, 593-601.

- Bury, N.R., Grosell, M., 2003. Waterborne iron acquisition by a freshwater teleost fish, zebrafish *Danio rerio*. *J. Exp. Biol.* 206, 3529-3535.
- Campbell, P.G.C., Pelletier, E., Denizeau, F., 2004. *Ecotoxicologie Moléculaire: Principes Fondamentaux et Perspectives de Développement*. Presses de l'Université du Québec.
- Cooley, H.M., Evans, R.E., Klaverkamp, J.F., 2000. Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat. Toxicol.* 48, 495-515.
- Craig, P.M., Galus, M., Wood, C.M., McClelland, G.B., 2009. Dietary iron alters waterborne copper-induced gene expression in soft water acclimated zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 296, R362-R373.
- De Souza, A.G., MacCormack, T.J., Wang, N., Li, L., Goss, G.G., 2009. Large-scale proteome profile of the zebrafish (*Danio rerio*) gill for physiological and biomarker discovery studies. *Zebrafish* 6, 229-238.
- Dedieu, A., Bérenguer, F., Basset, C., Prat, O., Quéméneur, E., Pible, O., Vidaud, C., 2009. Identification of uranyl binding proteins from human kidney-2 cell extracts by immobilized uranyl affinity chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 5365-5376.
- Donnadieu-Claraz, M., Bonnehogne, M., Dhieux, B., Maubert, C., Cheynet, M., Paquet, F., Gourmelon, P., 2007. Chronic exposure to uranium leads to iron accumulation in rat kidney cells. *Radiat. Res.* 167, 454-464.
- Farrell, A.P., Brauner, C.J., Wood, C.M., 2011. *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals*. Elsevier Science.
- Frelon, S., Guipaud, O., Mounicou, S., Lobinski, R., Delissen, O., Paquet, F., 2009. In vivo screening of proteins likely to bind uranium in exposed rat kidney. *Radiochim. Acta* 97, 367-373.
- Frelon, S., Mounicou, S., Lobinski, R., Gilbin, R., Simon, O., 2013. Subcellular fractionation and chemical speciation of uranium to elucidate its fate in gills and hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii*. *Chemosphere*.
- 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.
- Goulet, R.R., Fortin, C., Spry, D.J., Chris M. Wood, A.P.F., Colin, J.B., 2011. 8 - Uranium. *Fish Physiology*. Academic Press, pp. 391-428.

- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.* 86, 6-19.
- Johnston, B.D., Scown, T.M., Moger, J., Cumberland, S.A., Baalousha, M., Linge, K., Van Aerle, R., Jarvis, K., Lead, J.R., Tyler, C.R., 2010. Bioavailability of nanoscale metal oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to fish. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1144-1151.
- Lawrence, C., 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269, 1-20.
- Liu, F., Ni, H.G., Chen, F., Luo, Z.X., Shen, H., Liu, L., Wu, P., 2012. Metal accumulation in the tissues of grass carps (*Ctenopharyngodon idellus*) from fresh water around a copper mine in Southeast China. *Environ. Monit. Assess.* 184, 4289-4299.
- Long, Y., Li, Q., Wang, Y., Cui, Z., 2011. MRP proteins as potential mediators of heavy metal resistance in zebrafish cells. *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol.* 153, 310-317.
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., Gordon McDonald, D., Wood, C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: Tissue specific metal accumulation. *Aquat. Toxicol.* 50, 245-256.
- 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, 581-590.
- Pardoux, R., Sauge-Merle, S., Lemaire, D., Delangle, P., Guilloureau, L., Adriano, J.M., Berthomieu, C., 2012. Modulating Uranium binding affinity in engineered calmodulin EF-hand peptides: Effect of phosphorylation. *PLoS One* 7.
- 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.
- Playle, R.C., 1998. Modelling metal interactions at fish gills. *Sci. Total Environ.* 219, 147-163.
- Ray, R.S., Krüger, S., Rösch, N., 2010. Ternary uranyl hydroxo acetate complexes: A computational study of structure, energetics, and stability constants. *Inorg. Chim. Acta* 363, 263-269.
- Salonen, L., 1994. 238U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock. Future groundwater resources at risk, 71-84.

