

IRSN

INSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

Faire avancer la sûreté nucléaire

Identification des ligands biologiques de l'uranium dans les gonades de *Danio rerio*. Impact sur leur fonctionnalité.

Yvan Eb-Levadoux

ISRN/IRSN-2018/205

Le 3 Avril 2017

Laboratoire d'Ecotoxicologie des radionucléides



Université de Pau et des Pays de l'Adour

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

THESE

Présentée par

Yvan Eb-Levadoux

Le 3 Avril 2017

Pour obtenir le grade de DOCTEUR

Discipline : Chimie Analytique et Environnement

Identification des ligands biologiques de l'uranium dans les gonades de *Danio rerio*. Impact sur leur fonctionnalité.

DIRECTEUR DE THESE

Ryszard LOBINSKI

ENCADREMENT

Sandrine FRELON et Sandra MOUNICOU

JURY

C. BERTHOMIEU
X. COUSIN
R. ORTEGA
S. FRELON
R. LOBINSKI
F. PANNIER

Directrice de recherche, CEA **Rapporteur**
Chargé de recherche, IFREMER **Rapporteur**
Directeur de recherche, CNRS
Chargée de recherche, IRSN
Directeur de recherche, CNRS
Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour

Remerciements

Avant de remercier les personnes qui m'ont accueillies et avec lesquelles j'ai eu le plaisir de travailler, je souhaite remercier, en amont de ces trois années de thèse, Sandrine Frelon et Sandra Mounicou pour la confiance qu'elles m'ont accordée en me recrutant et, ce faisant, en m'offrant l'opportunité de travailler sur un sujet passionnant, à l'interface de la chimie analytique (mon domaine de prédilection) et l'écotoxicologie (qui a été un nouveau domaine pour moi). Travailler sur un sujet que j'ai apprécié est à mon sens un rare privilège. En amont de la thèse, je dois également remercier Olivier Simon qui était déjà en train d'exposer les poissons zèbres et en quelques sortes en train de travailler pour moi alors que je n'étais même pas encore doctorant et que nous ne nous étions pas encore rencontrés. Pour cette situation un peu cocasse où les rôles d'élève et d'encadrant ont été momentanément inversés afin de me permettre d'avoir du matériel biologique pour mes futures expériences, merci.

Je tiens également à remercier les membres du jury extérieurs à ma thèse, Catherine Berthomieu (CEA), Xavier Cousin (IFREMER), Florence Pannier (Université de Pau et des Pays de l'Adour) et Richard Ortega (CNRS), présents à ma soutenance de thèse. Même si je confesse avoir ressenti brièvement le besoin de m'asseoir sur la fin de la discussion, les échanges que nous avons eus ont été réellement passionnants. J'ai beaucoup appris au cours de la thèse et la soutenance a été à l'image de la thèse, riche et captivante. Je remercie à nouveau Catherine Berthomieu et Xavier Cousin en qualité de rapporteur qui ont évalué mon travail de thèse. Je profite également de ce paragraphe pour remercier François Brion qui n'a pu être présent le jour de la soutenance et n'apparaît donc pas officiellement comme membre du jury mais qui a donné son avis en qualité de membre extérieur (initialement) sur mon travail. Je souhaite enfin remercier Karine Faucher (TOTAL), Valérie Bolliet (INRA) et Richard Ortega (CNRS) qui ont participé en tant que membres extérieurs à mes comités de suivi de thèse. Ces réunions ont été l'occasion d'échanges scientifiques qui m'ont été particulièrement profitable dans l'avancée de mon travail de thèse.

Cette thèse réalisée en collaboration entre l'IRSN au Laboratoire de Biogéochimie, Biodisponibilité et Transfert des radionucléides (L2BT) puis au Laboratoire d'Ecotoxicologie des radionucléides (LECO) sur le site de Cadarache et le CNRS au Laboratoire de Chimie Analytique Biologique et Environnement (LCABIE) à Pau. Je souhaite remercier respectivement Rodolphe Gilbin, Christelle Adam-Guillermin et Ryszard Łobiński pour leur accueil dans chacun des laboratoires. Cette collaboration m'a permis de nombreux interactions et échanges avec les personnes des différents laboratoires, permanents et doctorants. Je vais essayer de n'oublier personne et m'excuse par avance si cela devait survenir.

Je remercie mon directeur de thèse Ryszard Łobiński pour les discussions très intéressantes que nous avons eues et les décisions prises à des moments charnières de ma thèse. Je tiens à remercier mes encadrantes Sandrine Frelon et Sandra Mounicou qui m'ont fait partager leur expérience et m'ont formé à la recherche pendant ces trois années. Sandrine, merci pour ton implication, ton soutien et ta confiance. En plus de ce qui était prévu dans le

programme de thèse, merci de m'avoir fait bénéficier de ton autre projet de recherche, ISATIS, qui m'a permis de beaucoup apprendre sur la protéomique sur gel. Je me rappelle, suite à mon audition pour devenir doctorant à l'IRSN, tu m'avais dit que tu étais très exigeante. A ce moment, j'avais trouvé cela raisonnable ; aujourd'hui, je considère cela indispensable. Merci de m'avoir fait donner maximum de moi-même, merci de m'avoir consacré autant de temps que nécessaire pour y arriver. Sandra, merci d'avoir assuré l'autre partie de la garde alternée du doctorant. Merci pour les discussions scientifiques, merci pour ta gentillesse. Merci également de m'avoir offert l'opportunité de travailler sur des appareils fabuleux (spectromètres de masse haute résolution ICP SF MS et ESI FT MS). Je tiens à remercier également Olivier Simon qui a participé à l'encadrement et qui a été mon référent pour la partie écotoxicologie. Venant de chimie analytique, il a fallu que nous nous comprenions (scientifiquement), merci pour ta patience et les discussions que nous avons pu avoir. Merci d'avoir donné le caractère « vivant » à ce qui n'était pour moi qu'un échantillon avec des analytes dedans. Merci de m'avoir accompagné pour l'expérience témoin des poissons zèbres, moi qui n'avait jamais touché un aquarium jusqu'alors. Merci enfin de m'avoir fait bénéficier de ton autre programme de recherche, OPERA, en me faisant participer à la campagne de prélèvement des gardons.

Je tiens à remercier les personnes à Cadarache avec lesquelles j'ai eu grand plaisir à travailler. Sans ordre de préférence, merci Claudine, tu as été l'un de mes premiers contacts sur Cadarache, merci pour ta bienveillance. Merci Clara d'avoir pris le relai dans la gestion de mon dossier, merci pour ta bonne humeur. Un merci particulier à Laureline pour ma petite bestiole, Llew est adorable et adorée, elle a toujours son caractère espiègle. Au moment où j'écris ces lignes, elle dort derrière l'écran de mon ordinateur. Sur une note plus studieuse mais non moins agréable, je souhaite remercier Fred C. qui m'a aidé pour la partie quenching de fluorescence, merci pour le temps accordé en plus de tes travaux. Je remercie les permanents du LECO et L2BT : outre l'ambiance de travail conviviale, à un moment ou un autre je vous ai presque tous sollicités ; j'ai été ravi de travailler en votre compagnie. Merci donc à Pascale, Béatrice, Magali, Virginie, Isabelle, Sylvie, Cathy, Fred A., Arnaud, Jean-Marc, Daniel, Laurent. Un merci particulier à Loïc pour le temps que nous avons passé avec les « non-permanents » et en compagnie de l'ICP MS. Je tiens à remercier les membres du GARM, groupement en support de nos activités de laboratoire. Merci Nicolas d'avoir veillé à ma sûreté radiologique ! Merci Nadine pour les échanges que nous avons eus en anticipation de mes activités. Merci à Jean-François et Julien que j'ai eu l'occasion de solliciter à diverses reprises. Au-delà de mes activités de recherche, faire attention à l'impact de mes activités pour les autres et sur les filières de retraitement est un enseignement que je garde en tête à chaque fois que je lance une expérience et je vous remercie pour cette sensibilisation.

Au cours de ma thèse, j'ai également eu l'occasion de travailler avec plusieurs personnes extérieures aux laboratoires. J'en profite donc pour remercier Cédric Garnier (Université de Toulon) pour les modélisations de courbes de quenching. Je remercie également Matthieu Pophillat et Patrick Fourquet (Institut Paoli-Calmettes) pour la formation à la protéomique, les discussions scientifiques et les analyses d'identification de protéines.

Je remercie les doctorants, post-doctorants et stagiaires du LECO et du L2BT. Je retiendrai les week-ends que nous avons occasionnellement organisés, nous appellerons cela du

« team building » et je pense que nous avons été bien « team buildés ». Merci Adeline de m'avoir accueillie en tant que première doyenne des doctorants, merci pour l'ambiance agréable, décontractée mais aussi sérieuse que tu as installée. Nous avons eu à cœur de la préserver par la suite. Je me souviendrai de ce coup de téléphone que j'ai reçu un vendredi, veille des vacances de Noël, à 16h (je finissais une manip en compagnie des sangliers) pour me demander un coup de main pour le déménagement ; cette fin de journée avait été épique, bonne chance dans ce que tu entreprendras. Merci à Adrien, second doyen, pour m'avoir fait connaître Carmen et m'avoir trouvé mon appartement à distance, merci pour le cat-sitting. Je salue la triplète Kewin, Antoine et Florian, nous avons partagé de sacrées tranches de rires à la pause ou en dehors du labo, au cours d'une partie de foot ou de pétanque, combien de balles perdues au fait ? Merci pour les discussions plus sérieuses voire philosophiques, en fonction du lieu et du degré d'éthanolémie. Je vous souhaite à tous le meilleur, ne changez surtout rien. Kewin, je passerai sous silence la fameuse soirée de restaurant, mais je te laisse cette phrase pour pique de rappel au cas où tu lirais ces lignes. Merci Laure d'avoir été ma studieuse partenaire de bureau pendant plus d'un 1 an, merci pour ton sourire et ta bonne humeur inconditionnels. Merci pour le coup de main quand il a fallu déménager à la hâte mes affaires. Je remercie les doctorants/post-doctorants du projet ISATIS Cécile, Mira et Sébastien, Vous avez une place très particulière pour moi. Merci Cécile, nous avons été « collègue-doctorant », avec des périodes des discussions sérieuses alternant avec des moments plus décontractés. Merci pour ton enthousiasme et ton rire, ne les perd surtout pas. Ne lâche rien en cette fin de thèse, courage. Merci Mira pour les discussions en tout genre, j'espère que ton séjour en France aura été riche scientifiquement, culturellement et gastronomiquement. J'ai été ravi de t'avoir fait découvrir un peu de notre terroir au détour de nos escapades au centre commercial. Un merci tout particulier à Sébastien, c'est avec grand plaisir que j'ai travaillé à tes côtés. Merci de m'avoir accepté comme padawan et de m'avoir initié au côté de la Force de la protéomique sur gel. Je pense ne pas avoir exagéré en te disant que je te vampirisais tes connaissances et tu as donné sans compter de ton temps. Merci pour les conseils, astuces, bref ton savoir-faire dans cet art délicat. Le vocabulaire francophonique de la paillasse (berlin, cylindre et autres tabliers) n'a désormais plus de secrets pour moi. Je te souhaite de la réussite dans tout ce que tu entreprendras. Je remercie également Ingrid, Magali, Marie, Remi et Caroline. Je n'oublie pas Shin, thank you for introducing me to sushi cooking. I try my best to spread the good word.

Je remercie également les personnes avec lesquelles j'ai eu l'occasion de travailler au LCABIE, en particulier au niveau du rez-de-jardin. Je souhaite remercier Carine qui m'a initié à l'utilisation de l'ICP MS haute résolution et qui a été présente pour nous aider à résoudre les petits et plus gros soucis qui arrivent inmanquablement sur ces appareils sensibles. Merci à Laurent pour les discussions que nous avons pu avoir, ta disponibilité et ton humour. Je souhaite remercier Hervé qui nous a dépanné quand nous avons eu des tracas avec l'OGE. Merci aussi pour le miel artisanal qui a servi entre autres à la confection de délicieux pains d'épices. Je tiens également à remercier plusieurs permanents que j'ai eu le plaisir de croiser et qui ont pu m'aider à un moment ou un autre : Brice, Florence, Kasia, Johanna, Marie-Pierre. J'en profite pour remercier plusieurs personnes en support de nos activités de recherche. Merci Géraldine pour avoir géré mon dossier sur Pau, merci

pour ta disponibilité, ton sourire et ta bonne humeur. Merci également à Mickael que j'embêtais quand je n'embêtais pas Géraldine, merci pour ta disponibilité et ta patience. Je remercie également Richard pour sa disponibilité, sa bonne humeur et les discussions que nous avons pu avoir.

Je remercie les doctorants avec lesquels j'ai passés de bons moments. Je souhaite tout d'abord remercier Marlène qui a été notre doyenne à mon arrivée. Merci pour ton accueil, ta bonne humeur et ton sourire, tous mes vœux de réussite dans ta filière, tu le mérites. Merci Jordan, qui a été mon collègue de bureau pour toute la durée de mon séjour à Pau. J'ai beaucoup apprécié les discussions que nous avons et le soutien mutuel. Je te souhaite bon courage pour la fin de thèse. Je tiens à remercier Sara pour les discussions et le temps passé en alternance au HR ou au chevet d'une pompe récalcitrante. Merci également pour le bon temps passé en dehors du labo, sushi party time ! Un petit coucou à Vicmary, merci pour ton sourire et ta bonne humeur ; ta soutenance en français et espagnol alternés était parfaite, je le redis ici puisque tu ne me crois pas. Nous n'avons pas acheté le nœud rose pour le HR ☺. Je te souhaite plein de bonnes choses pour l'avenir. Je remercie les doctorants avec lesquels j'ai eu l'occasion de discuter pour une raison ou un autre : merci à Marine, Maxime, Matthieu, Fanny. Merci également aux stagiaires, merci en particulier à Yohann qui m'a beaucoup aidé pour les expériences sur les gardons. Bon courage à Emmanuelle et Rémi pour la fin de leur stage.

Enfin, je tiens à remercier l'Ecole Doctorale qui a toujours été disponible pour répondre à mes questions ou résoudre des problèmes. Merci à Anna Chrostowska, directrice de l'ED, merci à Jacqueline Petitbon et Anne-Marie Venancio pour la gestion de mon dossier, merci pour votre accueil.

à ma famille

à Julie

Table des matières

| | |
|--|----|
| THÈSE | 1 |
| Résumé | 20 |
| Abstract | 21 |
| Introduction générale..... | 22 |
| Etude bibliographique (partie 1) | 28 |
| 1. Des effets individuels aux effets moléculaires : éléments de compréhension pour la toxicité de l'uranium | 30 |
| 1.1. Généralités sur l'uranium | 30 |
| 1.1.1. L'uranium dans l'environnement | 30 |
| 1.1.2. Toxicité et reprotoxicité de l'uranium chez Danio rerio | 31 |
| 1.2. Cas de la gonade..... | 33 |
| 1.2.1. Intérêt du modèle animal Danio rerio pour l'étude de la toxicité de l'uranium..... | 33 |
| 1.2.2. Reprotoxicité de l'uranium..... | 34 |
| 1.2.3. Biologie de la gonade et problématique associée | 35 |
| 1.2.4. Description de la vitellogénine : une protéine clé pour le développement..... | 39 |
| 1.3. L'étude des protéines, une clé pour élucider la toxicité | 42 |
| 1.3.1. Etat de l'art uranium/spéciation et uranium/métallomique | 42 |
| 1.3.2. Etat de l'art uranium/protéomique..... | 45 |
| Etude bibliographique (partie 2) | 47 |
| 2. Etude bibliographique (Partie 2) : Apports et problématiques de l'analyse métallomique . | 49 |
| 2.1. Définition et principes | 49 |
| 2.2. Techniques analytiques pour l'analyse métallomique | 50 |
| 2.3. Analyse métallomique en condition non dénaturante – Etat de l'art..... | 53 |
| 2.3.1. Présentation des contraintes de la démarche analytique | 53 |
| 2.3.2. Préparation d'échantillon en condition non dénaturante | 54 |
| 2.3.3. Séparation des complexes uranium- protéine | 55 |
| 2.3.3.1. En fonction de la masse moléculaire par SEC-ICP MS..... | 55 |
| 2.3.3.2. Séparation des complexes uranium-protéine en fonction du point isoélectrique par OGE | 55 |
| 2.3.3.3. Séparation des complexes sur gel d'électrophorèse..... | 56 |
| 2.3.4. Identification des protéines par approche top-down, bottom-up et shotgun | 57 |
| 2.4. Séparation IEF hors gel et ampholytes porteurs | 59 |
| 2.5. Etude de complexes uranium-protéine par spectrométrie de masse non dénaturante. | 64 |

| | |
|---|----|
| 2.5.1. Présentation de la problématique | 64 |
| 2.5.2. Ionisation par électrospray..... | 66 |
| 2.5.3. Transfert des ions dans l'analyseur | 67 |
| Matériel et méthodes..... | 73 |
| 3. Matériel et méthodes..... | 75 |
| 3.1. Constitution de la banque d'échantillons | 75 |
| 3.1.1. Poissons zèbres témoins pour la mise au point des techniques analytiques | 75 |
| 3.1.1.1. Description de la procédure | 75 |
| 3.1.1.2. Suivi des paramètres physico-chimiques | 76 |
| 3.1.1.3. Banque d'échantillon..... | 76 |
| 3.1.2. Contamination chronique des poissons zèbres..... | 77 |
| 3.1.2.1. Description de l'expérimentation..... | 77 |
| 3.1.2.2. Suivi des paramètres physico-chimiques | 79 |
| 3.2. Observations et détermination de paramètres biologiques | 79 |
| 3.2.1. Succès reproducteur..... | 79 |
| 3.2.2. Indice gonado-somatique et de condition | 79 |
| 3.3. Analyse chimique à l'échelle de l'organe | 80 |
| 3.3.1. Dosage de l'uranium et des métaux dans les organes | 80 |
| 3.3.1.1. ICP-MS quadripolaire..... | 80 |
| 3.3.1.2. ICP-SFMS (secteur magnétique) | 80 |
| 3.3.2. Dosage de protéines totales par Bradford | 81 |
| 3.3.3. Extraction et préparation des protéines en condition non dénaturante..... | 82 |
| 3.4. Analyse en condition dénaturante : protéomique et Western Blot | 82 |
| 3.4.1. SDS-PAGE..... | 82 |
| 3.4.1.1. Purification des protéines | 82 |
| 3.4.1.2. Marquage minimal fluorescent | 83 |
| 3.4.1.3. Migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide | 83 |
| 3.4.1.4. Transfert sur membrane PVDF et immunomarquage..... | 84 |
| 3.4.1.5. Détection de la fluorescence sur gel ou membrane | 85 |
| 3.4.2. DIGE..... | 85 |
| 3.4.2.1. Méthode..... | 85 |
| 3.4.2.2. Préparation d'échantillons | 87 |
| 3.4.2.3. Focalisation iso-électrique (IEF)..... | 88 |
| 3.4.2.4. Conditionnement des strips IEF et transfert sur gel..... | 89 |

| | | |
|--|--|-----|
| 3.4.2.5. | Migration électrophorétique et détection des spots protéiques | 89 |
| 3.4.2.6. | Analyse comparative Delta2D | 89 |
| 3.4.2.7. | Excision des spots d'intérêt SpotPicker | 90 |
| 3.4.2.8. | Digestion enzymatique et analyse par spectrométrie de masse | 90 |
| 3.5. | Détection des complexes en condition non dénaturante | 91 |
| 3.5.1. | Chromatographie multiélémentaire par SEC-ICP SF MS | 91 |
| 3.5.2. | Séparation par électrophorèse hors gel..... | 92 |
| 3.5.3. | Cartographie multiélémentaire par OGE x SEC – ICP SF MS | 93 |
| 3.6. | Identification des protéines par spectrométrie de masse | 94 |
| 3.6.1. | Préparation d'échantillon..... | 94 |
| 3.6.2. | Paramètres d'analyse LC-ESI MS | 95 |
| 3.6.3. | Traitement des données : PEAKS et bases de données des protéines | 95 |
| 3.7. | Etude in vitro de complexation de l'uranium par mesure de fluorescence..... | 96 |
| Résultats et discussions (partie 1) : Développements analytiques | | 99 |
| 4. | Résultats et discussions (Partie 1) : développements analytiques pour l'analyse des complexes U-protéine | 101 |
| 4.1. | Optimisation de l'extraction de complexes dans la gonade de poisson zèbre | 101 |
| 4.1.1. | Extraction des protéines et complexes en tampon non dénaturant | 101 |
| 4.1.2. | Détermination de la fraction subcellulaire d'intérêt..... | 102 |
| 4.2. | Optimisation des paramètres OGE..... | 108 |
| 4.2.1. | Choix de l'ampholyte porteur | 108 |
| 4.2.1.1. | Dosage de métaux dans les solutions mères d'ampholytes porteurs par ICP MS | 109 |
| 4.2.2. | Détermination de Kd apparent des ampholytes porteurs par quenching de fluorescence | 110 |
| 4.2.3. | Evaluation de la complexation des ampholytes porteurs (AP) par SEC-ICPMS..... | 114 |
| 4.2.4. | Optimisation des paramètres IEF sur des mélanges protéiques synthétiques..... | 115 |
| 4.2.4.1. | Influence du tampon sur la séparation électrophorétique | 115 |
| 4.2.4.2. | Détermination d'un équilibre concentration « protéines – tampon - ampholytes porteurs » | 117 |
| Résultats et discussions (partie 2) : Ecotoxicologie..... | | 124 |
| 5. | Résultats et discussions (Partie 2) : Ecotoxicologie..... | 126 |
| 5.1. | Paramètres biologiques et bioaccumulation | 126 |
| 5.1.1. | Indice de condition et indice gonado-somatique..... | 126 |
| 5.1.2. | Dosage protéique dans les gonades..... | 127 |
| 5.1.3. | Accumulation de l'uranium dans les organes du poisson zèbre | 128 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 5.2. | Distribution de l'uranium dans les protéines de la gonade : une analyse SEC-ICP SFMS multi-élémentaire globale..... | 131 |
| 5.3. | Analyse couplée OGE x SEC - ICP MS..... | 140 |
| 5.3.1. | Cartographie des complexes métal-protéine chez le poisson zèbre | 140 |
| 5.3.2. | Détermination des protéines cibles potentielles de l'uranium dans les fractions OGE..... | 144 |
| 5.3.3. | Conclusion partie métallomique | 147 |
| 5.4. | Etude protéomique des effets de l'uranium sur la gonade | 148 |
| 5.4.1. | Analyse différentielle des protéomes de 4 groupes de poissons, témoins vs contaminées et reproduites vs non reproduites..... | 148 |
| 5.4.2. | Discussion autour des protéines identifiées | 152 |
| 5.4.2.1. | La vitellogénine..... | 152 |
| 5.4.2.2. | L'actine | 157 |
| 5.4.2.3. | Enzymes GST et GAPDH..... | 159 |
| 5.4.2.4. | Autres protéines..... | 159 |
| 5.5. | Synthèse des approches métallomiques et protéomiques..... | 161 |
| 5.5.1. | Cas de la phosvitine..... | 161 |
| 5.5.2. | Complémentarité des approches métallomique et protéomique dans le cadre du projet | 162 |
| | Conclusions générales et perspectives..... | 166 |
| | Production scientifique | 172 |
| | Références bibliographiques | 174 |
| | Annexe 1 : publication..... | 184 |
| | Annexe 2 : liste des protéines OGE | 194 |

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Localisation des mines d'uranium en France. Extrait de la base de données MIMAUSA (IRSN, mise à jour 27/02/2017) | 30 |
| Figure 2 : Schémas d'un follicule (Tyler and Sumpter 1996)..... | 37 |
| Figure 3 : Ovocyte de poisson zèbre en phase prévitellogénique, observation par microscopie optique (x40) | 37 |
| Figure 4 : Ovocyte secondaire vitellogénique de poisson zèbre. Observation par microscopie optique (x40) | 38 |
| Figure 5 : Coupe histologique de poisson zèbre femelle, observation en microscopie optique. (a) ovogonies, (b) ovocytes primaires, (c) ovocytes prévitellogéniques, (d) ovocytes vitellogéniques (Menke et al. 2011)..... | 39 |
| Figure 6 : Cristallographie de la vitellogénine de lamproie (Thompson and Banaszak 2002) | 41 |
| Figure 7 : Techniques analytiques utilisées en métallomique. Adapté de (Mounicou et al. 2009)..... | 50 |
| Figure 8 : Exemple d'ampholytes porteurs (AP) et non porteurs parmi les acides aminés. La courbe bleue représente la conductivité en fonction du pH, le trait vertical rouge représente le point isoélectrique. Simulation Marvin® v6.2.2 | 60 |
| Figure 10 : Nombre de fractions dans lesquelles se retrouve chaque ampholyte après isofocalisation. Les ampholytes retrouvés dans 1 ou 2 fractions sont considérés comme bons (encadré vert). Les autres ne participent pas à la génération du gradient (encadré rouge). Analyse réalisée pour des ampholytes au pI acide (à gauche) et basique (à droite) (Righetti et al. 2007) | 63 |
| Figure 11 : Dispositif expérimental pour l'exposition chronique des poissons zèbres à l'uranium dans l'eau..... | 77 |
| Figure 12 : Schéma de l'expérimentation de contamination des poissons zèbres par l'uranium. | 78 |
| Figure 13 : Exemple de DIGE. 12 protéomes ont été séparés sur 6 gels..... | 86 |
| Figure 14 : Paramètres de focalisation isoélectrique | 88 |
| Figure 15 : Effet de la procédure d'élution sur le bruit de fond en uranium. | 92 |
| Figure 16 : Chambre de focalisation (au centre) et les deux réservoirs cathodiques et anodiques..... | 92 |
| Figure 17 : Construction de la cartographie (pI x MM) à partir des chromatogrammes issus de chaque fraction OGE via logiciel Origin..... | 94 |
| Figure 18 : Analyses menées pour caractériser les différentes fractions, exemple pour le protocole 1. | 104 |
| Figure 19 : Répartition des protéines entre les différentes fractions subcellulaires du protocole 2 (broyat, après centrifugations à 900 g, 10 000 g et 100 000 g) pour une femelle reproduite (panneau A) et non reproduite (panneau B). Abréviations : B broyat, S surnageant, C culot, PS phase supérieure, PI phase inférieure..... | 104 |
| Figure 20 : SEC-UV de fractions subcellulaires de femelle non reproduite : broyat, surnageant à 900 g, phases aqueuses (en noir) et lipidiques (en bleu) à 29 700 g et 100 000 g). Colonne SEC GE Healthcare 200 Increase, 100 mmol.L ⁻¹ acétate d'ammonium pH 7,4, 0,7 ml.min ⁻¹ , UV 254 nm. | 106 |

| | |
|---|-----|
| Figure 21 : Séparation par SDS-PAGE des protéines pour les fractions subcellulaires après centrifugation à 900 g, 10 000 g, 29 700 g et 100 000 g. Exemple pour un échantillon de gonade de femelle non reproduite. Piste de gauche : protéines totales, piste de droite : signal anti-vtg. | 108 |
| Figure 22 : Quenching de fluorescence de solutions d'ampholytes porteurs Biolyte, Servalyt et Pharmalyte par l'uranium. Intensité de fluorescence en ordonnée, concentration en U divisé par le pourcentage en AP en abscisse. La concentration en U varie de 0,8 à 600 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ | 111 |
| Figure 23 : Représentation de Stern-Volmer pour la détermination de constante de complexation. | 113 |
| Figure 24 : Influence de la température sur le quenching de fluorescence de Pharmalyte par l'uranium, à 15°C (en bleu) et 35°C (en rouge) | 113 |
| Figure 25 : SEC d'un extrait protéique de poissons zèbres contaminés non reproduit en absence (à gauche) et en présence d'ampholytes porteurs (à droite) Biolyte 1,5 % en haut, pharmalyte 1,5 % en bas. | 114 |
| Figure 26 : Influence du tampon sur la qualité de séparation OGE : tension en fonction du temps de focalisation (panneau A) et pH mesuré dans les fractions (panneau B). En carrés rouges, tampon acétate d'ammonium ; en losanges bleus, tampon HEPES / sucrose. | 116 |
| Figure 27 : Focalisation OGE du tampon HEPES / Sucrose en fonction de la concentration en ampholytes porteurs (Pharmalyte à 2 % en bleu, 1 % en vert et 0,5 % en rouge) | 118 |
| Figure 28 : Gradient de pH généré après séparation d'un mélange synthétique de protéines à 0,25 mg.ml^{-1} (panneau A) et 0,5 mg.ml^{-1} (panneau B) avec 1 % (en rouge), 1,5 % (en vert) et 2% (en bleu) d'ampholytes porteurs Pharmalyte. | 120 |
| Figure 29 : Distribution de l'uranium dans les fractions OGE pour un extrait protéique de poisson zèbre contaminé de concentration 0,25 mg.ml^{-1} (panneau A) et 0,5 mg.ml^{-1} (panneau B), concentration en AP = 1,5%. La masse d'uranium, dosée par ICP MS, est représentée sous forme d'histogramme et le gradient de pH par la courbe. | 120 |
| Figure 30 : Apport d'uranium par les ampholytes porteurs (histogramme jaune) dans la distribution de l'uranium dans échantillon protéique de femelles contaminées non reproduites (histogramme bleu). Exemple de la séparation de 0,5 mg.ml^{-1} d'échantillon avec 1,5 % Pharmalyte. | 121 |
| Figure 31 : Indice de condition (panneau A) et indice gonado-somatique (panneau B) pour chaque individu dans chaque groupe. Abréviations : T témoins, C contaminées, NR non reproduites et R reproduites..... | 127 |
| Figure 32 : Concentration protéique (en μg de protéines par mg de gonades) pour chaque échantillon réparti par groupe. | 128 |
| Figure 33 : Accumulation de l'uranium ($\mu\text{g/g}$, ps) dans les organes de poissons zèbres femelles. Abréviations : T témoins, C contaminée, 5j prélevée à 5 jours, 20j prélevée à 20 jours, R reproduite, NR non reproduite. $n>5$. Statistiques réalisées par tests Kruskal-Wallis et Wilcoxon post hoc groupe à groupe pour chaque organe. Les différences sont indiquées pour $p < 0,05$ | 130 |
| Figure 34 : Exemple de chromatogrammes d'un extrait protéique de femelle témoin (panneau de gauche) et contaminée (panneau de droite) non reproduite contaminée pendant 5 jours. Chromatogrammes en U, P, Fe, Cu, Zn et UV pour les individus témoins (A à F respectivement) et contaminées (A' à F') | 132 |
| Figure 35 : Exemple de chromatogrammes d'un extrait protéique de femelle témoin (panneau de gauche) et contaminée (panneau de droite) non reproduite contaminée | |

| | |
|--|-----|
| pendant 20 jours. Chromatogrammes en U, P, Fe, Cu, Zn et UV pour les individus témoins (A à F respectivement) et contaminées (A' à F') | 133 |
| Figure 36 : Chromatogrammes d'un extrait protéique de femelle témoin (panneau de gauche) et contaminée (panneau de droite) reproduite contaminée pendant 20 jours. Chromatogrammes en U, P, Fe, Cu, Zn et UV pour les individus témoins (A à F respectivement) et contaminées (A' à F'). | 134 |
| Figure 37 : Distribution relative des complexes U-protéine dans les extraits protéiques d'ovaires. Les groupes de rectangles ①, ②, ③, et ④ correspondent fractions de masses moléculaires >600 kDa, 150-400 kDa, 10-40 kDa et <4 kDa respectivement. | 135 |
| Figure 38 : Distribution de l'uranium parmi six fractions de masses moléculaires définies à partir des chromatogrammes d'exclusion stérique d'extrait protéiques d'épithélium branchial de poissons zèbres contaminés à 20 µg.L ⁻¹ et 250 µg.L ⁻¹ pendant 3 jours (3d) et 30 jours (30d) (extrait de Bucher 2013, thèse de doctorat). | 136 |
| Figure 39 : Description des fractions et coélution. Exemple de chromatogrammes d'un extrait protéique de femelle contaminée reproduite. Chromatogrammes en U, P, Fe, Cu, Zn et UV (A à F respectivement). | 137 |
| Figure 40 : Détection UV à 225 nm (à gauche) et 280 nm (à droite) pour un échantillon « C 20j NR ». | 139 |
| Figure 41 : Cartographies (pl x MM) des métaux (U, P, Fe) et des protéines (UV 280 nm) pour des poissons zèbres contaminés reproduits (panneaux A à D) et contaminés non reproduits (panneaux E à H). | 142 |
| Figure 42 : Gel d'électrophorèse pour une femelle contaminée reproduite après analyse DIGE. Illustration des 40 spots d'intérêt (annotés en bleu) sélectionnés pour analyse par LC-ESI-FT MS. | 149 |
| Figure 43 : La vitellogénine et les 5 fragments déterminés par la couverture peptidique et l'évaluation de la masse moléculaire des spots. | 153 |
| Figure 44 : Identification de la vitellogénine et de ses fragments parmi les spots d'intérêts. Le signe « - » indique que la protéine est sous-exprimée dans les conditions contaminées par rapport aux témoins, le signe « + » que la protéine est surexprimée. En orange la comparaison pour les conditions reproduites et en rouge pour les conditions non reproduites. | 154 |
| Figure 45 : Comparaison de protéomes : extrait de gonades (présente étude, A) et extrait d'ovocytes primaires et prévitellogéniques (B), vitellogéniques (C) et matures (D) extrait de (Ziv et al. 2008). | 155 |
| Figure 46 : Incorporation et lyse de la vitellogénine au niveau de l'ovocyte. D'après (Hara et al. 2016) | 156 |
| Figure 47 : Séquence en acides aminés du fragment phosphatase de la vitellogénine 1 de poisson zèbre. | 162 |
| Figure 48 : Hypothèse de mécanismes moléculaires liés à la contamination de l'uranium. | 165 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Tailles associées aux différents stades de développement chez <i>Danio rerio</i> . (Pelegri 2003; Aytekin and Yüce 2008)..... | 38 |
| Tableau 2 : La vitellogénine, 7 gènes codant pour 7 protéines différentes (Wang et al. 2005)..... | 41 |
| Tableau 3 : Constantes d'affinité de l'uranium pour des cibles protéiques potentielles déterminé par quenching de fluorescence. Constante d'affinité ($\log K_i$) et nombre de moles d'ions uranyles par moles de protéines (L_i) pour les sites de type « i » ($i = 1$ ou 2). Références : « a » (Michon et al. 2010) et « b » (Coppin et al. 2015)..... | 43 |
| Tableau 4 : Différentes approches envisageables pour l'analyse de complexes ou de protéines par spectrométrie de masse..... | 57 |
| Tableau 5 : Liste d'ampholytes porteurs candidats établie après criblage d'une chimiothèque. (Svensson 1962)..... | 61 |
| Tableau 6 : Description générale des solutions commerciales d'ampholytes porteurs Ampholine®, Servalyt®, Pharmalyte® et Biolyte®. *Masse moléculaire et nombre d'ampholytes théoriques, déterminés d'après le schéma réactionnel de chaque solution commerciale. D'après (Sebastiano et al. 2006)..... | 62 |
| Tableau 7 : à gauche, concentration ionique de l'eau synthétique ; à droite, quantité en sels pour la solution mère (concentrée 1000 fois) | 75 |
| Tableau 8 : Effectifs de femelles reproduites et non reproduites de l'expérimentation témoin pour le développement de méthodes analytiques..... | 76 |
| Tableau 9 : Banque d'échantillons de l'expérimentation de contamination des poissons zèbres par l'uranium. | 78 |
| Tableau 10 : Paramètres ICP-SF MS Thermo Element XR..... | 81 |
| Tableau 11 : Protocole de marquage par immunofluorescence. | 84 |
| Tableau 12 : Composition des solutions utilisées pour le marquage par immunofluorescence. | 85 |
| Tableau 13 : Répartition des échantillons pour chaque gel. Les femelles témoins non reproduites (6, 7, 8, 10) sont colorées en bleu, témoins reproduites (12, 13, 14, 15) en vert, contaminées non reproduites (28, 29, 30, 31) en rouge et contaminées reproduites (32, 34, 35, 37) en orange. L'étalon interne est marqué en Cy2..... | 87 |
| Tableau 14 : Paramètres fixés pour la détermination de la séquence en acide aminés des peptides..... | 96 |
| Tableau 15 : Caractérisation du succès reproducteur et masse des gonades des femelles utilisées pour la mise au point des protocoles. Le nombre d'œufs et le taux de fertilisation a été déterminé à 3 heures post-fertilisation. R, femelle reproduite ; NR femelle non reproduite. | 102 |
| Tableau 16 : Protocoles testés pour la détermination de la fraction d'intérêt. | 103 |
| Tableau 17 : Teneur en métaux (U, Fe, Cu, Zn) dans les solutions commerciales d'ampholytes porteurs Biolyte, Servalyt et Pharmalyte. | 109 |
| Tableau 18 : Identification des protéines par LC-ESI FT MS après digestion trypsique des fractions OGE. Les protéines ont été discriminées en fonction de leur masse moléculaire théorique. | 145 |

| | |
|--|-----|
| Tableau 19 : Comparaison de l'expression des protéines groupes à groupes pour les 40 spots sélectionnés. (Symboles : ++ > 3 ; + > 2 ; - < 0,5 ; -- < 0,33)..... | 150 |
| Tableau 20 : Protéines identifiées par LC-ESI FT MS pour les spots d'intérêt de l'expérimentation DIGE..... | 151 |
| Tableau 21 : Raffinement de l'identification des vitellogenines..... | 154 |
| Tableau 22 : Comparaison des cibles identifiées dans la gonade de poisson zèbre par approches protéomique et métallomique, mise en évidence des cibles également identifiées lors des études menées sur la branchie du poisson zèbre (Bucher et al. 2016)(a) et la branchie et l'hépatopancréas de l'écrevisse (b) (Xu et al. 2014)..... | 163 |

Résumé

L'uranium (U) est naturellement présent à l'état de trace dans l'eau ($\mu\text{g.L}^{-1}$), sa concentration pouvant atteindre localement quelques mg.L^{-1} du fait des activités anthropiques. Plusieurs études écotoxicologiques sur *Danio rerio* ont mis en évidence la toxicité, e.g. le stress oxydant, la génotoxicité mais aussi la reprotoxicité (i.e. réduction du nombre de pontes et d'œufs chez les poissons contaminés) de l'U. Toutefois les mécanismes d'action toxique ne sont pas connus.

L'objectif de cette étude est de contribuer à la compréhension de la reprotoxicité de l'U par l'élucidation de mécanismes moléculaires, associés aux protéines, perturbés après contamination. Pour cela, des investigations ont été menées sur les ovaires de poissons zèbre *Danio rerio*, reproduits (R) ou non (NR), après exposition par voie directe en condition de laboratoire à des concentrations représentatives d'environnements contaminés.

Ce travail de thèse a été divisé en deux volets. Un premier volet analytique avait pour but la poursuite des développements de méthodes pour l'identification des complexes U-protéines en condition non dénaturante, autour du couplage de techniques de séparation (chromatographie d'exclusion stérique SEC, électrophorèse hors gel OGE) et de détection sensible par spectrométrie de masse élémentaire (ICP MS) et moléculaire (ESI MS). Le second volet a été dédié à l'étude de la reprotoxicité de l'U à l'échelle moléculaire, avec i) l'étude des complexes natifs U-protéines (approche métallomique), et ii) l'analyse différentielle de l'expression des protéines (approche protéomique).

Les développements analytiques ont permis de garder le tampon physiologique et non dénaturant d'extraction pour l'étape de séparation OGE, améliorant le taux de recouvrement en U. En écotoxicologie, les principaux résultats montrent que l'ovaire est un organe accumulateur de l'U et que le statut de reproduction a une influence sur le niveau d'accumulation ($R < NR$). En revanche, cet état a peu d'influence sur sa distribution protéique pour laquelle 4 fractions (dont 1 principale) ont été identifiées, toutes contenant aussi du phosphore. L'identification des cibles potentielles de l'U et des protéines exprimées différemment (vtg, GST, GAPDH, ...) a montré que les processus biologiques perturbés suite à la contamination sont de deux niveaux : 1/ générique (stress oxydant) et 2/ plus spécifique de la gonade (développement et maturation des ovocytes). En conclusion, ces deux approches complémentaires ont permis de mettre en évidence un effet direct (complexation) et indirect (expression protéique modulée) de l'U, et de proposer l'hypothèse d'un défaut de maturation des ovocytes après contamination. Ce défaut pourrait impacter la réduction du nombre de ponte et *in fine* expliquer la reprotoxicité observée lors d'études écotoxicologiques précédentes.

Mots clés : écotoxicologie, uranium, reprotoxicité, poisson zèbre *Danio rerio*, complexe uranium-protéine, métallomique, couplage spectrométrie de masse élémentaire et moléculaire, analyse non dénaturante, protéomique, vitellogénine, stress oxydant, électrophorèse hors gel, SEC-ICP SFMS, LC-ESI FTMS.

Abstract

Uranium (U) is naturally presents at trace level ($\mu\text{g.L}^{-1}$) in aquatic environment; its concentration can increase up to a few mg.L^{-1} due to human activities. Several ecotoxicological studies have shown uranium toxicity in contaminated zebrafishes *Danio rerio*, e.g. oxidative stress, genotoxicity and reprotoxicity (*i.e.* lower number of spawn and eggs laid). However, mechanisms of toxicity are not well known.

The objective of this study is to contribute to the understanding of uranium reprotoxicity by elucidating the disrupted molecular mechanisms, *i.e.* associated to proteins, after contamination. Therefore, investigations have been carried out on ovaries from reproduced (R) and non-reproduced (NR) zebrafishes after waterborne exposure in laboratory conditions at environmentally relevant concentrations.

This project was divided into two parts. Firstly, analytical investigations were carried out to continue the development of non-denaturing methods for U-protein identification by coupling separative techniques (size exclusion chromatography SEC, off gel electrophoresis OGE) with elemental (ICP MS) and molecular (ESI MS) sensitive mass spectrometry detection. Secondly, studies of U reprotoxicity were investigated by studying i) native U-protein complexes (metallomics approach) and ii) differential analysis of protein expression (proteomics approach)

Analytical developments allowed keeping the physiological and non-denaturing extraction buffer for OGE separation step, improving U recovery. In ecotoxicology, the major results showed that ovary is an U accumulating organ and that the reproduction status modifies the accumulation level (R<NR). However, this status is of little influence on its distribution on proteins with 4 fractions (including a major one) determined, all of them coeluting with phosphorus. The identification of U potential targets and of protein expression differences (vtg, GST, GAPDH...) showed that biological processes disrupted after contamination are at two levels: 1/ generic (oxidative stress) and 2/ more specific to gonad (oocyte development and maturation).

As a conclusion, these two complementary approaches showed a direct (complexation) and indirect (modification of protein expression) effects of U, and enabled to hypothesize a lack of oocyte maturation after contamination. This defect could impact the number of spawn and *in fine* explain the reprotoxicity observed in previous ecotoxicological studies.

Key words: ecotoxicology, uranium, reprotoxicity, zebrafish *Danio rerio*, uranium-protein complex, metallomics, elemental and molecular mass spectrometry coupling, non-denaturing analysis, proteomics, vitellogenin, oxidative stress, off gel electrophoresis, SEC-ICP SFMS, LC-ESI FTMS.

Introduction générale

Dans un cadre où la pollution des eaux et l'exposition aux métaux 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 (Sheppard et al. 2005; Meador et al. 2011). En particulier, des études ont montré que le devenir des métaux au sein des organismes (e.g. organes, tissus, cellules, organites, biomolécules) doit être pris en compte pour expliquer leur toxicité (Markich 2002; Geffard et al. 2010).

L'uranium est un métal naturellement présent à l'état de traces, de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$, dans les milieux aquatiques. Du fait d'influences géologiques ou d'activités humaines liées à l'exploitation de l'énergie nucléaire (extraction de mines uranifères) ou aux d'activités agricoles (épandage d'engrais phosphatés), les concentrations en uranium peuvent augmenter localement jusqu'à quelques mg.L^{-1} (Betcher et al. 1988; W.H.O 2001). Par conséquent, les organismes aquatiques, sont susceptibles d'être contaminés par l'uranium et de l'accumuler dans les organes (Cooley and Klaverkamp 2000; Lourenço et al. 2010; Le Guernic et al. 2016).

Les effets toxiques de l'uranium ont été étudiés plus en détail chez le poisson zèbre *Danio rerio* et ont été mis en évidence dans plusieurs organes comme les branchies, le foie, le cerveau, le muscle et les gonades, et à plusieurs niveaux d'organisation biologique e.g. tissulaire, cellulaire, subcellulaire (Lerebours et al. 2010; Barillet et al. 2011). Parmi les effets observés, la reprotoxicité revêt un intérêt particulier du fait des conséquences possibles sur la descendance et *in fine* sur la population. Après une contamination chronique à de faibles concentrations en uranium ($20 \mu\text{g.L}^{-1}$), pouvant être retrouvées dans des environnements aquatiques sous influence de sites miniers uranifères, une diminution du nombre de pontes, d'œufs pondus et de survie des embryons a été observée (Bourrachot et al. 2008). De plus un effet génotoxique sur les gonades et les embryons (Bourrachot 2009) ainsi que des modifications du profil de méthylation lors des premières heures de développement embryonnaire ont pu être mis en évidence (Gombeau et al. 2017). L'ovaire est l'organe destiné à la reproduction dans lequel se développent les ovocytes qui stockent le matériel génétique, protéique et nutritif nécessaire au développement de la prochaine génération d'individus.

Cependant les mécanismes de toxicité de l'uranium ne sont pas totalement connus. Des études ont montré que la toxicité de l'uranium naturel est principalement due à sa composante chimique plutôt que radioactive (Denison and Garnier-Laplace 2005). Ainsi,

l'étude de la spéciation de l'uranium dans l'eau, de son entrée dans les organismes et de son transfert dans les organes sont particulièrement importants pour comprendre la toxicité de l'uranium. En milieu aqueux aérobie, l'uranium est principalement présent sous forme d'ion uranyle UO_2^{2+} . Cet ion présente une affinité pour les molécules oxygénées et azotées. Dans un organisme vivant, cet ion est donc susceptible d'interagir avec des biomolécules telles que l'ADN ou les protéines (Van Horn and Huang 2006). Suite à la complexation de l'uranium par une protéine, la structure tridimensionnelle de cette dernière peut être modifiée (Vidaud et al. 2007), ce qui peut entraîner une perturbation de l'activité de cette protéine.

Ainsi, l'une des clés pour comprendre les mécanismes de toxicité de l'uranium est l'étude de son interaction avec les protéines afin de déterminer les protéines pouvant le complexer et donc susceptibles de voir leur fonctionnalité perturbée. Pour ce faire, le développement d'outils et de méthodes analytiques pour l'étude des métalloprotéines et des complexes métal-protéines, *i.e.* la métallomique étudiant le métallome corrélé au génome et au protéome, est nécessaire. Or, dans le cas de l'uranium, les interactions avec les protéines sont de nature électrostatique, non covalente (Van Horn and Huang 2006). Par conséquent, les outils à développer devront être i) adaptés à la préservation des complexes uranium-protéine lors des différentes étapes analytiques (préparation d'échantillon, séparation chromatographique ou électrophorétique) jusqu'à la détection du complexe, ii) sensibles afin de détecter des traces de complexes (de l'ordre du pg pour l'uranium) et iii) spécifiques pour identifier métaux et protéines. Ces contraintes limitent le nombre de protocoles de préparation et de techniques de séparation et de détection utilisables. Ces dernières ont fait l'objet d'études dans le cadre du programme ST MALO (Speciation of uranium in Aquatic Living Organisms - Analytical Developments ; ANR-10-JCJC-0713, 2010-2013) de la préparation d'échantillon, la séparation non dénaturante, la détection des complexes métalliques jusqu'à l'identification des protéines candidates à la complexation de l'uranium. Cependant, plusieurs écueils ont été relevés (compatibilité de tampon entre les méthodes, taux de recouvrement en uranium) et nécessitent des développements analytiques complémentaires.