- Sappal, R., Burka, J., Dawson, S., Kamunde, C., 2009. Bioaccumulation and subcellular partitioning of zinc in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Cross-talk between waterborne and dietary uptake. *Aquat. Toxicol.* 91, 281-290.
- 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, 766-773.
- Szpunar, J., 2004. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 54-56.
- Tran, D., Massabuau, J.-C., Garnier-Laplace, J., 2004. Effect of carbon dioxide on uranium bioaccumulation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 739-747.
- Trenfield, M.A., Ng, J.C., Noller, B.N., Markich, S.J., Dam, R.A.v., 2011. Dissolved Organic Carbon Reduces Uranium Bioavailability and Toxicity. 2. Uranium[VI] Speciation and Toxicity to Three Tropical Freshwater Organisms. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3082-3089.
- Van Campenhout, K., Goenaga Infante, H., Hoff, P.T., Moens, L., Goemans, G., Belpaire, C., Adams, F., Blust, R., Bervoets, L., 2010. Cytosolic distribution of Cd, Cu and Zn, and metallothionein levels in relation to physiological changes in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) from metal-impacted habitats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 296-305.
- Vijver, M.G., Van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., Van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: A review. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4705-4712.
- WHO, 2011. Uranium in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO/SDE/WSH.
- Wright, D.A., Welbourn, P., 2002. *Environmental Toxicology*. Cambridge University Press.

Electronic Supplementary Information (ESI)

Supplemental Document 1

Extended materials and methods

1. Chemicals and reagents

All solutions were prepared with high-purity de-ionized water (resistivity $\geq 18.2 \text{ } \Omega \text{ cm}$) obtained from a Milli-Q Elix 3 water purification system (Millipore, Molsheim, France).

All chemicals and reagents were of the highest grade available from each supplier. Ammonium acetate (NH_4Ac , A1542 lot#021M1742V), ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3 , 40867 lot#BCBG1187V), BCA QuantiPro protein analysis kit and protein standards were from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Depleted uranyl nitrate hexahydrate ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; uranium isotopic composition: 99.65% ^{238}U , 0.33% ^{235}U , 0.0019% ^{234}U , 0.011% ^{236}U ; specific activity = $1.7 \times 10^4 \text{ Bq g}^{-1}$) was from Fluka (Buchs, Switzerland) and was further used as 1 g(U) L^{-1} stock solution in 0.016 M HNO_3 . 70% HNO_3 INSTRA-ANALYZED reagent was from Baker (Avantor Performance Materials, Deventer, The Netherlands). 30% H_2O_2 AnalaR NORMAPUR and 25% $\text{NH}_3(\text{aq})$ were from Prolabo (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France).

Buffer “B” was prepared by dissolving the appropriate amount of NH_4Ac in de-ionized water to reach the final concentration of 100 mM, then the pH was adjusted to 7.4 by addition of the appropriate volume of 1 M $\text{NH}_3(\text{aq})$ (ca. 1 mL for 1 L).

Mixture “M” was prepared by dissolving the approximate amount of NH_4HCO_3 and EDTA in de-ionized water to reach the final concentration of 200 mM and 2 mM, respectively. The resulting solution was degassed 5 min in an ultrasonic bath before utilization.