Une deuxième clé pour comprendre la toxicité de l'uranium est d'étudier son impact au niveau des protéines exprimées suite à la contamination. L'approche protéomique permet de mettre en évidence les modifications de l'expression des protéines pour un individu contaminé par rapport à un individu témoin et ainsi établir un profil de modification suite à une contamination (De Souza et al. 2009). Ce travail de thèse, inscrit dans un contexte

d'évaluation des risques écologiques après exposition chronique à l'uranium et faisant suite à une thèse dédiée aux effets (Bourrachot 2009), est consacré à l'étude des effets reprotoxiques au niveau moléculaire chez la femelle. Pour ce faire, ce projet a été divisé en deux volets. Un premier volet a pour objectif de poursuivre les développements analytiques initiés dans le projet ST MALO afin d'adapter les méthodes à l'organe étudié et résoudre certaines limitations des techniques séparatives non dénaturantes. Dans un second volet, les méthodes optimisées sont appliquées à des échantillons de gonades femelles de poissons zèbres contaminés chroniquement par l'uranium afin de déterminer des cibles protéiques perturbées. Pour ce faire, deux approches ont été utilisées : i) l'approche métallomique vise à étudier l'interaction de l'uranium avec les protéines et déterminer des cibles potentielles à la complexation et ii) l'approche protéomique pour déterminer les protéines exprimées différemment suite à la contamination. Des processus biologiques potentiellement perturbés ont été proposés *in fine* sur la base de la comparaison de ces deux approches.

Le manuscrit est articulé en cinq chapitres. L'étude bibliographique (partie 1a) est consacrée d'une part à l'état de l'art sur les études écotoxicologiques de l'uranium chez le poisson zèbre en général et au niveau de la gonade femelle en particulier. D'autre part, l'état de l'art sur l'impact au sens large de l'uranium sur les protéines a été étudié, à savoir la spéciation de l'uranium *in vitro* et *in vivo* ainsi que la modulation de l'expression protéique suite à une contamination par l'uranium. L'étude bibliographique (partie 2) présente l'état de l'art sur les techniques analytiques dédiées à l'étude des complexes uranium-protéine. L'approche métallomique est présentée, avec un point particulier sur les études en conditions non dénaturantes pour l'analyse des complexes métalliques non covalents. Des précisions sont apportées sur la séparation par électrophorèse hors gel et l'identification de complexes métal-protéine par spectrométrie de masse moléculaire. A l'issue de l'étude bibliographique, les orientations du projet seront décrites. Le troisième chapitre détaille le matériel et les méthodes employés pour cette étude, en particulier l'exposition des poissons zèbres à l'uranium, la préparation des échantillons biologiques et les méthodes utilisées pour les approches métallomiques et protéomiques. Le chapitre résultats et discussions (partie 1) présente les développements analytiques menés afin d'adapter le protocole de (i) préparation d'échantillon à l'échantillon étudié et de (ii) séparation des complexes uranium-protéine par focalisation isoélectrique hors gel. Le chapitre résultats et discussions (partie 2) est dédiée à la présentation et la discussion des résultats obtenus via les approches métallomique, menée pour étudier les complexes uranium-protéine et déterminer des protéines candidates à la complexation, et protéomique menée pour identifier les protéines dont l'expression est modifiée suite à la

contamination. Une conclusion intermédiaire visant à comparer les protéines identifiées par les deux approches et présenter les mécanismes biologiques perturbés est proposée. Enfin, une conclusion générale résume les principaux résultats de cette étude et des perspectives pour ces travaux seront proposées en dernière partie.

Chapitre I

Etude bibliographique (partie 1)

1. Des effets individuels aux effets moléculaires : éléments de compréhension pour la toxicité de l'uranium

1.1. Généralités sur l'uranium

1.1.1. L'uranium dans l'environnement

L'uranium (U) est un radionucléide naturellement présent dans l'environnement. Sa concentration dans la croûte terrestre est de 3 mg.kg^{-1} en moyenne (Bleise et al. 2003). La teneur en uranium dans l'eau peut varier de quelques $\mu\text{g.L}^{-1}$ jusqu'à 2 mg.L^{-1} selon l'influence géologique (Betcher et al. 1988; W.H.O 2001). Cette concentration peut augmenter du fait d'activités humaines liées au cycle du combustible nucléaire avec notamment l'exploitation de mines uranifères mettant à jour des roches riches en uranium. En France, environ 200 mines uranifères ont été exploitées de 1945 à 2001 (Figure 1).



Figure 1 : Localisation des mines d'uranium en France. Extrait de la base de données MIMAUSA (IRSN, mise à jour 27/02/2017)

L'uranium, est également utilisé pour ses propriétés physiques, en particulier sa forte densité, pour des activités militaires (blindages, perforateurs) ou civiles (contrepois dans l'aviation) (Bleise et al. 2003). Enfin l'uranium peut être involontairement introduit dans des exploitations agricoles du fait de l'utilisation d'engrais phosphatés. Par l'affinité de l'uranium pour les phosphates (Averseng et al. 2010), ces engrais contiennent des concentrations élevées en uranium qui sont redistribuées lors de l'épandage (W.H.O 2001). Ainsi, les organismes vivant dans ces milieux aquatiques contaminés, sont susceptibles d'être exposés chroniquement à l'uranium.

Suite à son internalisation, l'uranium se répartit dans les tissus des organismes aquatiques contaminés, pouvant conduire à une perturbation du fonctionnement des tissus ciblés. La toxicité de l'uranium a été étudiée en condition contrôlée de laboratoire ou dans l'environnement pour des mollusques (bivalve *Corbicula fluminea* (Simon et al. 2011)), des crustacés (écrevisse *Procambarus clarkii* (Al Kaddissi et al. 2011)) et de nombreuses espèces de poissons (poisson rouge *Carassius auratus* (Lourenço et al. 2010), épinouche *Gasterosteus aculeatus* (Le Guernic et al. 2016), corégone *Coregonus clupeaformis* (Cooley and Klaverkamp 2000) et poisson zèbre *Danio rerio* (Bourrachot et al. 2008; Lerebours et al. 2010; Bucher et al. 2014; Simon et al. 2014; Gombeau et al. 2016)).

1.1.2. Toxicité et reprotoxicité de l'uranium chez *Danio rerio*

Dans le cadre de l'évaluation des risques écologiques liés à l'uranium, les travaux scientifiques visent à raffiner la relation entre dose d'exposition, biodistribution et effets. En particulier, il est nécessaire de déterminer la fraction toxique du radionucléide au sein de l'organisme (organe, tissu, fraction subcellulaire) afin d'appréhender la toxicité du métal (Markich 2002; Geffard et al. 2010).

De 2001 à 2013, des études écotoxicologiques ont été conduites sur le poisson zèbre pour évaluer les effets d'une contamination chronique d'un environnement aquatique par l'uranium. La toxicité de l'uranium a été investiguée dans différents organes : les branchies (Lerebours et al. 2009; Barillet et al. 2010; Bucher et al. 2014), le foie (Barillet et al. 2011; Gagnaire et al. 2014), le rein (Gagnaire et al. 2014), le cerveau (Barillet et al. 2007; Lerebours et al. 2010; Gombeau et al. 2016), les gonades (Simon et al. 2014; Gombeau et al. 2016) et le muscle (Lerebours et al. 2010). Un aperçu des principaux effets observés après contamination est dressé ci-après.

Les effets de l'uranium ont été évalués à différents niveaux, de l'individu à la fraction subcellulaire. A l'échelle de l'individu, l'accumulation de l'uranium par voie directe *via* l'eau (Barillet et al. 2010; Gombeau et al. 2016) et voie trophique *via* l'alimentation (Simon et al. 2011) a pu être mise en évidence dans les organes du poisson zèbre. Au niveau de l'organe, des observations par microscopie optique et électronique de défauts de structures tissulaires et cellulaires ont été réalisées au niveau des branchies et des gonades notamment (Barillet et al. 2010; Bourrachot et al. 2014).

A l'échelle subcellulaire, des études ont mis en évidence la génotoxicité de l'uranium à forte concentration sur les cellules sanguines (Barillet et al. 2011), embryonnaires et les gonades femelles (Bourrachot 2009). Une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène a été montrée sur les leucocytes *in vitro* (Gagnaire et al. 2014) ainsi que chez le poisson zèbre adulte et la larve *in vivo* (Gagnaire et al. 2013). Lors d'études épigénétiques, des modifications du profil de méthylation de l'ADN ont été mises en évidence dans le cerveau, les yeux et les gonades des poissons zèbres (Gombeau et al. 2016). La méthylation est un processus cellulaire permettant de réguler la transcription des gènes, un taux de méthylation élevé sur un gène peut conduire à sa répression (Jaenisch and Bird 2003). Une augmentation de la méthylation de l'ADN a été observée dans les premières heures du développement d'embryon descendants de poissons zèbres contaminés (Gombeau et al. 2017). Les effets de l'uranium ont également été observés au niveau de la transcription des ARN avec une répression de 56 gènes au niveau du cerveau (Lerebours et al. 2010). Cet effet de répression des gènes a également été observé pour 30 gènes dans des embryons issus de poissons zèbres contaminés (Gombeau et al. 2017).

Enfin, au niveau des protéines, l'uranium peut également induire un stress oxydant modifiant la balance redox de la cellule et le niveau associé d'enzymes impliquées dans sa régulation. En effet, pour différents organes (foie, cerveau, muscle), la mesure de l'activité d'enzymes impliquées dans les réponses anti-oxydantes de la cellule a montré que ces dernières étaient perturbées lors d'une contamination à l'uranium : catalase (CAT) (Barillet et al. 2011), superoxyde dismutase (SOD) (Barillet et al. 2007; Barillet et al. 2011), glutathion-S-transférase (GST) (Barillet et al. 2007), glutathion peroxydase (GPx) (Barillet et al. 2011), acétylcholine estérase (AChE) (Lerebours et al. 2010). Cependant, seule une partie des enzymes impliquées dans la régulation du stress oxydant est affectée et les mécanismes associés ne sont pas élucidés.

La gonade est un organe d'intérêt particulier pour comprendre la toxicité de l'uranium. En effet, les gonades femelles font partie des organes accumulant l'uranium (Simon et al. 2011) et sont susceptibles de le transmettre à la génération suivante après l'événement de

reproduction (Bourrachot 2009). Or, les premiers stades du développement de l'embryon sont sensibles aux contaminations en général (Thompson and Bannigan 2008) et à l'uranium en particulier (Simon et al. 2014). Ainsi, des études sur les embryons de poissons zèbres en eau contaminée par l'uranium ont montré des perturbations du développement des organes dans les premiers jours (Bourrachot et al. 2008) dès de faibles concentrations ($20\mu\text{g.L}^{-1}$). La reprotoxicité de l'U, incluant son devenir dans la gonade ou dans les œufs et son impact sur la descendance, est donc un élément majeur pour avoir un aperçu de l'effet que pourrait avoir l'uranium *in fine* sur une population. L'état de l'art sur les connaissances dans ce domaine, mais aussi la biologie de la gonade pour une meilleure compréhension des mécanismes, sont présentés ci-après.

1.2. Cas de la gonade

1.2.1. Intérêt du modèle animal *Danio rerio* pour l'étude de la toxicité de l'uranium

Le poisson zèbre est recommandé par l'organisation internationale de normalisation comme modèle pour l'évaluation de contaminants dans les environnements aquatiques (norme ISO 7346-1996) tels que les éléments traces métalliques, les perturbateurs endocriniens ou les polluants organiques (Hill et al. 2005; Dai et al. 2014). Introduit dans les années 60 et popularisé dans le domaine de la génétique et de la biologie du développement à partir de 1981 (Streisinger et al. 1981; Grunwald and Eisen 2002), le poisson zèbre est l'un des modèles animaux les plus utilisés en laboratoire de nos jours (Reed and Jennings 2010). Robuste, de petite taille, avec un développement rapide et la production d'un grand nombre d'œufs, il permet de mener des expériences en condition de laboratoire sur un grand nombre d'individus. Le développement externe des œufs et l'enveloppe transparente de l'embryon permettent le suivi de l'apparition de malformations lors d'une contamination. Le premier séquençage du génome du poisson zèbre a été réalisé en 2001 par l'Institut Sanger en partenariat avec l'EBI (European Bioinformatics Institut) et le NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Howe et al. 2013); il a facilité l'identification de protéines et permis la compréhension de mécanismes physiologiques.

1.2.2. Reprotoxicité de l'uranium

Peu d'études ont été consacrées aux effets reprotoxiques de l'uranium après contamination chronique. Toutefois, quel que soit le mode de contamination, trophique via des paillettes contaminées (Simon et al. 2011), et directe via la contamination du milieu (Bourrachot et al. 2014; Simon et al. 2014), des effets reprotoxiques ont pu être mis en évidence sur le poisson zèbre. Après contamination chronique à l'uranium par voie directe (à $250 \mu\text{g.L}^{-1}$), le suivi de la reproduction a montré que le succès reproducteur des individus contaminés était plus faible lors de la première ponte avec un nombre d'évènements reproducteurs et d'œufs pondus moins importants pour les individus contaminés par rapport aux témoins (Bourrachot et al. 2014) mais qu'il tend à s'améliorer pour les pontes suivantes (Simon et al. 2014). Les observations par microscopie électronique ont également permis de montrer une perte d'intégrité de la membrane plasmique de l'ovocyte à forte contamination, en particulier des défauts au niveau de la *zona radiata*, qui assure les échanges protéiques et hormonaux entre l'ovocyte et les cellules folliculaires (Bourrachot et al. 2014). Ainsi, chez des poissons zèbres femelles contaminés via l'alimentation (à 50 et $500 \mu\text{g.g}^{-1}$ de paillettes alimentaires), les études de bioaccumulation ont montré que les ovaires contenaient 20 % de charge corporelle totale en uranium (Simon et al. 2011). Dans cette même étude, le suivi de la reproduction a mis également en évidence l'effet reprotoxique de l'uranium avec un taux de survie plus faible pour les larves issues d'individus contaminés par rapport à celle issues des individus témoins.

Cependant, les mécanismes moléculaires qui permettraient d'expliquer la reprotoxicité de l'uranium restent mal connus. Sur la base d'études consacrées à des métaux tels que le cadmium ou le zinc, il est possible d'envisager plusieurs processus de toxicité (McGeer et al. 2000). Des effets reprotoxiques (augmentation du nombre d'ovocytes atrétiques, baisse du nombre de pontes) ont en effet été observés après contamination au cadmium de certains organismes aquatiques comme la grenouille *Xenopus laevis* (Lienesch et al. 2000) ou le poisson *Danio rerio* (Wu et al. 2013) ; ces effets pourraient notamment être dus à une perturbation de la maturation des ovocytes. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ce défaut de maturation. L'altération des protéines d'adhésion pourrait perturber l'intégrité de la structure cellulaire de l'ovocyte et le transfert d'hormones entre l'ovocyte et les cellules folliculaires. La présence d'un stress oxydant provoqué par le cadmium a également été démontrée par l'augmentation du taux de protéines oxydées

ainsi que par une réduction de l'activité de la SOD. De plus, le Cd^{2+} , cation divalent, pourrait se substituer à certains cations essentiels, (Ca^{2+} , Zn^{2+}). Des auteurs ont également indiqué qu'un déséquilibre de l'homéostasie des métaux peut aboutir à la production de radicaux libres et à la génération de stress oxydant (Thompson and Bannigan 2008). Au niveau de la gonade, la gestion de ce stress métallique, en utilisant une partie des ressources de la cellule avec la production de protéines et d'enzymes détoxifiantes, pourrait résulter en une maturation plus faible des ovocytes (Jeziarska et al. 2009). De plus, certains métaux sont considérés comme des perturbateurs endocriniens (Iavicoli et al. 2009). Cette perturbation endocrinienne a été supposée chez des poissons zèbres, élevés dans un site sous influence minière et contaminés à l'arsenic. Les individus contaminés présentaient une expression de la vitellogénine plus faible par rapport aux individus témoins ainsi qu'une expression plus forte de la métallothionéine, protéine détoxifiante impliquée dans la séquestration de contaminants métalliques (Boyle et al. 2008).

Pour tenter de comprendre les effets de l'uranium au niveau de la gonade, une présentation du fonctionnement de l'organe et du développement des ovocytes est proposée.

1.2.3. Biologie de la gonade et problématique associée

Chez les poissons, il existe trois types de maturation correspondant à trois modes de reproduction et correspondant à des stratégies différentes d'adaptation pour la survie de l'espèce (Tyler and Sumpter 1996; Lubzens et al. 2010). Le premier type de maturation est la maturation synchronisée : l'ensemble des ovocytes sont recrutés à un instant donné à partir des cellules souches gonadiques, les ovogonies. Ces ovocytes vont se développer en même temps. Ainsi, deux populations d'ovocytes sont généralement présentes dans la gonade au cours du cycle de reproduction. Cette stratégie est utilisée par les poissons ayant une saison de reproduction, par exemple la truite *Oncorhynchus mykiss*, le saumon *Salmo salar* ou le gardon *Rutilus rutilus*. Le deuxième type de maturation est la maturation asynchronisée. A un instant donné lors de la saison de reproduction, l'ensemble des stades de croissance des cellules de la lignée germinale sont représentés. Cette stratégie permet une fréquence de ponte élevée, avec un intervalle de quelques jours seulement entre chaque ponte. Le poisson zèbre *Danio rerio* fait partie des reproducteurs asynchronisés. Le troisième type est la maturation par groupes synchronisés. Trois populations d'ovocytes

coexistent ; une première comprenant les ovogonies, une deuxième regroupant les ovocytes au même stade de développement, une troisième population d'ovocytes prêts pour la ponte. Ce mode de maturation est utilisé par les poissons qui pondent à plusieurs reprises lors de la période de reproduction, comme le syngnathe *Syngnathus acus*.

Au niveau cellulaire, les mécanismes principaux de développement et de maturation des ovocytes sont globalement bien conservés entre les différentes espèces de poissons. La gamétogénèse peut être décrite en 4 étapes, de la cellule souche « ovogonie » à la cellule différenciée et fécondable « ovocyte mature » (Tyler and Sumpter 1996; Patino and Sullivan 2002; Arukwe and Goksøyr 2003) :

- (1) Transformation des cellules germinales primaires en ovogonies,
- (2) Transformation des ovogonies en ovocyte,
- (3) Croissance de l'ovocyte,
- (4) Maturation de l'ovocyte

Lors de la première étape, l'ovogonie est recrutée parmi les cellules souches et entame sa différenciation. La croissance primaire se caractérise par une série d'évènements biologiques qui généreront les structures du follicule puis de l'œuf ainsi que par une intense activité transcriptionnelle : ARN ribosomiaux et ARNm pour les récepteurs à la vitellogénine. L'ovocyte réalise une première phase de croissance due principalement à la formation du corps de Bialbiani. Ce corps est un complexe regroupant de nombreux organelles (mitochondries, réticulum endoplasmique, éléments de Golgi, ...) qui va soutenir l'activité élevée de synthèse protéique. Il sert également dans l'adressage des protéines et plus tard dans la détermination des axes embryonnaires, en particulier l'axe animal-végétal (Marlow and Mullins 2008). Lors de cette phase, l'ovocyte s'entoure d'une enveloppe vitelline, acellulaire, également appelée *zona pellucida* ou *zona radiata*, et qui formera à terme la couche externe de l'œuf, alors appelé chorion. Les protéines sont synthétisées en partie par l'ovocyte et par le foie. Cette enveloppe joue un rôle significatif dans les processus de reproduction et de développement. Elle présente en effet des récepteurs pour les spermatozoïdes, contribue à la prévention de la polyfécondation et servira ensuite de barrière physique isolant l'embryon de l'environnement tout en permettant les échanges gazeux (Arukwe et al. 1997; Arukwe and Goksøyr 2003). À mesure que l'ovocyte croît, l'enveloppe s'amincit et s'invagine pour former un réseau de microvillosités qui assurera par la suite l'activité de pinocytose. Enfin, l'ovocyte commence à s'entourer de plusieurs couches cellulaires sécrétrices d'hormones, la granulosa et la thèque. L'ensemble est appelé follicule (**Figure 2**).

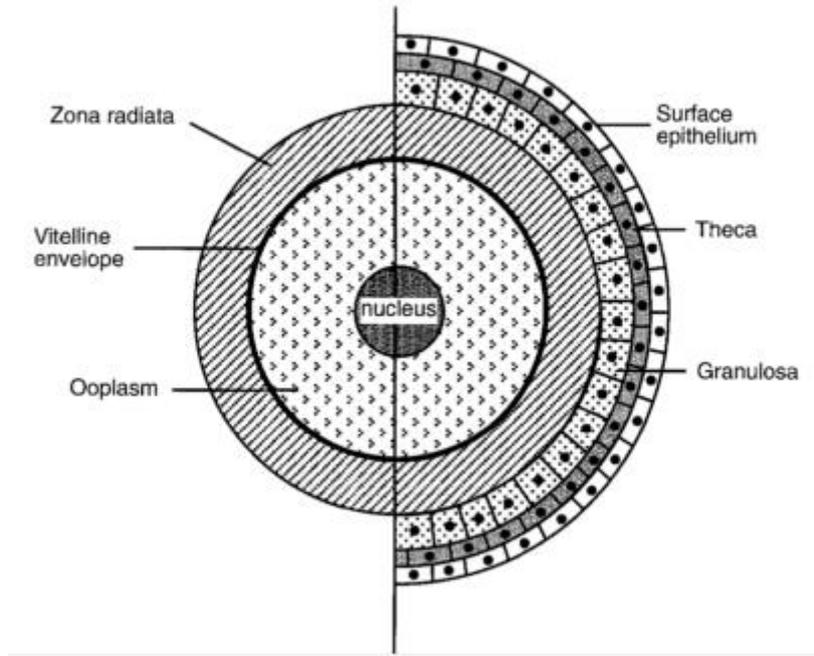


Figure 2 : Schémas d'un follicule (Tyler and Sumpter 1996)

La deuxième étape est la croissance prévitellogénique, également appelée étape des alvéoles corticales. L'ovocyte se charge en inclusions transparentes visibles en microscopie optique (Figure 3). Les alvéoles corticales sont synthétisées par l'ovocyte et sont constituées de polysyaloplycoprotéines. À la fin de cette étape, les alvéoles couvrent la majeure partie de l'ovoplasme. Lors de la fécondation, leur contenu sera libéré dans l'espace périvitellin, contribuant à l'isolement de l'œuf de son environnement.

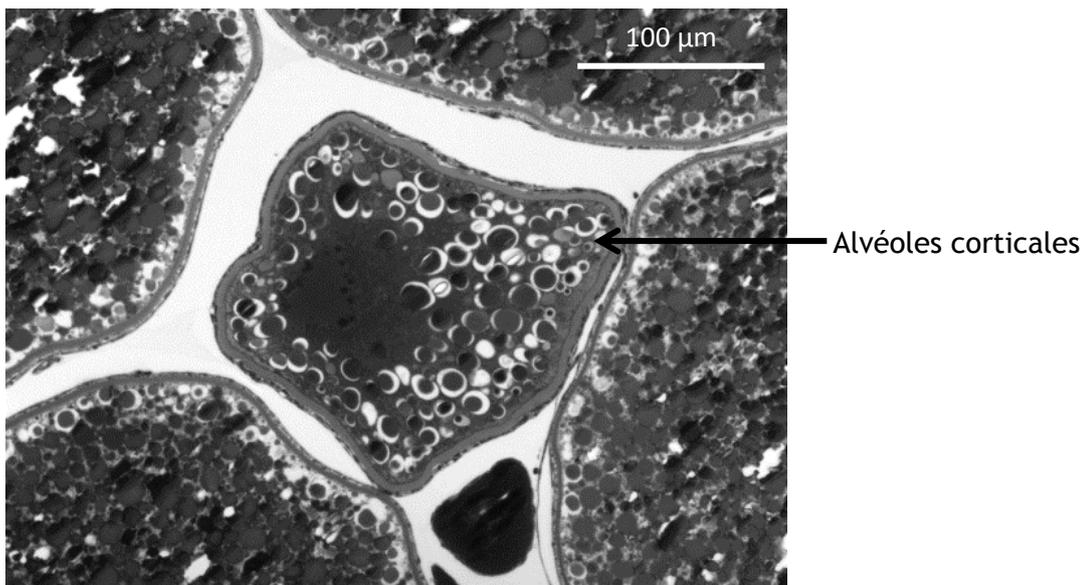


Figure 3 : Ovocyte de poisson zèbre en phase prévitellogénique, observation par microscopie optique (x40)

La troisième étape est la croissance vitellogénique, évènement principalement responsable de la croissance en taille de l'ovocyte (**Tableau 1**). Lors de cette étape, la vitellogénine, une phospholipoprotéine synthétisée dans le foie et transportée dans le sang, est absorbée par l'ovocyte via les récepteurs spécifiques situés sur l'enveloppe vitelline. La vitellogénine est stockée dans les vésicules vitellines où elle subit une étape protéolytique dans les lysosomes golgiens (Carnevali et al. 1999). A mesure de l'absorption de la vitellogénine, les vésicules repoussent les alvéoles corticales à la périphérie de l'ovocyte. Selon les espèces, les vésicules vitellines pourront occuper jusqu'à 95% du volume final de l'œuf (Tyler and Sumpter 1996) (**Figure 4**). Le contenu vitellin servira de réserve nutritive et protéique pour les premiers jours du développement embryonnaire. Selon les espèces, les vésicules fusionneront par la suite et constitueront ainsi le sac vitellin.

Tableau 1 : Tailles associées aux différents stades de développement chez *Danio rerio*. (Pelegri 2003; Aytekin and Yüce 2008)

| Stade de maturation | Diamètre |
|--|-----------------------|
| Ovogonie (=stade préfolliculaire) | 7-20 μm |
| Ovocyte primaire (=stade folliculaire) | 80-160 μm |
| Ovocyte prévitellogénique (=stade alvéoles corticales) | 160-280 μm |
| Ovocyte vitellogénique | 280-740 μm |
| Ovocyte mature | 740-760 μm |

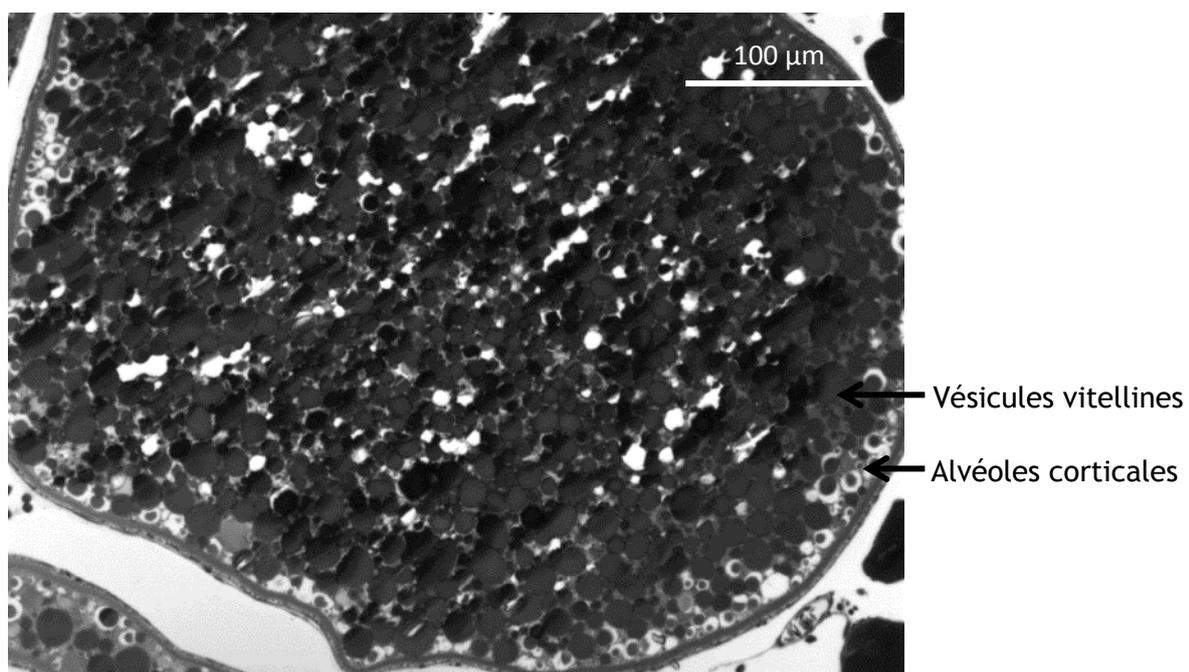


Figure 4 : Ovocyte secondaire vitellogénique de poisson zèbre. Observation par microscopie optique (x40)

L'acquisition du matériel protéique et ribonucléique maternel va assurer les fonctions élémentaires (métabolisme cellulaire, division nucléaire et cytoplasmique, adhésion intercellulaire) de l'embryon lors des stades précoces de son développement (Pelegri 2003).

Lors de la quatrième phase, de maturation, qui dure 3 à 4 heures, d'importants remaniements se produisent. Les vésicules vitellines fusionnent pour former le vitellus. Le noyau, migre pour constituer le pôle animal de l'œuf. Un espace périvitellin se crée, il s'agit d'un milieu hyperosmotique généré par un gradient d'ions et d'acides aminés libres. Enfin, l'ovocyte mature est également dépourvu de cellules folliculaires.

Chez le poisson zèbre, le développement des ovocytes est de type asynchrone : l'ensemble des stades d'ovocytes coexistent (**Figure 5**). Ainsi la complexité tissulaire due à la pluralité ovocytaire laisse pressentir une complexité particulière de la distribution des métaux après contamination. En particulier, la proportion des différents stades de maturation des ovocytes est modifiée après reproduction, puisque seuls les ovocytes matures sont expulsés lors de la fraie.

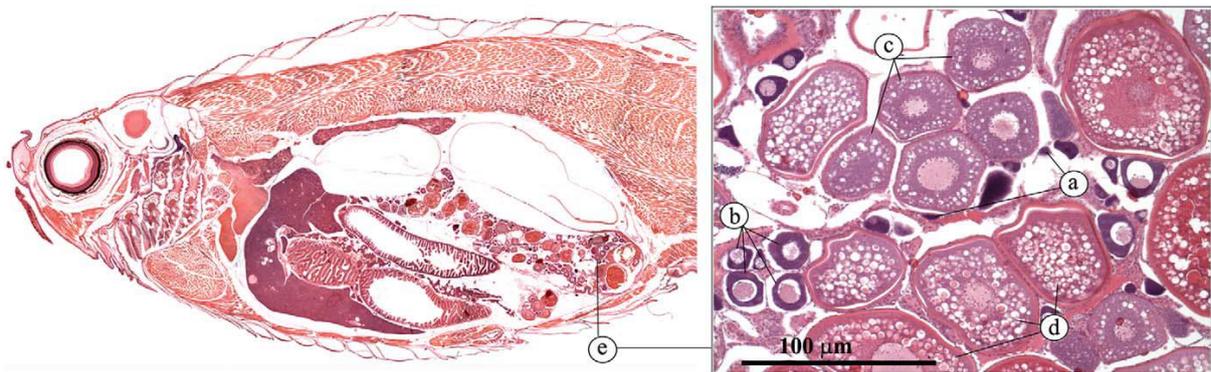


Figure 5 : Coupe histologique de poisson zèbre femelle, observation en microscopie optique. (a) ovogonies, (b) ovocytes primaires, (c) ovocytes prévitellogéniques, (d) ovocytes vitellogéniques (Menke et al. 2011).

1.2.4. Description de la vitellogénine : une protéine clé pour le développement

L'évènement visuellement marquant est la croissance en taille de l'ovocyte due à l'apport via le sang de vitellogénine. Majoritaire parmi les protéines de l'ovocyte, elle a été proposée dans une précédente thèse comme une cible potentielle de la complexation de l'uranium (Bourrachot 2009).

La vitellogénine est une glycolipophosphoprotéine synthétisée en grande quantité dans le foie du poisson zèbre femelle (Levi et al. 2009). Elle est ensuite libérée dans le sang circulant où sa concentration est d'environ 400 ng.ml⁻¹ (Bourrachot et al. 2014). La vitellogénine est spécifiquement absorbée par l'intermédiaire de la granulosa. Au niveau de la *zona radiata*, la vitellogénine se lie à des récepteurs spécifiques et est internalisée par endocytose. Elle est stockée dans des vésicules vitellines où elle subira des clivages enzymatiques (Hara et al. 2016). *In fine*, la vitellogénine constituera notamment les réserves énergétiques et métaboliques pour la croissance de l'embryon. (Finn et al. 2002; Lubzens et al. 2010)

La vitellogénine est une protéine relativement bien conservée d'une espèce à une autre au sein des ovipares. Chez le poisson zèbre, elle est composée en moyenne de 1360 acides aminés pour un poids moléculaire de 150kDa et est divisée en 3 régions principales : une chaîne lourde de lipovitelline (LvH), une courte séquence d'une centaine d'acides aminés appelée phosvitine (Pv) caractérisée par des polysérines souvent phosphorylées, et une chaîne légère de lipovitelline (LvL).

Dans le plasma sanguin, la protéine est présente sous forme de dimère avec un centre de symétrie en C2, elle forme une cage transportant des lipides avec une masse globale de 400 à 600kDa. Les lipides représentent environ 16% de la masse totale, ils sont concentrés au sein de la cage principale, sans liaisons covalentes à la protéine. Les deux tiers de ces lipides sont des phospholipides, le dernier tiers comprenant des triglycérides, du cholestérol et des esters de cholestérol. La protéine est composée de trois feuillets plissés bêta A, C et N et d'une super-hélice alpha droite (Figure 6) (Thompson and Banaszak 2002).

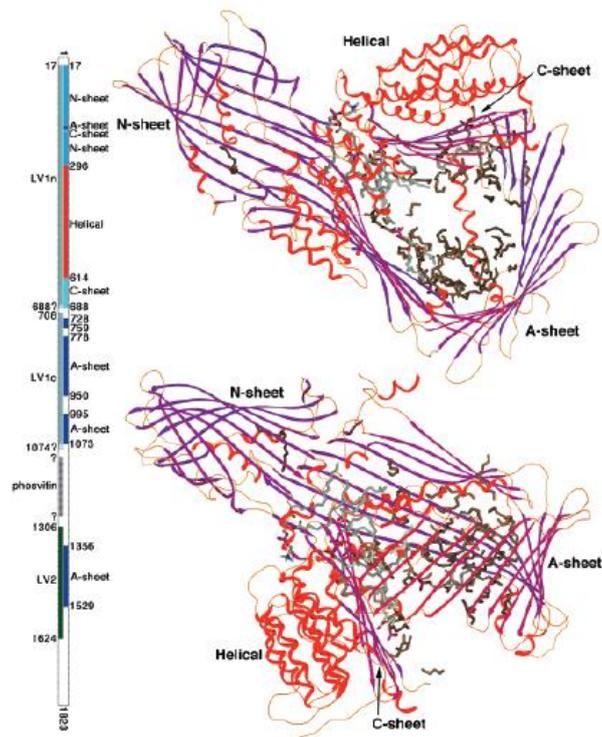


Figure 6 : Cristallographie de la vitellogénine de lamproie (Thompson and Banaszak 2002)

Au niveau de l'ADN de *Danio rerio*, sept gènes codent pour la vitellogénine (Tableau 2), 6 d'entre eux sont situés en série sur le chromosome 22 entre les loci 25,2Mb et 25,53Mb, le septième est situé sur le chromosome 11 et est considéré comme un vestige de l'évolution par certains auteurs (Finn and Kristoffersen 2007). Ces 7 isoformes de la vitellogénine sont regroupées en trois types, en fonction de leur homologie de séquence. Le type I regroupe les vitellogénines 1, 4, 5, 6, et 7 ; les types II et III sont représentés par les vitellogénines 2 et 3 respectivement. Dans l'ovocyte, les vitellogénines de type I sont principalement retrouvées (Tay et al. 2006; Groh et al. 2011).

Tableau 2 : La vitellogénine, 7 gènes codant pour 7 protéines différentes (Wang et al. 2005)

| Nom | Type | Nb AA | Chrom. | Remarques |
|------|------|-------|--------|--|
| Vtg1 | I | 1362 | 22 | |
| Vtg2 | II | 1631 | 11 | Génétiquement éloignée des autres vtg |
| Vtg3 | III | 1251 | 22 | « Vtg phosvitinless » ne possède pas la région phosvitine (Wang et al. 2000) |
| Vtg4 | I | 1363 | 22 | |
| Vtg5 | I | 1363 | 22 | |
| Vtg6 | I | 1368 | 22 | |
| Vtg7 | I | 1358 | 22 | |

Le contenu protéique des ovocytes à des stades de maturation différents et donc de composition protéique différente, pourrait jouer un rôle clé sur le transport et le devenir du métal au sein de la gonade, d'autant qu'il a précédemment été montré que l'uranium était susceptible d'être complexé par les groupements fonctionnels des protéines (Michon et al. 2010; Coppin et al. 2015) ou qu'il pouvait induire une modulation de l'expression des protéines après contamination (Dedieu et al. 2009; Basset et al. 2013; Petitot et al. 2016). C'est de l'impact de l'U sur les protéines dont traitera le chapitre suivant.

1.3.L'étude des protéines, une clé pour élucider la toxicité

1.3.1. Etat de l'art uranium/spéciation et uranium/métallomique

L'uranium est un acide dur de Lewis, qui interagit avec les bases dures de Lewis (contenant notamment des atomes d'azote ou d'oxygène), et un métal de classe A (récepteur d'oxygène). Dans un organisme, l'uranium est susceptible de se complexer à des molécules telles que les acides nucléiques ou les protéines (Van Horn and Huang 2006). Plusieurs approches sont possibles pour étudier les interactions de l'uranium avec des ligands biologiques. Bresson *et al* distinguent 4 types d'approches possibles, *in silico*, *in analytico*, *in vitro* et *in vivo*, qui font appel à des techniques de modélisation, de chimie analytique, de biochimie ou de toxicologie, respectivement (Bresson et al. 2011). L'approche *in silico* vise à déterminer le type d'interaction liant l'uranium à son ligand et à caractériser cette liaison (constante d'affinité, nombre de mole d'uranium par protéines, etc). L'approche *in analytico* regroupe les techniques analytiques spécialement créées pour étudier la spéciation d'un métal, identifier ces ligands potentiels et modéliser les interactions chimiques du métal avec de potentiels ligands. L'approche *in vitro* vise à décrire le devenir de l'uranium sur des cultures cellulaires ou des systèmes subcellulaires simples. L'approche *in vivo* étudie la distribution de l'uranium dans tout ou partie d'un organisme.

Le screening d'un mélange protéique permet de déterminer des cibles potentielles de l'uranium selon une approche *in analytico*. La chromatographie d'affinité métallique (IMAC) a été utilisée afin de séparer des protéines de sérum humain en fonction de leur affinité pour l'uranium (Basset et al. 2008). Appliquée à un extrait de cellules rénales, 64 protéines ont ainsi été identifiées (Dedieu et al. 2009). Parmi ces protéines, 44 présentent au moins une phosphorylation et 17 contiennent un cofacteur métallique Ca^{2+} , Zn^{2+} ou Mg^{2+} ,

suggérant une affinité préférentielle de l'U pour les protéines présentant ces deux caractéristiques chimiques.

Par ailleurs, l'affinité de l'uranium pour une sélection de protéines a été mise en évidence *in vitro* par des études infrarouge (Li et al. 2010; Basset et al. 2013; Safi et al. 2013), structurales (Van Horn and Huang 2006) et de quenching de fluorescence (Michon et al. 2010; Coppin et al. 2015). Par exemple, l'interaction de l'uranium avec la transferrine, une protéine de transport du fer, a été étudiée par spectrométrie infrarouge (Vidaud et al. 2007). Les auteurs ont montré que la forme apo de la protéine (*i.e.* dépourvue de métal) présente en effet deux sites de fixation pour l'uranium. Cette protéine, présente dans le sang et interagissant avec les autres tissus pour la régulation du fer, a ainsi été proposée comme une possible voie d'entrée de l'uranium dans les cellules. D'autres études ont montré que la transferrine, sous sa forme apo peut lier jusqu'à 28 moles d'ion uranyle par protéine (Michon et al. 2010).

Ces mêmes études ont également permis de caractériser la complexation d'autres protéines d'intérêt (Tableau 3) (Michon et al. 2010; Coppin et al. 2015) et notamment l'albumine et la vitellogénine qui sont intéressantes en tant que protéines abondantes dans le sang des mammifères et des poissons. Ainsi, après internalisation de l'uranium, ces protéines sont des cibles potentielles à la complexation pouvant être directement affectées ou servir de transporteur dans le sang jusqu'aux organes. Les études *in vitro* montrent que de nombreuses protéines ont une affinité pour l'uranium et peuvent lier jusqu'à plusieurs centaines de moles d'uranium par molécules (apoferritine, vitellogénine, acétylcholine estérase).

Tableau 3 : Constantes d'affinité de l'uranium pour des cibles protéiques potentielles déterminé par quenching de fluorescence. Constante d'affinité ($\log K_i$) et nombre de moles d'ions uranyles par moles de protéines (L_i) pour les sites de type « i » ($i = 1$ ou 2). Références : « a » (Michon et al. 2010) et « b » (Coppin et al. 2015)

| Protéine | $\log K1$ | $L1$ | $\log K2$ | $L2$ | ref. |
|------------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|------|
| Apotransferrine | $7,7 \pm 0,6$ | $1,9 \pm 0,1$ | $4,6 \pm 0,4$ | $26,6 \pm 1,8$ | a |
| Albumine | $6,1 \pm 0,4$ | $2,3 \pm 0,4$ | $4,8 \pm 0,3$ | $7,6 \pm 1,2$ | a |
| Métallothionéine | $6,5 \pm 0,1$ | $0,1 \pm 0,1$ | $5,6 \pm 0,2$ | $5,2 \pm 0,2$ | a |
| Apoferritine | $5,3 \pm 0,6$ | $46,8 \pm 5,5$ | $3,9 \pm 0,4$ | $504 \pm 21,4$ | a |
| Vitellogénine | $5,7 \pm 1,0$ | 83 ± 2 | $4,9 \pm 1,1$ | 2220 ± 150 | b |
| Acétylcholine estérase | $8,1 \pm 0,9$ | 115 ± 16 | $6,6 \pm 0,5$ | 530 ± 23 | b |

Ces études, *in analytico* et *in vitro*, sont réalisées protéine par protéine, en milieu artificiel simple. Pour étudier les mécanismes d'action et les effets de l'uranium, en prenant en compte la complexité de l'environnement chimique dans une cellule ou un organisme, d'autres approches, menées *in vivo*, sont nécessaires.

In vivo, l'étude de la spéciation de l'uranium dans des organes cibles de rongeurs ou d'organismes aquatiques exposés chroniquement à l'uranium a permis l'identification de plusieurs cibles potentielles. Dans l'hépatopancréas d'écrevisse, organe de stockage et de détoxification, la colocalisation entre l'uranium et le nickel, le manganèse ou le fer a pu être mise en évidence (Xu et al. 2014). Huit protéines ont pu être identifiées, dont la SOD et la GST impliquées dans les mécanismes cellulaires de gestion du stress oxydant, la ferritine indispensable dans le stockage du fer, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase impliquée dans le catabolisme énergétique, également identifiée comme cible potentielle de l'U pour le sérum humain (Vidaud et al. 2005). Dans les branchies d'écrevisse ou de poisson zèbre, organe d'entrée du contaminant après exposition à la voie directe, plusieurs protéines candidates à la complexation ont également été identifiées dans d'autres études, en particulier l'enzyme superoxyde dismutase. Toutefois, plusieurs enzymes et protéines, impliquées dans d'autres processus biologiques ont également été proposées, telles que l'actine chez le rongeur (Frelon et al. 2009), l'hémoglobine issue de sérum humain (Vidaud et al. 2007), la protéine HSP 70 dans l'écrevisse (Xu et al. 2014), la protéine 14-3-3 de cellule rénale humaine (Prat et al. 2005) et l'apolipoprotéine de sérum humain (Basset et al. 2013).

Ces études *in vivo* sembleraient montrer que l'uranium interagit avec de nombreuses protéines appartenant à différents processus biologiques. Il se dessine au travers des différentes approches et organes étudiés que les protéines impliquées dans la gestion du stress oxydatif cellulaire sont des cibles potentielles de l'uranium retrouvées quasiment systématiquement. En revanche, certaines autres cibles ne se recoupent pas entre les études, suggérant que la nature des cibles identifiées (et donc des processus potentiellement altérés) dépend des organes étudiés.

En conclusion, les études de spéciation de l'uranium en milieu biologique de l'uranium permettent d'identifier les cibles protéiques de l'environnement chimique simplifié à l'environnement cellulaire complexe. Ces informations sont importantes dans les études de la toxicité du métal (Szpunar 2004). En effet, l'uranium, en se liant à la protéine, est

susceptible de modifier sa structure tridimensionnelle. Cet effet direct a été montré par modélisation pour la transferrine, après substitution du cofacteur métallique Fe^{3+} par l'ion uranyle UO_2^{2+} (Figure 7). Une telle modification peut conduire à la perte de la fonctionnalité de la protéine.

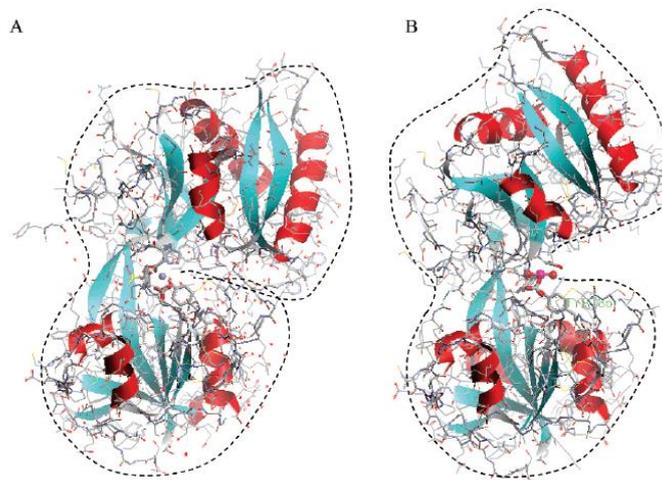


Figure 7 : Modélisation de la structure tridimensionnelle de la transferrine liée au fer (A) et complexée à l'uranium (B). Extrait de (Vidaud, Gourion-Arsiquaud et al. 2007)

Cependant, la seule approche de spéciation de l'uranium peut ne pas être suffisante pour expliquer les effets observés dans les études toxicologiques et écotoxicologiques car la complexation n'entraîne pas forcément une inactivation de la protéine complexée. De plus, l'uranium peut avoir des effets indirects sur certaines protéines, non complexées par l'uranium. En effet, la contamination peut perturber et entraîner une modulation de l'expression des protéines, molécules fonctionnelles de l'organisme. C'est l'objet des analyses protéomiques, décrites dans la section suivante.