2. Fish exposure and sampling method

All zebrafish used in this study were a subset of a larger experimental population ($n = 275$) composed of 6-month-old adult males (fresh weight $400 \pm 50 \text{ mg}$). They were purchased from Elevage de la Grande Rivière, 69490 St Forgeux, France (lot#D021110). Fish were acclimated to laboratory conditions for 1 month prior to experiments: 2.75 fish L^{-1} ;

12/12 h light/dark photoperiod; $26 \pm 1^\circ\text{C}$ artificial freshwater containing $\text{Ca}^{2+} = 11.6$, $\text{Mg}^{2+} = 4.7$, $\text{Na}^+ = 7.4$, $\text{K}^+ = 5.9$, $\text{Cl}^- = 32.6$, $\text{SO}_4^{2-} = 9.6$, $\text{NO}_3^- = 19.2$, and $\text{HCO}_3^- = 1.6$ (all in mg L^{-1}) at pH 6.5 at equilibrium with atmospheric CO_2 . Fish were fed twice a day with Tetramin (Tetra, Melle, Germany) flakes throughout the acclimation and exposure periods. The quantity of food provided each time, approximately 5% of total fish mass, was expected to be totally consumed within 5 min (Simon *et al.*, 2011).

Fish were separated into three groups (2.75 fish L^{-1}): control (c_0), c_{20} and c_{250} composed of 110, 110 and 55 fish, respectively. Each group was exposed to waterborne U: $0 \mu\text{g L}^{-1}$ (c_0) for 3 and 30 d; $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (c_{20}) for 3 and 30 d; $250 \mu\text{g L}^{-1}$ (c_{250}) for 3 d. No mortality was observed throughout the experiment. The pH was maintained at 6.5 ± 1 in each experimental unit via an online pH measurement system coupled to a peristaltic pump delivering 1 mM HNO_3 . The chosen pH value and the absence of phosphate ensured high U bioavailability in the medium. U-spiked artificial freshwater prepared once a week ($[\text{U}]_{\text{spike}}$: 0, 27 and $275 \mu\text{g L}^{-1}$) was continuously delivered to each experimental unit using multichannel peristaltic pumps to ensure that the fish were exposed to constant water chemical parameters and U levels. The equivalent volume of water was pumped out by the same pumps. This system enabled renewal of half the water column of each experimental unit every 24 h. The total concentrations of U ($[\text{U}]_{\text{total}}$) in water were monitored daily and corrected manually by direct addition of a U stock solution if necessary. In addition, dissolved U ($[\text{U}]_{\text{dissolved}}$) was measured daily by water filtration at $0.2 \mu\text{m}$ (PES syringe-filters from VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). Other abiotic parameters such as pH, temperature and major cation concentrations were also monitored daily. Nitrate and nitrite levels were controlled periodically. On days 3 (3d) and 30 (30d), 55 fish were sampled from each aquarium and sacrificed by knocking them out in iced water. Gills were collected from 50 fish after exsanguination. The branchial arch was discarded and the remaining epithelium was quick-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C prior to sample preparation and analysis. From these 50 fish, 10 were randomly selected for bioaccumulation assessment. In the remaining 5 fish, gills were collected and prepared as described by Barillet *et al.* (2010) for U microlocalization by TEM-EDX imaging ($n=5$ per exposure condition).

3. Sample preparation

Fresh gill epithelium stored at -80°C was homogenized in $600 \mu\text{L}$ ice cold 100 mM ammonium acetate buffer (pH 7.4) using a 4 mL Potter-Elvehjem grinder (PTFE pestle and

glass cylinder from Dutscher, Brumath, France; 2 x 1.5 min grinding, 30 s pause). A 50 μL aliquot of homogenate was quick-frozen in liquid nitrogen and stored in an Eppendorf tube at -80°C for further protein concentration determination. Another 50 μL aliquot was kept in a 5 mL screw-capped plastic vial prior to digestion and U determination. The remaining 500 μL of homogenate was centrifuged (Himac CS 120GX, Hitachi, Tokyo, Japan) at 100,000 g for 1 h at 4°C . The supernatant obtained corresponded to the cytosolic fraction. As previously described for the homogenate, two 50 μL aliquots of cytosol were kept for further protein assay and U analysis. The remaining supernatant ($\approx 400 \mu\text{L}$) was divided into three aliquots, two were quick-frozen and stored in Eppendorf tubes at -80°C and one was directly analyzed by SEC-ICP-SFMS. The pellet which was composed of cell debris, granules and cell organelles was transferred to a 5 mL screw-capped plastic vial.

Homogenate, cytosol and pellet aliquots were digested in the screw-capped plastic vials with 100, 100 and 200 μL of 70% HNO_3 , respectively, by incubation for 2 h at 85°C using a DigiPREP device (SCP Science, Courtaboeuf, France). The resulting digests were diluted with water to obtain a final concentration of 2% HNO_3 prior to total U determination.

4. Determination of total uranium and other metals

Water samples from the experimental units were acidified with 70% HNO_3 to obtain a final concentration of 2% HNO_3 prior to metal (U, Na, K, Ca and Mg) quantification. Samples were analyzed daily by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES Optima 4300DV, Perkin Elmer Inc, Wellesley, Massachusetts, USA; LOD for U: $10 \mu\text{g L}^{-1}$).

Diluted digests from gill subcellular fractions were further diluted with 2% HNO_3 if necessary to fit the U calibration range. An internal standard (ISTD, ^{209}Bi at $1 \mu\text{g L}^{-1}$ final concentration) was systematically added before analysis. These samples were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS Agilent 7500 Ce, Agilent, Tokyo, Japan) using external calibration ($[\text{U}]$ 1 - 1000 ng L^{-1} and $[\text{Cu}, \text{Zn}, \text{Fe}]$ 0.2 – 20 $\mu\text{g L}^{-1}$) including ISTD correction (LOD for U: 1 ng L^{-1} , Cu and Zn: $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ and Fe: $1 \mu\text{g L}^{-1}$). The absence of a matrix effect was verified by comparing the results with those obtained by the method of standard additions (data not shown) for nine different samples (*i.e.* different exposure conditions and type of subcellular fraction).

5. Protein concentration determination

Homogenate and cytosol samples (50 μL aliquots stored at -80°C) were slowly thawed in an ice bath prior to dilution by the addition of 200 μL ammonium acetate buffer. Samples were then quickly vortexed for homogenization. For each diluted sample, 200 μL were transferred to an Eppendorf tube and mixed 50/50 (v/v) by the addition of 200 μL BCA reagent. The resulting mixture was quickly vortexed prior to 2 h incubation in a 37°C thermostatted water bath. Upon incubation, the sample was set off at room temperature for 5 min before being transferred to an 8-well plastic plate (transparent bottom, 300 μL well⁻¹). Absorbance at 545 nm was then measured (Stat Fax 303+ Microstrip Reader, ABS mode without offset, Awareness Technology, Palm City, Florida, USA). Calibration was performed by preparing BSA (Bovine Serum Albumin, 65 kDa) standards (1 – 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Each standard was mixed 50/50 (v/v) with BCA reagent, incubated and analyzed as described previously.

References

- 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.
- 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.