1.3.2. Etat de l'art uranium/protéomique

L'approche protéomique est couramment utilisée pour l'étude des effets et processus biologiques impactés après exposition à des contaminants, organiques ou métalliques (Aebersold and Mann 2016). Concernant l'uranium, quelques études protéomiques sont recensées dans la littérature, principalement réalisées sur des cultures de cellules humaines (Malard et al. 2005; Prat et al. 2005) ainsi que dans le sérum de rongeurs exposés chroniquement à l'U (Petitot et al. 2016). *In vitro*, à travers les différentes études, il a pu

être montré une surexpression de plusieurs protéines participant à la protection contre le stress oxydant (la peroxiredoxine 1, participant à la réduction du peroxyde , les cytokératine CK8 et CK18 impliquées dans l'activité protéolytique du complexe ubiquitine-protéasome) (Malard et al. 2005), à la gestion de l'équilibre redox cellulaire (cytokératines CK8 et CK18) et une répression de protéines impliquées dans la gestion du stress (HSP 90, HMGB1) et la signalisation cellulaire (protéine 14-3-3) (Prat et al. 2005).

In vivo, après exposition chronique de rongeurs à l'uranium, la comparaison des profils de sérums sanguins entre les individus contrôles et exposés a permis de détecter 39 spots de protéines différemment exprimées. L'étude des processus biologiques associés aux protéines différemment exprimées a également permis de mettre en évidence que les mécanismes associés à la gestion du stress oxydant, à la réponse immunitaire et à la réponse inflammatoire étaient perturbés par la contamination à l'uranium (Petitot et al. 2016).

Chapitre II

Etude bibliographique (partie 2)

2. Etude bibliographique (Partie 2) : Apports et problématiques de l'analyse métallomique

2.1. Définition et principes

Sur la base de banques de données structurales, environ un tiers des protéines nécessiteraient un cofacteur métallique pour leur structure ou leur fonction (Tainer et al. 1991). Ces protéines interviennent dans plusieurs processus cellulaires tels que la régulation de l'expression protéique, la détoxification et l'homéostasie des métaux, le cycle cellulaire, la prolifération et l'apoptose. L'étude des métaux, de leur fonction et de leur devenir au sein des cellules, tissus ou organes a donné lieu au début des années 2000 à l'émergence d'un nouveau domaine à l'interface entre la biologie, la chimie inorganique et la chimie analytique : la métallomique (Williams 2001; Haraguchi 2004).

Par analogie avec les termes « génomique » et « protéomique », la métallomique est la science qui étudie le métallome. Le métallome est défini par l'ensemble des espèces métalliques ou métalloïdes présentes dans un type de cellules ou de tissus. La métallomique étudie la biodisponibilité des métaux dans le système biologique, la spéciation des espèces métalliques et l'identification de leur fonction (Maret and Copsey 2012; Sperling and Karst 2013).

Les espèces métalliques sont réparties en quatre catégories :

- Les métaux ou métalloïdes libres constituent le « ionome ».
- Les métaux ou métalloïdes liés aux composés organiques issus du métabolisme constituent le métallométabolome.
- Les métaux ou métalloïdes complexés par une liaison covalente à des biomolécules, en particulier des protéines constituent le metalloprotéome. Les metalloprotéines sont caractérisées par la présence d'un ion métallique qui assure la fonction, par exemple une activité enzymatique, ou la structure du complexe.
- Les métaux ou métalloïdes complexés par une liaison non covalente à des biomolécules. Dans ce cas, la présence de l'ion métallique est le résultat d'un équilibre thermodynamique favorable à la formation d'un complexe mais sans fonction biologique particulière.

Les techniques d'analyses utilisées en métallomique sont issues de développements spécifiques d'outils de chimie analytique dédiés à l'analyse de spéciation des métaux. Les protocoles de métallomique requièrent i) l'extraction de la fraction cellulaire riche en élément d'intérêt, ii) la préservation de la liaison métal-biomolécule lors de la préparation

de l'échantillon et de la séparation des complexes et métalloprotéines et iii) la détection spécifique et sensible du métal et de son ligand.

2.2. Techniques analytiques pour l'analyse métallomique

Les méthodes métallomiques reposent le plus souvent sur le couplage d'une technique séparative (chromatographie liquide, électrophorèse) avec un spectromètre de masse (élémentaire ou moléculaire) (**Figure 7**). Ce couplage est rendu possible par le développement d'interfaces permettant le transfert et l'ionisation des molécules ou l'atomisation des métaux des métalloprotéines et complexes protéiques, depuis les matrices liquides ou solides (gels) vers le spectromètre de masse.

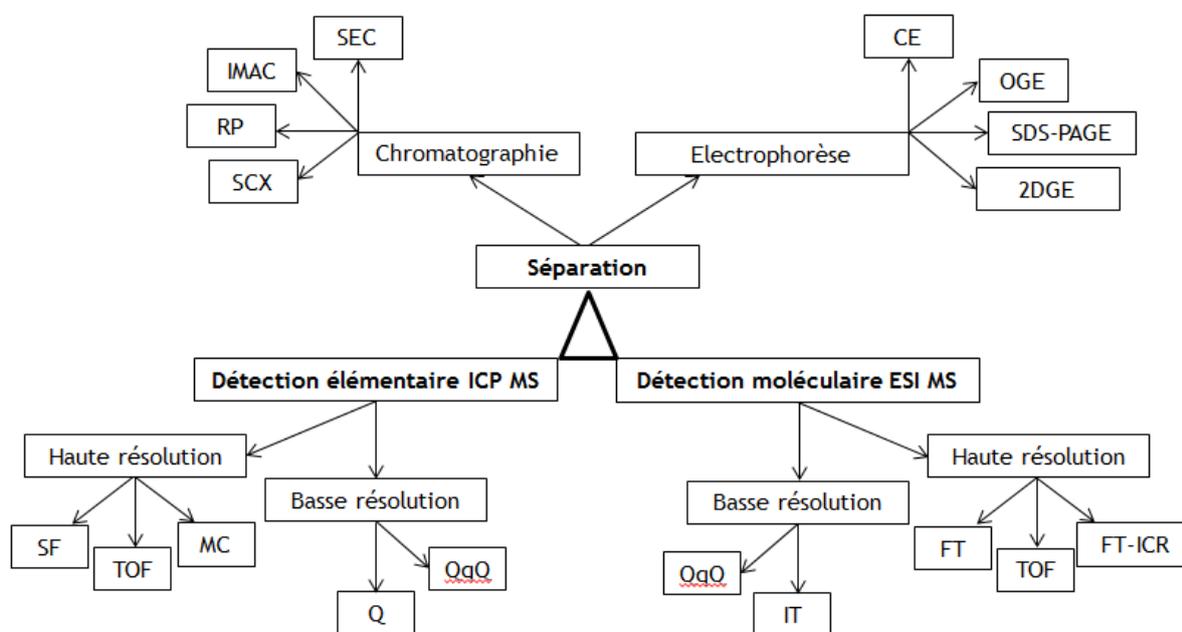


Figure 7 : Techniques analytiques utilisées en métallomique. Adapté de (Mounicou et al. 2009)

Une description brève des outils présentés en **Figure 7**, indispensables au triptyque Séparation/Détection élémentaire/Détection moléculaire est faite ci-après.

La séparation en phase liquide peut être réalisée par chromatographie. Les analytes sont séparés par partage entre la phase mobile et la phase stationnaire de la colonne de chromatographie en fonction soit de leur volume hygroscopique (chromatographie d'exclusion stérique, SEC), soit de leur affinité pour un ion (chromatographie d'échange de cations) ou un métal (chromatographie d'affinité sur métal immobilisé, IMAC) ou de leur hydrophobicité (phase inverse, RP). L'avantage de la chromatographie en phase liquide est

de pouvoir être couplée directement avec un spectromètre de masse si le solvant est compatible (Łobiński et al. 2006). Une technique couramment utilisée est le couplage SEC-ICP MS (chromatographie d'exclusion stérique et spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif) permettant de séparer des complexes métal-biomolécules en condition non dénaturante et de détecter et quantifier les métaux associés avec une grande sensibilité (Szpunar 2004).

L'électrophorèse est un deuxième grand principe de séparation des protéines qui peut se dérouler en milieu liquide ou sur gel. Moins utilisée que la chromatographie en phase liquide, la séparation par électrophorèse capillaire (CE) permet de séparer les analytes, en milieu liquide, en fonction de leur mobilité électrophorétique (charge ionique et friction avec le solvant). Cependant, bien que développée depuis la fin des années 80 (Smith et al. 1988), son utilisation pour l'analyse des protéines a été limitée par les contraintes liées à l'interfaçage avec un spectromètre de masse. De plus, les faibles quantités d'échantillons injectées, quelques nL, et les faibles débits, de l'ordre du $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ requièrent des limites de détection très faibles (femtomoles, attomoles) (Krenkova and Foret 2012).

Une seconde technique d'électrophorèse en milieu liquide est l'électrophorèse hors gel (off gel electrophoresis, OGE) qui permet le fractionnement des analytes en fonction de leur point isoélectrique dans un gradient de pH généré par des ampholytes porteurs (Lam 2008). L'avantage de la technique est que les fractions peuvent être directement recueillies et analysées par spectrométrie de masse ou avec une autre technique couplée (SEC-ICP MS par exemple (Bucher et al. 2016)).

La dernière approche est la séparation sur gel qui permet la discrimination des protéines en fonction de leur taille (électrophorèse sur gel de polyacrylamide, SDS-PAGE) ou de leur point isoélectrique sur bandelette par gradient de pH d'immobilines (focalisation isoélectrique, IEF) et leur taille (électrophorèse bidimensionnelle sur gel, 2D GE). Dans le cas de l'analyse des complexes non covalents, il est souvent nécessaire de modifier le protocole en évitant d'utiliser des agents dénaturants (gel d'électrophorèse en condition non dénaturante, ND-GE (Xu et al. 2014)). Un couplage en ligne avec le spectromètre de masse élémentaire est possible pour la détection des traces métalliques avec l'utilisation d'une ablation laser permettant de désorber et transférer les analytes en phase gazeuse (Becker et al. 2007). En revanche, l'ablation laser n'étant pas compatible avec l'analyse moléculaire, l'excision des spots détectés après coloration est nécessaire avant analyse par spectrométrie de masse moléculaire.

Dans les techniques couplées, l'outil de détection est le plus souvent un spectromètre de masse. Cet instrument est schématiquement constitué de 3 parties : i) une source d'ionisation où les ions sont produits à partir des matrices liquides, gazeuses ou solides, ii) un analyseur qui permet de relier la grandeur physique mesurée (la fréquence pour un analyseur à quadripôle, le temps pour un analyseur à temps de vol, ...) au rapport m/z (masse moléculaire divisée par la charge de l'ion) et iii) un détecteur qui permet de quantifier les ions transmis dans l'appareil.

La source d'ionisation ICP (inductively coupled plasma, plasma à couplage inductif) permet l'atomisation et l'ionisation de la plupart des éléments du tableau périodique. La sélectivité du métal observé alliée à la sensibilité de détection ont fait de l'ICP MS un outil indispensable pour les études métallomiques. Les ICP MS utilisés sont principalement des ICP MS à filtre quadripolaire (ICP Q-MS). Le recours à des spectromètres de masse à haute résolution (spectromètre de masse à secteur magnétique ICP SF MS ou à temps de vol ICP TOF MS) est parfois nécessaire pour séparer les interférences polyatomiques des éléments analysés (Mounicou et al. 2009). Le spectromètre de masse à multicollecteurs (ICP MS MC) est plus spécifiquement utilisé pour l'analyse de rapports isotopiques (Becker et al. 2007).

L'identification des ligands protéiques nécessite le recours à la spectrométrie de masse moléculaire, en plus de l'ICP MS. L'ionisation plus douce des analytes permet de préserver l'intégrité de la molécule. En fonction de la précision de masse requise pour l'identification du ligand, l'analyseur utilisé sera différent : la détection des molécules pourra être réalisée à basse résolution (triple quadripole QqQ, trappe ionique IT) ou haute résolution (piège à ions orbitrap FT, temps de vol TOF, transformée de Fourier de la résonance cyclotronique des ions FT ICR) (Aebersold and Mann 2016).

De nombreuses méthodes ont été développées pour l'analyse métallomique. Cependant, l'utilisation de ces techniques dépend de la nature de la liaison métal-biomolécule considérée. Peu d'études métallomiques couvrent le domaine des complexes non covalents uranium-protéine pour lequel les méthodes analytiques utilisées doivent préserver les faibles quantités de complexes natifs. Il existe cependant des données et méthodologies associées dans la littérature.

2.3. Analyse métallomique en condition non dénaturante - Etat de l'art

2.3.1. Présentation des contraintes de la démarche analytique

Du fait de la nature non covalente des complexes uranium-protéine (Van Horn and Huang 2006), des précautions supplémentaires doivent être prises pour limiter la perte des complexes lors des étapes analytiques de préparation d'échantillon, de séparation et de détection. En particulier, l'utilisation d'agents chimiques pouvant chélater l'uranium doit être limitée. De même, en présence de solvant organique, la structure tridimensionnelle des protéines est susceptible d'être modifiée et la liaison uranium-protéine peut être rompue. Ces deux contraintes limitent considérablement le nombre de techniques analytiques de séparation disponibles. Parmi les techniques de séparation par chromatographie en phase liquide, les méthodes les plus résolutive telles que la phase inverse nécessitent un gradient de solvants organiques comme l'acétonitrile ou le méthanol. Or il est connu que ces solvants, moins polaires que l'eau, modifient la structure tridimensionnelle des protéines, pouvant conduire à la perte du complexe uranium-protéine (Loo 1997). De plus, les chromatographies ioniques (SCX) et d'affinité (IMAC) faisant intervenir des agents compétitifs (acide ou chélatant) ne peuvent être utilisées pour l'étude des complexes métalliques de l'U. Concrètement, la chromatographie d'exclusion stérique est la technique la plus utilisée pour l'analyse de complexes métalliques non covalents (Szpunar 2005; Mounicou et al. 2009). Au niveau électrophorétique, les méthodes séparatives classiques sur gel (SDS PAGE 1D et 2D) ne sont pas directement utilisables du fait de la présence d'agents dénaturants et réducteur tels que l'urée, le dodécylsulfate de sodium (SDS), le dithiothréitol (DTT) (Xu et al. 2014).

L'analyse des complexes uranium-protéines en conditions non dénaturantes a fait l'objet de développements récents dans le cadre du projet ANR ST MALO (SpeciaTion of uranium in Aquatic Living Organisms - Analytical Developments), en particulier pour la préparation d'échantillon et la séparation des complexes en phase liquide et sur gel. Ces développements sont détaillés dans les prochains paragraphes.

2.3.2. Préparation d'échantillon en condition non dénaturante

L'extraction des protéines est réalisée par lyse des cellules afin de libérer le contenu protéique dans le tampon. Ce tampon doit présenter un certain nombre de caractéristiques physico-chimiques : un pH physiologique (proche de 7-7,5), une osmolarité proche de l'échantillon étudié et une neutralité vis-à-vis des analytes étudiés. De plus, pour l'étude des complexes uranium-protéine, les tampons contenant des ions chélateurs des métaux sont à éviter (ions phosphates dans le tampon PBS par exemple). Les tampons d'extraction à base d'acide 4-(2-hydroéthyl) -1-pipérazine-éthane-sulfonique (HEPES) sont privilégiés pour les études de complexation de l'uranium. L'HEPES présente une constante d'acidité proche du pH physiologique ($pK_a = 7,55$) et n'interagit pas avec l'ion uranyle (Scapolan et al. 1998). Le sucrose est ajouté pour équilibrer l'osmolarité du tampon et favoriser un éventuel fractionnement subcellulaire par centrifugation (Geffard et al. 2010; Frelon et al. 2013).

La libération du contenu protéique peut être réalisée par des méthodes physiques ou chimiques. La lyse chimique repose sur l'utilisation d'agents chimiques dénaturants (urée, thiourée, CHAPS, ...) ou d'enzymes, incompatibles avec la préparation des échantillons en condition non dénaturante. La lyse mécanique des membranes cellulaires peut être réalisée par broyage (à lame rotatives, à billes ou à piston), par sonication ou par cycles de congélations-décongélations. Les avantages et inconvénients de chacune des techniques de lyses, les volumes d'échantillons engagés, l'échauffement de l'échantillon ainsi que le prix et la disponibilité de l'appareillage ont été étudiés dans les travaux du programme ST MALO (Bucher 2013). En conclusion, le broyeur à piston Potter-Elvehjem présente plusieurs avantages : rapide, adapté aux faibles volumes d'échantillons, utilisation pour des tissus mous, et la possibilité de conserver l'échantillon à faible température (4°C) durant l'extraction.

2.3.3. Séparation des complexes uranium- protéine

2.3.3.1. En fonction de la masse moléculaire par SEC-ICP MS

Comme mentionné précédemment, la séparation par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la spectrométrie de masse est l'une des méthodes les plus utilisées en métallomique (Szpunar 2005; Mounicou et al. 2009). Cette méthode repose sur la séparation des protéines (et donc aussi des complexes U-protéine) en fonction de leur rayon hygroscopique, pouvant être relié à leur masse moléculaire pour des protéines globulaires. Cette technique permet une première mise en évidence de la présence de métallobiomolécules présentes dans l'extrait protéique. Cette technique a été utilisée pour étudier des extraits protéiques de cytosols d'organes issus d'écrevisses (Frelon et al. 2013) et de poissons zèbres (Bucher et al. 2014) après contamination par l'uranium.

2.3.3.2. Séparation des complexes uranium-protéine en fonction du point isoélectrique par OGE

Le fractionnement par électrophorèse hors gel (off gel electrophoresis, OGE) repose sur la focalisation isoélectrique des protéines dans un gradient de pH généré par la présence d'ampholytes porteurs. L'échantillon est introduit dans une chambre de focalisation divisée en plusieurs compartiments, séparés par des membranes semi-poreuses. Les protéines peuvent migrer d'un compartiment à un autre en fonction de leur charge. Dans le compartiment de pH égal au point isoélectrique de la protéine, la charge globale de cette dernière devient nulle et la protéine s'immobilise, également appelé fraction OGE (Lam 2008). Dans le cadre du projet ST MALO, des extraits protéiques de branchies de poissons zèbres contaminés par l'uranium ont été séparés en fonction de leur point isoélectrique (Bucher et al. 2016). Au préalable, l'influence de la gamme de pH des ampholytes porteurs et la concentration en ampholytes porteurs avaient été étudiés.

A l'issue de la focalisation, les fractions ont été récupérées pour déterminer leur pH, doser l'uranium et réaliser des analyses de spéciation.

Cependant quelques faiblesses ont été soulignées lors de l'utilisation de cette approche, notamment au niveau du taux de recouvrement en uranium obtenu d'environ 25%. La nature des ampholytes porteurs, les conditions de tampon (nature des sels) et de préparation des échantillons dans le cas de cette séparation peuvent être incriminées.

2.3.3.3. Séparation des complexes sur gel d'électrophorèse

L'électrophorèse sur gel 2D dénaturante, classiquement utilisé en protéomique, permet une séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI) et de leur masse moléculaire. Après extraction du contenu cellulaire, les protéines sont purifiées de leur matrice (étape de nettoyage). L'échantillon est éventuellement marqué chimiquement puis mélangé avec une solution commerciale d'ampholytes porteurs pour être séparé par focalisation isoélectrique (isoelectrofocusing, IEF) sur bandelette de gel en fonction des pI des protéines. Les protéines sont ensuite réduites et alkylées puis transférées dans un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) pour être séparées en fonction de leur masse moléculaire sous l'action d'un champ électrique.

Quelques études utilisant cette approche ont été référencées dans la littérature, démontrant sa faisabilité (Becker et al. 2007; Xu et al. 2014). Dans le cadre de ST MALO, la séparation sur gel en condition non dénaturante a consisté en la suppression de l'ensemble des agents dénaturants et chaotropiques (urée, thiourée, iodoacétamide (IAA), DTT, SDS et 3-((3-Cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate (CHAPS)) et potentiellement chélateurs (ampholytes porteurs) présents dans les protocoles classiques. Ce choix méthodologique est réalisé au détriment de la résolution des spots protéiques. Afin de compenser cette perte en résolution, le gel est polymérisé avec un pourcentage plus important de bisacrylamide, un agent pontant permettant de réduire la taille des mailles du gel de polyacrylamide (Xu et al. 2014). La conséquence de ce maillage plus important est une plus grande difficulté d'inclusion dans le gel pour les protéines de haute masse moléculaire (supérieure à 100 kDa). De plus, l'entrée des protéines hydrophobes dans le gel, principalement assistée par des agents dénaturants en électrophorèse sur gel classique, est limitée avec cette approche. Enfin, pour l'identification par spectrométrie de masse moléculaire, les protéines doivent être extraites de la pièce de gel par des solvants et agents dénaturants, résultant en la perte des métaux et en l'analyse de la ou des protéine(s) ayant formé le complexe. Ainsi, une éventuelle identification du complexe métal-protéine par spectrométrie de masse n'est pas possible.

La complexité de mise en œuvre de cette approche reste un frein pour son développement générique pour l'analyse des complexes non covalents. En outre, lors de l'ablation laser, l'énergie apportée est susceptible de désolidariser le complexe.

2.3.4. Identification des protéines par approche top-down, bottom-up et shotgun

L'identification de protéines par spectrométrie de masse peut être réalisée selon trois approches : top-down, bottom-up et shotgun (Tableau 4) (Aebersold and Mann 2003).

Tableau 4 : Différentes approches envisageables pour l'analyse de complexes ou de protéines par spectrométrie de masse.

| Approche | Top-down | Bottom-up | Shotgun |
|------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Echantillon | Complexe ou protéine purifié | Spot protéique | Mélange protéique |
| Analyse par spectrométrie de masse | Injection directe en MS | Digestion enzymatique puis LC-MS/MS | Digestion enzymatique puis LC-MS/MS |
| Analyte | Complexe ou protéine entier | Fragments de peptides | Fragments de peptides |
| Nb. protéines identifiées | Quelques | Quelques | Centaines à milliers |

Dans l'approche top-down, la protéine est introduite entière dans le spectromètre de masse, la masse de la protéine entière est mesurée ainsi que celle des fragments de protéines obtenus après collision. La masse des fragments est comparée à une banque de spectres de masse afin de déterminer des fragments caractéristiques, uniquement retrouvés chez une protéine, permettant ainsi son identification. Cette méthode présente l'avantage de permettre l'étude complexes protéiques entiers. En revanche, les protéines sont des molécules de hautes masses moléculaires (supérieure au kDa) qui peuvent être difficile à détecter par des analyseurs de type quadripôle (ESI Q MS) ou orbitrap (ESI FT MS) dont la gamme de masse sur charge dynamique (m/z) est relativement faible, jusqu'à 4000.

Des complexes cadmium-metallothionéine (Cd₇MT-1a et Cd₇MT-2a) ont pu être identifiés par LC-ESI FT MS après exposition de cultures cellulaires de reins de cochons à des nanoparticules de cadmium (Mounicou et al. 2010). En revanche, aucune étude n'a permis l'identification de complexes uranium-protéine natifs par spectrométrie de masse moléculaire. Les développements les plus avancés ont été réalisés sur des branchies de

poissons zèbres. Le complexe uranium-protéine a été détecté par LC-ICP MS. Dans une analyse distincte, la protéine hémoglobine a été identifiée par top-down à un temps de rétention coïncidant avec le pic chromatographique en uranium (Bucher et al. 2016).

Dans l'approche bottom-up, une digestion enzymatique, communément trypsique, est réalisée sur les spots protéiques d'un échantillon préalablement séparé sur gel d'électrophorèse. Des peptides, de masses plus faibles que celle de la protéine entière, sont ainsi introduits dans le spectromètre de masse. La masse des peptides peut être directement mesurée et comparée à une banque de données de peptides afin de déterminer les peptides caractéristiques uniquement retrouvés chez une protéine (appelés peptides protéotypiques) et de permettre l'identification de la protéine. Les peptides peuvent également être analysés par spectrométrie de masse en tandem. Dans ce cas, les masses des peptides ainsi que celle des fragments de peptides, générés par collision, sont mesurées. L'analyse des fragments de peptides permet la détermination de la séquence en acides aminés sur la base de l'analyse des spectres de masses (Aebersold and Mann 2003). Les peptides séquencés sont ensuite comparés à une base de données protéomiques, déterminées à partir du génome de l'espèce étudiée.

L'approche shotgun est similaire à l'approche bottom-up, sans séparation chromatographique ou électrophorétique préalable à l'analyse par spectrométrie de masse. L'échantillon est directement digéré par une enzyme. Les peptides sont ensuite injectés en LC-MS/MS, comme décrit dans l'approche bottom-up.

L'analyse de peptides séquencés présente l'avantage de permettre l'identification de nouvelles protéines n'ayant pas encore été rapportées dans la littérature. En revanche, cette analyse est très dépendante des données de génomique disponibles. De plus, du fait de la préparation d'échantillon (digestion enzymatique et agents dénaturants, *e.g.* DTT, IAA), les liaisons non covalentes métal-protéines ne sont pas préservées. En conséquence, en l'absence de détection du complexe par ESI MS, les protéines identifiées ne peuvent être considérées que comme des candidates.

Malgré ces écueils, cette approche a été utilisée pour déterminer des protéines candidates à la complexation de l'uranium dans les branchies de poissons zèbres (Bucher et al. 2016) et l'hépatopancréas d'écrevisse (Xu et al. 2014) après contamination par l'uranium.

En conclusion, des méthodes analytiques de préparation d'échantillon et de séparation, sur gel natif et par électrophorèse hors gel, en condition non dénaturante ont été précédemment développées pour l'étude des complexes uranium-protéines. Ces études ont permis la détection de complexes par ICP MS et l'identification de protéines candidates

par ESI MS. Pour notre étude, vu la complexité cellulaire et le contenu protéique des ovaires (macroprotéines, contenu hydrophobe et transporteur lipidique), l'électrophorèse *in gel* en condition native a été écartée pour obtenir une séparation 2D résolue des protéines. Une analyse 2D par séparation OGE suivi d'une analyse SEC des fractions sera privilégié.

Ainsi, sur la base des développements précédemment énoncés et des limitations relevées pour l'OGE, un premier point d'étude bibliographique a été particulièrement investigué pour tenter d'améliorer l'utilisation des ampholytes porteurs dans cette séparation par OGE. Par ailleurs, suite aux débuts de développements effectués par Bucher *et al* sur l'analyse des complexes protéiques intacts, un second point d'étude pour améliorer l'analyse de complexes non covalents par spectrométrie de masse non dénaturante a été réalisé.

2.4.Séparation IEF hors gel et ampholytes porteurs

Afin d'améliorer le taux de recouvrement de la séparation OGE, une étude bibliographique a été menée pour identifier les agents dénaturants pour les complexes uranium-protéines. La solution d'ampholytes porteurs (AP), faiblement caractérisée, a notamment été étudiée afin de mieux décrire la composition chimique, d'évaluer la présence d'agents complexants et d'envisager une éventuelle substitution de cette solution.

La séparation électrophorétique par focalisation isoélectrique (IEF) repose sur la formation d'un gradient de pH établi via des espèces chimiques : les ampholytes porteurs (Svensson 1961; Svensson 1962). Le principe de fonctionnement de l'IEF est le suivant : dans un champ électrique, un ampholyte migre en fonction de sa charge et s'immobilise lorsque sa charge devient nulle (point isoélectrique). En faisant migrer une solution de plusieurs dizaines de molécules avec des pI différents, il est alors possible de créer un gradient de pH. En revanche lors des développements précédemment réalisés dans le cadre du projet ST MALO, le faible taux de recouvrement en U après l'OGE a en partie été attribué à l'utilisation des AP, susceptibles de déplacer l'uranium des complexes biologiques. La préparation de solutions d'AP non chélatants pour l'uranium a ainsi été investiguée.

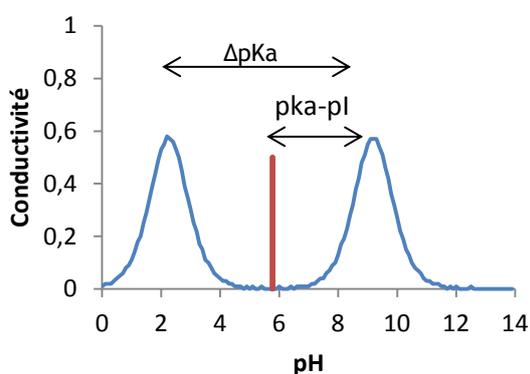
Afin que les ampholytes porteurs soient utilisables pour l'IEF, ils doivent respecter plusieurs caractéristiques. En effet, ces molécules servent de support à la séparation et doivent donc assurer une bonne capacité tampon (pour solubiliser les protéines) et une bonne conductivité (pour assurer le passage du courant). La condition d'ampholyte n'est donc pas suffisante : il existe des « bons » ampholytes porteurs, des « mauvais »

ampholytes porteurs et des ampholytes inutilisables pour l'IEF. En pratique, un « bon » ampholyte porteur est isoélectrique entre deux pKa proches (Svensson 1962). (Figure 8).

Les valeurs repères sont les suivantes :

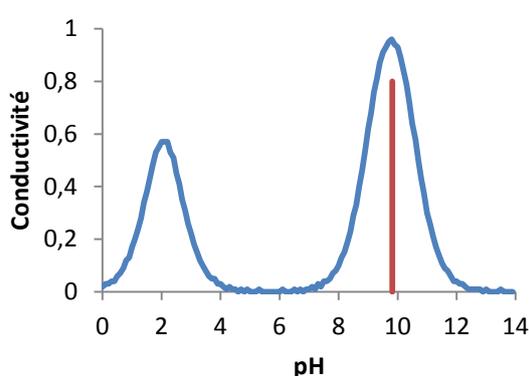
- $\Delta pK_a < 4$ (condition nécessaire mais non suffisante)
- $pI - pK_a < 1,5$: bon ampholyte porteur (condition nécessaire et suffisante)
- $1,5 < pI - pK_a < 2,5$: ampholyte porteur faible
- $pI - pK_a > 2,5$: ampholyte non utilisable

A- Proline



$pK_{a1}=1,95$; $pK_{a2}=10,64$; $pI=6,3$
 $\Delta pK_a=8,69$ -> Mauvais ΔpK_a
 $pI - pK_{a1}=4,35$ -> AP inutilisable

B- Lysine



$pK_{a1}=2,16$; $pK_{a2}=9,06$; $pK_{a3}=10,54$; $pI=9,6$
 $\Delta pK_a=1,48$
 $pI - pK_{a2}=0,54$ -> bon AP

Figure 8 : Exemple d'ampholytes porteurs (AP) et non porteurs parmi les acides aminés. La courbe bleue représente la conductivité en fonction du pH, le trait vertical rouge représente le point isoélectrique. Simulation Marvin® v6.2.2

Ainsi, pour créer un gradient de pH, il suffit théoriquement de faire migrer dans un champ électrique une solution d'ampholytes porteurs aux pI régulièrement espacés dans la gamme de pH souhaitée. Lors des premiers développements de solutions d'ampholytes porteurs, un criblage d'une chimiothèque de 40 000 composés chimiques a été réalisé. Cependant, seules 40 molécules présentaient en fait les caractéristiques minimales requises d'ampholytes porteurs. De plus, aucun « bon » ampholyte porteur n'a pu être relevé entre les pH 4 et 6,8 (Tableau 5).

Tableau 5 : Liste d'ampholytes porteurs candidats établie après criblage d'une chimiothèque. (Svensson 1962)

| | pI | pI-pK1 | | pI | pI-pK1 |
|---------------------------|------|-------------|---------------------------|-------|-------------|
| Aspartic acid | 2,77 | 0,89 | b-aspartyl-histidine | 4,94 | 2 |
| Glutathion | 2,82 | 0,7 | cysteinyl-cysteine | 4,96 | 2,31 |
| Aspartyl-tyrosine | 2,85 | 0,72 | Pentaglycine | 5,32 | 2,27 |
| o-aminophenylarsonic acid | 3 | 0,77 | Tetraglycine | 5,4 | 2,35 |
| Aspartyl-aspartic acid | 3,04 | 0,34 | Triglycine | 5,59 | 2,33 |
| p-aminophenylarsonic acid | 3,15 | 0,92 | Tyrosyl-tyrosine | 5,6 | 2,08 |
| picolinic acid | 3,16 | 2,15 | Isoglutamine | 5,85 | 2,04 |
| L-glutaminc acid | 3,22 | 1,03 | Lysyl-glutamic acid | 6,1 | 1,65 |
| b-hydroxyglutamic acid | 3,29 | 0,96 | Histidyl-glycine | 6,81 | 1 |
| Aspartyl-glycine | 3,31 | 1,21 | Histidyl-histidine | 7,3 | 0,5 |
| isonicotinic acid | 3,35 | 1,51 | Histidine | 7,47 | 1,5 |
| Nicotinic acid | 3,44 | 1,37 | L-methylhistidine | 7,67 | 1,19 |
| Anthranilic acid | 3,51 | 1,47 | Carnosine | 8,17 | 1,34 |
| p-aminobenzoic acid | 3,62 | 1,3 | a,b-Diaminopropionic acid | 8,2 | 1,4 |
| Glycyl-aspartic acid | 3,63 | 0,82 | Anserine | 8,27 | 1,23 |
| m-aminobenzoic acid | 3,93 | 0,81 | Tyrosyl-arginine | 8,38 | 1 |
| Diiodotyrosine | 4,29 | 2,17 | L-Ornithine | 9,7 | 1,05 |
| Cystinyl-diglycine | 4,74 | 1,62 | Lysine | 9,74 | 0,79 |
| a-hydroxyasparagine | 4,74 | 2,43 | Lysyl-lysine | 10,04 | 0,59 |
| a-aspartyl-histine | 4,92 | 1,9 | Arginine | 10,76 | 1,72 |

La sélection d'un ensemble d'ampholytes porteurs ne permettant pas de couvrir correctement la gamme usuelle de pH (3-10), des développements ont été menés pour synthétiser de nouveaux ampholytes porteurs. En 1964, Vesterberg a mis au point une synthèse dite « chaotique » permettant de générer une famille d'ampholytes. La synthèse met en jeu deux familles chimiques : des oligoaminoalcanes (dont la molécule type est le pentaéthylène hexamine -PEHA-) et des alcènes substitués par des acides carboxyliques (dont la molécule type est l'acide propénoïque) (Vesterberg 1969). Dans cette synthèse, Vesterberg utilise la propriété des polyamines capables de présenter une grande gamme de pKa pour une même fonction. Dans le cas du PEHA, les pKa varient de 3,7 à près de 10. En greffant une ou plusieurs fonctions acides, la molécule néo-synthétisée est un ampholyte possédant donc un pI encadré par 2 pKa. Or, ces pKa seront théoriquement proches du pI et par conséquent l'ampholyte créé devrait être un « bon » ampholyte porteur.

En pratique, les réactifs introduits sont des mélanges de polyamines (longueur de la chaîne carbonée, nombre d'azotes, isomères...) et des mélanges d'acides carboxyliques afin de produire une grande variété d'ampholytes, plusieurs centaines, lors de la synthèse dont les pI couvriront la gamme de pH souhaitée.

Tableau 6 : Description générale des solutions commerciales d'ampholytes porteurs Ampholine®, Servalyt®, Pharmalyte® et BioLyte®. *Masse moléculaire et nombre d'ampholytes théoriques, déterminés d'après le schéma réactionnel de chaque solution commerciale. D'après (Sebastiano et al. 2006)

| |
|---|
| <p><u>A- Ampholine® :</u> US patent n° 3485736 (1969) Amine aliphatique : -NH-CH₂-CH₂-NH- ou -NH-(CH₂)₃-NH-, peut contenir des cycles Acide carboxylique α-B-insaturé : acide acrylique, crotonique, méthacrylique, maléique, itaconique, ... Masse des ampholytes* : de 203,1 à 979,6 Nombre d'ampholytes détectés* : 294 (1182 isoformes)</p> |
| <p><u>B- Servalyt® :</u> US patent n° 3770603 (1973) Amine aliphatique : PEHA, toute molécule polyprotique contenant au moins une amine quaternaire Acides sulfoniques : propanesultone, bromoethanesulfonate, vinylsulfonate ... Acides phosphoniques : chlorométhylène phosphonate, ... Masse des ampholytes* : de 204,3 à 929,4 Nombre d'ampholytes détectés* : 686 (3899 isoformes)</p> |
| <p><u>C- Pharmalyte® :</u> US patent n° 4334972 (1982) Amine aliphatique, hydroxylamines, épihalohydrines, ... Acides aminés naturels et synthétiques, dipeptides, tripeptides Remarque : les ampholytes sont synthétisés autour d'un pH donné et non pas pour une large gamme de pH Masse des ampholytes* : de 149 à 1179,6 Nombre d'ampholytes détectés* : 643 (2211 isoformes)</p> |
| <p><u>D- BioLyte® :</u> Pas de brevet pour la gamme de pH 3-10 Pour les pH basiques : US patent n° 7022214 (2006) (Olech 2006) Amine aliphatique substituée par des groupements guanidine Acides carboxyliques Remarque : La synthèse pourrait être proche de celle utilisée pour le Servalyt® (Righetti et al. 2007) Masse des ampholytes* : de 205 à 1048,7 Nombre d'ampholytes détectés* : 255 (1192 isoformes)</p> |

Cette synthèse de Vesterberg a permis le développement des techniques d'IEF en résolvant le problème des ampholytes porteurs. Au cours des années 70, avec l'introduction des gels d'électrophorèse, d'autres acteurs industriels (Tableau 6, encadrés 1 à 4) se sont lancés dans la commercialisation d'ampholytes (Grubhofer and Pogacar 1973; Soderberg 1982; Olech 2006). Parallèlement, d'autres laboratoires (Just 1978) ont développé leurs propres ampholytes (Righetti 2006).

Toutefois, le schéma de synthèse des ampholytes est chaque fois similaire à celui proposé par Vesterberg en 1964, c'est-à-dire une synthèse chaotique mettant en jeu une polyamine

et une famille d'acide. En effet, les brevets diffèrent principalement par la famille d'acide (acides carboxyliques, sulfoniques, phosphoniques, aminés). En revanche, ces solutions sont peu caractérisées. L'identité et la proportion des ampholytes porteurs ne sont pas indiquées dans ces documents. Peu d'études se sont intéressées à caractériser les ampholytes porteurs. Une étude de 4 solutions commerciales d'ampholytes porteurs a permis de montrer qu'il pouvait exister un biais entre la gamme de pH annoncée par le fournisseur et le pH mesuré dans les fractions après séparation OGE (Righetti et al. 2007). De plus, il a été mis en évidence par spectrométrie de masse que tous les composés issus de ces solutions d'ampholytes porteurs ne participent pas à la génération du gradient de pH et sont retrouvés dans plusieurs fractions. En particulier, dans les solutions commerciales pour séparer les pH basiques, plus de la moitié des molécules peuvent ne pas être utiles (**Figure 9**, à droite, encadré rouge). Les auteurs n'ont en revanche pas pu identifier ni caractériser les ampholytes porteurs par spectrométrie de masse.

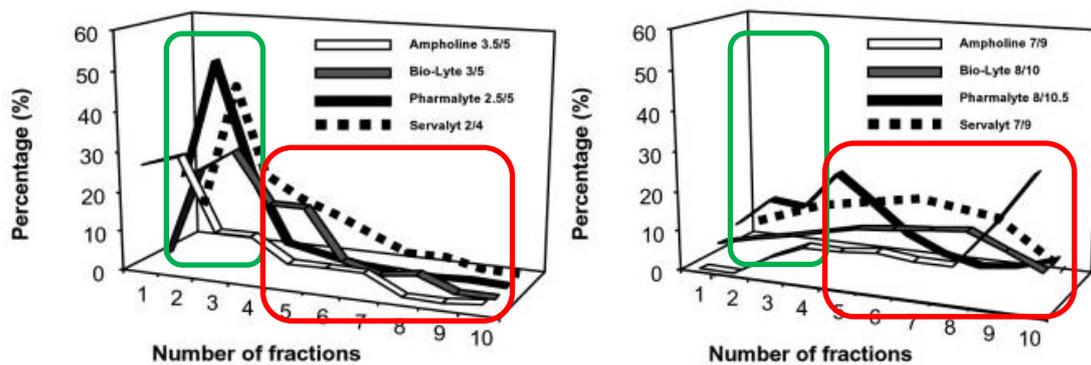


Figure 9 : Nombre de fractions dans lesquelles se retrouve chaque ampholyte après isofocalisation. Les ampholytes retrouvés dans 1 ou 2 fractions sont considérés comme bons (encadré vert). Les autres ne participent pas à la génération du gradient (encadré rouge). Analyse réalisée pour des ampholytes au pl acide (à gauche) et basique (à droite) (Righetti et al. 2007)

Ainsi, malgré l'utilisation fréquente de méthodes de séparation reposant sur le principe de l'IEF (gel d'électrophorèse 2D notamment), il est surprenant de constater que très peu d'études ont été consacrées à l'analyse des solutions d'ampholytes porteurs, support chimique indispensable à la séparation par IEF. Les informations extraites ont permis d'obtenir, des caractéristiques générales telles que le nombre de molécules impliquées (plusieurs centaines à milliers), la gamme de masse des ampholytes (entre 200 et 1200 Daltons) et les fonctions chimiques principales. Cependant, du fait de l'absence de description précise des molécules présentes dans les solutions, il n'est pas possible d'évaluer leur capacité à complexer l'uranium.

En conclusion, cette étude bibliographique n'a pas permis de déterminer la composition chimique des solutions d'ampholytes porteurs mais toutefois de décrire la composition en fonction chimiques. Or, ces fonctions chimiques sont susceptibles de complexer l'uranium. Cette étude a également montré qu'il n'est pas possible de remplacer les solutions commerciales par une solution personnalisée d'ampholytes porteurs. Ainsi, les solutions commerciales d'ampholytes porteurs doivent être étudiées afin de déterminer la moins complexante pour l'uranium.

2.5. Etude de complexes uranium-protéine par spectrométrie de masse non dénaturante.

2.5.1. Présentation de la problématique

Lors des développements menés dans le cadre du programme ST MALO, la détection des complexes de l'uranium et l'identification de la protéine ont toujours été réalisées par deux analyses distinctes, ICP MS et ESI MS respectivement (Xu et al. 2014; Bucher et al. 2016), après partage de l'échantillon. En effet, il n'est à l'heure actuelle pas possible d'observer des complexes uranium-protéines *in vivo* par spectrométrie de masse. Ainsi, aucune preuve formelle de l'existence des complexes suspectés n'a pu être donnée et seules des hypothèses peuvent être faites quant aux protéines candidates à la complexation de l'uranium. Il a donc été choisi de mener une étude bibliographique afin d'évaluer la faisabilité d'analyser des complexes uranium-protéine, dans des conditions de contamination environnementale, par spectrométrie de masse non dénaturante.

Dans la littérature, les études de complexes par spectrométrie de masse sont principalement dénommées « spectrométrie de masse native » mais peuvent également être identifiées par « spectrométrie de masse non dénaturante », « spectrométrie de masse macromoléculaire » ou « spectrométrie de masse supramoléculaire » (Van Den Heuvel and Heck 2004). Quatre types de complexes protéiques peuvent être étudiés en fonction de leur ligand : protéine-peptide, protéine-métal, protéines-acide nucléique, sous-unités protéiques (Loo 1997). La synthèse bibliographique sur ce domaine requiert donc de rechercher sur l'ensemble de ces mots clés pour être exhaustive.

L'étude des complexes biomolécule-ligand par spectrométrie de masse a été rendue possible par le développement des méthodes d'ionisation douce pour les macromolécules. En particulier, l'ionisation par électrospray, introduite par Fenn (Fenn J.B. 1989) sur la

base de travaux de Dole, est aujourd'hui le moyen le plus utilisé pour l'étude de tels complexes. Les premières études ont permis de montrer que certains adduits et agrégats étaient observés par spectrométrie de masse et donc que des complexes pouvaient être maintenus dans le vide de l'analyseur et être détectés (Jaquinod et al. 1993). Cependant, du fait de la technique d'analyse, le complexe doit subir un changement de phase : de la solution aqueuse à la phase gazeuse dans le spectromètre de masse. Or, ce changement d'état conduit à une modification des forces d'interactions non covalentes des composés. Au moins quatre types de forces non covalentes sont impliqués dans le repliement des protéines : les deux types d'interactions électrostatiques (interaction ionique, liaison hydrogène), les forces de Van der Waals et les répulsions hydrophobes. Or, le vide du spectromètre de masse est un milieu apolaire hydrophobe, dans lequel le solvant est absent et donc pour lequel les équilibres des forces non covalentes sont modifiés : les interactions hydrophobes sont plus faibles mais les interactions ioniques et liaisons de Van der Waals deviennent plus fortes.

Or, la formation d'un complexe protéique est le résultat d'interactions stériques et électrostatiques entre une molécule (métal, acide nucléique, protéine) et un ligand protéique. L'interaction stérique est liée à la structure tridimensionnelle de la protéine, conditionnée par sa composition en acides aminés et de leur organisation spatiale sous l'influence du solvant. Les possibilités d'analyse non dénaturante des complexes protéiques par spectrométrie de masse ont alors fait l'objet de nombreux débats. Les forces hydrophobes étaient considérées comme trop importantes pour que la structure de la protéine soit conservée dans le vide, les acides aminés apolaires devant *a priori* passer de l'intérieur à l'extérieur de la protéine. Finalement, les forces attractives de Van der Waals pourraient expliquer le maintien des complexes dans le vide (Loo 1997). Ainsi, selon la force de la somme des liaisons faibles, un complexe peut être conservé dans le vide poussé de l'analyseur et observable par spectrométrie de masse. Toutefois, les complexes plus faiblement liés peuvent être désolidarisés. En effet, afin d'opérer le passage des complexes de la phase liquide à la phase gazeuse, c'est-à-dire de libérer l'analyte du solvant, une série d'actions physicochimiques (nébulisation, transfert) sont opérées et peuvent être incompatibles avec la préservation du complexe.

Les deux sections suivantes présentent la description du mode d'ionisation par électrospray (nébulisation de l'échantillon et passage progressif en phase gazeuse) et les modifications moléculaires susceptibles d'être mises en jeu lors du transfert. Les différents écueils seront discutés et des solutions proposées.

2.5.2. Ionisation par électrospray

Lors de l'ionisation par électrospray, l'échantillon passe à travers un capillaire métallique soumis à un fort potentiel électrique, de l'ordre du kilovolt. À la pointe du capillaire, ce potentiel électrique provoque le phénomène de nébulisation avec la formation du cône de Taylor qui émet de fines gouttelettes de l'ordre du μm de diamètre. Ces gouttelettes sont ensuite séchées sous l'effet du gradient de potentiel et de pression en direction du cône d'échantillonnage (« ion sampling cone »). La nébulisation peut être assistée par l'ajout de gaz auxiliaires, pouvant également être chauffés dans le cas de l'hESI (heated ESI) (Kearle 2000). Les analytes passent progressivement de la solution aqueuse à la phase gazeuse par fission séquentielle des gouttelettes de solvant. Lors de chaque fission, la gouttelette-fille conserve environ 2% de la masse et 15% de la charge de la gouttelette-mère. Une désolvatation additionnelle est souvent nécessaire pour éliminer les traces résiduelles de solvant ainsi que les particules de solutés liées à la protéine (adduits). Elle est réalisée par collision avec des molécules de gaz émises à proximité du cône d'écrémage (sweep gas) (Benesch et al. 2007).