Supplemental Figure S1

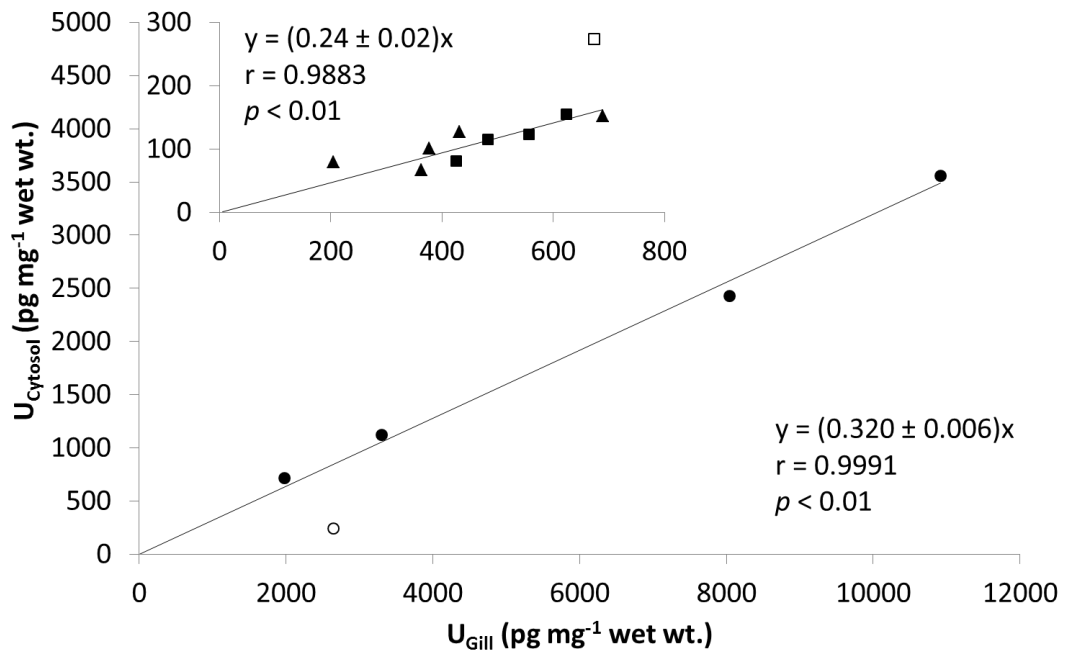


Figure S3: Linear relation between the cytosolic and whole gill total U concentrations with data from c₂₅₀ samples (plain circles in main figure) and c₂₀ samples (plain triangles 3d and plain squares 30d in insert). Hollow data points were considered as outliers (Q-test at 90 % confidence) and thus discarded for linear regression.