Pour cette étape, le complexe est donc soumis à plusieurs contraintes physico-chimiques. Afin de générer les gouttelettes d'échantillons, une tension électrique élevée est appliquée à la pointe de l'aiguille de nébulisation pouvant décomplexer l'ion uranyle UO_2^{2+} de la protéine par interaction électrostatique. De plus, la désolvatation assistée des gouttelettes apporte de l'énergie thermique au complexe, ce qui est un facteur déstabilisant (Kearle 2000). Enfin, lors de la fission séquentielle des gouttelettes, les répulsions coulombiennes augmentent à mesure que la taille de la gouttelette diminue, ce qui pourrait rompre la liaison métal-protéine. Ces contraintes sont assez génériques pour les études de complexes non covalents et nécessitent le plus souvent de changer la source d'ionisation et de produire une désolvatation plus douce. En effet, l'ionisation par électrospray conventionnelle utilise classiquement des capillaires de l'ordre de 0,5 mm de diamètre qui nécessitent un débit de plusieurs $\mu\text{l}/\text{min}$ afin de maintenir la stabilité du cône de Taylor et donc une tension élevée pour la nébulisation. L'ionisation par nanoélectrospray quant à elle utilise des capillaires en verre ou en quartz de diamètre plus fin (environ 1 μm de diamètre) ainsi qu'un débit de solvant plus faible ($1\text{-}100\text{ nl}\cdot\text{min}^{-1}$) et une tension de capillaire plus faible (environ 1 kV contre 4 kV pour l'ESI classique) (Benesch et al. 2007). De plus, l'ionisation par nanoélectrospray est plus tolérante aux sels présents en solution. En effet, durant la désolvatation se produit une concentration des sels dans les gouttelettes. Or, la taille initiale des gouttelettes produites par nESI est plus

faible, 0,15 μm de diamètre contre 2 μm de diamètre pour l'ESI, ce qui engendre une concentration plus faible des sels et par conséquent une tolérance plus forte. Après cette description, la source nESI semble indispensable pour l'analyse des complexes non covalents.

2.5.3. Transfert des ions dans l'analyseur

Suite à l'ionisation par électrospray, réalisée à pression atmosphérique, les analytes entrent dans le vide de l'analyseur. Ce faisant, ils subissent de fortes variations d'énergie interne et cinétique. La différence de pression entre les deux compartiments (chambre de nébulisation et analyseur) séparés par un orifice de faible diamètre a pour conséquence une expansion supersonique du gaz constitué par les analytes ionisés. La vitesse des ions est également amplifiée du fait des différences de potentiel appliquées lors de la nébulisation et imposées par les différents éléments focalisateurs. De plus, la désolvation des analytes est finalisée par collision des gouttelettes avec un gaz neutre. Ce faisant, l'énergie cinétique des ions est réduite mais leur énergie interne augmente. Or, dans le cas d'un complexe, une augmentation de cette énergie interne peut conduire à une déstabilisation des interactions constituant le complexe (Kearle 2000).

Lors de cette expansion supersonique se crée une onde de choc, le disque de Mach. L'espace entre le disque de Mach et l'orifice d'entrée des analytes est appelé la « zone de silence ». Les molécules présentes dans la zone de silence sont protégées du milieu extérieur par l'onde de choc, conservant les complexes protéiques. En revanche, la désolvation y est plus faible et les adduits plus abondants. Les molécules dans le disque de Mach sont désolvatées plus efficacement mais leur énergie interne est plus élevée avec un risque de perte du complexe plus important (Gabelica et al. 2004). Le disque de Mach est influencé par la différence de pression entre les deux compartiments et la taille de l'orifice, paramètres qui sont définis par les constructeurs pour l'étude d'analytes simples, pas pour des complexes non covalents. De même, afin de limiter la présence d'adduits, les ions sont extraits à partir du disque de Mach et non de la zone de silence ; alors que pour préserver les complexes, il serait préférable de les maintenir dans la zone de silence et de les extraire de cette zone. Ces paramètres étant optimisés par le constructeur et ne pouvant être modifiés, à moins d'intervenir physiquement sur le spectromètre de masse pour agrandir l'orifice ou réduire le vide de l'analyseur, il n'est pas possible d'influencer le transfert des ions (Benesch et al. 2007).

En conclusion, les principaux paramètres susceptibles d'influencer la déstabilisation des complexes lors des étapes d'ionisation et de passage en phase gazeuse sont la technologie de l'ionisation (électrospray et nanoélectrospray) et le vide primaire du spectromètre de masse. Or ces deux paramètres nécessitent une intervention physique sur l'appareil, non envisageable au laboratoire.

Description du projet

Le projet de thèse a été organisé sur la base des études écotoxicologiques de l'uranium et sur les développements analytiques récents pour la détection de complexes uranium-protéines.

A partir des études écotoxicologiques, il a été choisi de poursuivre l'étude de la reprotoxicité de l'U initié notamment dans la thèse de S. Bourrachot. Ainsi, l'organisme modèle *Danio rerio* a été exposé à une faible concentration en uranium, $20 \mu\text{g.L}^{-1}$, correspondant à une valeur pouvant être relevée dans des environnements aquatiques sous influence de mines uranifères (Le Guernic et al. 2016). De plus, l'étude bibliographique de la gonade a montré une diversité des types cellulaires chez le poisson zèbre dont la proportion varie suite à un événement de reproduction. Ainsi, il a été choisi de considérer deux conditions biologiques contrastées : femelles reproduites et non reproduites, pour les groupes contaminés et témoins.

Concernant les méthodes analytiques dédiées à l'approche métallomique (analyse du devenir de l'U dans la gonade après exposition), dans la mesure où une des cibles potentielles de l'uranium pourrait être la vitellogénine, la séparation sur gel non dénaturante a été écartée. En effet, l'entrée des protéines de hautes masses moléculaires est difficile en gel natif. La séparation OGE présentait quant à elle certaines limitations, mais il a été choisi d'étudier la complexation de plusieurs solutions commerciales d'ampholytes porteurs pour l'uranium et de travailler *in fine* avec la solution la moins complexante, pour un même pouvoir séparatif.

De plus, la détection directe des complexes uranium-protéine par spectrométrie de masse non dénaturante nécessitant un certain nombre de modifications physiques sur le spectromètre de masse, l'analyse métallomique a donc été poursuivie avec les méthodes développées précédemment dans ST MALO, en menant deux analyses distinctes pour la détection des complexes d'une part et l'identification des cibles protéiques potentiellement complexante pour l'U d'autre part.

Enfin, en complément de l'approche métallomique, une approche protéomique a également été réalisée afin de mettre en avant des modifications de l'expression des protéines suite à l'exposition des poissons à l'uranium.

En comparant les cibles identifiées par les deux approches, des mécanismes de toxicité pourront être proposés.

Chapitre III

Matériel et méthodes

3. Matériel et méthodes

3.1. Constitution de la banque d'échantillons

3.1.1. Poissons zèbres témoins pour la mise au point des techniques analytiques

3.1.1.1. Description de la procédure

Les expérimentations « poissons zèbres témoins pour la mise au point de techniques analytiques » et « contamination chronique des poissons zèbres » décrites dans les parties 3.1.1 et 3.1.2 ont fait l'objet d'une demande d'autorisation de projet pour l'utilisation des animaux à des fins scientifiques. Elles ont été approuvées par le comité d'éthique appliqué à l'expérimentation animale de l'IRSN (comité éthique en expérimentation animale n° 81).

L'objectif de l'expérimentation « témoin » était d'obtenir du matériel biologique élevé dans des conditions similaires à l'expérimentation d'exposition à l'uranium afin de développer les méthodes analytiques adaptées au type d'échantillon. Cette expérimentation consistait en l'acclimatation progressive des poissons en eau synthétique à pH 6,5 (Composition Tableau 7) puis d'une période de suivi durant 20 jours.

Tableau 7 : à gauche, concentration ionique de l'eau synthétique ; à droite, quantité en sels pour la solution mère (concentrée 1000 fois)

| Ions | Concentration | Sels | Quantité |
|----------------------------------|-------------------------|--|----------|
| [Mg ²⁺] | 4,7 mg.L ⁻¹ | MgCl ₂ , 6 H ₂ O | 19,3 g |
| [Cl ⁻] | 32,6 mg.L ⁻¹ | MgSO ₄ , 7 H ₂ O | 24,64 g |
| [SO ₄ ²⁻] | 9,6 mg.L ⁻¹ | NaNO ₃ | 26,35 g |
| [Na ⁺] | 7,4 mg.L ⁻¹ | CaCl ₂ , 2 H ₂ O | 42,48 g |
| [NO ₃ ⁻] | 19,2 mg.L ⁻¹ | Na ₂ CO ₃ | 0,775 g |
| [Ca ²⁺] | 11,6 mg.L ⁻¹ | KCl | 11,33 g |
| [CO ₃ ²⁻] | 1,6 mg.L ⁻¹ | | |
| [K ⁺] | 5,9 mg.L ⁻¹ | | |

Les poissons zèbres (34 femelles et 41 mâles) ont été fournis par l'unité mixte de service AMAGEN CNRS INRA (Gif-sur Yvette). Les mâles et les femelles ont été séparés jusqu'à la date de reproduction. Après réception, les poissons ont été préservés en armoire à poissons dans l'eau du réseau pendant 4 jours puis ont été progressivement acclimatés à l'eau synthétique pendant 5 jours. Au cours de l'expérience, le bien-être des animaux, la

température, le pH et la concentration en nitrates et nitrites ont été suivis quotidiennement. Après 20 jours dans ces conditions, la moitié des femelles a été mise à reproduire avec les mâles dans des pondeurs individuels. Le succès reproducteur, le nombre d'œufs pondus et leur viabilité à 3h ont été déterminés individuellement. Les poissons ont été anesthésiés dans de l'eau glacée et exsanguinés, les ovaires ont été disséqués et immédiatement plongés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

3.1.1.2. Suivi des paramètres physico-chimiques

En armoire à poissons, la température, le pH et la conductance de l'eau circulant dans les aquariums ont été relevés quotidiennement. Les taux de nitrites et nitrates ont été évalués chaque jour par tests colorimétriques.

En aquarium expérimental, la température et le pH de l'aquarium ont été relevés quotidiennement. La qualité de l'eau a été évaluée par tests colorimétriques des concentrations en nitrites et nitrates. L'eau de l'aquarium a été renouvelée manuellement pour prévenir une concentration trop élevée en nitrates et la présence de nitrites.

3.1.1.3. Banque d'échantillon

La reproduction a été réalisée en deux sessions, les 26 et 27 juin 2014. Les échantillons ont été répartis en deux catégories : femelles reproduites et femelles non reproduites (**Tableau 8**). Le nombre d'œufs pondus ainsi que leur viabilité à 3 heures post-fécondation ont été déterminés pour chaque femelle ayant été mise en contact avec les mâles.

Tableau 8 : Effectifs de femelles reproduites et non reproduites de l'expérimentation témoin pour le développement de méthodes analytiques

| Groupe | Effectifs | Remarques |
|--------------------------|-----------|-------------------------------------|
| Femelles reproduites | 6 | Session 1 (26 juin 2014) |
| | 5 | Session 2 (27 juin 2014) |
| Femelles non reproduites | 1 | Echec reproduction session 1 |
| | 2 | Echec reproduction session 2 |
| | 11 | Pas mises en contact avec les mâles |

3.1.2. Contamination chronique des poissons zèbres

3.1.2.1. Description de l'expérimentation

Le dispositif expérimental est présenté dans la **Figure 10**. En arrière-plan, les nourrices alimentent les aquariums (au premier plan) en eau synthétique contenant $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'uranium au moyen de pompes péristaltiques. La température est maintenue constante à 26°C par bain-marie.

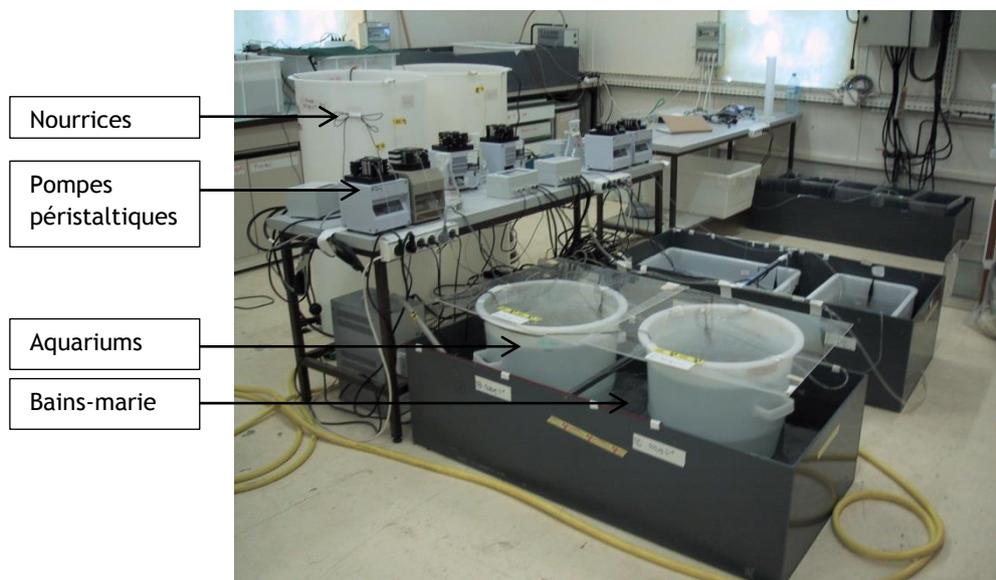


Figure 10 : Dispositif expérimental pour l'exposition chronique des poissons zèbres à l'uranium dans l'eau.

Les poissons zèbres ont été fournis par l'unité mixte de service AMAGEN CNRS INRA (Gif-sur-Yvette). Après acclimatation en eau synthétique à $\text{pH} = 6,5$, les poissons ont été répartis en trois groupes, témoins et contaminés ($20 \mu\text{g.L}^{-1}$ et $250 \mu\text{g.L}^{-1}$). Les mâles et les femelles ont été séparés durant la période d'exposition. Un premier prélèvement de poissons femelles non reproduites a été réalisé à 5 jours pour le suivi de la bioaccumulation de l'uranium. Malheureusement, la condition $250 \mu\text{g.L}^{-1}$ a été perdue à 5j lors de l'expérimentation suite à un problème de régulation du pH (acidification des bacs). Pour les conditions de poissons zèbres contaminés ($20 \mu\text{g.L}^{-1}$ et $250 \mu\text{g.L}^{-1}$), les femelles et les mâles ont été exposés séparément à l'uranium. Pour le groupe de femelles reproduites, les poissons femelles fournis par Amagen ont au préalable été testées pour leur aptitude à la reproduction et seules des femelles aptes ont été utilisées pour ce groupe. Pour le groupe de femelles non reproduites, des poissons en âge de se reproduire (3 mois) ont été utilisés.

Après 20 jours d'exposition, pour chaque groupe témoins et contaminés, les femelles dédiées à la reproduction ont été mises en contact avec les mâles en eau claire pendant une nuit et constituent le sous-groupe « femelles reproduites » ; les femelles matures, non dédiées à la reproduction ont été directement prélevées et constituent le sous-groupe « femelles non reproduites » (Figure 11). Les effectifs associés à chaque groupe sont donnés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Banque d'échantillons de l'expérimentation de contamination des poissons zèbres par l'uranium.

| Groupe | Effectifs | |
|---------------------------------|-----------|---|
| | ♀ | ♂ |
| Témoins 5j | 5 | 7 |
| Témoins 20j non reproduites | 5 | 6 |
| Témoins 20j reproduites | 5 | 7 |
| Contaminées 5j | 6 | 7 |
| Contaminées 20j non reproduites | 7 | 7 |
| Contaminées 20j reproduites | 6 | 7 |

Les poissons ont été anesthésiés dans de l'eau glacée et exsanguinés, les ovaires ont été disséqués et divisés en 2 parties pour les expérimentations « protéomiques » et « métallomiques ». Les fractions ont ensuite été plongées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

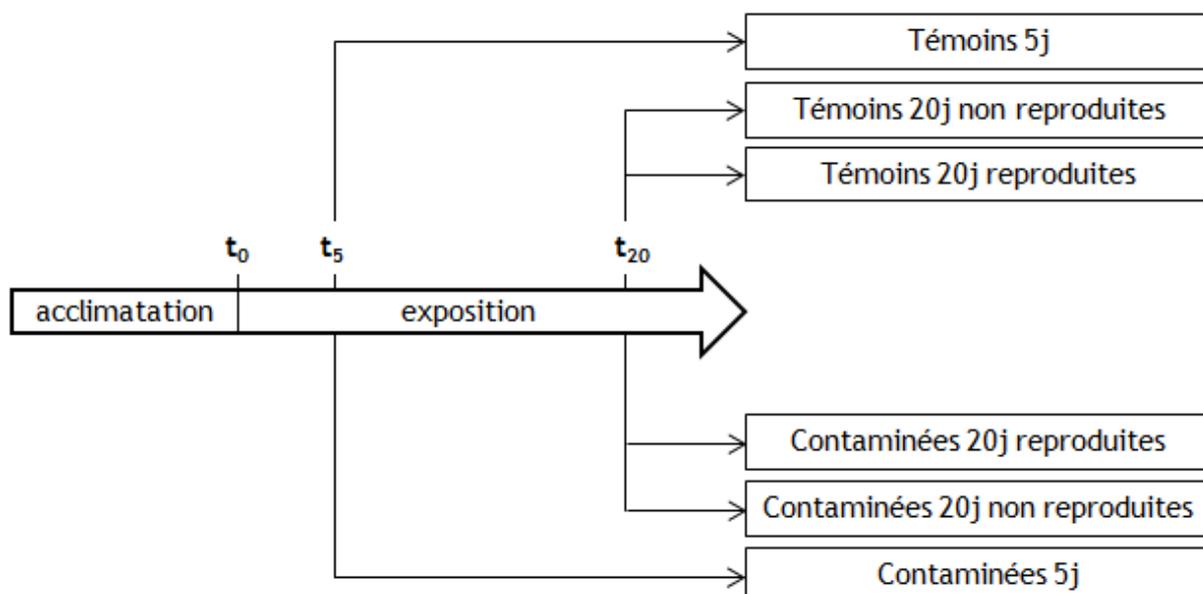


Figure 11 : Schéma de l'expérimentation de contamination des poissons zèbres par l'uranium.

3.1.2.2. Suivi des paramètres physico-chimiques

La biodisponibilité de l'uranium a été maintenue constante au cours de la période de contamination par le maintien du pH et de la concentration en uranium dans l'eau de l'aquarium.

Le pH a été maintenu à une valeur de consigne de 6,5 par ajout d'acide nitrique à 1 mmol.L⁻¹ via une pompe péristaltique couplée à une électrode de mesure. La concentration en uranium et en cations majeurs a été mesurée quotidiennement par ICP MS et ICP AES respectivement.

3.2. Observations et détermination de paramètres biologiques

3.2.1. Succès reproducteur

La viabilité des œufs a été évaluée à trois heures post-fertilisation. Les œufs ont été comptés. La viabilité des œufs a été déterminée par observation en microscopie optique. Les œufs ont été considérés viables si l'enveloppe est transparente et l'embryon visible. Les œufs ont été considérés non viables si l'enveloppe est opaque.

3.2.2. Indice gonado-somatique et de condition

L'indice gonado-somatique (GSI) permet d'évaluer la maturité des ovaires. L'indice de condition de Fulton (K) permet d'obtenir des informations quant à l'état de santé de l'organisme suite à la période d'exposition.

L'indice gonado-somatique a été calculé selon la formule suivante :

$$GSI = \frac{m_{\text{gonades}} \text{ (mg)}}{m_{\text{totale}} \text{ (mg)}} \times 100$$

L'indice de condition de Fulton a été calculé selon la formule suivante :

$$K = \frac{m_{\text{totale}} \text{ (g)}}{\text{longueur}^3 \text{ (cm}^3\text{)}} \times 100$$

3.3. Analyse chimique à l'échelle de l'organe

3.3.1. Dosage de l'uranium et des métaux dans les organes

3.3.1.1. ICP-MS quadripolaire

Les organes (le foie, les reins, l'épithélium et l'arc branchial, le muscle dorsal, le tube digestif et le reste du corps), à l'exception des ovaires, ont été minéralisés par digestion acide selon la procédure suivante. Les organes sont préalablement séchés et pesés. Une aliquote de 200 µL d'acide nitrique à 70% et haute pureté (qualité MS) et de 100µL de peroxyde d'hydrogène sont ajoutés aux échantillons, chauffés à 80°C sur bain de sable sous hotte chimique. L'opération est renouvelée autant de fois que nécessaire jusqu'à l'obtention d'un dépôt blanc. Trois blancs de minéralisation sont ajoutés pour évaluer l'apport de métaux par les réactifs de minéralisation. L'échantillon est resuspendu dans 5 mL d'acide nitrique à 2% et dilué en fonction de la concentration en métaux attendue pour chaque organe.

Le dosage des échantillons a été réalisé par ICP MS (7500 Agilent). La sensibilité du spectromètre de masse a été vérifiée quotidiennement et les performances ont été comparées aux spécifications de l'appareil recommandées par le constructeur. La déviation du signal du spectromètre de masse est corrigée par ajout d'un étalon interne de bismuth à 1 µg.L⁻¹. La courbe de calibration multiélémentaire, préparée chaque jour a été analysée au début et à la fin de la série d'échantillons. Un blanc a été inséré tous les 3 à 5 échantillons, en fonction de la concentration attendue en métaux, afin de s'assurer de l'absence de contamination inter-échantillons.

3.3.1.2. ICP-SFMS (secteur magnétique)

Les dosages des métaux ont été réalisés par ICP-SF MS (Element XR, Thermo Scientific) dans l'homogénat, le surnageant, le culot des gonades. La procédure de minéralisation était la suivante : 50 µL d'échantillon (ou la totalité du culot) ont été digérés avec 150 µL d'acide nitrique à 70% dans une étuve thermostatée à 80°C. Le digestat a ensuite été resuspendu dans 5 mL d'eau ultrapure.

La sensibilité et la stabilité du signal du spectromètre de masse ont été vérifiées quotidiennement pour trois éléments (^7Li , ^{115}In et ^{238}U) répartis sur la gamme de masse ainsi que le taux d'oxyde pour l'uranium (UO , $m/z = 254$). Au besoin, la position de la torche à plasma et les débits de gaz vecteur et auxiliaire ont été ajustés (Tableau 10). La précision de masse en basse et moyenne résolution a été ensuite déterminée. L'échelle de masse a été calibrée deux fois par semaine en basse et moyenne résolution, la haute résolution n'étant pas nécessaire pour les métaux investigués. L'uranium 238 a été mesuré en basse résolution afin d'accroître la sensibilité de détection et les autres métaux (^{31}P , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{64}Zn) en moyenne résolution afin de discriminer les interférences.

La série d'échantillons a été encadrée par deux gammes d'étalonnage, deux blancs ont été insérés tous les 5 échantillons. L'éventuelle dérive du signal a été corrigée par étalonnage interne ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ^{209}Bi).

Tableau 10 : Paramètres ICP-SF MS Thermo Element XR

| | |
|-------------------------|--------------------------------|
| Chambre de nébulisation | Scott à 2 °C |
| Nébuliseur | Conikal 1 mL.min ⁻¹ |
| Injecteur | 1,75 mm diamètre interne |
| Cônes | Nickel |
| Puissance | 1200-1300 W |
| Gaz de nébulisation | 0,95 L.min ⁻¹ |
| Gaz auxiliaire | 0,80 L.min ⁻¹ |

3.3.2. Dosage de protéines totales par Bradford

Un volume de 250 μL de réactif de Bradford est ajouté à 5 μL d'échantillon. Le mélange est incubé 10 minutes à l'abri de la lumière. L'absorbance à la longueur d'onde 590 nm est mesuré par spectromètre UV-visible.

L'une des limitations de la méthode de Bradford est sa faible gamme dynamique. Les concentrations attendues dans les extraits protéiques et les échantillons préparés étant souvent supérieures à la limite haute de la gamme, une simple dilution dans le tampon de la gamme d'étalonnage est opérée pour réaliser le dosage. Le réactif de Bradford a également été utilisé pour sa tolérance pour des concentrations élevées en urée et thiourée (4 mol.L^{-1} et 1 mol.L^{-1} , respectivement) utilisées pour certaines expériences protéomiques.

Le dosage par 2D Quant kit a également été testé mais, bien que présenté comme plus adapté aux matrices complexes et aux tampons salins, cette méthode s'est avérée moins robuste que la méthode de Bradford, qui lui a été préférée, notamment pour sa tolérance à des concentrations élevées en urée et thiourée.

3.3.3. Extraction et préparation des protéines en condition non dénaturante

Le tampon d'extraction non dénaturant est constitué de 250 mmol.L⁻¹ de sucrose et 25 mmol.L⁻¹ d'acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-pipérazine-éthane-sulfonique (HEPES), ajusté à pH 7,4 par de la soude à 1 mol.L⁻¹. Le tampon d'extraction est préparé fraîchement et est conservé dans la glace au cours de la série de préparation d'échantillons. Une aliquote de 1500 µL de tampon d'extraction HEPES/sucrose est ajouté au fragment de gonade préalablement pesé, la masse du fragment variant de 11,7 mg à 67,1 mg. Le contenu cellulaire est extrait par lyse au Potter Elvehjem. L'échantillon est broyé pendant 1,5 min à 1000 tr.min⁻¹ puis 1,5 min à vitesse maximale (2000 tr.min⁻¹). Le piston est rincé deux fois avec 150 µL de tampon d'extraction. Le broyat est transféré dans un tube eppendorfs 2 mL (qualité « low binding »). L'échantillon est centrifugé à 900 g pendant 20 min. Le surnageant est aliquoté en fractions de 200 µL, plongés dans l'azote liquide (quick freeze) et est conservé à -80°C.

3.4. Analyse en condition dénaturante : protéomique et Western Blot

3.4.1. SDS-PAGE

3.4.1.1. Purification des protéines

Suite à l'extraction des protéines, les extraits ont été nettoyés par « clean-up acide trichloroacétique / acétone ». L'objectif de cette étape est de purifier l'extrait protéique par précipitation pour éliminer les lipides, acides nucléiques et sucres qui pourraient interférer lors du marquage et de la migration des protéines. Cette étape permet également de concentrer les protéines et d'inhiber les protéases, actives en l'absence d'agents anti-protéases dans le protocole d'extraction non dénaturant.

Des kits de clean-up sont disponibles commercialement mais n'ont pas donné entière satisfaction pour le type d'échantillon utilisé, avec un taux de recouvrement des protéines faible pour un certain nombre d'échantillons. La procédure de clean-up a été adaptée au laboratoire. Pour 200 μL d'échantillon, les protéines ont été précipitées par 20 μL d'acide trichloroacétique 6,1N (soit 10% du volume d'échantillon). Le culot a ensuite été rincé par 200 μL de déoxycholate 0,2% (100% du volume d'échantillon) suivi de deux rinçages successifs avec 50 μL de solution de déoxycholate 0,2% puis avec 50 μL d'eau ultrapure. Enfin, une dernière phase de nettoyage a été réalisée dans 100 μL d'acétone froid (-20°C) avant séchage du culot. Les culots protéiques ont ensuite été repris pendant 3 heures à température ambiante en tampon UTC à pH non ajusté (urée 9 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, thiourée 2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, CHAPS 4%) sous agitation (bloc Thermomixer, 1600 rpm). Une aliquote de 20 μg de protéines a été concentrée dans 6 μL de tampon.

3.4.1.2. Marquage minimal fluorescent

Les fluorophores cyanine NHS ester ont été reconstitués en solution de travail avec 12,5 μl de diméthylformamide (DMF) pour 5 nmol de fluorophores, soit une concentration de 400 $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Cette solution est conservée à -20°C , à l'abri de la lumière. Une solution de tampon de marquage (« labelling buffer »), a également été préparée avec 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Tris, ajusté à pH 8,72 sur glace. La réaction de marquage a été réalisée par incubation de 400 pmol de fluorophore pour 50 μg de protéines, sur glace et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. La réaction de marquage a été arrêtée par ajout de lysine à 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.4.1.3. Migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide

Une aliquote de 10 μg d'échantillons est préalablement incubée avec 3 μl de tampon de charge 5X à 95°C pendant 5 minutes dans un bloc thermomixer sous agitation douce (300 rpm).

La migration a été réalisée en cuve d'électrophorèse Mini-Protean (Biorad) selon le protocole de migration du manuel d'instruction « Mini-Protean Tetra vertical

electrophoresis cell, rev. D » (Biorad). Après focalisation pendant 10 minutes à 100V, les protéines ont été mises à migrer pendant 45 minutes à 1 heure à 150V.

3.4.1.4. Transfert sur membrane PVDF et immunomarquage

Le transfert des protéines du gel d'électrophorèse sur membrane a été réalisé en phase liquide, appelé « transfert humide », par le système « Mini Trans-Blot Cell » (Biorad). Le dispositif était lui-même placé dans une enceinte thermostatée à 4°C pour limiter l'échauffement de la cellule de transfert et l'éventuelle dégradation du matériel biologique. La membrane de PVDF a été préférée à la membrane de nitrocellulose classiquement utilisée pour les transferts de protéines mais dont le bruit de fond est plus élevé en fluorescence.

Le transfert a été réalisé selon le protocole extrait du manuel d'instruction « Mini Trans-Blot, Rev. K » (Biorad). Après activation dans le méthanol, la membrane de PVDF a été équilibrée en tampon de transfert (10% de tampon de migration 10X et 20% d'éthanol). Un sandwich de gel (papier Whatman / membrane PVDF / gel d'électrophorèse / papier Whatman) a été inséré dans une cellule de transfert, maintenue dans une enceinte thermostatée à 4°C. Le transfert est opéré à 200V pendant 1h.

L'immunomarquage fluorescent de la vitellogénine sur membrane a été réalisé par l'action de l'anticorps primaire monoclonal anti-vitellogénine JE-10d4 (isotype IgG1, chaîne légère κ) produit chez la souris, révélé par un anticorps secondaire fluorescent dirigé contre l'anticorps primaire. Les différentes étapes sont réalisées sous agitation douce et à température ambiante, à l'exception de l'étape d'incubation avec l'anticorps primaire, réalisé à 4°C sous agitation douce. Le protocole est donné dans le **Tableau 11** et la composition des solutions utilisées dans le **Tableau 12**. La solution d'anticorps primaire peut être réutilisée et conservée à 4°C.

Tableau 11 : Protocole de marquage par immunofluorescence.

| Etape | Description |
|--------------------|---|
| Blocage | 1x 1h, 15 mL de TBS-BSA |
| Rinçage | 3x 15 min, 15 mL de TBS-Tween |
| Anticorps primaire | Nuit, 7 mL de solution anticorps primaire à 4°C |

| | |
|----------------------|--|
| Rinçage | 3x 15 min, 15 mL de TBS-Tween |
| Anticorps secondaire | 1h30, 7 mL de solution anticorps secondaire |
| Rinçage | 2x 15 min, 15 mL de TBS-Tween 2x 15 min, 15 mL de TBS |

Tableau 12 : Composition des solutions utilisées pour le marquage par immunofluorescence.

| Solution | Composition |
|----------------------|--|
| TBS | Tris HCl 50 mmol.L-1 NaCl 150 mmol.L-1 pH 7,6 |
| TBS-Tween | 0,1% de Tween20 dans la solution de TBS |
| TBS-BSA | 0,5% de BSA dans la solution de TBS |
| Anticorps primaire | Solution mère d'anticorps JE-10d4 diluée 1000 fois en solution de TBS-Tween |
| Anticorps secondaire | Solution mère d'anticorps anti-souris marquée cydye5 diluée 6000 fois en solution de TBS-Tween |

3.4.1.5. Détection de la fluorescence sur gel ou membrane

La détection de la fluorescence sur les gels d'électrophorèse ou les membranes de transfert a été réalisée par scanner laser Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). L'appareil dispose d'un jeu de lasers permettant d'émettre 4 longueurs d'onde d'excitation et d'un jeu de filtres permettant de sélectionner la longueur d'émission associée au fluorophore. Il est donc possible d'analyser plusieurs fluorophores cyanine NHS ester sur un même gel (multiplexing). Le signal est amplifié par des photomultiplicateurs avant détection. L'utilisation d'un scanner laser permet de réduire le rapport signal sur bruit et d'augmenter le nombre de spots protéiques détectés. Les spécifications du constructeur indiquent que les limites de détections pour la protéine anhydrase carbonique sont de 0,2 ng en cyanine 2 (cy2) et cyanine 3 (Cy3) et de 25 pg en cyanine 5 (cy5).

3.4.2. DIGE

3.4.2.1. Méthode

L'électrophorèse DIGE (difference in gel electrophoresis) est une technique d'analyse permettant la comparaison quantitative de protéomes. Les extraits protéiques sont séparés en 2 dimensions, en fonction du point isoélectrique et de la masse moléculaire des protéines, par focalisation isoélectrique (IEF) et migration en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), respectivement. Le marquage fluorescent des lysines des protéines en amont de la séparation permet la détection et la quantification des spots protéiques. De plus, le marquage par différents fluorophores permet de comparer plusieurs échantillons. Un jeu de trois fluorophores est classiquement utilisé pour une expérimentation DIGE : deux échantillons marqués peuvent migrer simultanément en présence d'un étalon interne composé d'un mélange de tous les échantillons marqués par le troisième fluorophore. Ainsi, il est par exemple possible de comparer 12 échantillons sur 6 gels, les différences de migrations des protéines d'un gel à un autre étant corrigées par l'étalon interne (Cy2) (Figure 12).

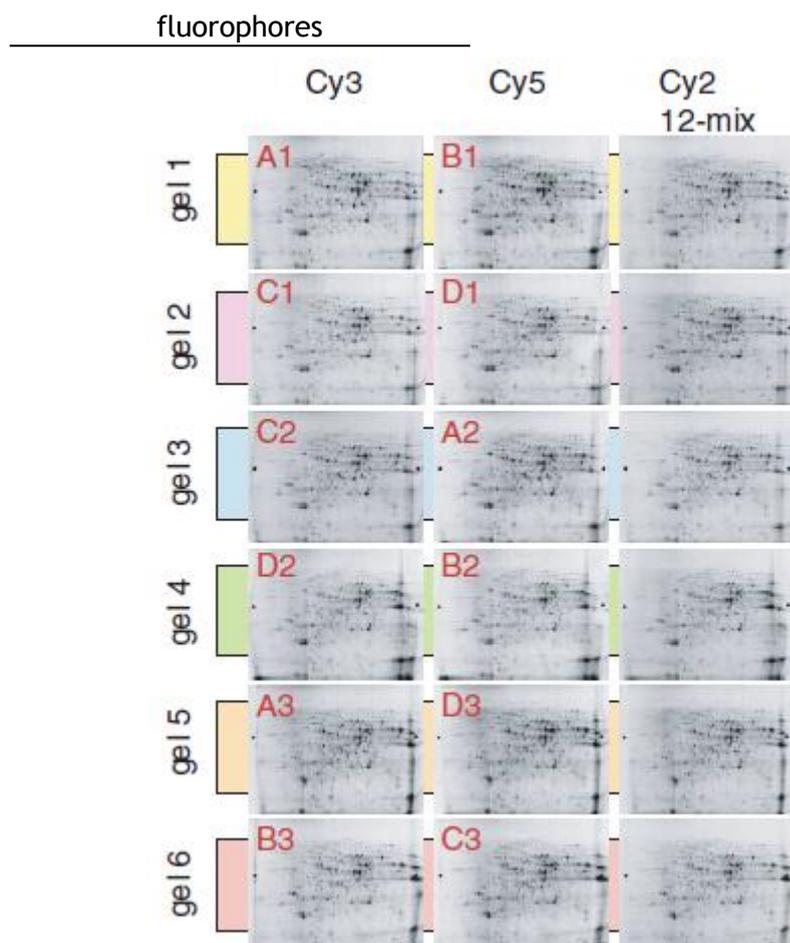


Figure 12 : Exemple de DIGE. 12 protéomes ont été séparés sur 6 gels.

3.4.2.2. Préparation d'échantillons

Les étapes de purification des échantillons et de marquage fluorescent des protéines sont identiques à celles décrites dans la partie préparation d'échantillon pour le SDS-PAGE. Les fluorophores cyanine NHS ester ont été reconstitués en solution de travail avec 12,5 µl de pour 5 nmol de fluorophores, soit une concentration de 400 pmol.µL⁻¹. Chaque échantillon (16 au total, 75 µg de protéines par échantillon) a été marqué avec 1,5 µL de cyanine NHS ester Cy3 et Cy5, soit une concentration de 400 pmol pour 50 µg de protéines. L'étalon interne a été constitué par 25 µg de chaque échantillon, puis marqué avec 8 µL de cyanine NHS ester cy2 à 400 pmol.µL⁻¹.

Pour la constitution des groupes d'échantillons (échantillon marqué en cy3, échantillon marqué en cy5, étalon interne marqué en cy2), une procédure de « dye swap » a été réalisée pour augmenter la robustesse de l'expérimentation DIGE. Les échantillons sont répartis entre les différents gels en excluant les échantillons d'un même groupe pour un même gel. Les échantillons d'un même groupe sont répartis entre les fluorophores cy3 et cy5 afin d'éliminer un éventuel biais lors de l'acquisition du signal de fluorescence entre les deux couleurs. De plus, cette procédure évite la perte de deux échantillons provenant d'un même groupe en cas de perte d'un gel dû à un défaut de migration ou à une erreur de manipulation. Le nombre minimal recommandé d'échantillons par groupe est de 4, pour tenir compte d'un éventuel problème lors de l'expérimentation. L'organisation des échantillons par gel est présentée dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : Répartition des échantillons pour chaque gel. Les femelles témoins non reproduites (6, 7, 8, 10) sont colorées en bleu, témoins reproduites (12, 13, 14, 15) en vert, contaminées non reproduites (28, 29, 30, 31) en rouge et contaminées reproduites (32, 34, 35, 37) en orange. L'étalon interne est marqué en Cy2.

| N° gel | N° strip IEF | N° éch Cy3 | N° éch Cy5 | N° éch Cy2 |
|--------|--------------|------------|------------|------------|
| 1 | 75530 | 14 | 6 | EI |
| 2 | 75531 | 30 | 7 | EI |
| 3 | 75532 | 8 | 28 | EI |
| 4 | 75533 | 10 | 32 | EI |
| 5 | 75534 | 31 | 12 | EI |
| 6 | 75535 | 35 | 13 | EI |

| | | | | |
|---|-------|----|----|----|
| 7 | 75536 | 15 | 34 | EI |
| 8 | 75537 | 37 | 29 | EI |

A l'issue du marquage, 50 µg d'échantillon marqué cy3, 50 µg d'échantillon marqué cy5 et 50 µg d'étalon interne marqué cy2 sont groupés pour chaque numéro de gel. Un volume final du pool d'échantillon est ajusté à 150 µl avec la solution de réhydratation Destreak (GE Healthcare), utilisée pour la réhydratation des bandelettes IEF afin d'atteindre une concentration en protéine de 1 µg.µL⁻¹.

3.4.2.3. Focalisation iso-électrique (IEF)

Avant utilisation, les bandelettes IEF (immobiline dry strip, pH 3-11 NL 24 cm, GE Healthcare) ont été réhydratées sur la nuit avec 450 µL de solution « Destreak rehadration solution » contenant 0,5% d'ampholytes IPG pH 3-10.

Les 150 µL d'échantillons à 1 µg.µL⁻¹ de protéines ont été introduits par un système de cupule. La séparation isoélectrique, a été réalisée en système électrophorétique (Ettan IPGphor IEF system, GE Healthcare) pendant la nuit à 50 µA / bandelettes et à 15°C. Le programme d'électrofocalisation est indiqué dans la **Figure 13**.

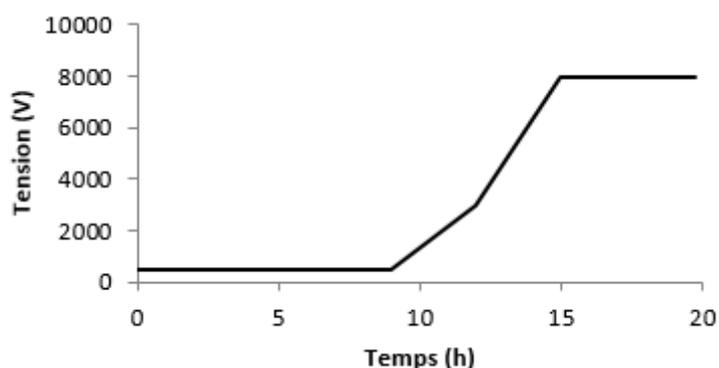


Figure 13 : Paramètres de focalisation isoélectrique

3.4.2.4. Conditionnement des strips IEF et transfert sur gel

Les gels d'acrylamide utilisés sont des gels de 24 cm à 10% (37,5 :1, acrylamide : bisacrylamide), préalablement coulés et stockés à 4°C en chambre humide pour éviter tout dessèchement.

Afin de transférer sur le gel les protéines séparées sur bandelette par IEF, une étape de conditionnement des bandelettes a été réalisée.

Les bandelettes ont été plongées pendant 15 minutes à l'abri de la lumière et sous agitation douce dans un tampon d'équilibration contenant 1 % de DTT pour dissocier les sous-unités protéiques maintenues par liaisons disulfure entre deux cystéines. Les bandelettes sont ensuite mises à incuber en tampon d'équilibration contenant 2,5 % d'IAA pour alkyler les groupements thiols des cystéines. Le tampon d'équilibration est composé de 6 mol.L⁻¹ d'urée, 75 mmol.L⁻¹ de TrisHCl, 29,3 % de glycérol et 2 % de SDS.

Les bandelettes ont ensuite été déposées sur les gels d'électrophorèse et scellées par un gel d'agarose (0,5 % d'agarose en tampon TGS).

3.4.2.5. Migration électrophorétique et détection des spots protéiques

La migration a été effectuée pendant la nuit, à 1 W par gel en cuve d'électrophorèse Ettan6 (GE Healthcare) et à l'abri de la lumière. Le tampon de migration a été thermostaté à 12°C par circulateur thermostatique MultiTemp IV (GE Healthcare).

La détection et quantification des spots protéiques a été réalisée par scanner laser Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare).

3.4.2.6. Analyse comparative Delta2D

L'ensemble des gels a été analysé et comparé par logiciel d'analyse Delta2D (Decodon). Après filtrage des traces et impuretés, un alignement de spots protéiques de l'étalon interne entre les différents gels a été réalisé. Au sein d'un même gel, les signaux des différents fluorophores cy2, cy3 et cy5 ont été ajustés. A l'issue, une image de synthèse a été créée à partir de l'ensemble des signaux des échantillons, hormis l'étalon, afin d'identifier et d'isoler les spots protéiques. Ces deux étapes, assistées par le logiciel ont été révisées manuellement. Enfin, une analyse statistique groupe à groupe par test de Student ($p < 0.05$) et sélection en spots surexprimés (ratio > 2) et sous-exprimés (ratio $< 0,5$) a permis de déterminer les spots d'intérêt.

3.4.2.7. Excision des spots d'intérêt SpotPicker

Après exportation des coordonnées des spots d'intérêt dans les différents gels, l'excision des spots protéiques a été réalisée par piqueur semi-automatique SpotPicker (Proteomics Consult). L'image des gels (visuellement incolores) était projetée afin de cibler la bonne position dans le gel. Les pièces de gels ont été déposées en microplaque dans 100 μ L de solution d'éthanol à 10 %. Les gels ont été contre-scannés afin de vérifier le bon prélèvement des spots protéiques.

3.4.2.8. Digestion enzymatique et analyse par spectrométrie de masse

La préparation d'échantillon, *i.e.* l'extraction des protéines des pièces de gels et la digestion enzymatique, puis l'analyse spectrométrie de masse haute résolution (MALDI-TOF MS Ultraflex, Bruker Daltonics et ESI-FT MS Orbitrap Velos, ThermoFisher Scientific) ont été réalisées par l'équipe protéomique du CRCM (Centre de recherche en cancérologie à Marseille). Les protéines ont été identifiées par le logiciel SEQUEST par comparaison avec la base de données génomique du poisson zèbre (GRCz10).

3.5. Détection des complexes en condition non dénaturante

3.5.1. Chromatographie multiélémentaire par SEC-ICP SF MS

Une aliquote de 80 μL d'échantillon a été injectée sur une colonne d'exclusion stérique Superdex 200 10/300 (GE Healthcare, gamme de séparation 4-600 kDa) et a été éluée en tampon acétate d'ammonium à 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ par une chaîne HPLC 1200 series (Agilent). La détection des protéines a été réalisée par UV à 280 nm. La colonne a été calibrée avec un mélange de protéines commerciales (thyroglobuline 670 kDa, ferritine 474 kDa, transferrine 80 kDa, superoxyde dismutase 40 kDa, myoglobine 16 kDa, métallothionéine 6,8 kDa et cobalamine 1,3 kDa).

La détection des métaux a été réalisée par couplage du système HPLC avec un ICP MS haute résolution (Element XR, ThermoFisher Scientific). L'uranium (^{238}U) a été analysé en basse résolution ($R = 300$) afin de maximiser la sensibilité de détection, et les métaux ^{63}Cu , ^{56}Fe , ^{31}P et ^{64}Zn ont été analysés en moyenne résolution ($R = 4000$) afin de résoudre les interférences. Une procédure de rinçage de la colonne a été intégrée au run chromatographique. Après 30 minutes, 3 injections successives de 3 minutes de solution de carbonate d'ammonium à 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ et 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ d'EDTA ont été appliquées afin de libérer l'uranium de la colonne, ce qui a permis de maintenir un bruit de fond faible pour l'uranium (environ 100 coups) (**Figure 14**).

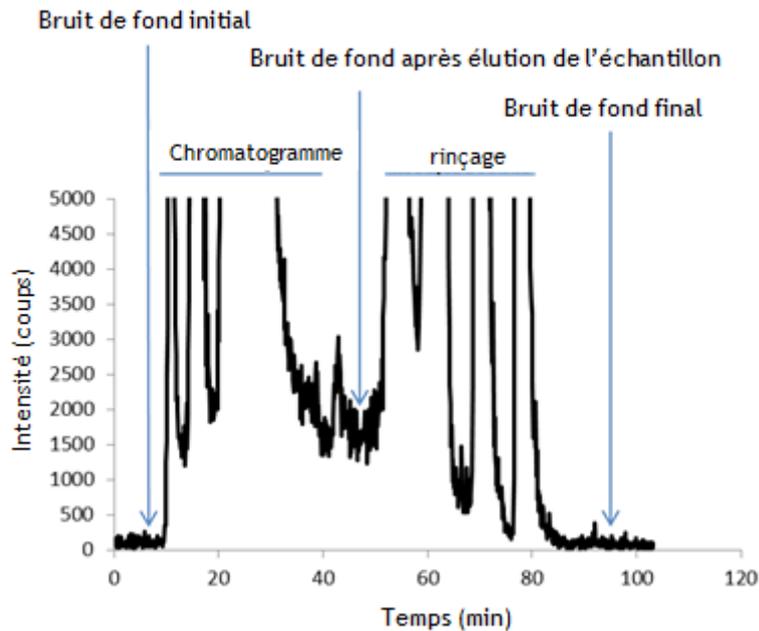


Figure 14 : Effet de la procédure d'élution sur le bruit de fond en uranium.

3.5.2. Séparation par électrophorèse hors gel

La séparation par électrophorèse hors gel a été réalisée par appareil Microtofor (Biorad). Un mélange de 3 mL d'échantillons (mélange à volume équivalent d'échantillons et dont la concentration protéique finale a été ajustée à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) et de solution d'ampholytes porteurs est introduit dans la chambre de focalisation. Cette chambre est constituée de 10 compartiments semi-perméables et est en contact avec deux solutions d'électrolytes cathodique ($0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaOH}$) et anodique ($0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$) (Figure 15). La séparation a été obtenue par application d'une tension (jusqu'à 1000 V à 1 W constant). Après génération du gradient de pH par la solution d'ampholytes porteurs, les protéines ont été focalisées en fonction de leur point isoélectrique.



Figure 15 : Chambre de focalisation (au centre) et les deux réservoirs cathodiques et anodiques

A l'issue de la séparation OGE, les fractions ont été prélevées par aspiration sous vide et récupérées dans un tiroir de récolte compartimenté. Dix fractions de 250 à 300 μ L ont été collectées. Ces fractions sont disponibles pour des analyses de mesures de pH, de dosages de protéines (section 3.3.2) et de métaux par ICP MS (section 3.3.1.1). De plus, il est possible de réaliser un couplage hors ligne avec la SEC - ICP MS décrite précédemment (section 3.5.1), ce qui permet de séparer les protéines et les complexes uranium-protéine selon deux dimensions (point isoélectrique et masse moléculaire), décrit en section 3.5.3. Enfin, il est également possible, d'identifier les protéines de ces fractions par spectrométrie de masse moléculaire (section 3.6).

3.5.3. Cartographie multiélémentaire par OGE x SEC - ICP SF MS

Les cartographies des métaux et protéines ont été réalisées par fusion des chromatogrammes issus de de chaque fraction OGE dont le pH a été mesuré. C'est l'interpolation linéaire de l'ensemble des points de coordonnées (pH, temps d'élution, intensité) par le logiciel Origin qui permet d'obtenir une cartographie telle que présentée en **Figure 16**. Cette représentation graphique par construction mathématique est à distinguer des cartographies pouvant être obtenues par d'autres méthodes analytiques d'imagerie telles que l'ablation laser où un pixel correspond à un point de mesure. Par conséquent, dans la représentation proposée, il est important de noter que la résolution selon l'axe x (pH) correspond au nombre de fractions OGE, c'est-à-dire 10, et non pas au nombre de pixels visuellement observables. Ainsi, la forme d'un même spot peut être différente d'une analyse à une autre, suivant le pH mesuré de la fraction.

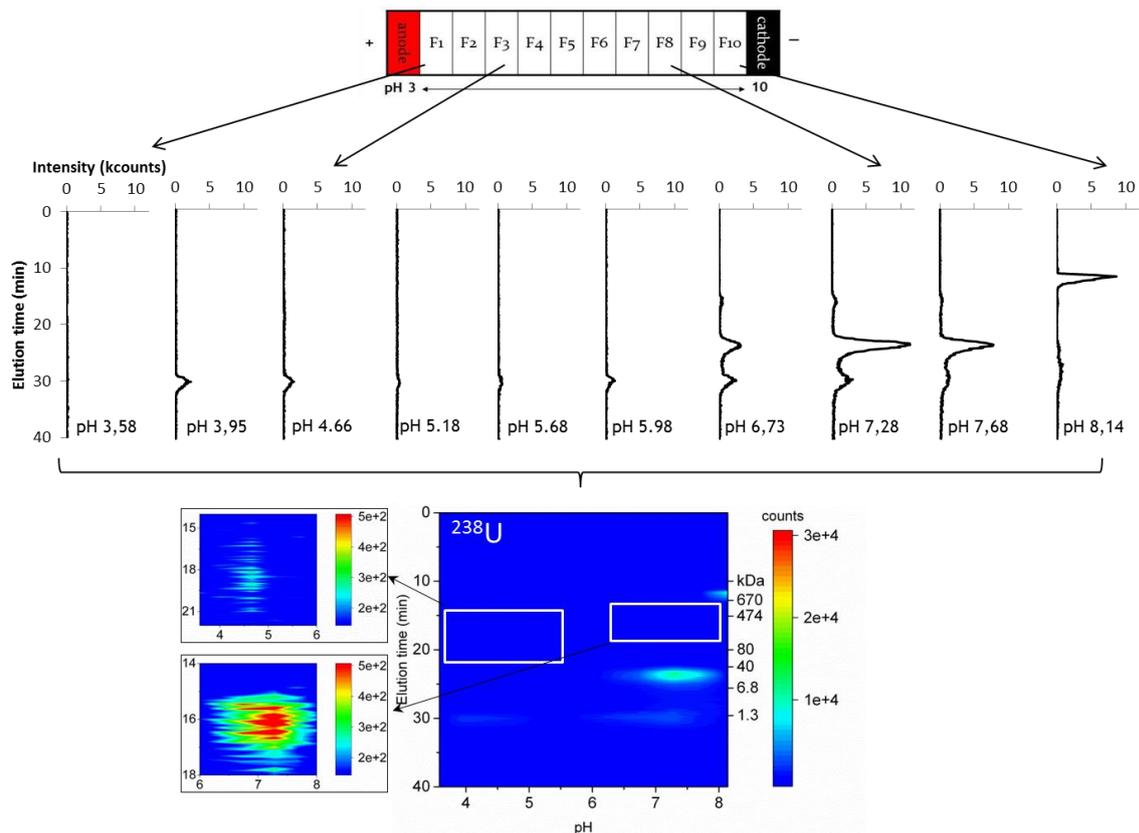


Figure 16 : Construction de la cartographie (pI x MM) à partir des chromatogrammes issus de chaque fraction OGE via logiciel Origin.

3.6. Identification des protéines par spectrométrie de masse

3.6.1. Préparation d'échantillon

Une aliquote de 50 μL de fraction OGE a été prélevée. Les échantillons ont préalablement été filtrés (filtre 10 kDa, Vivacon) sous centrifugation (14 000 g, 15 minutes) afin de retirer les ampholytes porteurs présents en abondance et qui pourraient contaminer le spectromètre de masse. Les protéines ont été récupérées du filtre par centrifugation à 2 500 g pendant 2,5 min. 20 μL de tampon NH_4CO_3 à 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8 ont été ajoutés. L'échantillon a été mis à incuber après ajout de 5 μL de DTT 45 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pendant 15 min à 50 °C. Après retour à température ambiante, 5 μL de IAA à 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ont été ajoutés et le mélange est incubé pendant 15 min à l'abri de la lumière. L'échantillon a ensuite été incubé pendant la nuit à 37 °C en présence de 1 μL de trypsine à 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. A l'issue, les peptides ont été récupérés après filtration (filtre 10 kDa, Vivacon) sous centrifugation à

14 000 g pendant 15 minutes. Le cas échant, les échantillons ont été concentrés sous vide (SpeedVac) pendant 30 minutes à 30 °C.

3.6.2. Paramètres d'analyse LC-ESI MS

Une aliquote de 8 µL d'échantillon a été injectée sur colonne C18 (300SB-C18 150 mm x 1 mm i.d. x 3.5 µm Zorbax) et a été éluée à 50 µL.min⁻¹ en gradient 0,05 % acide formique / acétonitrile par une chaîne chromatographique capillaire (Agilent 1100 capillary HPLC system, Agilent). L'analyse des peptides a été réalisée par spectromètre de masse moléculaire à haute résolution (Velos Orbitrap, ThermoFisher Scientific). L'acquisition des spectres a été définie en mode MS et MS/MS : suite à un premier scan MS, les 20 ions les plus intenses sont collectés et fractionnés pour une analyse des fragments (MS/MS). La limite minimale de sélection des ions a été fixée à 5000 coups afin de limiter la fragmentation d'ions non pertinents. De plus, la méthode a été programmée avec une liste noire dynamique afin d'accroître le nombre d'identification de peptides : à mesure de l'analyse, les ions analysés en MS/MS ne sont pas à nouveau retenus lors d'un nouveau scan MS. Ainsi, les éventuelles impuretés et les protéines abondantes ne sont pas détectées plusieurs fois au détriment de peptides moins abondants.

3.6.3. Traitement des données : PEAKS et bases de données des protéines

L'analyse des spectres a été réalisée par le logiciel de spectrométrie de masse PEAKS 6.5 (Bioinformatics Solution Inc.). La séquence en acides aminés des peptides a été déterminée à partir des spectres de masse MS et MS / MS. La recherche de modifications post-traductionnelles a également été ajoutée. Les paramètres utilisés pour le séquençage *de novo* des peptides sont indiqués dans le **Tableau 14**.

Les peptides identifiés ont ensuite été comparés avec la base de données de protéines UniProtKB, générée à partir de la base de données génomiques du poisson zèbre GRCz10 et annotée.

Tableau 14 : Paramètres fixés pour la détermination de la séquence en acide aminés des peptides

| Paramètre | Décision |
|-------------------------------------|--|
| Enzyme | Trypsine |
| Biais de masse de l'ion | 5 ppm |
| Biais de masse fragment | 0,5 Da |
| Nombre de misclivage | 0 à 4 |
| Nombre de charges de l'ion | 2 à 5 |
| Nombre de peptides uniques | 2 minimum |
| Modifications post-traductionnelles | Oxydation, déamidation, carboxyméthylation, phosphorylation, déshydratation, dihydroxylation |

3.7. Etude *in vitro* de complexation de l'uranium par mesure de fluorescence

Les expériences de fluorescence ont été réalisées en microplaques par spectrofluorimètre (Infinite 1000, Tecan).

Dans un premier temps, les longueurs d'onde d'émission et d'excitation optimales des solutions commerciales d'ampholytes porteurs ont été déterminées par scan 2D (intensité de fluorescence en fonction du couple longueur d'onde d'excitation - longueur d'onde d'émission). La linéarité de réponse de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en ampholytes porteurs a ensuite été vérifiée.

Dans un second temps, l'intensité de fluorescence a été mesurée pour chaque solution (ligand) en présence d'uranium, susceptible de provoquer une extinction de la fluorescence du ligand. L'effet de l'uranium sur l'émission de fluorescence des solutions d'ampholytes a été décrit par environ 15 points de mesure correspondant à une concentration croissante en uranium (de 0,5 à 600 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) pour une concentration en ligand. Plusieurs courbes (4 à 5) d'extinction de fluorescence (quenching) à différentes concentrations en ligand ont ainsi été obtenues. L'uranium a été mis à réagir avec les solutions commerciales d'ampholytes en tampon HEPES 50 mmol.L^{-1} à pH 7,4.

Les mélanges ont été réalisés par injecteur automatique. Chaque point de mesure a été réalisé en triplicat, et chaque courbe a été réalisée en duplicat. De plus, la mesure de la fluorescence a été réalisée en enceinte thermostatée à des températures variant de 15 °C à 35 °C, par incrément de 5 °C. La microplaque en quartz a été fermée par un couvercle en quartz également afin de limiter l'évaporation des échantillons au cours de la mesure.

Après mesure de fluorescence, le pH des mélanges a été vérifié par un pH-mètre muni d'une électrode de verre et 50 μL de mélange ont été prélevés pour vérifier la concentration en uranium par ICP MS.

Chapitre IV

Résultats et discussions (partie 1) : Développements analytiques

4. Résultats et discussions (Partie 1) : développements analytiques pour l'analyse des complexes U-protéine

4.1. Optimisation de l'extraction de complexes dans la gonade de poisson zèbre

4.1.1. Extraction des protéines et complexes en tampon non dénaturant

Le protocole de préparation d'échantillon a été déterminé sur la base de développements précédemment réalisés au laboratoire pour l'extraction et le fractionnement subcellulaire des complexes uranium-protéine en condition non dénaturante (Frelon et al. 2013).

Suite à la problématique mise en évidence dans la bibliographie sur les ovaires, leur hétérogénéité cellulaire et l'important rôle de la vitellogénine, plusieurs questions émergent et notamment celle de l'existence dans l'ovocyte d'un compartiment subcellulaire (organite, vésicule, ...) particulièrement concentré en protéines potentiellement enrichi en uranium après exposition, ou celle d'une distribution distincte des protéines entre des femelles « reproduites » et « non reproduites ». Ainsi, l'objectif des mises au point présentées dans ce chapitre a été de déterminer une fraction enrichie en protéines, en particulier en vitellogénine, candidate à la complexation du fait de ses nombreux groupements phosphorylés. De plus, le protocole devait être déterminé de sorte à limiter les risques de dénaturation des complexes uranium-protéine, à savoir une extraction en tampon physiologique, à faible température et un nombre d'étapes limité. L'extraction étant basée sur une lyse cellulaire suivie d'une centrifugation, les paramètres sur lesquels l'optimisation s'est portée et qui seront discutés par la suite sont principalement la vitesse de centrifugation et le nombre d'étapes nécessaires pour obtenir la fraction d'intérêt. Cependant, le mode d'extraction et le choix du tampon sont tout de même brièvement traités ci-après.

Le choix du tampon a été déterminé par deux contraintes : le besoin de préserver les complexes dans un tampon faiblement complexant pour l'uranium et celui de maintenir l'échantillon dans un tampon ayant des propriétés physico-chimiques proches des paramètres physiologiques (pH, osmolarité). L'extraction des protéines en tampon HEPES / sucrose a donc été choisie, sur la base des développements (Frelon et al. 2013) et applications précédents (Xu et al. 2014). La libération du contenu cellulaire par broyage à piston Potter-Elvehjem a été choisie à partir de la comparaison des différents moyens d'extraction protéiques, physiques, chimiques et enzymatiques et la possibilité d'extraction dans la glace (Bucher 2013).

Le fractionnement subcellulaire a été réalisé par centrifugation à 4°C. Trois protocoles ont été comparés sur la base d'informations d'études précédentes (Frelon et al. 2013) et d'informations extraites de la littérature plus spécifiquement focalisées sur la gonade (Kondo et al. 1997; Tan et al. 2009; Hanna and Zhu 2011). Les protocoles testés ont été appliqués aux 6 mêmes échantillons non contaminés (provenant du groupe de poissons dédié à la mise au point des techniques analytiques), 3 femelles reproduites et 3 femelles non reproduites, afin de prendre en compte d'éventuelles différences entre les fractions, du fait de la différence de degré de maturation du contenu ovocytaire. Les caractéristiques de reproduction et la masse des gonades sont présentés dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 : Caractérisation du succès reproducteur et masse des gonades des femelles utilisées pour la mise au point des protocoles. Le nombre d'œufs et le taux de fertilisation a été déterminé à 3 heures post-fertilisation. R, femelle reproduite ; NR femelle non reproduite.

| N° femelle | Nb. œufs pondus | % œufs fertilisés | m gonades |
|------------|-----------------|-------------------|-----------|
| R 5 | 642 | 93,5 | 33,0 mg |
| R 6 | 304 | 83,2 | 45,8 mg |
| R 12 | 241 | 32,8 | 34,0 mg |
| NR 4 | - | - | 53,7 mg |
| NR 5 | - | - | 86,9 mg |
| NR 6 | - | - | 83,5 mg |

4.1.2. Détermination de la fraction subcellulaire d'intérêt

Tout d'abord, chaque échantillon de gonade a été divisé en 3 fractions, un pour chaque protocole, afin de comparer ces protocoles entre eux et ainsi limiter la variabilité due à la diversité interindividuelle. Les protocoles issus de l'étude bibliographique n'étaient pas applicables en l'état du fait de la présence, dans les procédures d'extraction, d'agents dénaturants des protéines (Wang and Ge 2003) comme le thiocyanate de guanidine ou d'éléments chimiques complexants de l'uranium tels que les ions phosphates dans la solution de Hank. Différents protocoles de fractionnement subcellulaires ont été comparés pour déterminer la fraction d'intérêt. En particulier, une étude a mis en évidence le fusionnement des vésicules vitellines dans l'ovocyte à 10 000 g, à 4°C et en tampon Ficoll (Kondo et al. 1997). Cette vitesse de centrifugation à 10 000 g a donc été retenue pour l'un des protocoles (**Tableau 16** - Protocole 1). Les autres fractions subcellulaires considérées ont été les lysosomes isolés à 29 700 g, qui éliminent notamment les protéines

dégradées et les agrégats métalliques, (Nordberg et al. 1994; Frelon et al. 2013) et le cytosol (Bucher et al. 2014), sensible aux métaux (Geffard et al. 2010) et précédemment investigué à 100 000 g (Protocole 2). Enfin, il a été choisi pour le protocole 3, le plus court, une première centrifugation à 900g afin de sédimenter les débris cellulaires et tissulaires suivi d'une centrifugation à 100 000 g.

Tableau 16 : Protocoles testés pour la détermination de la fraction d'intérêt.

| Protocole 1 : | Protocole 2 : | Protocole 3 : | Fraction isolée |
|---|---|---------------------------------------|---|
| Broyage | Broyage | Broyage | |
| Centrifugation (4°C, 900g, 15min) | Centrifugation (4°C, 900g, 15min) | Centrifugation (4°C, 900g, 15min) | Cytoplasme (surnageant) |
| Centrifugation (4°C, 10 000g, 20min) | | | Vésicules vitellines (fusion) |
| | Centrifugation (4°C, 29 700g, 20min) | | Lysosome (culot) |
| Centrifugation (4°C, 100 000g, 1h) | Centrifugation (4°C, 100 000g, 1h) | Centrifugation (4°C, 100 000g, 1h) | Cytosol (surnageant) |

Afin de comparer ces protocoles, les différentes fractions ont été caractérisées par dosage protéique, chromatographie liquide non dénaturante SEC-UV et gel d'électrophorèse dénaturant SDS-PAGE suivi d'un transfert sur membrane et de l'immunodétection de la vitellogénine. Un exemple de schéma des analyses effectuées est proposé pour le protocole 1 (Figure 17). Les analyses SDS-PAGE n'ont pas pu être menées pour les phases lipidiques du fait de la faible quantité en protéines présentes dans la fraction.

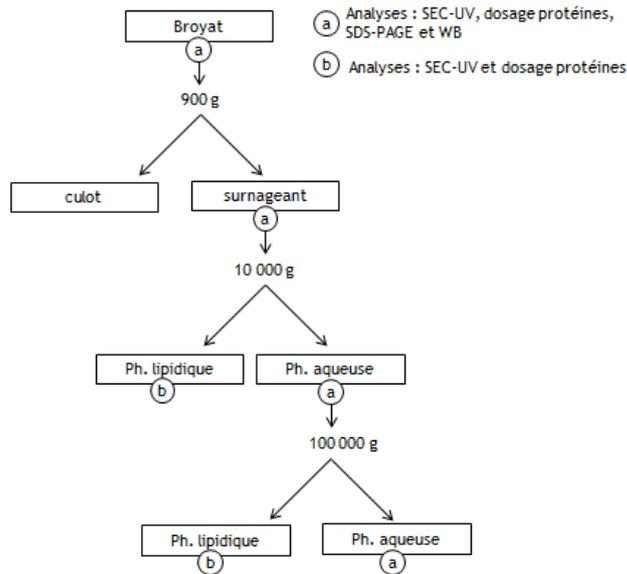


Figure 17 : Analyses menées pour caractériser les différentes fractions, exemple pour le protocole 1.

Le dosage des protéines a été réalisé dans l'ensemble des fractions. Les résultats pour le protocole 1 sont donnés dans la **Figure 18**. Le dosage des protéines montre que le contenu protéique est principalement retrouvé dans le surnageant après centrifugation à 900 g et dans la phase supérieure à 29 700 g, pour les femelles reproduites (panneau A) et non reproduites (panneau B). A 100 000 g, environ la moitié de la quantité initiale en protéine est mesurée dans la phase supérieure. La perte en matériel peut s'expliquer par la multiplication des étapes de centrifugation et prélèvement du protocole.

La concentration en protéines varie fortement d'un individu à un autre, notamment entre les femelles reproduites et non reproduites. Lors des différentes centrifugations, un faible contenu protéique est présent dans le culot ou la phase inférieure. Ainsi, il semblerait que le contenu vitellogénique, prédominant dans l'ovocyte n'ait pas sédimenté lors des différentes centrifugations.

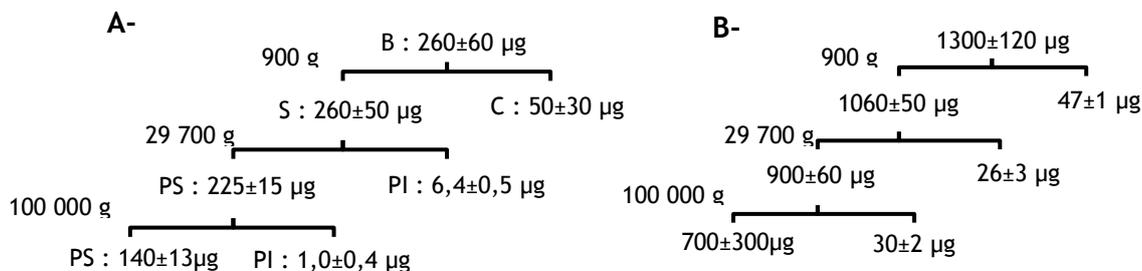


Figure 18 : Répartition des protéines entre les différentes fractions subcellulaires du protocole 2 (broyat, après centrifugations à 900 g, 10 000 g et 100 000 g) pour une femelle reproduite (panneau A) et non

reproduite (panneau B). Abréviations : B broyat, S surnageant, C culot, PS phase supérieure, PI phase inférieure.

Ces mêmes fractions ont été analysées par SEC-UV afin de comparer la distribution des protéines en condition non dénaturante. La comparaison des chromatogrammes obtenus pour les trois protocoles après analyse d'un échantillon issu de femelle non reproduite est donnée dans la **Figure 19**.

L'une des premières observations concerne la comparaison des broyats. Bien que provenant du même poisson, les trois fragments préparés séparément présentent des différences, en particulier un pic à 12 min, correspondant à des agrégats protéiques présents dans le volume mort, d'intensité plus faible pour le broyat du protocole 3. Ceci reflète l'hétérogénéité du contenu cellulaire de la gonade. En effet, l'échantillon congelé de gonade a été coupé en 3 fragments qui correspondent donc à trois localisations de la gonade dont la composition en ovocytes à différents stades de développements et en cellules de soutien peut ne pas être tout à fait homogène.

Pour les trois protocoles, en comparant le broyat et le surnageant de la première centrifugation (cytoplasme), peu de différences sont observées entre les chromatogrammes. De plus, la différence d'intensité des pics entre l'extrait protéique et la fraction subcellulaire est faible. Le contenu protéique des cellules est donc principalement dans les différents compartiments du cytoplasme.

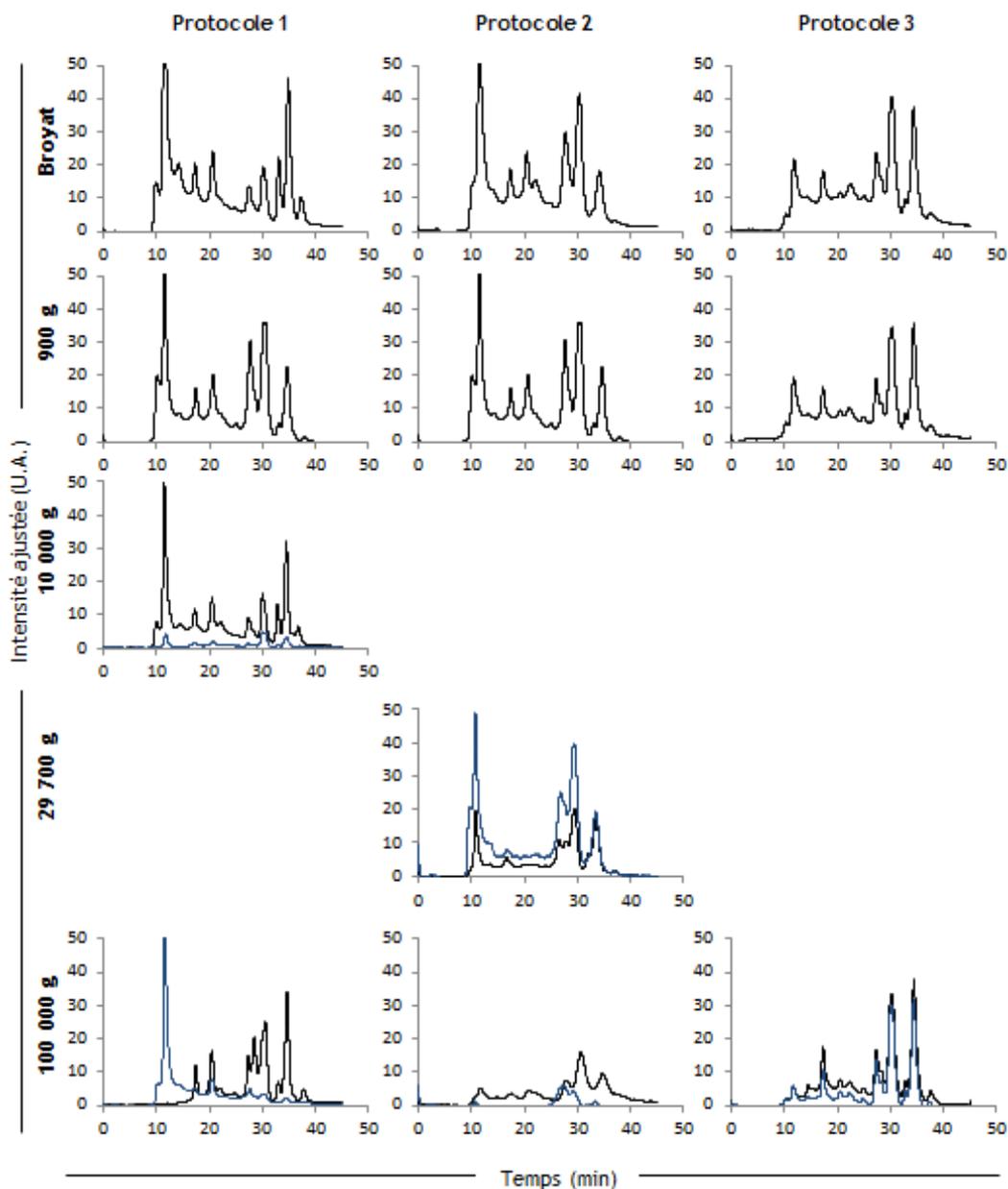


Figure 19 : SEC-UV de fractions subcellulaires de femelle non reproduite : broyat, surnageant à 900 g, phases aqueuses (en noir) et lipidiques (en bleu) à 29 700 g et 100 000 g). Colonne SEC GE Healthcare 200 Increase, 100 mmol.L⁻¹ acétate d'ammonium pH 7,4, 0,7 ml.min⁻¹, UV 254 nm.

Après centrifugation à 10 000 g, l'ensemble des pics chromatographiques de la fraction de la phase aqueuse (Figure 19, 3^{ème} ligne, en noir) est retrouvé par rapport au surnageant à 900 g, mais l'intensité de ces pics est globalement plus faible. Le chromatogramme de la phase lipidique (Figure 19, 3^{ème} ligne, en bleu) présente des pics chromatographiques d'intensité plus faible, indiquant qu'une faible proportion des protéines est présente dans cette fraction. Ainsi, par rapport à Kondo *et al.* ayant montré la fusion des vésicules vitellines et leur séparation du cytoplasme dans un ovocyte entier, il semble qu'après extraction des protéines, cette vitesse de centrifugation ne permet pas d'isoler les

vésicules vitellines. A des vitesses de centrifugations plus élevées, 29 700 g (Figure 19, 4^{ème} ligne) et 100 000 g (Figure 19, 5^{ème} ligne, colonne 3), il semble que les protéines sont partagées entre les deux phases. En effet, les deux chromatogrammes des deux phases lipidiques et aqueuses présentent des pics d'intensité proche pour les mêmes temps de rétention.

Par conséquent, sur la base de ces observations, il semblerait que la fraction cytosolique (100 000 g) et la fraction appauvrie en lysosome (29 700 g) ne soient pas les plus pertinentes pour notre étude. Peu de différences sont observées entre le cytoplasme (900 g) et la fraction subcellulaire à 10 000 g qui aurait pu contenir les vésicules vitellines. Des analyses complémentaires ont été menées par SDS-PAGE et WB avec immunodétection anti-vitellogénine afin d'observer d'éventuelles différences sur gel et plus spécifiquement pour cette protéine, d'intérêt dans le développement ovocytaire. Les résultats de la répartition des protéines et de la vitellogénine sont présentés dans la **Figure 20** pour un échantillon de femelle non reproduite dans différentes fractions subcellulaires. Six bandes protéiques sont principalement observées, à 100 kDa, 66 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 27 kDa et 24 kDa. Les quatre pistes de migrations, correspondant aux fractions subcellulaires obtenues suite aux centrifugations à 900 g, 10 000 g, 29 700 g et 100 000 g, ne présentent pas de différences notables pour les six bandes protéiques principales (pistes de gauche, en jaune). Après immunodétection anti-vitellogénine (pistes de droite, en blanc), deux bandes principales autour de 25 kDa sont observées ainsi qu'une série de quatre bandes protéiques de plus faible intensité pour les fractions subcellulaires issues des centrifugations à 900 g, 10 000 g et 100 000 g. Après centrifugation à 100 000 g en revanche, des fragments de la vitellogénine de tailles plus importantes (50, 66 et 100 kDa) sont observés.

Cette expérimentation nous permet de remarquer qu'à 900, 10 000 et 29 700g, les bandes de protéines détectées par l'anticorps anti-vitellogénine sont présentes à une masse moléculaire bien plus faible que celle de la vitellogénine totale (150 kDa). Cette observation suggère que la vitellogénine serait lysée en plusieurs fragments (de 27 kDa et moins) dans l'ovocyte. Les différences observées à 100 000 g par rapport aux autres vitesses de centrifugation pourraient être due à une proportion différente des protéines, et en particulier des fragments de la vitellogénine (les fragments de taille plus faible (26 kDa et inférieurs à 20Kda) étant moins intenses). En revanche, ni la vitellogénine de poisson zèbre, ni ses fragments ne sont disponibles commercialement pour poursuivre cette étude.

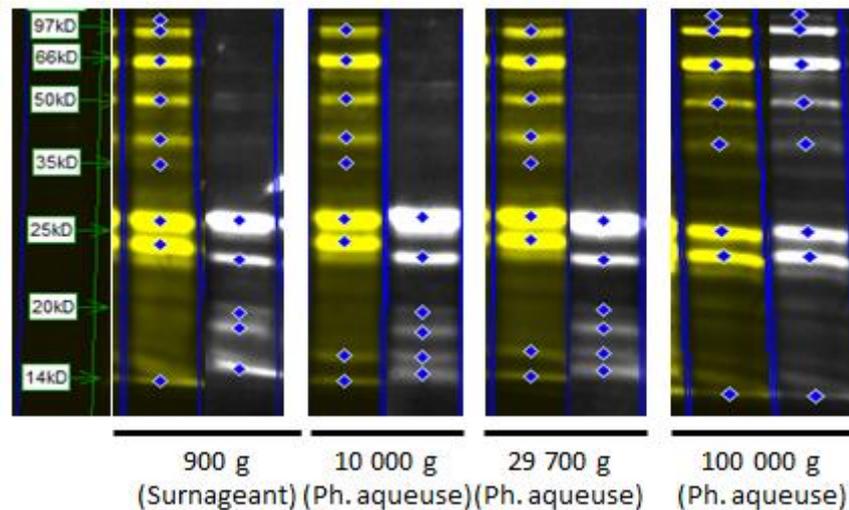


Figure 20 : Séparation par SDS-PAGE des protéines pour les fractions subcellulaires après centrifugation à 900 g, 10 000 g, 29 700 g et 100 000 g. Exemple pour un échantillon de gonade de femelle non reproduite. Piste de gauche : protéines totales, piste de droite : signal anti-vtg.

Ainsi, l'absence de raffinement de l'extrait protéique suite au fractionnement subcellulaire est confirmée par deux approches analytiques différentes. Sur cette base, il a donc été choisi de ne conserver que la première centrifugation à 900 g dans le protocole de préparation d'échantillon afin de réduire le temps de préparation de l'échantillon et éviter la dénaturation des complexes protéiques.

4.2. Optimisation des paramètres OGE

4.2.1. Choix de l'ampholyte porteur

Lors des développements menés dans le cadre du programme ST MALO, un faible taux de recouvrement avait été observé pour la séparation OGE (environ 25%). Sur la base de la littérature, il a été remarqué que les ampholytes porteurs pouvaient constituer une source d'agents complexants, du fait de la présence de groupements acides carboxyliques, phosphoniques ou aminés. Dans la mesure où il n'est pas possible de constituer un cocktail d'ampholytes porteurs dédiés à l'analyse des complexes uranium-protéines, trois solutions commerciales (Servalyt, Biolyte, Pharmalyte) ont été comparées. Pour ce faire, trois paramètres ont été étudiés pour évaluer le potentiel complexant des ampholytes porteurs : i) la quantification de l'U et des métaux en solution par dosage ICP MS, ii) la détermination de constantes apparentes de complexation des ampholytes porteurs pour l'U par extinction de fluorescence (également appelé quenching de fluorescence par la suite)

et iii) l'évaluation du pouvoir déplaçant des ampholytes porteurs pour les complexes des échantillons par SEC-ICP MS.

4.2.1.1. Dosage de métaux dans les solutions mères d'ampholytes porteurs par ICP MS

La teneur en métaux (^{238}U , ^{56}Fe , ^{63}Cu et ^{64}Zn) a été évaluée par dosage ICP MS pour chacune des trois solutions commerciales d'ampholytes porteurs. Les résultats sont reportés dans le **Tableau 17**. Ce dosage permet de mettre en évidence l'apport en métaux à l'échantillon lors de la séparation par OGE et de son analyse élémentaire. Il est intéressant de noter que, selon la solution commerciale utilisée, les concentrations en métaux varient fortement (d'un facteur 100 environ entre Biolyte et Pharmalyte pour l'uranium). Ces variations sont dues à la composition chimique de la solution d'ampholytes porteurs ainsi qu'aux processus chimiques par lesquels cette solution a été synthétisée et conditionnée.

Tableau 17 : Teneur en métaux (U, Fe, Cu, Zn) dans les solutions commerciales d'ampholytes porteurs Biolyte, Servalyt et Pharmalyte.

| Métal | Biolyte | Servalyt | Pharmalyte |
|---|-----------------|-----------------|------------------|
| ^{238}U ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | $0,11 \pm 0,02$ | $4,68 \pm 0,14$ | $13,08 \pm 0,24$ |
| ^{56}Fe (mg.L^{-1}) | $1,21 \pm 0,03$ | $1,95 \pm 0,05$ | $4,50 \pm 0,29$ |
| ^{63}Cu (mg.L^{-1}) | $2,12 \pm 0,06$ | $0,49 \pm 0,02$ | $0,86 \pm 0,04$ |
| ^{64}Zn (mg.L^{-1}) | $2,43 \pm 0,09$ | $1,33 \pm 0,08$ | $2,07 \pm 0,08$ |

Ainsi, pour le cas d'une concentration en ampholytes porteurs à 1,5 %, qui sera définie comme concentration optimale pour réaliser la séparation OGE en tampon HEPES / sucrose (section 4.2.4.2), l'apport en uranium de chacune des solutions d'ampholytes porteurs est de 0,012 ; 0,53 et 1,5 ng pour Biolyte, Servalyt et Pharmalyte, respectivement. A titre de comparaison, la quantité en uranium apportée par l'échantillon utilisé pour le développement OGE (0,5 mg.ml⁻¹ en protéines) est de 1,97 ng. A noter que la contribution en uranium apportée par le tampon HEPES / sucrose est négligeable, la concentration en uranium de la solution mère étant inférieure à la limite de détection de l'ICP MS. Sur la

base de ces dosages, Biolyte semble donc la solution commerciale la plus adaptée. Toutefois, cette information seule n'est pas suffisante et il est important d'évaluer le potentiel de complexation des ampholytes porteurs pour l'uranium.

4.2.2. Détermination de K_d apparent des ampholytes porteurs par quenching de fluorescence

Une expérience par quenching de fluorescence pour trois ampholytes porteurs a été réalisée afin d'évaluer la constante de complexation des ampholytes porteurs pour l'uranium. Cependant, les ampholytes porteurs étant constitués d'un mélange complexe de molécules (Simo et al. 2006), seule une constante apparente de complexation globale est susceptible d'être déterminée. Cette approche ne prend donc pas en compte chaque type de ligand potentiel de l'uranium. De plus, cette approche ne permet pas de mesurer de façon exhaustive la complexation de l'uranium, puisque seuls les mécanismes de fixation de l'uranium qui entraînent une extinction de la fluorescence sont pris en compte. L'hypothèse de travail pour la détermination de cette constante est que, malgré la diversité des molécules présentes dans la solution, les sites d'affinité pourraient être les mêmes : acides carboxyliques, phosphoniques et aminés pour Biolyte, Servalyt et Pharmalyte respectivement et que l'approche de fluorescence devrait permettre de donner une caractérisation qualitative des solutions d'ampholytes. Une courbe d'extinction de fluorescence est présentée dans la **Figure 21** : la fluorescence de la solution d'ampholytes porteurs diminue avec une concentration croissante d'uranium.

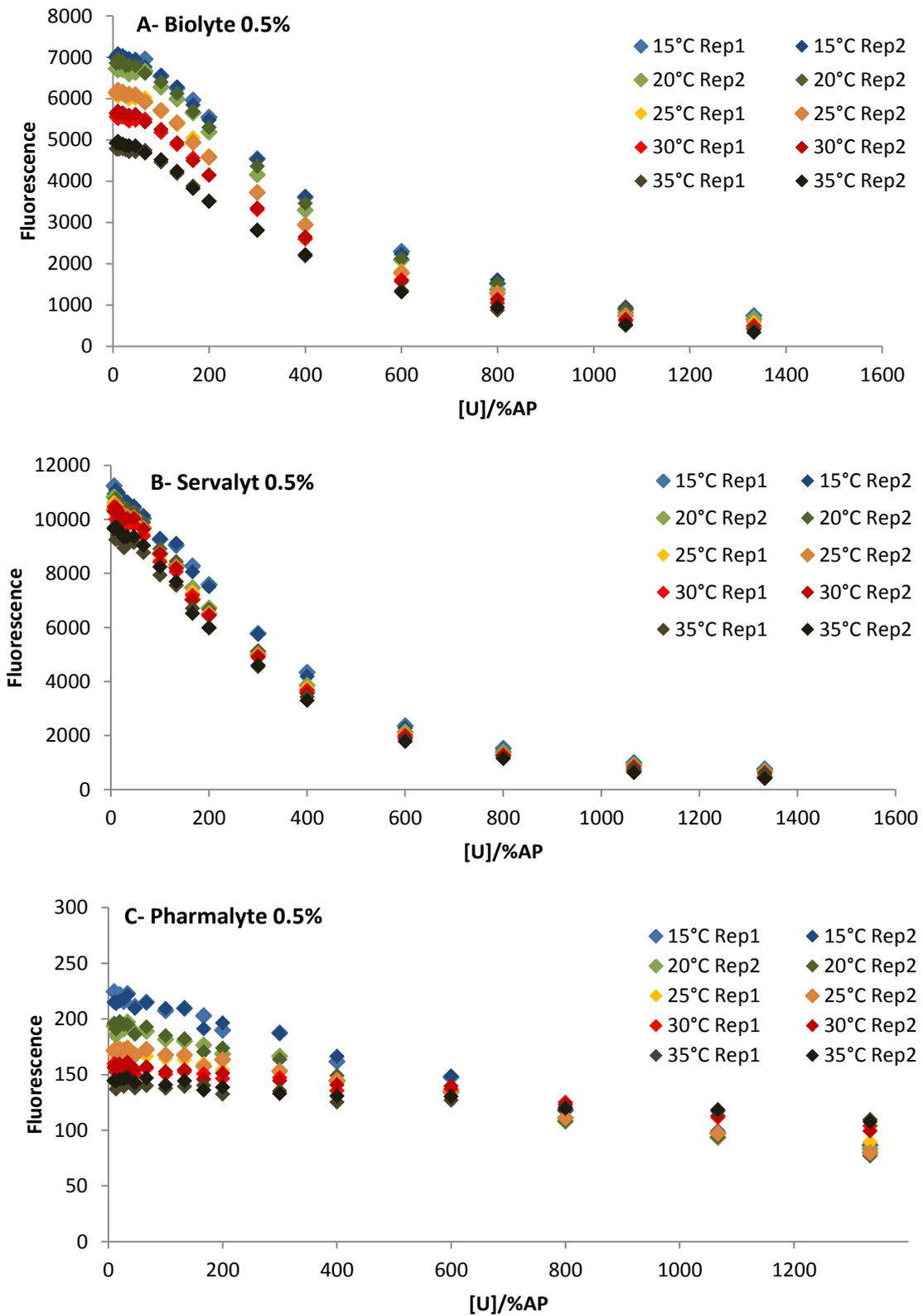


Figure 21 : Quenching de fluorescence de solutions d'ampholytes porteurs Biolyte, Servalyt et Pharmalyte par l'uranium. Intensité de fluorescence en ordonnée, concentration en U divisé par le pourcentage en AP en abscisse. La concentration en U varie de 0,8 à 600 $\mu\text{mol.L}^{-1}$

Une première approche pour déterminer la constante de complexation a été réalisée par résolution graphique (**Figure 22**). Cette approche suppose qu'il n'y a qu'un seul type de fluorophore en solution. Ce fluorophore est susceptible d'être complexé par une petite molécule appelée quencher (Q). Dans ce cas, la fluorescence émise est dite *quenchée*. Deux types de quenching sont possibles : le quenching statique et le quenching dynamique (Lakowicz 1983). Dans les deux cas, l'équation de Stern-Volmer associée est linéaire et de la forme :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q]$$

avec F_0 fluorescence initiale, F fluorescence en présence de quencher, $[Q]$ concentration en quencher et K_{SV} constante de Stern-Volmer.

Dans le cas d'un quenching dynamique, $K_{SV} = k_q \tau_0$ avec k_q constante de quenching bimoléculaire et τ_0 temps de vie de fluorescence en présence de quencher, il n'est pas possible de déterminer la constante de complexation uranium-ligand. En revanche, dans le cas d'un quenching statique, K_{SV} est la constante de complexation uranium-ligand.

Seul le quenching de fluorescence observé pour la solution d'ampholytes de Pharmalyte peut être décrit par l'équation de Stern-Volmer. L'influence de la température sur le quenching de fluorescence (**Figure 23**) montre que K_{SV} augmente avec la température. En conséquence, le type de quenching est dominé par des phénomènes dynamiques, et ne peut donc pas être relié à une constante de complexation entre l'uranium et les mélange d'ampholytes (Lakowicz 1983). La constante globale de complexation ne peut donc pas être calculée pour Pharmalyte.

Les résultats de fluorescence obtenus pour les solutions d'ampholytes porteurs Servalyt et Biolyte ne peuvent pas être décrits par l'équation de Stern-Volmer, le quenching de fluorescence semble combiné : statique et dynamique. En conséquence, le quenching de fluorescence est décrit par l'équation modifiée de Stern-Volmer : $\frac{F_0}{F} = (1 + K_D [Q])(1 + K_S [Q])$, avec K_D constante de quenching dynamique et K_S constante de quenching statique.

La représentation linéaire est de la forme :

$$\frac{F_0}{F} = a[Q] + b, \text{ avec l'ordonnée } b = K_S + K_D \text{ et la pente } a = K_S K_D.$$

Les courbes de quenching de fluorescence des ampholytes porteurs Biolyte et Servalyt sont bien décrites par l'équation de Stern-Volmer modifiée mais les calculs ne permettent pas de déterminer K_S et K_D ; le système d'équations n'admet pas de solutions. Il ne semble

donc pas possible de déterminer une constante d'affinité apparente pour les solutions Biolyte et Servalyt, ce qui pourrait indiquer plusieurs types de sites de complexations.

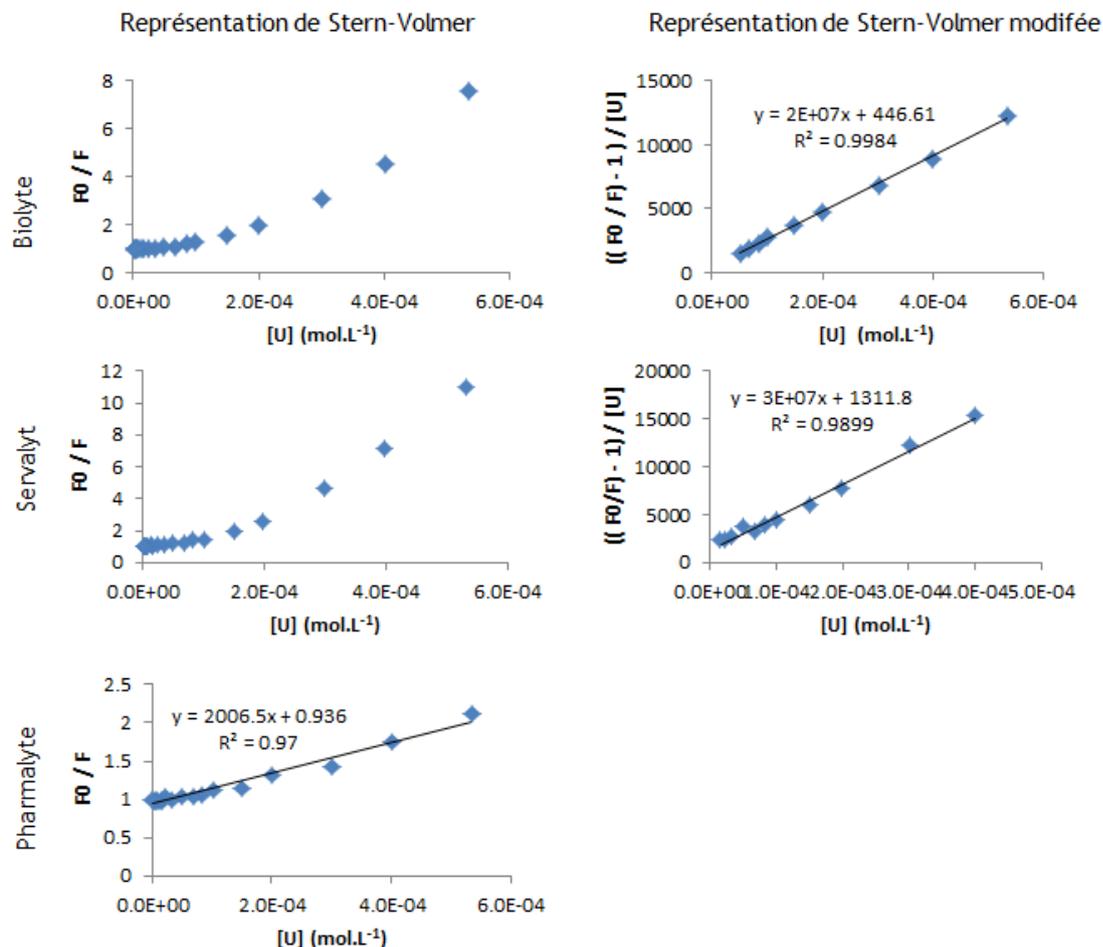


Figure 22 : Représentation de Stern-Volmer pour la détermination de constante de complexation.

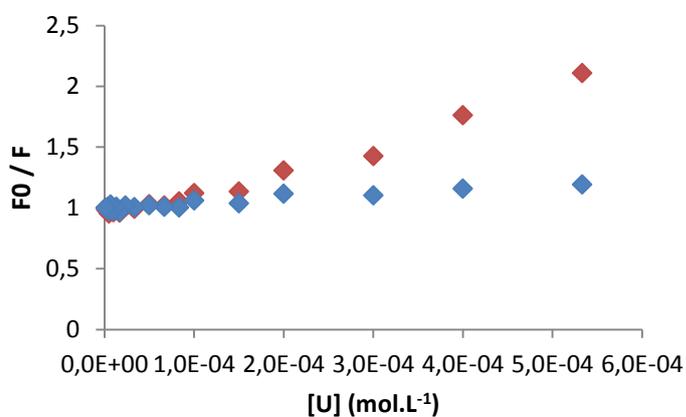


Figure 23 : Influence de la température sur le quenching de fluorescence de Pharmalyte par l'uranium, à 15°C (en bleu) et 35°C (en rouge)

En conclusion, l'approche de quenching de fluorescence nous a permis de démontrer qu'il existe une interaction entre ampholytes et uranium mais il n'a pas été possible de déterminer une constante d'affinité apparente avec l'U pour les solutions Biolyte et Servalyt, sans doute à cause de la variété des composants de ces solutions et des ligands potentiels de l'uranyle.