Supplemental Figure S2

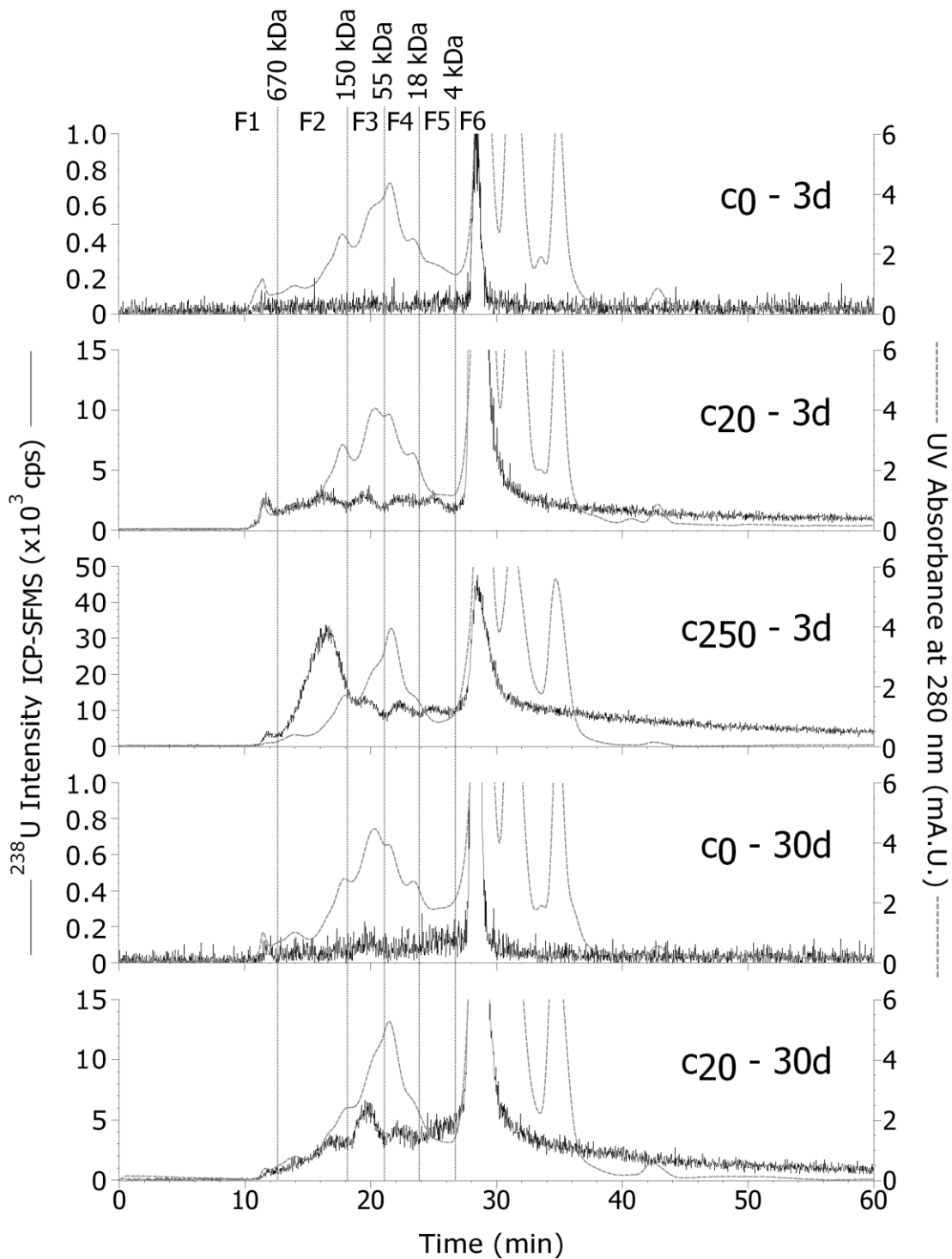


Figure S4: Typical ^{238}U chromatographic profiles of gills cytosols obtained by SEC-ICP-SFMS. The vertical dotted lines delimit the six U fractions. Molecular weights were calculated from calibration data. The major peaks between 27 and 35 minutes may be truncated for some samples in order to zoom in the 6.7 – 670 kDa region of interest.

Supplemental Table S1

Table S1: Summary of fish exposure pH (n=30 at 3 d, n=100 at 30 d) and U concentrations from daily monitoring (total n=10 at 3 d and n=60 at 30 d, dissolved n=6 at 3 d and n=30 at 30 d). Results are given as mean \pm SD.

	<i>3 days</i>			<i>30 days</i>	
	c_0	c_{20}	c_{250}	c_0	c_{20}
pH	6.3 \pm 0.2	6.3 \pm 0.2	6.4 \pm 0.2	6.3 \pm 0.3	6.3 \pm 0.2
[U]_{total} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.034 \pm 0.003	20.8 \pm 1.5	265 \pm 20	0.12 \pm 0.01	18.6 \pm 1.4
[U]_{dissolved} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	n.a.	14.3 \pm 1.1	174 \pm 13	n.a.	9.7 \pm 0.8

n.a.: not applicable

Supplemental Table S2

Table S2: Uranium concentration in the gills for each sampled zebrafish as well as mean and SD after 3d and 30d exposure to control (c_0 , $< 0.2 \mu\text{g L}^{-1}$), c_{20} ($20 \mu\text{g L}^{-1}$), and c_{250} ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) conditions.

<i>pg mg⁻¹ wet wt.</i>	<i>3 days</i>			<i>30 days</i>	
	c_0 (n = 4)	c_{20} (n = 5)	c_{250} (n = 5)	c_0 (n = 4)	c_{20} (n = 5)
[U]_{Gills} for each individual sorted in ascending order	4.0	206	1984	2.9	426
	4.9	363	2648	4.2	484
	5.1	377	3307	4.5	558
	7.8	432	8040	5.7	624
			689		674
Mean	5.5 ^a	413 ^b	5379 ^c	4.3 ^a	553 ^b
SD	1.6	176	3906	1.2	101

Superscripts (a, b or c) denote statistically equivalent mean values (ANOVA at critical threshold $\alpha = 5\%$).

Supplemental Table S3

Table S3: Concentration of Fe, Cu and Zn in whole gills and cytosolic fraction for each exposure condition (mean \pm SD, n=2).