4.2.3. Evaluation de la complexation des ampholytes porteurs (AP) par SEC-ICPMS

En complément de l'expérience par quenching de fluorescence, cette expérience a été réalisée afin d'évaluer le déplacement potentiel de l'uranium des complexes U-protéine des échantillons contaminés par les ampholytes porteurs. A partir des résultats précédents (dosage et quenching de fluorescence des solutions d'ampholytes porteurs), seules les solutions de Pharmalyte (témoin « positif » de complexation) et de Biolyte (solution la plus dépourvue en U), ont été testées. Un même échantillon a été analysé par SEC-ICP MS en absence et en présence d'ampholyte porteur. Les concentrations en protéines et en ampholytes porteurs ont été déterminées sur la base des développements OGE décrits dans le paragraphe suivant, à savoir $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ de protéines en tampon HEPES / sucrose et 1,5 % de solution commerciale d'ampholytes porteurs Biolyte et Pharmalyte.

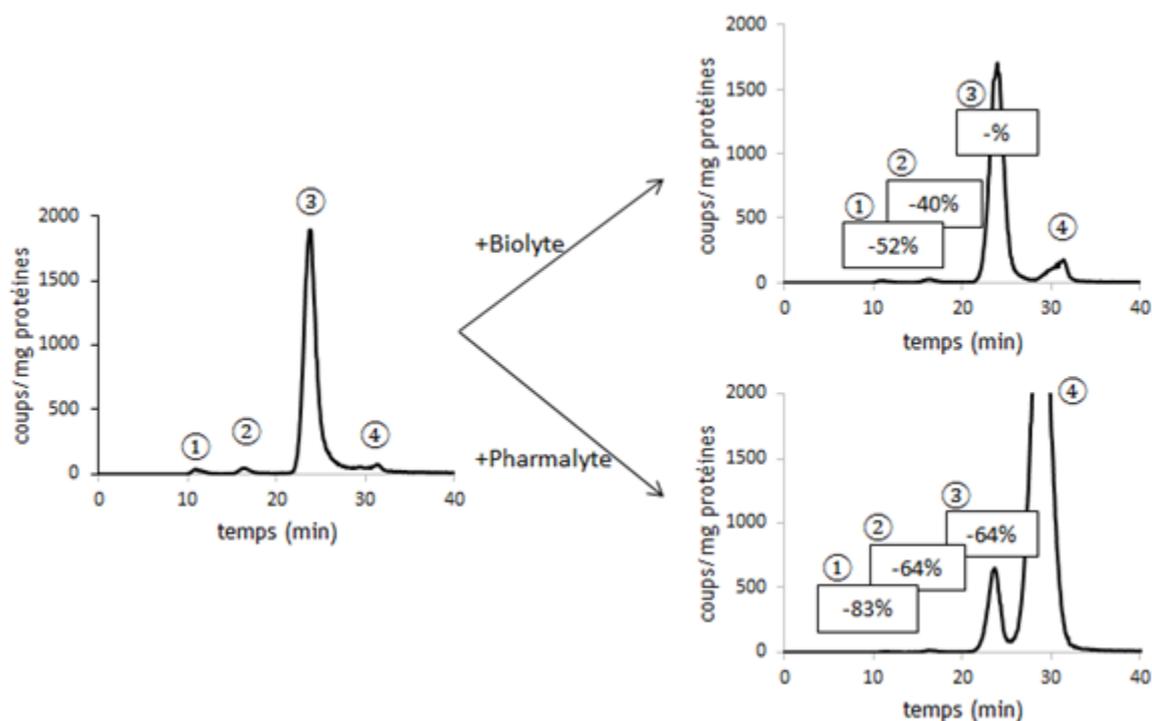


Figure 24 : SEC d'un extrait protéique de poissons zèbres contaminés non reproduit en absence (à gauche) et en présence d'ampholytes porteurs (à droite) Biolyte 1,5 % en haut, pharmalyte 1,5 % en bas.

La **Figure 24** montre les chromatogrammes obtenus pour un extrait protéique de gonade de poissons zèbres après contamination, avant et après ajout d'ampholytes porteurs Biolyte et Pharmalyte. La comparaison des aires de pics de l'échantillon seul ou en présence d'ampholytes porteurs permet de remarquer que la solution Biolyte a moins d'effet sur les complexes protéine-uranium que la solution pharmalyte. En effet, le pic principal d'uranium (pic 3) ne présente pas de variation d'amplitude suite à l'ajout de Biolyte alors que son aire décroît de 64 % en présence de Pharmalyte à concentration équivalente. En revanche, l'effet complexant des ampholytes porteurs est observé avec les deux solutions pour les deux pics de plus faible intensité au temps de rétention 11 et 15 min (pics 1 et 2), avec une diminution de 52 % et 40 % respectivement pour Biolyte et de 83 % et 64 % respectivement pour Pharmalyte. De plus, l'aire du pic 4, correspondant au volume d'exclusion stérique (29 min) est nettement plus important pour Pharmalyte par rapport à Biolyte. L'uranium présent dans ce pic est dû en partie à la complexation de l'uranium de l'échantillon mais également à l'uranium apporté par la solution d'ampholyte porteur (section 4.2.1.1).

En conclusion, sur la base du dosage des solutions et de l'évaluation de la complexation des échantillons par les ampholytes porteurs, il a été choisi de mener les analyses par OGE avec la solution commerciale Biolyte.

4.2.4. Optimisation des paramètres IEF sur des mélanges protéiques synthétiques

4.2.4.1. Influence du tampon sur la séparation électrophorétique

Dans cette partie, les développements ont été initialement menés sur Pharmalyte. Les paramètres ajustables étaient les suivants : la nature de la solution d'ampholyte porteur, le type de tampon, la concentration en ampholytes porteurs, la concentration en tampon, la concentration en protéines.

L'effet du tampon a tout d'abord été évalué sur la capacité de l'instrument à focaliser les protéines. En effet, initialement, deux schémas de séparation pouvaient être envisagés : 1) séparation de l'échantillon par SEC suivi de la séparation par OGE des pics chromatographiques collectés ou 2) séparation par OGE de l'extrait protéique suivie de la séparation chromatographie de chaque fraction OGE. Ainsi, dans le premier cas, les échantillons sont présents en tampon d'élution de la chromatographie liquide, à savoir un

tampon 100 mmol.L⁻¹ d'acétate d'ammonium, à pH 7,4 ; dans le second cas, l'échantillon est présent dans son tampon d'extraction 25 mmol.L⁻¹ HEPES, 250 mmol.L⁻¹ sucrose, à pH 7,4. Or, dans les deux cas, la concentration en tampon est plus élevée que les recommandations du fournisseur, qui fixe la limite de concentration en sels à 10 mmol.L⁻¹.

Cette limitation en concentration de tampon est basée sur le fait que les ampholytes porteurs tamponnent et focalisent l'ensemble des molécules présentes en solution, à savoir protéines et molécules de tampon. Une expérience de focalisation du tampon (acétate d'ammonium ou HEPES/sucrose), en l'absence de protéines, avec une concentration élevée en ampholyte porteur (Pharmalyte 2%) a été réalisée afin d'évaluer la possibilité de l'utilisation des deux tampons.

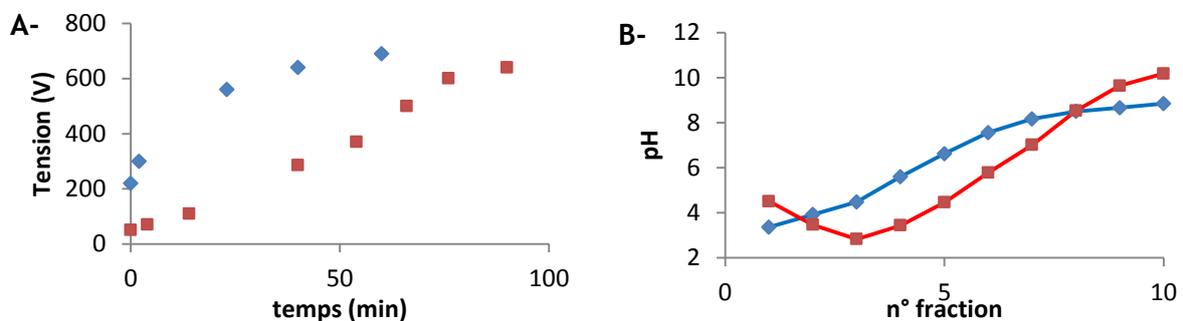


Figure 25 : Influence du tampon sur la qualité de séparation OGE : tension en fonction du temps de focalisation (panneau A) et pH mesuré dans les fractions (panneau B). En carrés rouges, tampon acétate d'ammonium ; en losanges bleus, tampon HEPES / sucrose.

La focalisation du tampon et la génération d'un gradient de pH sont possibles en HEPES / sucrose. La courbe de tension en fonction de pH (Figure 25, panneau A, en losanges bleus) est caractéristique de la focalisation OGE, à savoir une première phase d'augmentation de la tension dans les premières minutes suivi d'un plateau. A l'inverse, cette même courbe pour le tampon acétate d'ammonium (Figure 25, panneau A, en carrés rouges) ne présente pas de pH croissant avec le numéro de fraction : la focalisation du tampon n'a pu être réalisée en 90 minutes.

La mesure du pH dans les fractions OGE à la fin de la séparation permet de confirmer les observations issues du suivi régulier de la tension en cours d'expérimentation. Le pH croît régulièrement avec le numéro de fraction croissant pour le tampon HEPES / sucrose (Figure 25, panneau B, en losanges bleus). En revanche, en présence de tampon acétate d'ammonium, un gradient de pH n'a pas été obtenu avec une décroissance du pH dans fractions 1 à 3 suivi d'une croissance pour les fractions 4 à 10 (Figure 25, panneau B, en carrés rouges).

Cette expérience montre que la présence de tampon HEPES / sucrose est tolérée par les ampholytes porteurs. Ainsi, les extraits protéiques en tampon HEPES/sucrose, peuvent *a priori* être séparés directement par OGE. Concernant l'acétate d'ammonium, des fractions issues d'une SEC ne pourraient être directement exploitées comme précédemment observé par Bucher *et al* qui n'avait pas dépassé une concentration de 10 mmol.L⁻¹, préconisé par le fournisseur (Bucher 2013). C'est donc la concentration en tampon qui est limitante pour l'acétate d'ammonium.

Sur la base de ces expérimentations, il a donc été choisi de travailler avec le tampon HEPES / sucrose pour préserver les complexes en tampon d'extraction physiologique non dénaturant.

4.2.4.2. Détermination d'un équilibre concentration « protéines - tampon - ampholytes porteurs »

Après avoir montré qu'il est possible d'utiliser le tampon HEPES / sucrose pour la focalisation, la suite des développements a été réalisée avec un mélange de protéines standards en présence de tampon puis avec des extraits protéiques contaminés de gonade.

Pour cette étape du développement, deux contraintes opposées sont à prendre en compte : tout d'abord, avec pour but de détecter *in fine* les traces d'uranium dans les fractions issues des échantillons biologiques faiblement contaminés, par dosage puis par SEC-ICP MS, il est préférable d'introduire un extrait protéique le moins dilué possible. Cependant comme la concentration en tampon peut perturber la séparation OGE un compromis entre la dilution de l'échantillon et la sensibilité de détection du signal doit être trouvé. Ensuite, la concentration en ampholytes porteurs doit être minimale pour limiter le risque de rupture des complexes uranium-protéines. Or, limiter la concentration en ampholytes porteurs est une contrainte pour l'établissement de la gamme de pH en présence d'une concentration élevée en protéines et en molécules organiques constituant le tampon.

Les développements présentés ci-dessous visent à trouver un point d'équilibre entre les concentrations en protéines, tampon et ampholytes porteurs afin de permettre la séparation par OGE sans compromettre la détection des complexes par ICP MS. Une première série d'expérience a été réalisée afin d'évaluer, sans échantillon, la limite supérieure de concentration en tampon pour une concentration en ampholytes porteurs permettant d'obtenir une séparation par OGE.

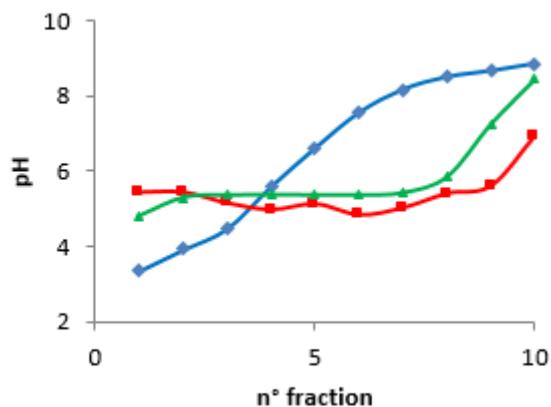


Figure 26 : Focalisation OGE du tampon HEPES / Sucrose en fonction de la concentration en ampholytes porteurs (Pharmalyte à 2 % en bleu, 1 % en vert et 0,5 % en rouge)

Pour une séparation d'échantillons en concentrations analytiques (environ 1 mg.ml^{-1} de protéines), le fournisseur recommande d'ajouter une concentration en ampholytes porteurs variant de 0,5 % à 2 %. En plus de la concentration à 2 % précédemment présentée, des expériences de focalisation du tampon en présence de concentration plus faible en ampholytes porteurs (0,5 % et 1 %) ont été testées. La **Figure 26** montre que la présence d'ampholytes porteurs à 0,5 % n'est pas suffisante à la génération du gradient de pH. La condition de séparation avec 1 % est un cas limite où le gradient de pH est bien réalisé mais présente un plateau à pH 5,4 pour les fractions 3 à 6. Le nombre de fractions utiles à la séparation est par conséquent réduit de 10 à 7, les fractions 3 à 6 pouvant être considérées comme une seule et même fraction. Bien que sur un nombre plus faible de fractions, la séparation est toutefois bien réalisée.

La série d'expériences suivante a été réalisée afin d'évaluer l'impact de la concentration en protéines. Afin de limiter la consommation d'échantillon biologique, ces essais ont été initialement menés sur un mélange équimolaire de protéines commerciales (ferritine, transferrine, albumine, phosvitine) avant d'être réalisés sur des extraits protéiques de poissons zèbres.

La **Figure 27** présente le gradient de pH obtenu après différentes séparations OGE testées pour déterminer un optimum entre les concentrations en protéines et en tampon d'une part et la concentration en ampholyte porteur d'autre part. Dans cette expérimentation sur un mélange de protéines, il a été choisi, pour simplifier, de diluer dans les mêmes proportions les concentrations en protéines et en tampon.

Deux conditions ont été initialement choisies :

- 1) 0,5 mg.ml⁻¹ de protéines en tampon 12,5 mmol.L⁻¹ HEPES et 125 mmol.L⁻¹ sucrose (Figure 27, panneau A) et
- 2) 0,25 mg.ml⁻¹ de protéines en tampon de 6,25 mmol.L⁻¹ HEPES et 62,5 mmol.L⁻¹ sucrose pour (Figure 27, panneau B).

Ces concentrations en tampon ont été choisies pour être représentatives de concentrations pouvant être retrouvées dans les échantillons préparés pour le fractionnement OGE. Une première comparaison entre les deux concentrations en protéines permet de noter que le gradient est mieux généré pour la concentration la plus faible en protéines (et donc en tampon) pour l'ensemble des concentrations en ampholytes porteurs. Pour une concentration en protéines de 0,25 mg.ml⁻¹, une concentration à 1% en ampholytes porteurs est suffisante pour réaliser la séparation. La qualité du gradient de pH est meilleure pour une concentration à 1,5 % en ampholytes porteurs. En revanche, pour une concentration plus élevée en protéines, une concentration en ampholytes porteurs à 2% semble nécessaire pour limiter l'effet de plateau visible pour 1 % et 1,5 % d'ampholytes porteurs qui réduit le nombre de fractions OGE ayant un point isoélectrique (pI) distinct.

Sur la base de cette deuxième série d'expérimentations, le fractionnement OGE a été testé sur des échantillons de gonades de poissons zèbres contaminés. Cette troisième série d'expérience avait pour objectif d'intégrer les contraintes liées aux complexes en évaluant i) le taux de recouvrement de la méthode dans les nouvelles conditions de séparation et ii) les effets des ampholytes vis-à-vis des complexes natifs, observés en SEC. Un échantillon de poisson zèbre a été séparé par OGE avec 1,5% d'ampholytes porteurs Pharmalyte pour deux concentrations en protéines (0,5 mg.ml⁻¹ et 0,25 mg.ml⁻¹). La concentration en tampon a été ajustée à 12,5 mmol.l⁻¹ HEPES 125 mmol.l⁻¹ sucrose et 6,25 mmol.l⁻¹ HEPES 62,5 mmol.l⁻¹ sucrose, respectivement, pour être cohérent avec les expérimentations menées sur le mélange protéique.

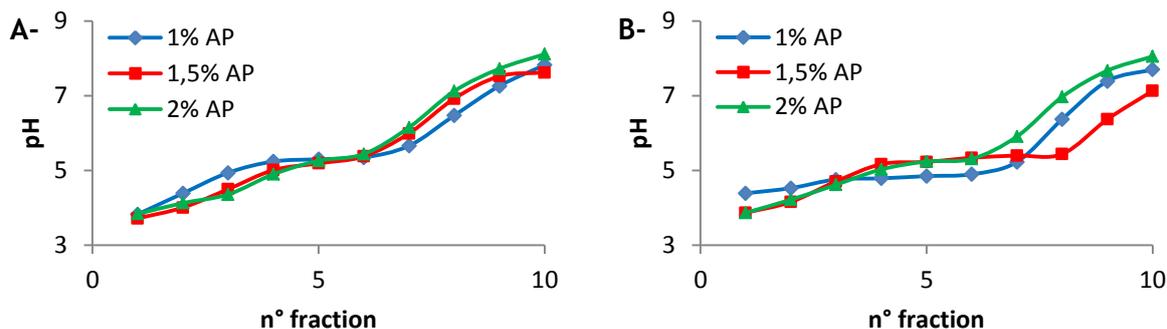


Figure 27 : Gradient de pH généré après séparation d'un mélange synthétique de protéines à 0,25 mg.ml⁻¹ (panneau A) et 0,5 mg.ml⁻¹ (panneau B) avec 1 % (en rouge), 1,5 % (en vert) et 2% (en bleu) d'ampholytes porteurs Pharmalyte.

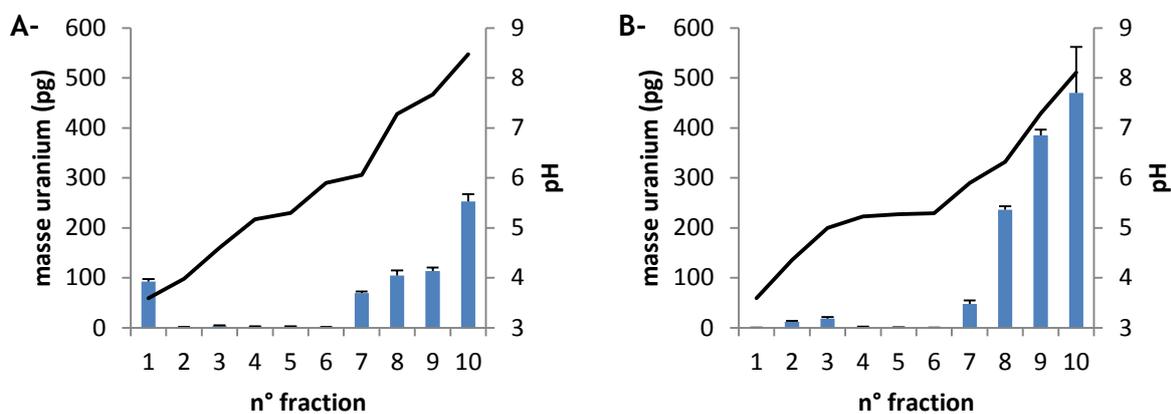


Figure 28 : Distribution de l'uranium dans les fractions OGE pour un extrait protéique de poisson zèbre contaminé de concentration 0,25 mg.ml⁻¹ (panneau A) et 0,5 mg.ml⁻¹ (panneau B), concentration en AP = 1,5%. La masse d'uranium, dosée par ICP MS, est représentée sous forme d'histogramme et le gradient de pH par la courbe.

La Figure 28 permet de constater que le gradient de pH est mieux généré pour la condition à 0,25 mg.ml⁻¹ (courbe du panneau A), la condition à 0,5 mg.ml⁻¹ présente un plateau de pH aux fractions 4 à 6 (courbe du panneau B). Cette observation est cohérente avec la série d'expériences réalisée sur un mélange de protéines. Ainsi, pour une séparation optimale, une concentration en protéines fixée à 0,25 mmol.l⁻¹ est préférable. Toutefois, une séparation avec une concentration plus élevée en protéines est possible en diminuant la qualité de la séparation OGE. Ceci pourrait s'avérer nécessaire pour éviter d'appliquer une trop grande dilution à l'échantillon et pouvoir détecter des complexes uranium-protéines présents à l'état de traces.

Concernant le profil de distribution protéique des extraits de poisson zèbre, l'uranium est principalement distribué dans les fractions de pH 6,0 à 8,5 pour les deux séparations OGE. L'effet du plateau observé pour un pH entre 5,2 et 5,4 n'est donc a priori pas préjudiciable pour la détection du complexe par SEC-ICP MS dans ces extraits. Les faibles concentrations en uranium détectées dans les fractions OGE présentées dans la Figure 28, panneau A, qui varient de 70 à 250 ng pourraient être proches des limites de détections suite à la seconde séparation par SEC. Dans la Figure 28, panneau A, la fraction 1 est probablement un artefact, dans la mesure où l'uranium est plus faiblement détecté dans l'autre expérimentation pour laquelle la concentration en protéines est plus élevée.

Dans les fractions 7 à 10, la concentration en uranium pour l'échantillon de concentration 0,5 mg.ml⁻¹ est plus importante que pour l'échantillon de concentration 0,25 mg.ml⁻¹. Suite à ces observations, il a donc été choisi de travailler avec une concentration à 0,5 mg.ml⁻¹ en protéines pour maximiser la quantité de complexe et la probabilité de leur détection au détriment de la qualité de la séparation par OGE (dans la mesure où le plateau de pH n'est pas tout à fait présent dans les fractions OGE riches en uranium).

La contribution en uranium de la solution d'ampholytes porteurs et de l'échantillon après séparation OGE a été évaluée sur un extrait protéique de gonade femelle de poisson zèbre contaminé et est présenté dans la Figure 29 pour la solution Pharmalyte. La contribution en uranium des ampholytes porteurs est non négligeable, notamment dans les fractions basiques, fractions qui paraissent d'intérêt pour notre échantillon.

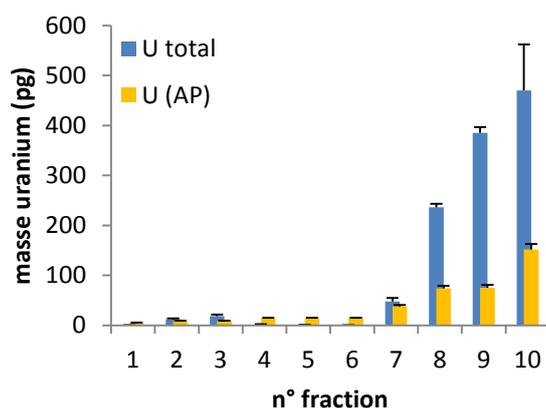


Figure 29 : Apport d'uranium par les ampholytes porteurs (histogramme jaune) dans la distribution de l'uranium dans échantillon protéique de femelles contaminées non reproduites (histogramme bleu). Exemple de la séparation de 0,5 mg.ml⁻¹ d'échantillon avec 1,5 % Pharmalyte.

En conclusion, ces développements ont permis de mettre en évidence que la séparation OGE est possible en tampon HEPES / sucrose, faiblement complexant de l'uranium et plus proche des conditions physiologiques de l'échantillon que le tampon acétate d'ammonium à 10 mmol.L⁻¹. Pour les extraits protéiques de gonades, jusqu'à 0,5 mg.mL⁻¹ de protéines ont pu être séparés en tampon 12,5 mmol.L⁻¹ HEPES et 125 mmol.L⁻¹ sucrose et en présence de 1,5 % d'ampholytes porteurs. La solution commerciale d'ampholytes porteurs utilisée pour les échantillons de gonades femelles est Biolyte, qui présente des propriétés plus intéressantes vis-à-vis des complexes U-protéine (constante de complexation et concentration en U plus faible).

Le taux de recouvrement en uranium suite au fractionnement OGE a été évalué à 29 % et 34 % pour les expérimentations à des concentrations en protéines de 0,25 mg.ml⁻¹ et 0,5 mg.ml⁻¹, respectivement. Ce rendement correspond à une augmentation de 10% par rapport aux travaux précédemment menés (Bucher et al. 2014), et ce, en combinant Biolyte et le tampon d'extraction HEPES/sucrose.

Chapitre V

Résultats et discussions (partie 2) : Ecotoxicologie

5. Résultats et discussions (Partie 2) : Ecotoxicologie

5.1. Paramètres biologiques et bioaccumulation

5.1.1. Indice de condition et indice gonado-somatique

Les indices de condition et gonado-somatique ont été déterminés pour chaque poisson utilisé dans l'expérience afin de déterminer les femelles non reproduites dans le groupe des femelles reproduites, après reproduction. Les résultats sont présentés dans la **Figure 30**. Pour cette expérience, les femelles et les mâles ont été mis à reproduire dans un même aquarium pour chacune des conditions témoins et contaminées. Les données de reproduction (nombre d'œufs pondus, taux de fertilisation et de survie des larve) n'ont pas pu être déterminés individuellement. Des travaux précédemment réalisés dans le cadre de la thèse de S. Bourrachot ont montré qu'il n'y avait pas de différence pour ces paramètres entre les conditions témoins et contaminés à $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Bourrachot 2009).

Une première observation est l'absence de différence pour ces deux indices entre les groupes témoins et contaminés de chaque condition étudiée (5j, 20j NR et 20j R). De plus, pour une même condition, une grande variation peut être notée pour les deux indices. Bien que les paramètres d'exposition aient été les plus homogènes possibles, cette variation montre la diversité interindividuelle des poissons. L'écart important de cet indice entre les poissons d'un même groupe est cohérent avec la stratégie de reproduction du poisson zèbre qui ne dépose qu'une partie des ovocytes matures, en quantité variable, lors d'une ponte. Suite à la période de fraie, l'indice gonado-somatique n'est pas significativement plus faible pour les femelles reproduites par rapport aux femelles non reproduites.

Ces observations sont cohérentes avec des expériences précédemment réalisées dans des conditions similaires (Bourrachot 2009). Dans cette étude aussi, aucune différence pour les indices de condition et gonado-somatique n'avait été notée entre les femelles témoins et contaminées pendant 20 jours à $20 \mu\text{g.L}^{-1}$. De plus, suite à une période de reproduction de 15 jours, l'indice gonado-somatique était plus faible pour les femelles reproduites, sans être significativement différent.

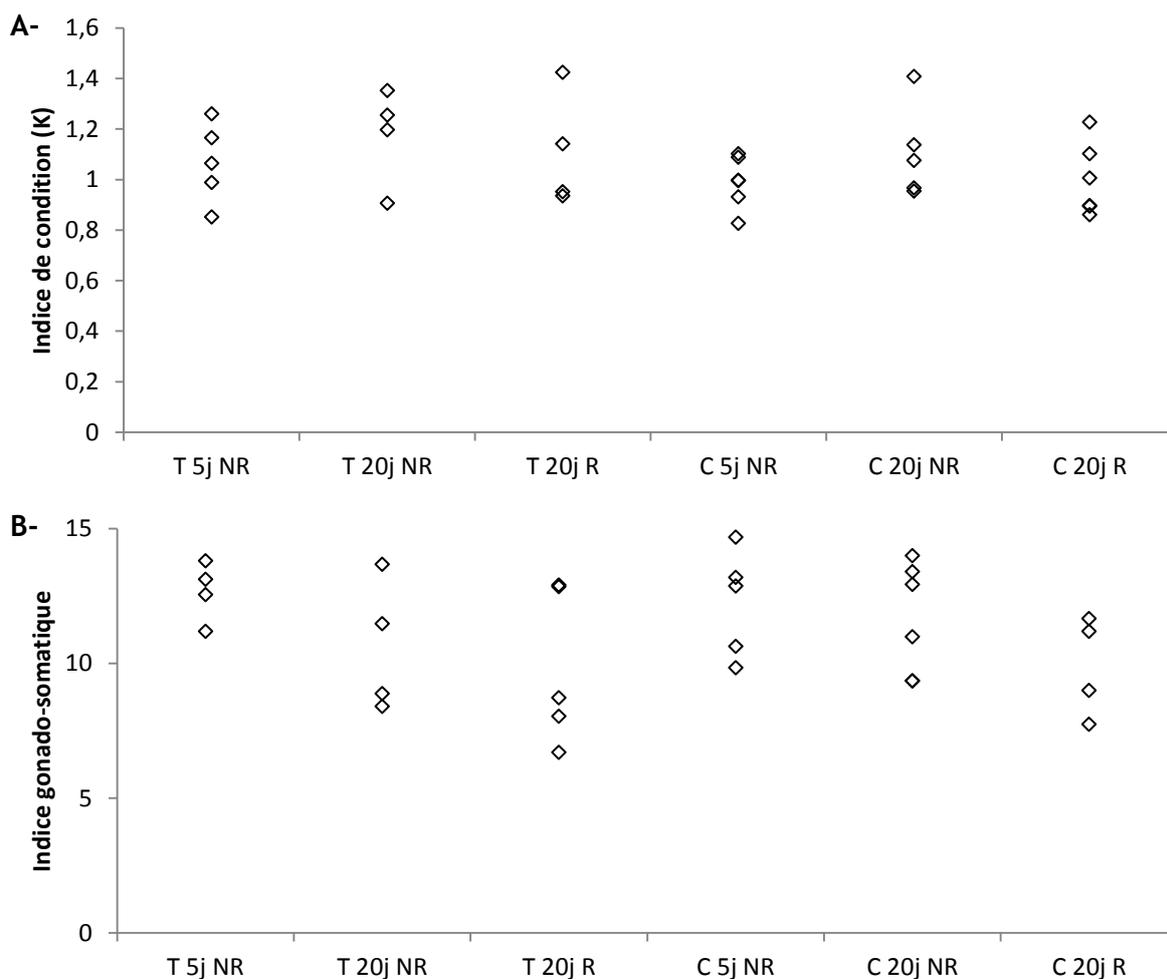


Figure 30 : Indice de condition (panneau A) et indice gonado-somatique (panneau B) pour chaque individu dans chaque groupe. Abréviations : T témoins, C contaminées, NR non reproduites et R reproduites.

5.1.2. Dosage protéique dans les gonades

Le dosage des protéines a été réalisé pour chaque individu sur l'extrait utilisé pour les analyses métallomiques et ne représentant donc que le contenu cytoplasmique, dépourvu des débris membranaires et du noyau. Les résultats, exprimés en concentration de protéines par masse de tissu, est donné dans la **Figure 31**.

Les observations sont similaires à celles qui ont été dressées pour les indices de condition et gonado-somatique. La variation de concentration en protéines au sein d'un même groupe reflète la variation entre les individus, même dans des conditions expérimentales pouvant être considérées comme homogènes. De même, une concentration plus faible en protéine pouvait être attendue suite à l'évènement reproducteur du fait de la libération

des ovocytes matures, riches en contenu protéique. Toutefois, du fait de la présence de la variété cellulaire au sein de l'organe d'une part et de la variation du nombre d'œufs pondus d'autre part, la différence entre les concentrations en protéines pour les femelles reproduites et non reproduite est faiblement notable pour les deux groupes, témoins et contaminées.

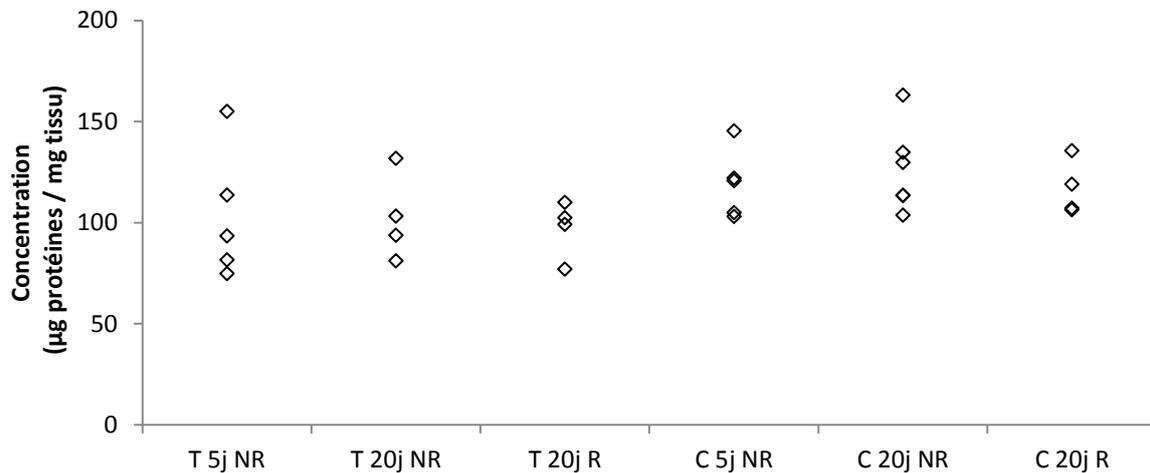


Figure 31 : Concentration protéique (en µg de protéines par mg de gonades) pour chaque échantillon réparti par groupe.

5.1.3. Accumulation de l'uranium dans les organes du poisson zèbre

L'accumulation de l'uranium a été déterminée pour 7 parties du corps du poisson : l'épithélium branchial, l'arc branchial, le rein, l'ovaire, le muscle dorsal, le tube digestif et le reste du corps. La branchie a été divisée en deux parties, épithélium et arc branchial, car l'accumulation de l'uranium est différente entre ces deux tissus (Bucher 2013). Le dosage de l'uranium a pu être réalisé pour l'ensemble des individus, soit un nombre de répliques biologiques par conditions de 5, minimum.

Pour l'ensemble des organes, l'accumulation de l'uranium est significativement plus importante pour les individus contaminés (Figure 32), à l'exception de la condition 5j NR pour le rein. Les conditions contaminées 5j NR et 20j NR présentent une dispersion des valeurs de concentrations plus importante que la condition contaminées 20j R. Les différences statistiques ($p < 0,05$) ont été déterminées par tests Kruskal-Wallis et Wilcoxon *post hoc* par comparaison groupe à groupe pour chaque organe. Les différences sont indiquées pour $p < 0,05$. Cette observation peut être expliquée par la différence entre les

populations de poissons zèbres utilisées pour l'expérimentation. En effet, le groupe des femelles non reproduites était constitué de femelles matures sexuellement. Le groupe des femelles reproduites était constitué de femelles matures sexuellement et ayant déjà été mise à reproduire une fois chez le fournisseur de poissons. Les deux groupes, bien que provenant de la même ponte, n'ont pas tout à fait les mêmes histoires de vie.

Concernant l'accumulation de l'uranium dans les ovaires, les concentrations mesurées pour les témoins sont de $0,016 \pm 0,006 \mu\text{g.g}^{-1}$, $0,054 \pm 0,042 \mu\text{g.g}^{-1}$ et $0,043 \pm 0,016 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour les conditions d'exposition 5j NR, 20j NR et 20j R, respectivement. Aucune différence statistique n'a été observée sur l'ensemble des conditions témoins. Pour les poissons zèbres femelles contaminés, les concentrations mesurées sont significativement plus élevées avec $0,19 \pm 0,19 \mu\text{g.g}^{-1}$, $2,1 \pm 1,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ et $0,96 \pm 0,38 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour les conditions d'exposition 5j NR, 20j NR et 20j R respectivement. Les concentrations mesurées sont en accord avec d'autres expériences réalisées pour la contamination de poissons zèbres à $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'uranium (Gombeau et al. 2016). Une dispersion importante des valeurs pour les conditions non reproduites peut être due à l'hétérogénéité des stades de maturation des ovocytes. En moyenne, le contenu en uranium de la condition « C 20j R » est 55% plus faible que celui de la condition « C 20j NR », mais cette différence n'est pas significative. Cette diminution est probablement due à une forme d'élimination consécutive à l'évènement de reproduction a déjà été montrée par Bourrachot *et al*, dans des conditions d'expositions similaires pour lesquelles la présence d'uranium a également été observée dans les embryons (Bourrachot 2009).

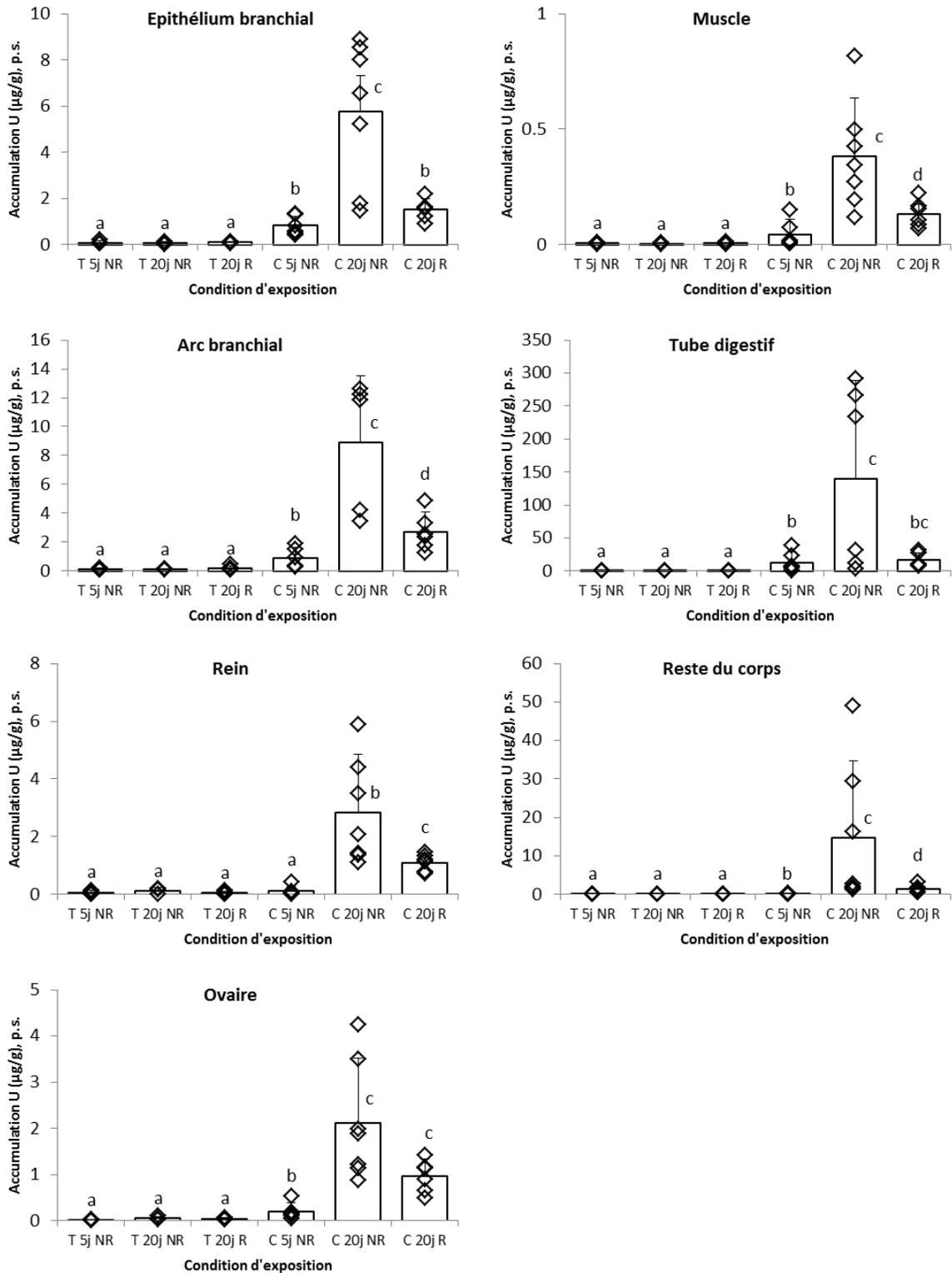


Figure 32 : Accumulation de l'uranium ($\mu\text{g/g}$, ps) dans les organes de poissons zèbres femelles. Abréviations : T témoins, C contaminée, 5j prélevée à 5 jours, 20j prélevée à 20 jours, R reproduite, NR non reproduite. $n > 5$. Statistiques réalisées par tests Kruskal-Wallis et Wilcoxon *post hoc* groupe à groupe pour chaque organe. Les différences sont indiquées pour $p < 0,05$.

5.2. Distribution de l'uranium dans les protéines de la gonade : une analyse SEC-ICP SFMS multi-élémentaire globale

Les analyses par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la spectrométrie de masse atomique à secteur magnétique, ont été menées sur l'ensemble des individus, sur une période consécutive de 2 semaines afin de limiter les variations instrumentales. La préparation non dénaturante des échantillons a systématiquement été réalisée individu par individu, à faible température (broyage sur glace et centrifugation à 4°C), 30 minutes avant le début de l'injection en chromatographie afin de limiter les risques de déstabilisation et dénaturation des complexes. Les métaux ont été mesurés par ICP SF MS (^{238}U , ^{31}P , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{66}Zn) et les protéines par absorbance UV à 280 nm.

Ainsi, la répartition de l'U dans les protéines, pour les échantillons de gonades des 6 groupes étudiés, a été comparée. Un exemple de chromatogramme pour chacune des conditions d'exposition « 5j NR », « 20j NR » et « 20j R est présenté dans les **Figure 33**, **Figure 34** et **Figure 35**, respectivement. Les chromatogrammes des femelles témoins et contaminées sont disposés en vis-à-vis pour chaque condition d'exposition. L'analyse des chromatogrammes uranium (figures Figure 33-Figure 35, panneau A) permet de déterminer 4 fractions en fonction de la masse moléculaire (MM) : haute MM > 600 kDa, 150-400 kDa, moyenne MM 10-40 kDa et faible MM <4 kDa. Les complexes de plus de 600 kDa sont plus susceptibles d'être des agrégats de protéines tandis que les complexes de moins de 4 kDa sont constitués de peptides ou de petites molécules organiques susceptibles d'interagir avec la phase stationnaire de la colonne (> volume total de la colonne) et de ne plus être éluées par rapport à leur masse moléculaire.

En comparant les chromatogrammes de chaque métal pour l'ensemble des conditions, très peu de différences sont observées entre les différents échantillons. En effet, seul le pic des agrégats (> 600 kDa) n'est pas présent pour certains échantillons (exemple pour le fer : Figure 33-C') mais cette observation n'est pas constante au sein d'une même condition. De plus, les conditions témoins 5j NR, 20j NR et 20j R présentent un bruit de fond plus élevé pour le cuivre (Figure 33-D, Figure 34-D et Figure 35-D) phénomène probablement dû à une contamination interne du spectromètre de masse, éliminée progressivement.

Ces deux points mis à part, aucun pic supplémentaire, déplacement de pic ou disparition de pic, n'est observé suite à la contamination pour l'uranium ou pour les autres métaux étudiés. Ainsi, il semblerait notamment que, dans notre expérience où les poissons ont été exposés à des concentrations environnementales d'uranium, les protéines complexant l'uranium soient les mêmes chez les poissons témoins et contaminés.

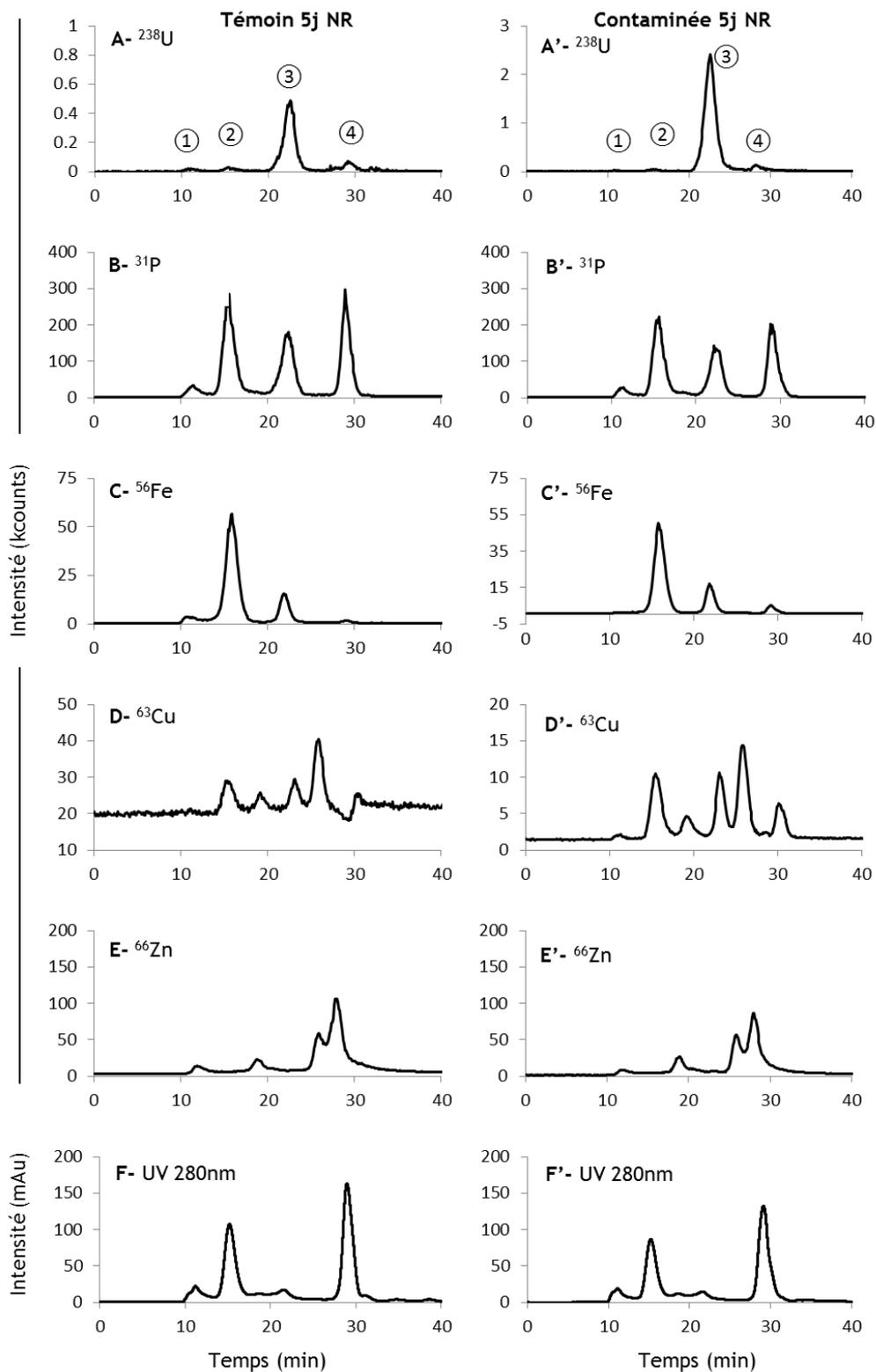


Figure 33 : Exemple de chromatogrammes d'un extrait protéique de femelle témoin (panneau de gauche) et contaminée (panneau de droite) non reproduite contaminée pendant 5 jours. Chromatogrammes en U, P, Fe, Cu, Zn et UV pour les individus témoins (A à F respectivement) et contaminées (A' à F')

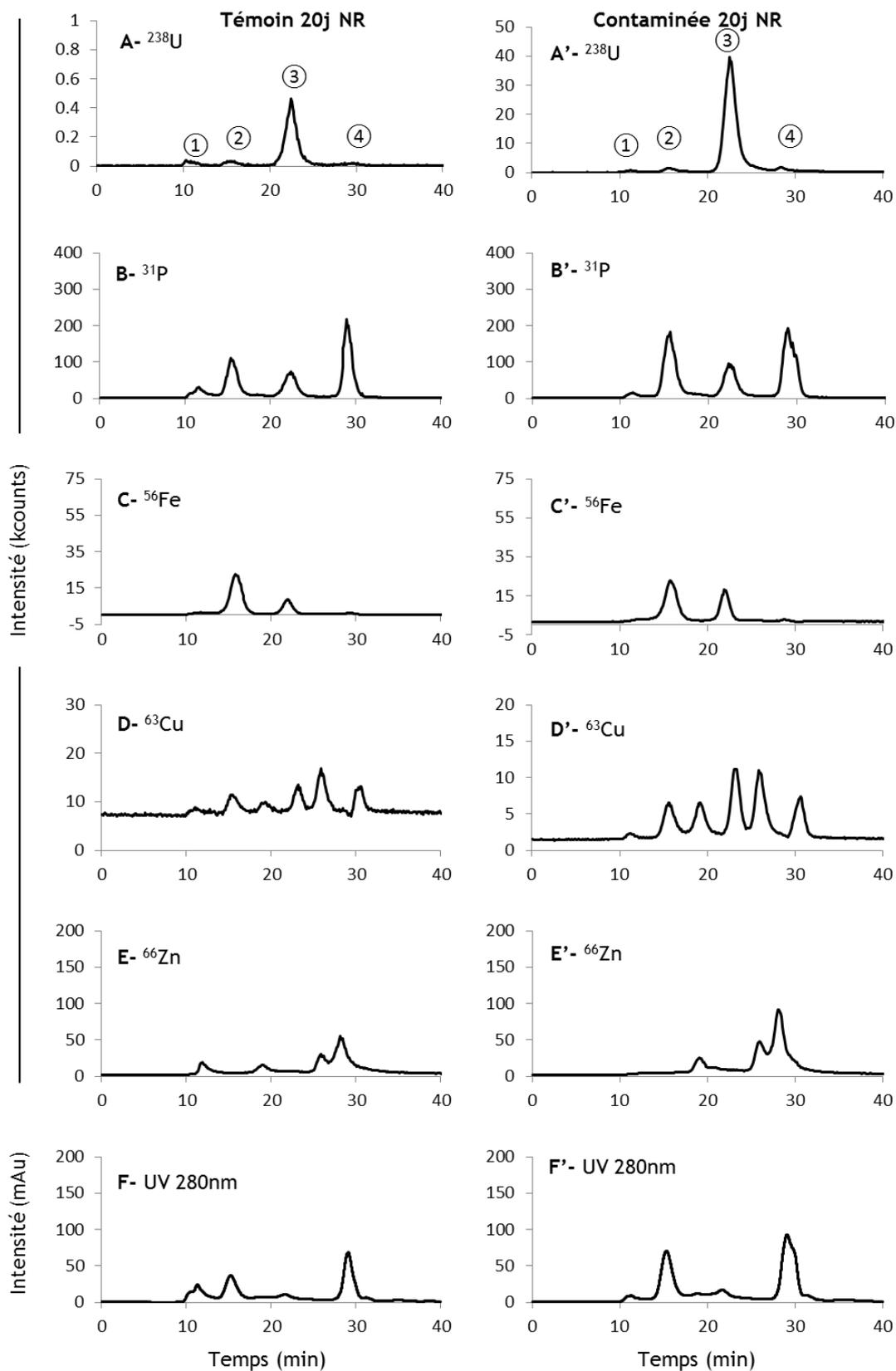


Figure 34 : Exemple de chromatogrammes d'un extrait protéique de femelle témoin (panneau de gauche) et contaminée (panneau de droite) non reproduite contaminée pendant 20 jours. Chromatogrammes en U, P, Fe, Cu, Zn et UV pour les individus témoins (A à F respectivement) et contaminées (A' à F')

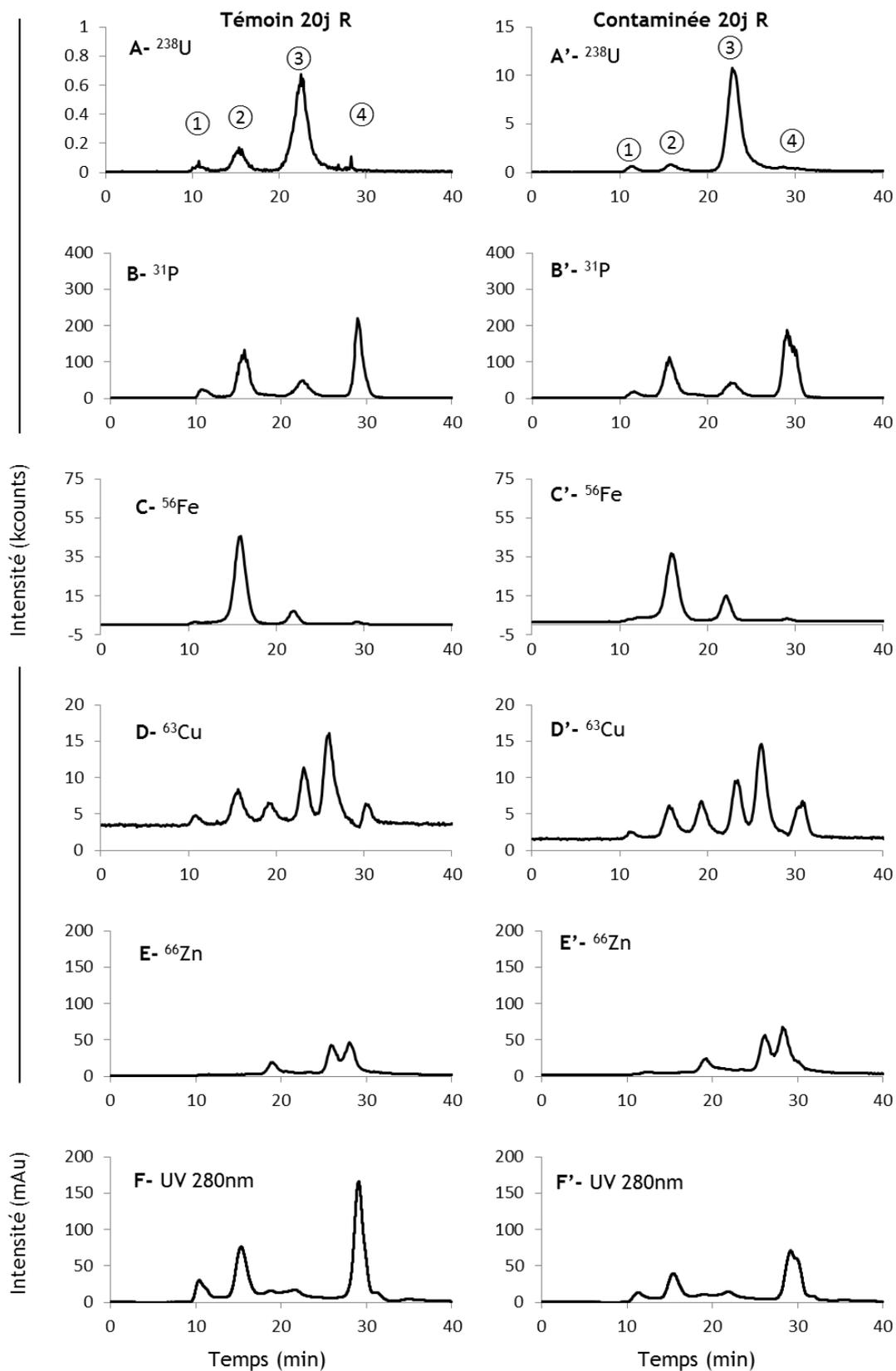


Figure 35 : Chromatogrammes d'un extrait protéique de femelle témoin (panneau de gauche) et contaminée (panneau de droite) reproduite contaminée pendant 20 jours. Chromatogrammes en U, P, Fe, Cu, Zn et UV pour les individus témoins (A à F respectivement) et contaminées (A' à F').

En parallèle, une comparaison quantitative de la distribution des complexes uranium-protéines a été réalisée pour l'ensemble des conditions. Pour ce faire, du fait de la dispersion de l'uranium accumulé dans les ovaires, la comparaison a été faite en utilisant la répartition relative de l'uranium sur l'ensemble des pics, c'est-à-dire en utilisant l'aire du pic divisée par l'aire totale du chromatogramme. Les résultats sont présentés dans la **Figure 36**.

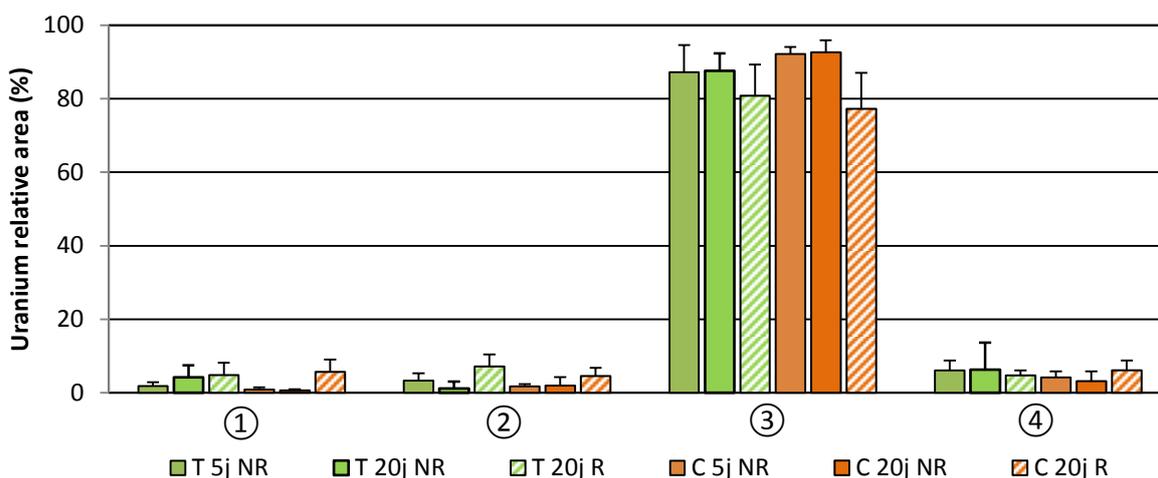


Figure 36 : Distribution relative des complexes U-protéine dans les extraits protéiques d'ovaires. Les groupes de rectangles ①, ②, ③, et ④ correspondent fractions de masses moléculaires >600 kDa, 150-400 kDa, 10-40 kDa et <4 kDa respectivement.

Pour l'ensemble des échantillons analysés, la fraction 3 concentre la majorité de l'uranium. La mesure du rapport de l'aire du pic sur l'aire du chromatogramme total permet de montrer que 87 ± 8 % de l'uranium est retrouvé dans cette fraction.

En outre, une diminution de l'aire relative est observée pour les femelles témoins reproduites (81 ± 9 %) par rapport aux femelles témoins non reproduites 5j et 20j (87 ± 7 % et 88 ± 5 % respectivement). La même observation est obtenue pour les femelles contaminées reproduites (77 ± 10) par rapport aux femelles contaminées non reproduites 5j et 20j (92 ± 2 % et 93 ± 3 % respectivement). Il semblerait donc que l'évènement de reproduction ait eu un effet sur la répartition de l'uranium. Une hypothèse permettant d'expliquer cette observation serait que le complexe (ou un des complexes) de la fraction 3 serait principalement présent dans les ovocytes matures, libérés lors de la ponte. Les complexes présents dans les autres fractions seraient alors plutôt présents dans le tissu de soutien de la gonade ou dans des ovocytes non matures.

La répartition de l'uranium au sein de la gamme de masse moléculaire des protéines est différente de celle observée dans l'épithélium branchial de poissons zèbres contaminés dans des conditions similaires. Dans cette étude, l'uranium était principalement présent sous forme liée à de petites molécules <4 kDa, e.g. des peptides (fraction 6, **Figure 37**). Cette fraction pourrait être considérée comme peu toxique pour la cellule car des protéines détoxifiantes, telles que les métallothionéines (MT), sont présentes à ces faibles masses moléculaires (Geffard et al. 2010), même si la constante d'affinité U-MT n'est pas des plus élevées (Michon et al. 2010). Dans notre étude, l'uranium est lié à des protéines de masses moléculaires plus élevées, de 10 à 40 kDa, ce qui pourrait suggérer une toxicité de l'uranium dans les gonades par interaction directe avec ces protéines. De plus, de la même façon que dans notre étude, les cibles de l'uranium entre les poissons contrôles et contaminés à $20\mu\text{g.L}^{-1}$, semblent être les mêmes. Seule la concentration $250\mu\text{g.L}^{-1}$ a entraîné une augmentation significative de la proportion de l'aire de la fraction 2 et une diminution significative de l'aire de la fraction 6..

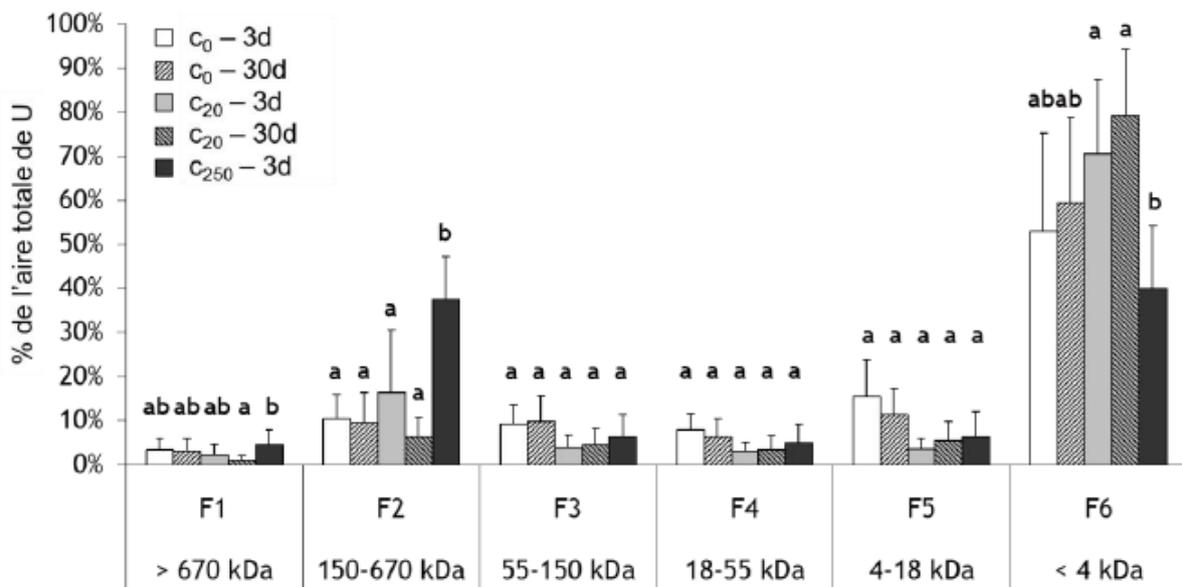


Figure 37 : Distribution de l'uranium parmi six fractions de masses moléculaires définies à partir des chromatogrammes d'exclusion stérique d'extrait protéiques d'épithélium branchial de poissons zèbres contaminés à $20\mu\text{g.L}^{-1}$ et $250\mu\text{g.L}^{-1}$ pendant 3 jours (3d) et 30 jours (30d) (extrait de Bucher 2013, thèse de doctorat).

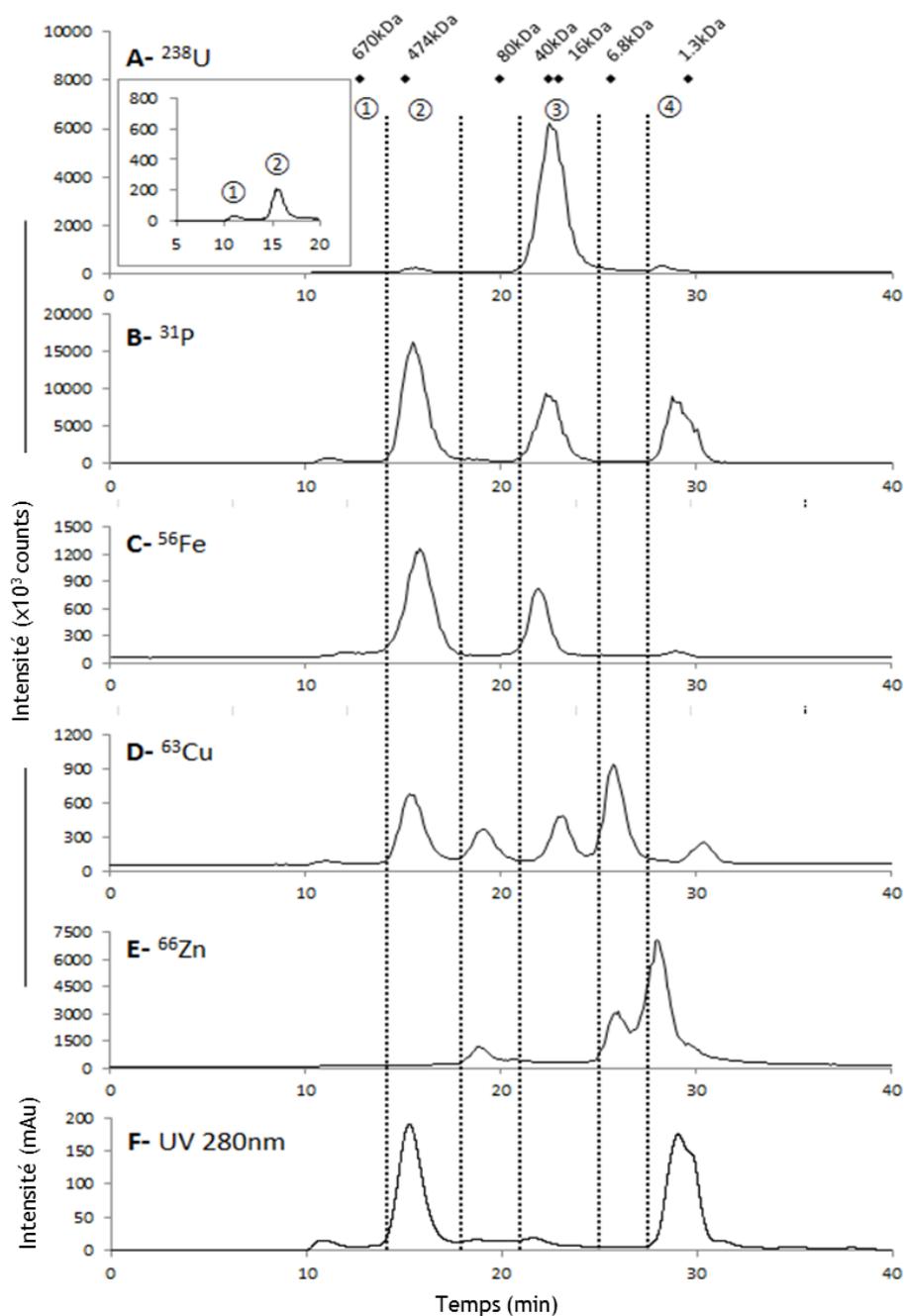


Figure 38 : Description des fractions et coélution. Exemple de chromatogrammes d'un extrait protéique de femelle contaminée reproduite. Chromatogrammes en U, P, Fe, Cu, Zn et UV (A à F respectivement).

Ainsi, à partir des chromatogrammes en ^{238}U , 4 fractions ont été déterminées (Figure 38, panneau A). La fraction 1 correspond à des complexes de haute masse moléculaire ou des complexes multiprotéines, supérieurs à 600 kDa, qui sont élués dans le volume mort. La fraction 2 est constituée de complexes de masse moléculaire comprise entre 150 et 400 kDa. La fraction 3, composée de complexes de masse moléculaire de 10 à 40 kDa,

représente la fraction la plus riche en uranium pour l'ensemble des échantillons analysés. En fin de chromatogramme, la fraction 4 correspond à des complexes de petite taille, inférieure à 4 kDa, composée de peptides ou de petites molécules organiques.

La détection multi-élémentaire par ICP SF MS permet d'observer une coélution de l'uranium avec le phosphore, le fer, le cuivre et le zinc. Le phosphore (Figure 38, panneau B) est présent exclusivement dans les 4 fractions définies sur la base du chromatogramme en uranium ce qui semble montrer une bonne correspondance entre les protéines contenant du phosphore et celles contenant de l'uranium. Cette observation est en accord avec la littérature : des études par chromatographie d'affinité sur métal immobilisé (IMAC) ont permis de montrer l'affinité de l'ion uranyle pour les protéines phosphorylées (Basset et al. 2008; Li et al. 2010). En revanche, il faut également noter que la fraction 3, majoritaire en uranium, n'est pas la plus riche en phosphore. Inversement la fraction 2, minoritaire en uranium, est la plus riche en phosphore. Ainsi, pour la fraction 3, la chelation pourrait être réalisée sur des sites non phosphorylés. En outre, la présence de groupement phosphorylés n'implique pas nécessairement la chélation avec l'uranium, le site doit également être accessible à la chelation.

Le fer (Figure 38, panneau C) est principalement détecté dans la fraction 2, peu riche en uranium. Dans la fraction 3, le temps de rétention du pic d'élution du fer présente un décalage d'une minute par rapport au pic d'élution de l'uranium, avec des apex respectifs de 21,6 min et 22,6 min.

Le chromatogramme du cuivre (Figure 38, panneau D) présente 6 pics au total dont 2 sont présents dans les fractions définies par la présence d'uranium avec des temps de rétention correspondant à ceux des pics d'uranium (fractions 2 et 3).

Le chromatogramme du zinc (Figure 38, panneau E) montre que le zinc n'est pas détecté dans les fractions 2 et 3. Le métal est en revanche plus largement détecté dans la fraction 4. Cette observation peut être expliquée par l'utilisation de l'HEPES en tant que tampon non dénaturant pour l'uranium mais qui présente une affinité pour le zinc. Le zinc des métalloprotéines aurait ainsi pu être complexé par l'HEPES lors de la préparation d'échantillon et élué dans le volume total lors de la chromatographie d'exclusion stérique (fraction 4).

Le chromatogramme UV (Figure 38, panneau F) montre que les protéines sont principalement présentes dans la fraction 2, pour des masses moléculaires comprises entre 150 et 400 kDa. Cette observation est en accord avec la littérature sur la biologie de l'ovaire chez le poisson zèbre. En effet, des auteurs ont montré que la vitellogénine, dont

la masse moléculaire correspond assez bien avec la fraction 2 (monomère 150 kDa et forme native 400 kDa), peut représenter jusqu'à 80% en masse du contenu protéique d'un ovocyte mature (Thompson and Banaszak 2002). Il est intéressant de remarquer que la fraction 3, la plus riche en uranium, ne présente pas de pic protéique dans ces conditions d'analyse. Deux hypothèses permettent d'expliquer cette observation : soit la concentration en protéines dans la fraction 3 est plus faible que la limite de détection de l'UV, soit les protéines de cette fraction ne possèdent pas d'acides aminés tryptophane ou tyrosine et ne sont par conséquent pas détectées à 280 nm. La détection UV à 225 nm, basée sur la détection des liaisons peptidiques n'a pas non plus permis d'observer de pic dans cette fraction. Elle a simplement conduit à la mise en évidence d'une augmentation du niveau basal du signal (**Figure 39**). L'uranium contenu dans la fraction 3 pourrait par conséquent être complexé par une protéine présente en « faible » concentration, possédant une forte constante d'affinité et un grand nombre de sites de complexation.

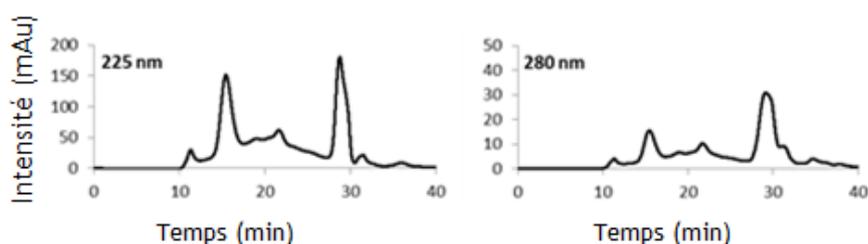


Figure 39 : Détection UV à 225 nm (à gauche) et 280 nm (à droite) pour un échantillon « C 20j NR ».

En conclusion, ces analyses SEC-ICP MS ont permis de définir un certain nombre de caractéristiques des complexes uranium-protéine (gamme de masse moléculaire, possible coélution avec des métaux). Toutefois, du fait de la faible résolution de la SEC, il a été choisi d'utiliser une seconde dimension de séparation afin de mieux séparer les complexes et ainsi pouvoir déterminer des protéines candidates à la complexation de l'uranium. Cette étude a été réalisée pour les deux conditions « C 20j R » et « C 20j NR » pour lesquelles la concentration en uranium est la plus importante afin de maximiser les chances d'observer des complexes.

5.3. Analyse couplée OGE x SEC - ICP MS

5.3.1. Cartographie des complexes métal-protéine chez le poisson zèbre

Ainsi, les cartographies élémentaires ont été réalisées pour les conditions « C 20j NR » et « C 20j R » (Figure 40). Les cartographies « poissons zèbres contaminés reproduits » (Figure 40, partie gauche) et « poissons zèbres contaminés non reproduits » (Figure 40, partie droite) ont été obtenus respectivement pour un groupe de 7 et 6 échantillons. Le pool a été constitué par volume équivalent des échantillons et ajusté à une concentration en protéine de $0,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ pour les deux conditions. Ainsi, il est possible de comparer les cartographies pour les conditions contaminées reproduites et contaminées non reproduites. Cependant, la comparaison selon l'axe x (pH, fractionnement OGE) doit être prudente. En effet, entre les conditions « C 20j R » et « C 20j NR », de légères variations de pH (inférieur à 0.5 pH) peuvent être observées en raison de la composition protéique distincte des échantillons et donc de l'abondance relative de certaines protéines. De plus, la séparation en fonction du pH ayant permis d'obtenir 10 fractions en tout, il n'est pas possible de mesurer le volume des spots afin de comparer les concentrations en protéines et métaux des deux conditions. En conséquence, les comparaisons seront déterminées à partir de l'apex des spots (c'est-à-dire de l'apex du pic chromatographique correspondant au spot considéré dans la fraction OGE d'intérêt) ; les variations de pH inférieures à la différence entre deux fractions OGE consécutives ne seront pas considérées.

Comme précédemment pour l'analyse 1D, deux comparaisons ont été menées : entre les cations métalliques, au sein d'une même condition expérimentale, pour étudier la coélution métallique, et entre les conditions, R et NR, pour un même élément (phosphore et uranium notamment) ou pour les protéines, afin d'observer l'impact de l'évènement de reproduction sur les complexes. Les cartographies du cuivre et du zinc ne sont pas présentées car aucun spot n'a pu être détecté. Deux raisons principales peuvent expliquer cette observation. Tout d'abord, les métaux ont pu être complexés par les ampholytes porteurs (Simo et al. 2006). De plus, la concentration en protéine est ajustée à $0,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ avant injection pour le fractionnement OGE, ce qui représente une dilution de l'échantillon d'un facteur 4,2 et 4,6 pour les conditions femelles contaminées reproduites et femelles contaminées non reproduites, respectivement. Par conséquent, le signal du cuivre et du zinc, déjà proche du bruit de fond lors de l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique n'est peut-être plus détectable.

Pour l'ensemble des cartographies élémentaires, une bande plus ou moins intense est observée dans la 2^{ème} dimension à 28-30 min ; elle correspond au volume total de la SEC. Le signal correspond donc, comme précédemment, à des ions métalliques libres ou liés à de petites molécules (solvants, ampholytes porteurs, peptides, ...). Cette bande n'a pas été considérée comme une zone d'intérêt pour les cartographies présentées.

Trois spots « a », « b » et « c » sont visibles sur la cartographie de l'uranium pour la condition « femelles contaminées reproduites » (Figure 40 - A).

Le spot « a », correspondant à la fraction 2 en SEC (Figure 38, panneau A), est caractérisé par un point isoélectrique (pI) variant de 6 à 8 et une gamme de masse moléculaire allant de 150 kDa à 400 kDa. Ce spot correspond au signal le plus intense en phosphore et en UV (Figure 40 - B et Figure 40 - D, respectivement). En revanche, alors que le chromatogramme SEC indiquait une possible coélution entre l'uranium et le fer dans la fraction 2 (Figure 38, panneaux A et C), les complexes métalliques du fer sont focalisés dans une fraction de pH plus acide par OGE et deux spots « d » et « f » (Figure 40- C), distincts du spot « a » de l'uranium, sont observés.

Le spot « b » est le plus intense en uranium, il est caractérisé par un pI variant de 6 à 8, comme le spot « a » et une gamme de masse moléculaire de 10 à 40 kDa (Figure 40 - A). Ce spot coexiste avec le phosphore (Figure 40 - B) mais ne correspond à aucun signal UV (Figure 40 - D), comme observé par analyse SEC (Figure 38, panneau F). Pour ce spot également, comme préalablement suspecté lors de l'analyse SEC, le fer ne coélue pas avec l'uranium et est focalisé à un pH plus acide (spot « e », Figure 40 - C).

Le spot « c » est caractérisé par un pI autour de 4 - 5 et une gamme de masses moléculaires variant de 80 à 150 kDa. Le signal en U est proche du bruit de fond pour la condition « femelles contaminées reproduites ». L'uranium coélue avec le phosphore mais pas avec le fer, le spot « f » du fer, présent dans les mêmes fractions OGE n'est pas localisé au même endroit que le spot « c », avec un temps de 17 min et 19 min, respectivement.

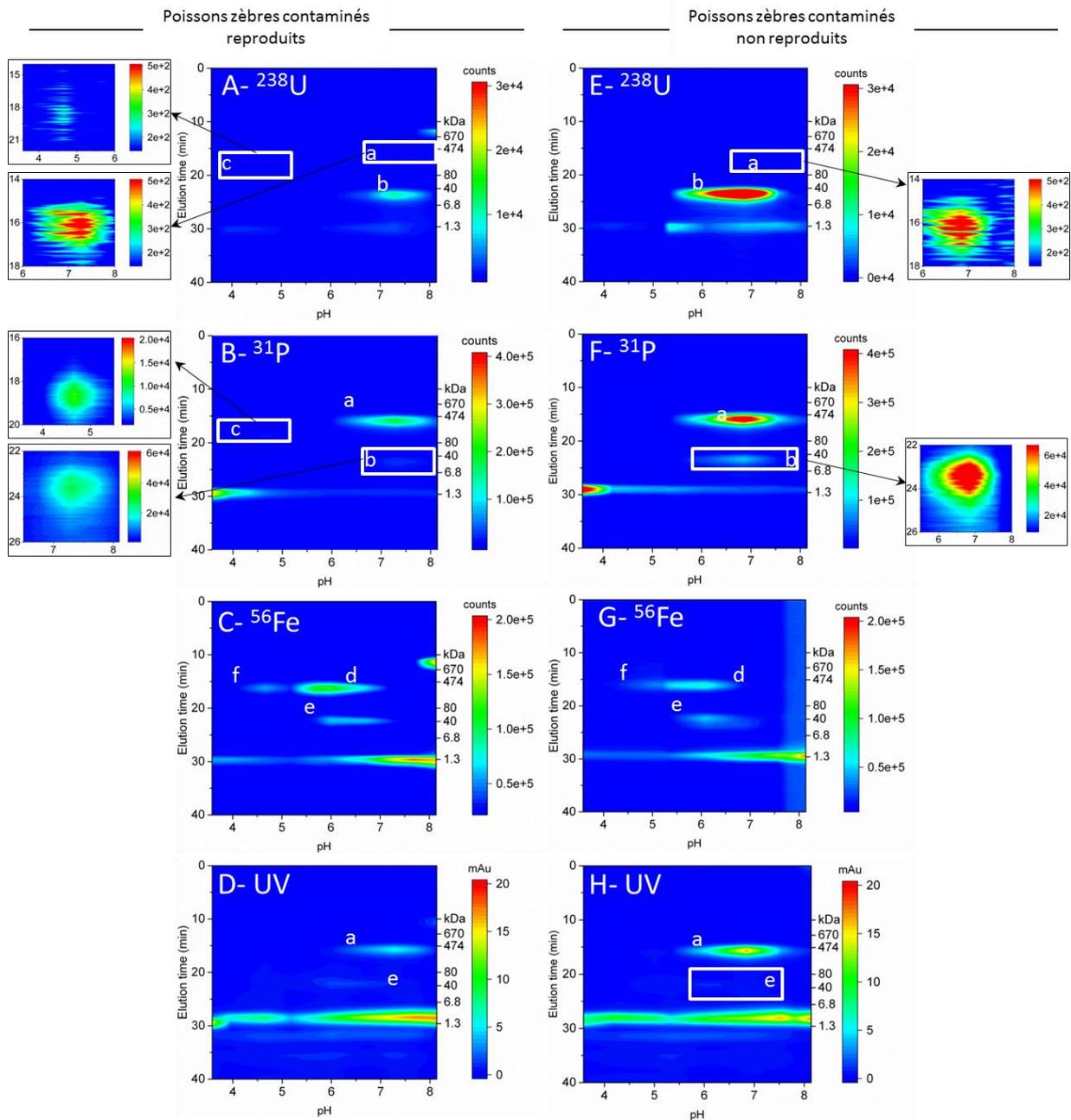


Figure 40 : Cartographies (pI x MM) des métaux (U, P, Fe) et des protéines (UV 280 nm) pour des poissons zèbres contaminés reproduits (panneaux A à D) et contaminés non reproduits (panneaux E à H)

Pour l'uranium, l'intensité maximale du spot « b », le plus riche en uranium, est réduite d'un facteur 5 pour la condition « femelles contaminées reproduites » par rapport à la condition « femelles contaminées non reproduites » (Figure 40, cartographies A et E, respectivement). La même observation peut être faite pour les cartographies du phosphore (B et F). Ainsi, en plus de la coélution 2D de l'uranium avec une protéine contenant du phosphore, l'intensité du signal en uranium et en phosphore varie dans les mêmes

proportions en fonction de l'évènement de reproduction. Ceci conforte l'existence d'un complexe uranium-protéine de faible masse moléculaire contenant du phosphore, impliqué dans l'évènement de reproduction.

L'intensité du spot « a » pour l'uranium est faible et constante entre les deux conditions. En revanche, le signal en phosphore et en UV décroît d'environ 40% pour la condition « femelle contaminée reproduite » par rapport à la condition « femelle contaminée non reproduite ». La forte intensité du signal en UV et phosphore dans la condition non reproduite ainsi que la variation d'intensité entre les conditions reproduites et non reproduites, permettent de supposer que la vitellogénine pourrait être l'une au moins des protéines constituant ce spot. En revanche, en l'absence de variation d'intensité du signal de l'uranium entre les conditions reproduites et non reproduites par rapport à celle du phosphore ou de l'UV, aucun lien entre l'uranium et cette protéine contenant du phosphore ne peut être directement établi. Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette différence. La première hypothèse serait que l'uranium est complexé par une protéine différente de celle contenant du phosphore, le complexe uranium-protéine pourrait alors contenir ou non du phosphore. La seconde hypothèse serait que la protéine complexant l'uranium est bien la même protéine que celle contenant du phosphore mais que celle-ci existerait sous 2 formes, avec ou sans U, en fonction du type ou du compartiment cellulaire. La protéine et le complexe uranium-protéine ne seraient alors simplement pas présents au même endroit dans la cellule et ne subiraient donc pas le même devenir.

Le signal en uranium pour le spot « c », observé pour la condition « C 20j R » n'est pas détecté pour la condition « C 20j NR ». De même, le signal en phosphore n'est pas observé pour la condition « C 20j NR ». Cette absence de détection de spot pourrait être expliquée par un faible signal de départ et par la différence de contribution de ces protéines à l'extrait, en raison de la nature de la composition intrinsèque des deux types d'extraits dont la concentration a été ajustée. Ainsi, la proportion de protéine plus importante pour le spot « a » contrebalancerait celle pour le spot « c ». La condition « C 20j R », appauvrie en protéines du spot « a », permettrait de détecter les protéines présentes dans le spot « c ». Enfin, d'après ce résultat, on peut penser que les protéines présentes sous ce spot ne sont pas impliquées dans l'évènement de reproduction, comme par exemple des protéines de structure de la gonade ou présentes dans le tissu de soutien de la gonade.

A l'issue de cette analyse, la caractérisation des cibles potentielles a été réalisée par spectrométrie de masse moléculaire ESI-FT MS à partir des fractions OGE afin d'optimiser le nombre de protéines identifiées. Cette étape n'a pas pu être directement réalisée sur

les fractions chromatographiques post OGE, du fait d'une incompatibilité entre la concentration protéique des fractions de SEC et l'analyse en spectrométrie de masse moléculaire, d'une part, et d'une incompatibilité entre le tampon d'éluion de SEC et l'analyse en spectrométrie de masse moléculaire, d'autre part. Cette analyse a donc été réalisée sur chaque fraction OGE préalablement concentrée et digérée enzymatiquement.

5.3.2. Détermination des protéines cibles potentielles de l'uranium dans les fractions OGE

La détermination des protéines potentiellement complexantes de l'uranium a été effectuée sur la base d'un screening de l'ensemble des protéines détectées pour chaque fraction OGE ayant servi à produire les cartographies. Le nombre de candidats a ensuite été restreint sur la base de leur masse moléculaire théorique par rapport aux gammes de masse moléculaire d'intérêt, à savoir ceux des spots « a », « b » et « c » de la cartographie, riches en uranium. Dans un second temps, les protéines candidates retenues ont été comparées entre les conditions reproduites et non reproduites et discutées au regard des données de la littérature : soit des expérimentations précédemment réalisées sur les cibles de l'uranium, soit des informations sur la fonction biologique en lien avec des données d'études écotoxicologiques sur la contamination par l'uranium.

Dans l'ensemble des fractions OGE, pour les conditions contaminées reproduites et contaminées non reproduites, plus de 200 protéines ont été identifiées. La liste complète des protéines identifiées dans les fractions OGE est présentée en Annexe 2. Dans cette liste, la vitellogénine a été identifiée dans la plupart des fractions OGE, cette observation est cohérente avec l'analyse protéomique sur gel décrite par la suite dans laquelle des spots identifiés vitellogénine sont présents sur la gamme de pH 3 à 10. Après séparation OGE, le plus grand nombre de peptides uniques attribués à la vitellogénine a été retrouvé pour les fractions les plus basiques. La liste des candidates, après restriction comme défini ci-dessus, est donnée dans le **Tableau 18**.

Tableau 18 : Identification des protéines par LC-ESI FT MS après digestion trypsique des fractions OGE. Les protéines ont été discriminées en fonction de leur masse moléculaire théorique.

| Nom protéine | Identifiant UnitProtKB | -10lgP | Couverture (%) | Peptides | Peptides Uniques | Masse moléculaire |
|---|------------------------|--------|----------------|----------|------------------|-------------------|
| spot a | | | | | | |
| vitellogénine 1 type I | Q1LWN2 | 400.86 | 78 | 268 | 23 | 149234 |
| vitellogénine 4 type I | F1Q7L0 | 401.3 | 73 | 249 | 0 | 149297 |
| vitellogénine 5 type I | F1R2S5 | 399.86 | 75 | 249 | 1 | 148706 |
| vitellogénine 6 type I | F1QV15 | 392.07 | 71 | 235 | 8 | 150022 |
| vitellogénine 7 type I | F1R2T3 | 384.78 | 64 | 216 | 3 | 148990 |
| vitellogénine 2 type II | Q1MTC4 | 352.08 | 54 | 142 | 77 | 179896 |
| α -macroglobuline | E7F3L3 | 97.93 | 7 | 8 | 2 | 156996 |
| spot b | | | | | | |
| Factor d'initiation 5A2 | B0UY94 | 71.98 | 20 | 3 | 2 | 14059 |
| Glutathion S-transférase π | Q9DDU5 | 94.99 | 23 | 5 | 5 | 23526 |
| Glutathion S-transférase p1 | Q1L907 | 81.35 | 19 | 4 | 4 | 26409 |
| Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase | Q5XJ10 | 195.09 | 56 | 16 | 16 | 35784 |
| Superoxyde dismutase [Cu-Zn] | B2GRH9 | 115.61 | 30 | 3 | 3 | 15953 |
| Peptidylprolyl cis-transisomérase Aa | B8JKN6 | 84.95 | 26 | 4 | 3 | 17404 |
| Peptidylprolyl cis-transisomérase Ab | Q6PC53 | 111.73 | 38 | 6 | 5 | 17489 |
| Malate déshydrogénase 2 | Q7T334 | 109.7 | 24 | 7 | 7 | 35420 |
| nucleic binding prot cnbpa | F1Q6Z5 | 112.77 | 26 | 4 | 4 | 18015 |
| Hémoglobine α 1 | Q1JQ69 | 161.21 | 62 | 14 | 4 | 15522 |
| Globine Ba1 | B3DG37 | 190.96 | 83 | 16 | 14 | 16389 |
| spot c | | | | | | |
| Actine 2 | Q7ZVI7 | 166.75 | 30 | 11 | 1 | 41753 |
| Dipeptidylpeptidase 3 | Q6DI20 | 114.18 | 6 | 4 | 4 | 81877 |

Dans le spot « a », deux familles de protéines ont été retenues comme candidates à la complexation de l'U. Les types I et II de la vitellogénine ont été identifiés par un grand nombre de peptides (142 à 268) pour un taux de couverture élevé (54 à 78%). Le nombre de peptides uniques, nettement plus faible (0 pour la vitellogénine 4 et 1 pour la vitellogénine 5) s'explique par la grande similarité entre les séquences en acides aminés des différentes isoformes de la vitellogénine de type I qui regroupe les vitellogénines 1, 4, 5, 6 et 7. La vitellogénine 2, de type II, homologiquement moins proche des vitellogénines 1, 4, 5, 6 et 7, notamment du fait de la présence d'un fragment supplémentaire (le facteur de Von Willebrand) (Finn and Kristoffersen 2007), présente un nombre plus important de peptides uniques. L'identification de la vitellogénine est également supportée par les informations de la cartographie : la coélution uranium/phosphore est cohérente avec la présence d'acides aminés phosphorylés au niveau de la sous-unité phosphovine de la vtg (MM

~ 11 kDa). De plus, la diminution de l'intensité du spot pour la cartographie des femelles reproduites par rapport à celle des femelles non reproduites est en accord avec l'accumulation de la vitellogénine dans les ovocytes matures, libérés lors de la ponte.

Dans le spot « a », l' α -macroglobuline (A2M) a également été retenue comme candidate. Plusieurs isoformes de la protéine sont présentes chez le poisson zèbre, regroupées en deux lignées phylogénétiques. Des études ont montré que l' α -macroglobuline est un acteur de la défense immunitaire en tant qu'inhibiteur de protéase (Padhi et al. 2008). Son rôle a par ailleurs été prouvé dans le développement du foie durant l'embryogénèse (Hong and Dawid 2008).

Dans le spot « b », plusieurs protéines et enzymes candidates identifiées ont été rapportées dans des études précédentes. Les enzymes superoxyde dismutase (SOD) et glutathion-S-transférase (GST) sont notamment impliquées dans les équilibres redox et peuvent être exprimées pour lutter contre le stress oxydant. Une superoxyde dismutase à Mn (SOD) et la GST ont également été proposées comme candidates à la complexation dans des études précédentes dans les branchies du poisson zèbre (Bucher et al. 2016) et l'hépatopancréas de l'écrevisse (Xu et al. 2014). La superoxyde dismutase identifiée ici est la superoxyde dismutase à Cu,Zn qui a un site métallique et des propriétés différentes. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est une enzyme impliquée dans le catabolisme énergétique et la production de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH). Le coenzyme NADH peut être utilisé pour régénérer la GST oxydée. La GAPDH peut ainsi également contribuer aux défenses cellulaires contre le stress oxydant. La GAPDH a été proposée comme candidate à la complexation dans une étude sur l'écrevisse (Xu et al. 2014). Enfin, l'hémoglobine (Hb) a également été identifiée à deux reprises dans des études précédentes (Xu et al. 2014; Bucher et al. 2016). Cette protéine de transport de l'oxygène pourrait contribuer au transfert de l'uranium du sang vers les organes. La protéine identifiée « globine » n'est pas assez caractérisée biologiquement pour déterminer son activité. En effet, la famille des globines englobe des protéines telles que l'hémoglobine, la myoglobine ou la neuroglobine (Vinogradov et al. 2007).

Parmi les nouvelles protéines identifiées, la malate déshydrogénase (MDH) est impliquée dans le métabolisme énergétique et la production de NADH (Minárik et al. 2002). Ainsi, au même titre que la GAPDH, la MDH peut également participer aux mesures antioxydantes de la cellule. En revanche, le facteur d'initiation 5A2, participant à la production des protéines, semble plus spécifique de la gonade et du développement embryonnaire. En effet, son implication a été mise en évidence dans la différenciation des organes chez la souris (Parreiras-E-Silva et al. 2010). La peptidylprolyl cis-trans isomérase (PPIase) fait

également partie des enzymes contribuant à la différenciation cellulaire (Schiene-Fischer 2015). La protéine CNBPA (nucleic acid binding protein A) participe au développement de la tête et à la formation de la crête neurale du poisson zèbre (Weiner et al. 2011).

Dans le spot « c », 2 protéines candidates ont été retenues. L'actine (actn) a été identifiée sur la base d'un seul peptide unique, au lieu de deux comme recommandé. Toutefois, après des investigations complémentaires, 6 des 11 peptides attribués à l'actine sont uniquement retrouvés parmi ses différentes isoformes. Ainsi, l'actine a été considérée comme complètement identifiée. Lors de l'étape de sélection des candidats, les masses moléculaires de la molécule seule, du dimère et du trimère ont été considérées. En effet, *in vivo*, l'actine est présente sous ces trois formes ou sous forme de filament (Sjöblom et al. 2008), les masses 42 kDa, 83 kDa et 125 kDa ont donc été prises en compte pour la détermination des candidats. Or, les masses du dimère et du trimère sont en bon accord avec la gamme de masse moléculaire du spot « c ». L'actine a déjà été proposée comme une cible possible de l'uranium dans les branchies du poisson zèbre (Bucher et al. 2016) et de l'écrevisse (Xu et al. 2014) après contamination ainsi qu'après criblage *in vitro* parmi des protéines de cellules rénales humaines (Dedieu et al. 2009). De plus, le cytosquelette, notamment composé de filaments d'actine est fortement remodelé lors du développement de l'ovocyte (Nukada et al. 2015) et des défauts dans la structure du cytosquelette de l'ovocyte ont déjà été mis en évidence par microscopie électronique chez des poissons zèbres exposés à une concentration élevée en uranium (Bourrachot et al. 2014). Cette cible est donc un candidat sérieux. Enfin, la dipeptidylpeptidase 3 identifiée pour ce spot constitue une nouvelle protéine candidate à la complexation. Cette enzyme dispose dans son site catalytique d'un domaine pouvant lier le zinc (Bateman et al. 2015). Un tel site pourrait aussi lier l'uranium (Basset et al. 2013).