	<i>ng mg⁻¹ wet wt.</i>	Fe	Zn	Cu
	Whole gills	c₀ - 3d	87 \pm 16	16.2 \pm 0.8
c₂₀ - 3d		91 \pm 49	13.2 \pm 2.5	1.1 \pm 1.8
c₂₅₀ - 3d		127 \pm 65	40 \pm 26	4.0 \pm 1.6
c₀ - 30d		71 \pm 10	16.4 \pm 6.4	1.5 \pm 0.4
c₂₀ - 30d		68 \pm 11	18.8 \pm 2.5	0.9 \pm 0.8
Literature		60^a \pm 15	45^c \pm 5 21^b \pm 4	1.0^a \pm 0.1 4^b \pm 2
	<i>ng mg⁻¹ wet wt.</i>	Fe	Zn	Cu
	Cytosol	c₀ - 3d	60 \pm 6	6.1 \pm 0.5
c₂₀ - 3d		60 \pm n.a.	12.5 \pm 1.3	n.a.
c₂₅₀ - 3d		63 \pm 2	10.7 \pm 0.5	n.a.
c₀ - 30d		70 \pm 46	6.6 \pm 0.7	0.3 \pm 0.2
c₂₀ - 30d		59 \pm 24	9.6 \pm 2.4	n.a.

n.a.: below detection limits (estimated LOD in ng mg⁻¹ wet wt.: Fe = 6.0, Zn = 1.0, Cu = 0.3) or insufficient number of replicates

^a Craig *et al.* (2009) (*Danio rerio*)

^b Liu *et al.* (2012) (*Ctenopharyngodon idellus*)

^c Johnston *et al.* (2010) (*Danio rerio*)

Développements analytiques pour la spéciation de l'uranium dans les branchies du poisson zèbre (*Danio rerio*) après exposition

L'objectif de cette thèse porte sur l'étude de la compartimentalisation cellulaire et de la prise en charge de l'uranium (U) par les protéines cytosoliques des cellules branchiales du poisson zèbre (*Danio rerio*, espèce modèle en toxicologie aquatique) après exposition contrastées (chronique vs. aiguë, 20 et 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) par voie directe. Cette étude a nécessité le développement, l'utilisation et le couplage d'outils analytiques de pointe (SEC, IEF hors-gel, RP-UHPLC pour la séparation, ICP-SFMS, ESI-FTMS/MS pour la détection) avec comme défis majeurs la conservation des interactions non-covalentes U-biomolécule et une sensibilité maximale pour travailler à des niveaux d'exposition proches de ceux rencontrés dans l'environnement. Après extraction, 24 à 32% de la charge branchiale totale en U est contenue dans le cytosol dans lequel la distribution de l'U sur les biomolécules (en fonction de leur PM mais aussi de leur pI) diffère selon le niveau d'exposition. Enfin, une cartographie des biomolécules cibles de l'U a permis (i) de mettre en évidence une affinité particulière de l'U pour les protéines à caractère acide et/ou contenant du phosphore et (ii) d'identifier 24 protéines candidates pour lier U.

Analytical developments for the speciation of uranium in zebrafish (*Danio rerio*) gills after exposure

The objective of this thesis is to study the cellular compartmentalization and the chelation of uranium (U) by cytosolic proteins of gill cells of the zebrafish (*Danio rerio*, model specie in aquatic toxicology) under different direct exposure conditions (chronic vs. acute, 20 and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). This study required the development of hyphenated techniques (SEC, IEF off-gel, RP-UHPLC for the separation, ICP-SFMS, ESI-FTMS/MS for the detection) with the main challenges of maintaining the non-covalent U-biomolecule interactions and enhancing sensitivity for the analysis of environmentally relevant samples. After extraction, 24% to 32% of the total U detected in the gills were present in the cytosolic fraction, in which the U distribution on the biomolecules (as a function of their MW and pI) varied depending on the exposure level. Finally, U target biomolecules mapping allowed us (i) to highlight a particular affinity of U for acidic and/or P-containing proteins and (ii) to identify 24 protein candidates for U binding.