5.3.3. Conclusion partie métallomique

A partir des cibles protéiques potentielles identifiées, plusieurs processus biologiques pourraient *a priori* être perturbés par la contamination même si la complexation de l'uranium n'induit pas nécessairement une perte d'activité de la protéine : lutte contre le stress oxydant (SOD, GST), transport de l'oxygène (Hb), cycle énergétique (MDH, GAPDH), structure (actn, A2M) ou développement embryonnaire (PPIA, CNBPA).

De plus, parmi les protéines retenues comme candidates, plusieurs ont déjà été proposées dans des expérimentations précédentes (GST, Hb, ...). Cette observation pourrait illustrer

un mécanisme générique de toxicité associé à une exposition à l'uranium avec en particulier la génération d'un stress oxydant. De nouvelles protéines candidates, plus spécifiques à la biologie de la gonade, pourraient, quant à elles, illustrer un mécanisme de toxicité plus spécifiquement lié à la reproduction.

Cette étude a permis d'étudier la spéciation de l'uranium parmi les protéines de la gonade et de rechercher un effet direct de la contamination via la modification de la fonctionnalité des protéines complexées (métalloenzymes, ...), perturbations de l'homéostasie des métaux essentiels mais aussi une possible transmission de ces complexes à l'embryon (spot b sur les cartographies de l'uranium).

Toutefois, l'effet de l'uranium peut être indirect, une protéine complexant l'uranium, ne jouant plus son rôle, pourrait perturber les processus moléculaires dans lesquels elle est impliquée. Pour déterminer l'ensemble des processus biologiques impactés par une contamination en uranium, une analyse différentielle des protéomes des ovaires des femelles *Danio rerio* après les différentes conditions d'exposition a été réalisée.

5.4. Etude protéomique des effets de l'uranium sur la gonade

5.4.1. Analyse différentielle des protéomes de 4 groupes de poissons, témoins vs contaminés et reproduites vs non reproduites

L'étude protéomique a été menée sur 16 individus, soit 4 répliques biologiques pour les 4 conditions d'exposition « T 20j NR », « T 20j R », « C 20j NR » et « C 20j R ». Parmi les 900 spots détectés, 40 ont été choisis après analyse statistique (test de Student groupe à groupe). La sélection des spots a été réalisée à partir de l'intensité de chacun des spots. Ainsi, lors de la comparaison entre deux groupes, les spots présentant un ratio d'intensité supérieur à 2 (ou inférieur à 0,5) associé à une statistique significative $p < 0.05$ ont été sélectionnés. La position de ces spots dans le gel d'électrophorèse est indiquée dans la **Figure 41**. Les tendances associées pour chaque spot sélectionné sont reportées pour les 4 conditions d'exposition dans le **Tableau 19**.

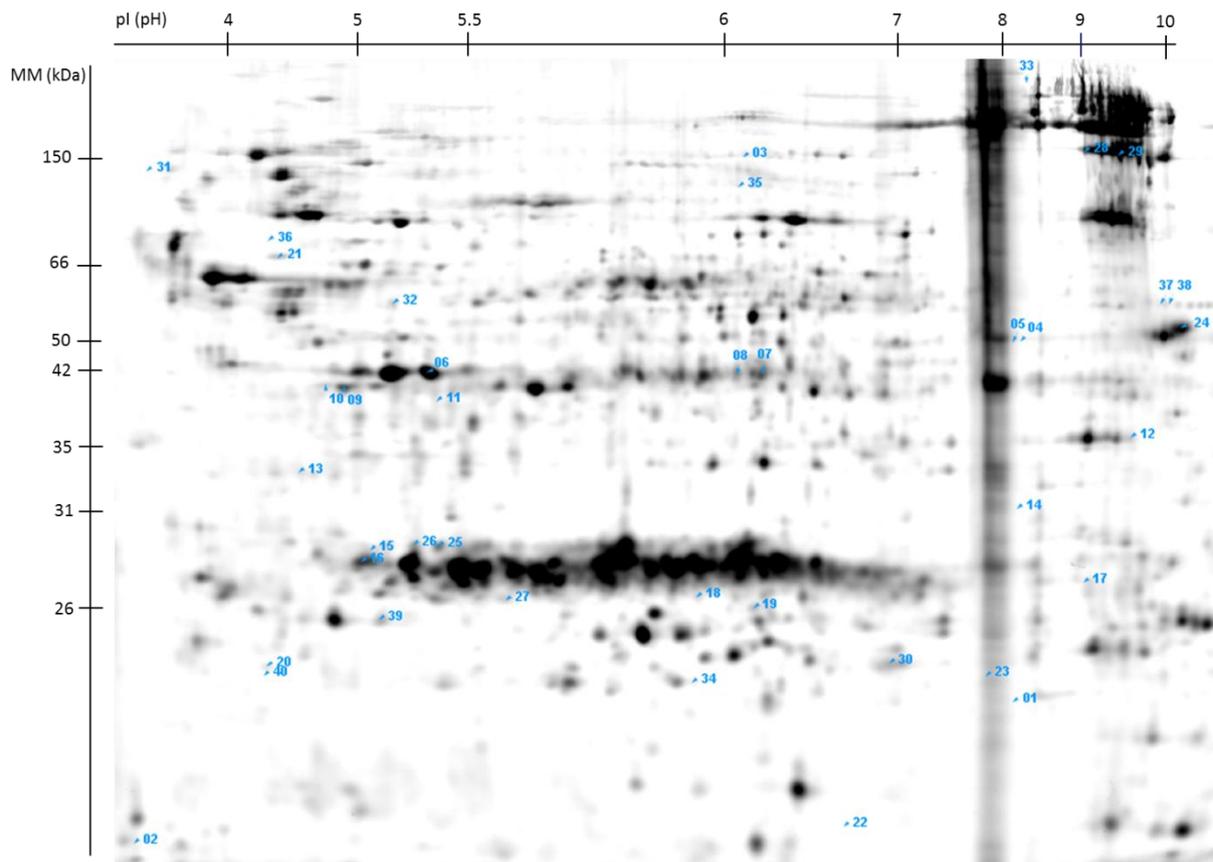


Figure 41 : Gel d'électrophorèse pour une femelle contaminée reproduite après analyse DIGE. Illustration des 40 spots d'intérêt (annotés en bleu) sélectionnés pour analyse par LC-ESI-FT MS.

Tableau 19 : Comparaison de l'expression des protéines groupes à groupes pour les 40 spots sélectionnés. (Symboles : ++ > 3 ; + > 2 ; - < 0,5 ; -- < 0,33)

| n° | Contaminées vs témoins | | Repro. vs non repro. | | n° | Contaminées vs témoins | | Repro. vs non repro. | |
|----|------------------------|------------|----------------------|-------------|----|------------------------|------------|----------------------|-------------|
| | Repro. | Non repro. | Témoins | Contaminées | | Repro. | Non repro. | Témoins | Contaminées |
| 1 | ++ | | | ++ | 21 | + | | | + |
| 2 | + | | | | 22 | | ++ | | |
| 3 | + | | | | 23 | | + | | |
| 4 | + | | - | | 24 | | - | | |
| 5 | + | | - | | 25 | | - | | |
| 6 | + | | | + | 26 | | - | | |
| 7 | - | | | - | 27 | | ++ | | |
| 8 | - | | | | 28 | | + | | |
| 9 | - | | + | | 29 | | + | | |
| 10 | -- | | | | 30 | | ++ | | |
| 11 | + | | | | 31 | | | ++ | |
| 12 | + | | | | 32 | | | -- | |
| 13 | + | | - | | 33 | | | | + |
| 14 | + | | | | 34 | | | | + |
| 15 | - | | | | 35 | | | | ++ |
| 16 | - | | | - | 36 | | | | ++ |
| 17 | -- | | | | 37 | | | | ++ |
| 18 | - | | | | 38 | | | | ++ |
| 19 | + | | | + | 39 | | | | ++ |
| 20 | + | | | + | 40 | | | | ++ |

Les protéines d'intérêt ont été analysées par spectrométrie de masse haute résolution et identifiées par deux logiciels complémentaires SEQUEST et PEAKS, en utilisant la base de données *Danio rerio* GRCz10. SEQUEST a été utilisé pour une première identification, raffinée par l'analyse *de novo* des peptides par PEAKS pour augmenter le taux d'identification des protéines. Ainsi, 34 spots sur 40 ont pu être annotés, les spots n° 1, 2, 30-32 et 40 n'ont pu être identifiés par spectrométrie de masse. Le spot est annoté à partir de l'identification croisée par les deux logiciels. La protéine identifiée avec la valeur de décision $-\log P$ la plus élevée est considérée comme la protéine principale du spot. Les identifications fondées sur l'identification d'un seul peptide n'ont pas été prises en compte et sont laissées à titre indicatif. Les résultats sont présentés dans le Tableau 20. Les variations différentielles de l'expression des protéines sont discutées par famille

protéique. Compte-tenu de l'existence de plusieurs fragments de la vitellogénine, la masse moléculaire théorique n'a pas été retenue.

Tableau 20 : Protéines identifiées par LC-ESI FT MS pour les spots d'intérêt de l'expérimentation DIGE

| Spot | Nom protéine | Ref UniProt | -10lgP | Couverture (%) | Nb Peptides | Peptide Unique | MM (kDa) | Commentaire |
|------|--|----------------|--------|-------------------|----------------|-------------------|-------------|--------------|
| 1 | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | - | |
| 3 | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 125.44 | 5 | 6 | 1 | - | vtg |
| | Phosphorylase, glycogen, liver (pygl) | F8W5B8 | 65.61 | 4 | 2 | 2 | 98.5 | |
| 4 | Elongation factor 1 alpha (eef1a) | F1QQW9 | 111.25 | 27 | 10 | 10 | 53.6 | |
| | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 80.15 | 5 | 5 | 4 | - | |
| | Y box binding protein 1 | A1A605 | 54.93 | 11 | 2 | 2 | 34.9 | |
| 5 | Elongation factor 1 alpha (eef1a) | F1QQW9 | 111.76 | 22 | 8 | 8 | 53.6 | |
| | Vitellogenin 5 (vtg5) | F1QHH9 | 107.69 | 6 | 7 | 1 | - | |
| | Y box binding protein 1 | A1A605 | 68.41 | 11 | 2 | 2 | 34.9 | |
| | DEAD box helicase 6 (ddx6) | E7FD91 | 56.23 | 6 | 2 | 2 | 53.9 | |
| 6 | Actin beta 1 (actb1) | Q7ZVI7 | 158.03 | 47 | 14 | 1 | 41.8 | |
| | Vitellogenin 7 (vtg7) | Q1MTC6 | 58.50 | 1 | 2 | 2 | - | |
| 7 | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 194.01 | 12 | 16 | 2 | - | vtg dégradée |
| | Phosphoglycerate kinase 1 | E9QF19 | 72.36 | 13 | 2 | 2 | 24.1 | |
| 8 | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 168.26 | 13 | 18 | 1 | - | vtg dégradée |
| 9 | Actin beta 2 (actb2) | Q7ZVF9 | 141.88 | 45 | 14 | 1 | 41.8 | |
| 10 | Zona pullicida glycoprotein 2 (Zp2) | F1QJ26 | 53.75 | 6 | 2 | 2 | 47.4 | |
| 11 | Glycogenin 1a (gyg1a) | Q6NV37 | 71.60 | 9 | 3 | 3 | 37 | |
| 12 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh) | Q5XJ10 | 110.42 | 16 | 4 | 4 | 35.8 | |
| | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 90.26 | 4 | 5 | 1 | - | |
| 13 | Zona pullicida glycoprotein 2 (Zp2) | F1QUS3 | 123.89 | 14 | 5 | 5 | 46.8 | |
| 14 | Ribosomal protein L6 (rpl6) | Q567N5 | 88.27 | 11 | 2 | 2 | 30.5 | |
| | Guanine nucleotide binding protein (gnb2l1) | O42248 | 76.93 | 20 | 4 | 4 | 35.1 | |
| 15 | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 106.56 | 6 | 8 | 8 | - | LvL |
| | RAN binding protein 1 (ranbp1) | Q6NWK3 | 45.11 | 9 | 2 | 2 | 24.6 | |
| 16 | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 147.97 | 9 | 11 | 4 | - | LvL |
| | Actin beta 2 (actb2) | Q7ZVF9 | 142.51 | 34 | 12 | 12 | 41.8 | |
| 17 | Vitellogenin 5 (vtg5) | F1QHH9 | 112.75 | 5 | 7 | 0 | - | LvL |
| 18 | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 128.59 | 9 | 10 | 2 | - | LvL |
| 19 | Gluthation S-transferase mu (gtsm) | A8KBR8 | 79.25 | 19 | 5 | 2 | 26.1 | |
| 20 | Vitellogenin 4 (vtg4) | E9QFD8 | 63.23 | 4 | 5 | 4 | - | |
| 21 | Protein phosphatase 2 A beta (ppp2r1b) | Q642H5 | 182.24 | 25 | 12 | 5 | 65.2 | |
| | Heat shock 60 protein 1 (hspd1) | Q803B0 | 71.91 | 7 | 3 | 3 | 61.2 | |
| 22 | Actin beta 1 (actb1) | E9QD59 | 56.88 | 11 | 2 | 2 | 42 | |
| 23 | Vitellogenin 7 (vtg7) | A0A0R4IU40 | 101.72 | 5 | 7 | 7 | - | LvL |
| 24 | Elongation factor 1 alpha 1 like 1 (eef1a1l1) | Q92005 | 157.43 | 36 | 14 | 4 | 50 | |
| | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 127.05 | 4 | 5 | 0 | - | |
| 25 | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 133.67 | 8 | 10 | 10 | - | LvL |
| 26 | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 123.13 | 6 | 8 | 8 | - | LvL |
| 27 | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 105.32 | 7 | 9 | 5 | - | LvL |
| 28 | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 193.11 | 19 | 26 | 3 | - | LvH |
| 29 | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 226.80 | 28 | 41 | 5 | - | LvH |

| | | | | | | | | |
|----|----------------------------|--------|--------|----|----|---|------|--------------|
| 30 | | | | | | | | |
| 31 | | | | | | | - | |
| 32 | | | | | | | | |
| 33 | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 196.54 | 28 | 37 | 3 | - | vtg |
| 34 | Unknown - actin alpha | F1RCB6 | 66.14 | 11 | 3 | 3 | 42 | |
| 35 | Unknown - actin alpha | F1RCB6 | 68.92 | 12 | 3 | 3 | 42 | |
| 36 | Actin beta 2 (actb2) | Q7ZVF9 | 106.30 | 18 | 4 | 4 | 42 | |
| 37 | Vitellogenin 1 (vtg1) | Q1LWN2 | 91.37 | 6 | 7 | 1 | - | LvH dégradée |
| | DEAD box helicase 6 (ddx6) | E7FD91 | 62.80 | 11 | 3 | 3 | 53.9 | |
| | Actin alpha 2 (actn2) | F8W3L1 | 41.72 | 17 | 4 | 4 | 37.5 | |
| 38 | Vitellogenin 4 (vtg4) | F1RBA0 | 89.09 | 3 | 4 | 3 | - | LvH dégradée |
| 39 | Actin alpha 2 (actn2) | F8W3L1 | 89.87 | 18 | 4 | 4 | 37.5 | |
| 40 | | | | | | | | |

5.4.2. Discussion autour des protéines identifiées

Les activités biologiques des protéines sont présentes dans les sections suivantes. Des hypothèses quant aux effets de l'uranium sont proposées sur la base de l'expression des protéines. La vitellogénine et l'actine ont été identifiées à plusieurs reprises, 22 et 9 fois respectivement, dans les spots différenciellement exprimés. Une section est consacrée à chacune des deux protéines. La présentation des autres protéines a été organisée en fonction de leurs fonctions biologiques.

5.4.2.1. La vitellogénine

Des peptides spécifiques de la vitellogénine ont été identifiés dans 22 des 40 spots. Compte tenu des résultats de protéomique et de métallomique et du rôle majeur de cette protéine, une étude détaillée des séquences en acides aminés a été réalisée pour la vitellogénine.

Dans notre expérimentation, la vitellogénine de type I est principalement observée, ce qui est en accord avec la littérature, sur gel d'électrophorèse (Tay et al. 2006; Gündel et al. 2007) comme en phase liquide (Groh et al. 2011). La vitellogénine est une protéine qui a été peu modifiée au cours de l'évolution, il y a très peu de modifications entre les 5 vitellogénines de type I et donc peu de peptides uniques associés aux isoformes des vitellogénines de type I. Il est par conséquent difficile d'affiner davantage l'identification de la protéine (Finn et al. 2002).

Par ailleurs, le mode d'identification des protéines par spectrométrie de masse, *via* la détection de peptides uniques et la comparaison à une base de données traduites *in silico* des séquences ADN, ne permet d'obtenir que l'identification de la protéine entière mais pas de tenir compte des éventuels processus enzymatiques que la protéine aurait pu subir. En effet, chez le poisson zèbre, il existe 7 formes de la vitellogénine, codées par 7 séquences d'ADN (Howe et al. 2013), synthétisées dans le foie (Wang et al. 2005; Hara et al. 2016). Après incorporation dans l'ovocyte, la vtg est clivée et dégradée par des enzymes. Chez le poisson zèbre, les sous-unités sont les lipovitellines lourdes (LvH) et légères (LvL) et la phosvitine (Pv) (Wang et al. 2005). Ainsi, pour l'identification « vitellogénine », l'ensemble des données ont été raffinées sur la base de la couverture peptidique de la séquence en acides aminés et de la masse moléculaire évaluée sur la base de la migration au sein du gel d'électrophorèse. Ce travail a permis de raffiner les identifications déterminées comme « vitellogénine » en première approche (**Figure 42**).

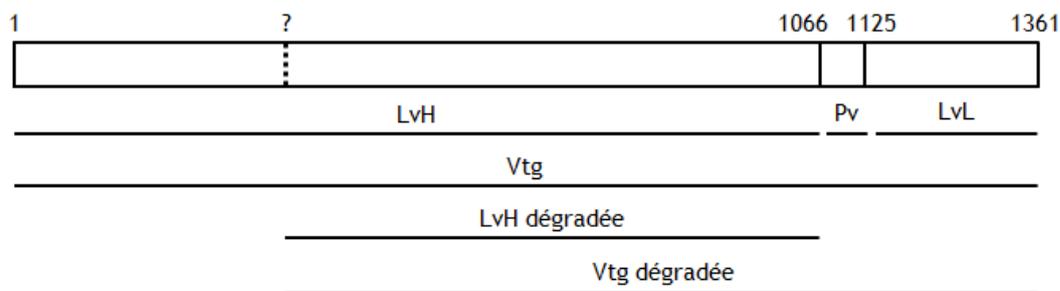


Figure 42 : La vitellogénine et les 5 fragments déterminés par la couverture peptidique et l'évaluation de la masse moléculaire des spots.

La protéine est identifiée « vtg » si sa masse moléculaire est proche de 150 kDa et lorsque des peptides couvrant l'ensemble de sa séquence en acides aminés ont été identifiés. La dénomination « vtg dégradée » indique que des peptides couvrent les séquences LvL et LvH de la vtg mais que la masse moléculaire est plus faible (environ 40 kDa) que celle de la protéine entière (150 kDa). La protéine est identifiée LvL ou LvH si les peptides identifiés couvrent uniquement la séquence en acides aminés correspondante et que la masse moléculaire déterminée à partir du gel est en accord avec la masse moléculaire théorique. L'identifiant « LvH dégradée » indique que les peptides identifiés sont uniquement retrouvés dans la séquence de la LvH mais que la masse moléculaire est plus faible qu'attendue. L'identification raffinée est donnée dans le **Tableau 21** et est reportée dans la **Figure 43**.

Tableau 21 : Raffinement de l'identification des vitellogénines

| Spot | Identification | Spot | Identification |
|------|----------------|------|----------------|
| 3 | LvH | 25 | LvL |
| 7 | Vtg dégradée | 26 | LvL |
| 8 | Vtg dégradée | 27 | LvL |
| 15 | LvL | 28 | LvH |
| 16 | LvL | 29 | LvH |
| 17 | LvL | 33 | Vtg |
| 18 | LvL | 37 | LvH dégradée |
| 23 | LvL | 38 | LvH dégradée |

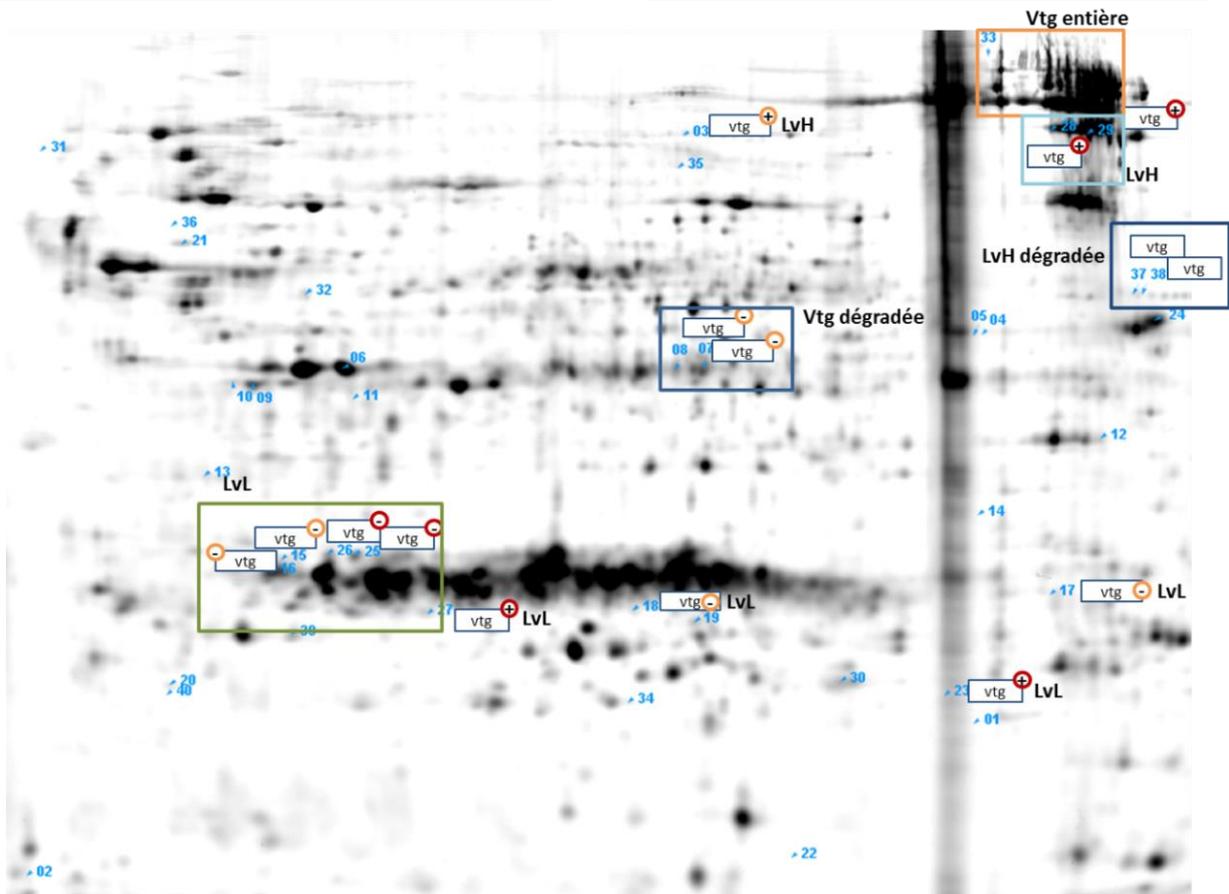


Figure 43 : Identification de la vitellogénine et de ses fragments parmi les spots d'intérêts. Le signe « - » indique que la protéine est sous-exprimée dans les conditions contaminées par rapport aux témoins, le signe « + » que la protéine est surexprimée. En orange la comparaison pour les conditions reproduites et en rouge pour les conditions non reproduites.

L'image du gel d'électrophorèse, ici celle obtenue à partir d'un échantillon de femelle contaminée reproduite, a été comparée avec les données de la littérature sur l'étude protéomique des différents stades de développement de l'ovocyte (Ziv et al. 2008), ovocytes primaires et prévitellogéniques, ovocytes vitellogéniques et ovocytes matures, **Figure 44**). Cette comparaison permet de montrer que le contenu protéique étudié est principalement composé de protéines d'ovocytes vitellogéniques (C). En conséquence, les différences observées par l'étude protéomique sont principalement présentes au niveau des ovocytes aux stades de développements les plus avancés.

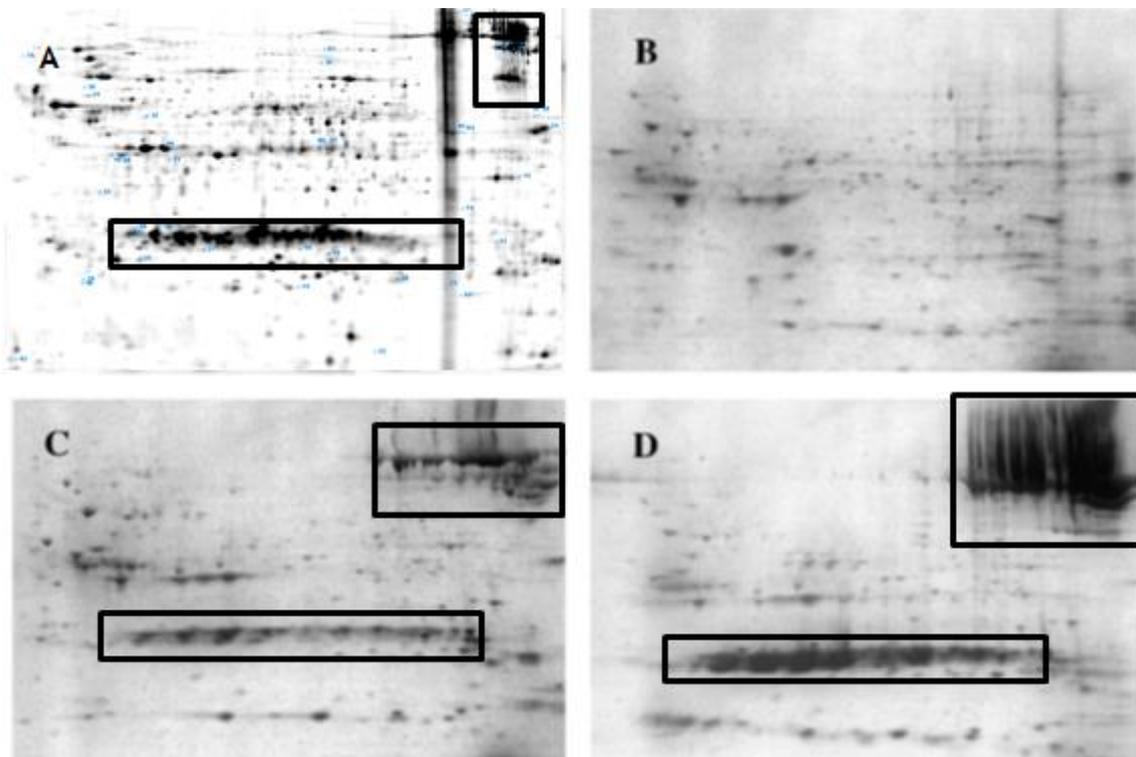


Figure 44 : Comparaison de protéomes : extrait de gonades (présente étude, A) et extrait d'ovocytes primaires et prévitellogéniques (B), vitellogéniques (C) et matures (D) extrait de (Ziv et al. 2008).

La plupart des spots « vtg » de faible masse moléculaire, *i.e.* LvL (n° 15, 16, 17, 18 25, 26, Figure 43) et vtg dégradée (n° 7 et 8) sont plus faiblement exprimés chez les femelles contaminées par rapport aux témoins. En revanche, les spots « vtg » de haute masse moléculaire « vtg » (n° 3) et LvH (n° 28, 29) sont plus fortement exprimés pour les femelles contaminées. Ces deux observations vont dans le même sens où moins de « dégradation » de la vtg aurait lieu après une contamination à l'uranium. Une activité enzymatique

pourrait être perturbée chez les poissons contaminés impactant les étapes de maturation de la vtg, c.à.d. leur coupure enzymatique.

Les spots 37 et 38, correspondant à de la « LvL dégradée » sont plus intenses chez les femelles contaminées reproduites par rapport aux échantillons de femelles contaminées non reproduites mais ne présentent pas de différence d'intensité entre les conditions d'exposition témoin et contaminé. Ils ne semblent donc pas liés à un effet observable suite à la contamination.

Chez le poisson zèbre, la vitellogénine est présente dans le sang sous forme d'un dimère protéique chargé en lipides, phosphore, sucres et cations (Tyler et al. 1996; Arukwe and Goksøyr 2003). Après l'internalisation dans l'ovocyte, la vitellogénine subit une série de coupures enzymatiques qui libère son contenu et ses sous-unités protéiques (Figure 45). Elle est réalisée par la cathépsine D, qui libère les fragments protéiques lipovitelline chaîne lourde, lipovitelline chaîne légère et phosvitine (Hara et al. 2016). L'uranium pourrait entraîner une performance moindre de cette lyse enzymatique de la vtg au niveau du lysosome de la gonade chez les femelles contaminées. Ce défaut d'activité enzymatique peut être expliqué par interaction de l'uranium avec le site catalytique de l'enzyme ou avec le site de coupure de la vtg.

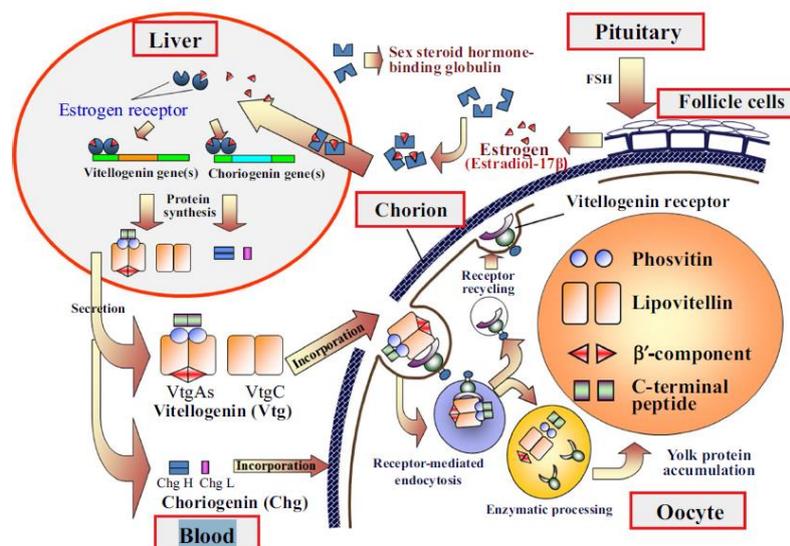


Figure 45 : Incorporation et lyse de la vitellogénine au niveau de l'ovocyte. D'après (Hara et al. 2016)

L'observation d'une perturbation de la maturation de la vitellogénine est cohérente avec celle d'une mortalité accrue chez les juvéniles à la même concentration en uranium (S. Bourrachot, thèse 2009). La vitellogénine, ressource nutritionnelle principale chez la larve, pourrait être moins disponible, car insuffisamment dégradée lors de la maturation de l'ovocyte. Autrement dit, un ovocyte contaminé pourrait ne pas être aussi mature qu'un ovocyte témoin pour une même période de temps de maturation. D'autre part, les produits de dégradation de la vitellogénine ne sont pas seulement des apports nutritifs. En effet, la LvH présenterait par exemple des propriétés antibactériennes chez les larves de poissons zèbres en se liant aux bactéries et activant la phagocytose (Liang, Hu et al. 2016). L'étape de maturation de la vitellogénine est donc particulièrement importante pour le développement de l'embryon.

Cependant, le nombre de spots de vitellogénine modifiés entre les femelles contaminées et témoins est relativement faible devant l'abondance de spots protéiques (encadrés Figure 44) présents et changeant au cours de la maturation des ovaires du poisson zèbre. Il semblerait que l'effet de l'uranium, à la concentration d'exposition utilisée, soit plutôt tenu sur l'expression des protéines. Il paraît donc difficile d'attribuer uniquement les effets reprotoxiques de l'uranium à un défaut de maturation de la vitellogénine.

5.4.2.2. L'actine

Des peptides de l'actine ont été identifiés dans 9 spots. Deux spots sont différentiellement exprimés entre les femelles contaminées reproduites par rapport aux témoins : le spot n°6 est plus intense pour les femelles contaminées, à l'inverse, le spot n°9 est moins intense. La masse moléculaire des protéines correspondant à ces deux spots, évaluée à partir de la migration dans le gel, est en accord avec celle de la protéine entière (42 kDa). La différence de migration entre ces deux spots pourrait être due à des modifications post-traductionnelles. Parmi les femelles non reproduites, un spot est plus intense chez les contaminées par rapport aux témoins (n°22). La masse moléculaire de la protéine du spot est inférieure à 26 kDa, ce qui signifie que la protéine identifiée pourrait en fait être un fragment de l'actine. Quatre spots sont plus intenses chez les femelles contaminées reproduites par rapport aux non reproduites (n° 34, 35, 36, 39). Sur la base de la migration dans le gel, ces spots correspondraient à des fragments de l'actine (n° 34 et 39) ou bien à de l'actine liée à d'autres protéines (n° 35 et 36). Enfin, l'actine a été identifiée dans deux spots en commun avec la vitellogénine (n° 16 et 37). Cette observation pourrait indiquer

une interaction entre ces deux protéines. Cependant, l'homologie de séquence entre les différentes formes d'actines ne permet pas l'identification précise des isoformes d'actine et par conséquent la détermination exacte des mécanismes perturbés.

Au niveau des cellules d'une manière générale, la polymérisation et la dépolymérisation des filaments d'actine sont des processus biologiques importants pour le maintien de la structure cytoplasmique ou dans les échanges de signaux intracellulaires. Pour l'ovocyte en particulier, lors de sa croissance vitellogénique, la structure des filaments d'actine est considérablement remodelée, surtout à proximité de la membrane cellulaire où les échanges moléculaires avec les cellules folliculaire sont importants.

Les mécanismes impliquant l'actine sont assez mal compris mais les variations de la structure ont pu être montrées par imagerie par fluorescence en temps réel (Nukada et al. 2015). Les auteurs montrent que dans les stades prévitellogéniques (I et II), le réseau d'actine est organisé en une fine couche visible dans la région corticale, qui constituera le futur chorion. Ce réseau se réorganise lors de la croissance vitellogénique avec une distribution plus large des filaments d'actine dans la zone sous-corticale où les vésicules vitellines s'accumulent. Ce remodelage de la structure de l'ovocyte est directement lié à la génération des vésicules vitellines. Ainsi, lors de cette étape où l'ovocyte absorbe un contenu maternel important (vtg du sang mais aussi facteurs de croissances et signaux hormonaux via les cellules folliculaires), le réseau d'actine subit des modifications importantes. Or, des défauts dans la structure des ovocytes, en particulier à l'interface « ovocyte-cellules folliculaires » ont été identifiés après exposition à l'U (250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en uranium) par microscopie électronique (Bourrachot et al. 2014).

L'actine peut également provenir des cellules de soutien. En effet, au niveau des cellules folliculaires, le cytosquelette d'actine est également très développé. Zampolla *et al* ont montré un maillage hexagonal des filaments d'actines servant d'encrage aux mitochondries (Zampolla et al. 2011) qui participent à l'effort énergétique important de l'ovocyte dans sa production de protéines et de mARN. La structure externe de l'ovocyte est particulièrement importante pour sa croissance car elle est le lieu d'intense échange de protéines et d'hormones *via* les microvillosités. Une modification dans cette structure pourrait donc perturber ces échanges énergétiques, nutritifs, protéiques et hormonaux.

5.4.2.3. Enzymes GST et GAPDH

La glutathion S-transférase, présente dans les compartiments cytosolique, mitochondrial et microsomal, possède une activité détoxifiante via sa capacité à lier le glutathion (Habig et al. 1974). Une quantité élevée en glutathion S-transférase peut par conséquent être considérée comme un indicateur de dommages cellulaires. La GST est considérée comme un biomarqueur et a été récemment utilisée pour étudier les effets de polluants chimiques sur des poissons zèbres adultes et dans les stades précoces de développement (Oliveira et al. 2009). Dans notre expérimentation DIGE, la « glutathion S-transférase $\mu 3$ » est surexprimée d'un facteur 3 chez les poissons zèbres contaminés reproduits par rapport aux témoins reproduits. L'activation de la GST est un mécanisme de détoxification qui pourrait intervenir au niveau de l'ovocyte et/ou des cellules folliculaires en réponse au stress métallique de l'uranium.

La GAPDH est surexprimée d'un facteur 2 (spot n°12) chez les femelles contaminées reproduites par rapport aux témoins. L'action de cette enzyme impliquée dans le catabolisme énergétique, résulte en la production de NADH utilisé dans le cycle de la glycolyse. Lors d'une contamination métallique, le NADH peut être utilisé pour la régénération des enzymes réductrices impliquées dans la lutte contre le stress oxydant, notamment la glutathion S-transférase (Agarwal, Zhao et al. 2012).

Ainsi, la double observation d'une surexpression de la GST et de la GAPDH va dans le sens de l'hypothèse d'un stress oxydant généré par l'uranium.

5.4.2.4. Autres protéines

La sérine/thréonine phosphatase, *i.e.* phosphatase PP2A, est surexprimée chez les femelles contaminées reproduites par rapport au témoin. La phosphatase PP2A joue un rôle important dans le développement, la prolifération cellulaire et dans la régulation d'un grand nombre de voies de signalisation (Shi 2009). Des effets délétères, comme l'observation d'une déstructuration du cytosquelette, ont été montrés dans le cas d'une sous-expression de cette enzyme (Carneiro et al. 2015; Zhou et al. 2015). En revanche, le cas d'une surexpression de cette phosphatase n'a pas été rapporté. Cette surexpression peut être expliquée par deux hypothèses : soit l'enzyme est surproduite suite à un

stimulus, soit le taux de dégradation de l'enzyme est plus faible chez les individus contaminés.

La protéine ZP2 est surexprimée d'un facteur 2,4 chez les femelles contaminées reproduites par rapport aux témoins. Cette glycoprotéine est présente au niveau la zone pellucide (ZP), à l'interface entre l'ovocyte et les cellules folliculaires. Les protéines de la famille des « egg envelope ZP » sont impliquées dans l'intégrité de la membrane de l'œuf et comme récepteur des spermatozoïdes. Cependant, il n'y a pas d'étude ayant montré un effet d'une contamination métallique sur cette protéine. Ainsi, comme pour l'enzyme PP2A, il est difficile de relier la surpression de la protéine avec un effet de l'uranium.

La protéine Ef1 α a été identifiée dans le spot n°24 et présente une expression plus faible chez les femelles contaminées non reproduites par rapport aux témoins. Cette protéine est une sous-unité du complexe facteur d'élongation 1 qui est impliqué dans la synthèse de polypeptides au niveau des ribosomes et qui régule son activité (Sims Iii et al. 2004). Des auteurs ont par ailleurs montré que le facteur d'élongation 1-alpha interagit avec l'actine et sert de point d'ancrage, de nœud dans le réseau d'actine. La protéine est très conservée au cours de l'évolution ce qui montre son importance tant au niveau de l'activité traductionnelle que dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette (Deschamps D. et al. 1991; Pittman et al. 2009).

La protéine Ef1 α 42sp50 identifiée dans les spots 4 et 5 est un facteur d'élongation spécifiquement retrouvé dans les ovocytes. Ces spots sont surexprimés chez les femelles contaminées reproduites par rapport aux femelles témoins (facteur 2,6 et 2,4 respectivement). L'activité ribosomale de cette protéine est plus faible que Ef1 α et la protéine est en théorie uniquement présente dans les stades prévitellogéniques (Deschamps D. et al. 1991), non matures. Ainsi, la surexpression de cette protéine chez les individus contaminés pourrait être cohérente avec l'hypothèse d'un défaut de maturation des ovocytes, évoqué pour la vitellogénine.

Les protéines qui n'ont pas été présentées en gras ont été identifiées en commun avec une autre protéine pour le spot considéré. En l'absence d'analyse quantitative par spectrométrie de masse, il n'est pas possible de déterminer l'abondance de ces protéines dans le spot. Une description de ces protéines est proposée dans le paragraphe suivant.

Ces protéines sont regroupées en trois fonctions biologiques : développement, synthèse protéique et production d'énergie. HSP60 (« heat shock protein 60 ») a été mise en évidence dans les activités de développement cellulaire et de régénération tissulaire (Qin et al. 2009). RANBP1 (« RAN binding protein 1 ») est impliquée dans le développement

embryonnaire et son activité a pu être localisée dans les organes lors des premières heures de développement (Mangos et al. 2001). Deux protéines, « phosphoglycerate kinase » (PGK1) et « glycogen phosphorylase » (PYGL) intervenant dans le cycle de production d'énergie par glycolyse (Breton et al. 2006) ont été identifiées. Enfin, plusieurs protéines impliquées dans la synthèse des protéines ont été mises en évidence. La protéine « Y-box binding protein » (YBX1) intervient dans la transcription de l'ADN. La « guanine nucleotide binding protein » (GNB2L1) est une protéine ribosomale qui agit en tant que récepteur à la protéine kinase C pour la signalisation du ribosome (Nilsson et al. 2004). La « glycogenin 1a » (GYG1a) intervient dans la biosynthèse des protéines en catalysant la liaison de sucres (Breton et al. 2006). La protéine « DEAD box helicase » (DDX6) est principalement exprimée lors de l'ovogénèse et intervient en réprimant la traduction de protéines. Cette protéine est activée pour permettre l'accumulation des ARNm maternels dans l'ovocyte qui seront traduits plus tard pendant le développement embryonnaire.

5.5. Synthèse des approches métallomiques et protéomiques

5.5.1. Cas de la phosvitine

Les deux approches, protéomique et métallomique, ont été mises en œuvre afin d'observer les effets de l'uranium au niveau de l'expression des protéines d'une part et au niveau de la complexation de l'uranium par les protéines d'autre part. Ces deux approches complémentaires ont mis en évidence un certain nombre de cibles protéiques pouvant être regroupées en plusieurs fonctions biologiques principales : réserve physiologique, lutte contre le stress oxydant, protéine de structure, catabolisme énergétique, biosynthèse ARN et protéines, transport de l'oxygène et développement embryonnaire (**Tableau 22**). Il est intéressant de remarquer que plusieurs protéines ont été identifiées par les deux approches (VTG, GST, ACTN, GAPDH), ce qui permet de supposer que ces protéines pourraient être perturbées par la contamination à l'uranium. De plus, plusieurs protéines ont également été identifiées dans deux études métallomiques précédentes de la contamination par l'uranium (SOD, GST, ACTN, GAPDH, Hb).

En revanche, ces approches bien que complémentaires semblent omettre une des cibles privilégiées de l'étude. En effet, sur la base de l'approche métallomique (l'uranium se lierait principalement à une ou plusieurs protéines de masse moléculaire variant à 10 à 40 kDa, contenant du phosphore et principalement présente dans des ovocytes matures), il est possible de proposer la phosvitine, un fragment richement phosphorylé de la

A partir de ces deux approches et du support de la littérature, plusieurs mécanismes biologiques impliqués dans la toxicité de l'uranium peuvent être proposés. L'uranium semble présenter un mécanisme assez générique de stress oxydant mis en lumière dans plusieurs études métallomique (Xu et al. 2014; Bucher et al. 2016) ou toxicologiques (Barillet et al. 2007; Gagnaire et al. 2014). De plus, en fonction de l'organe, plusieurs fonctions biologiques semblent être affectées du fait de l'affinité que l'uranium peut avoir pour certaines protéines ou enzyme. L'uranium pourrait ainsi perturber directement ou indirectement des fonctions biologiques (biosynthèse, transport de l'oxygène, développement embryonnaire).

Tableau 22 : Comparaison des cibles identifiées dans la gonade de poisson zèbre par approches protéomique et métallomique, mise en évidence des cibles également identifiées lors des études menées sur la branchie du poisson zèbre (Bucher et al. 2016)(a) et la branchie et l'hépatopancréas de l'écrevisse (b) (Xu et al. 2014)

| Fonction biologique | Gonade (protéomique) | Gonade (métallomique) | Autres organes |
|----------------------------|--|---------------------------|---------------------------------------|
| Réserve physiologique | VTG | VTG | |
| Stress oxydant | GST | SOD, GST | SOD ^{ab} , GST ^{ab} |
| Structure | ACTN, ZP2 | ACTN | ACTN ^{ab} |
| Energie | GAPDH, PGK1, PYGL | GAPDH, MDH | GAPDH ^b |
| Biosynthèse | Ef1 α , Ef1 α 1 α , YBX1, DDX6, GYG1a, GNB2L1 | | |
| Transport oxygène | | Hb | Hb ^a |
| Développement embryonnaire | PP2A, RANBP1, HSP60 | A2M, F15A2, PPlase, CNBPA | |

Sur la base des données métallomiques et protéomiques, un schéma de synthèse est proposé en **Figure 47**. Synthétisée dans le foie, la vitellogénine, très phosphorylée, pourrait complexer l'uranium lors du transport de la protéine par le sang et permettre l'entrée de l'uranium, comme le calcium et le fer, dans l'ovocyte (Arukwe and Goksøyr 2003). Suite à l'entrée médiée par des récepteurs spécifiques, la vitellogénine est séquestrée dans les vésicules vitellines où elle subit une maturation enzymatique libérant ses sous-unités protéiques et son contenu lipidique et ionique (Hara et al. 2016). Cette étape pourrait également libérer l'uranium au sein de la cellule. Deux voies de toxicité de l'uranium pourraient alors être mises en œuvre, l'une via le stress oxydant comme dans le cas de contaminant métallique (Goulet et al. 2011), l'autre plus spécifique des processus biologiques nécessaires au développement et à la maturation de l'ovocyte. L'existence de cette seconde voie est supportée par les observations combinées des protéines impliquées dans ces processus, candidates à la complexation (métallomique) dont l'expression est

modifiée (protéomique) suite à la contamination. La complexation de l'uranium pourrait donc perturber trois processus biologiques : maintien de la structure, production d'énergie et lutte contre le stress oxydant. De plus, ces trois processus peuvent s'influencer indirectement. En effet, l'intégrité du réseau d'actine est importante pour les échanges protéiques et hormonaux entre l'ovocyte et les cellules folliculaires. Le réseau de ces dernières est étroitement lié aux capacités de production d'énergie nécessaires au développement de l'ovocyte (Zampolla et al. 2011). Une partie de la production d'énergie est également utilisée pour la lutte contre le stress oxydant. De plus, lors d'un stress oxydant, des voies de production d'énergie moins efficaces sont activées pour augmenter la production de substrats (NADH) nécessaire au fonctionnement des enzymes de lutte contre le stress oxydant (Agarwal et al. 2012). Ces mécanismes pourraient être activés au détriment des besoins énergétiques consacrés à la biosynthèse des ARNm et des protéines, très sollicitée pour constituer les réserves de l'ovocyte. En retour, la perturbation de l'activité de synthèse peut avoir des effets indirects sur l'ensemble des fonctions biologiques de l'ovocyte, notamment la production d'enzymes et protéines nécessaires à la maturation de l'ovocyte et au développement de l'embryon. Une mauvaise qualité des réserves nutritives en plus d'un contenu protéique insuffisant pourraient ainsi être à l'origine de la reprotoxicité (Drevnick and Sandheinrich 2003) avec une possible répercussion sur la mortalité des embryons futurs.

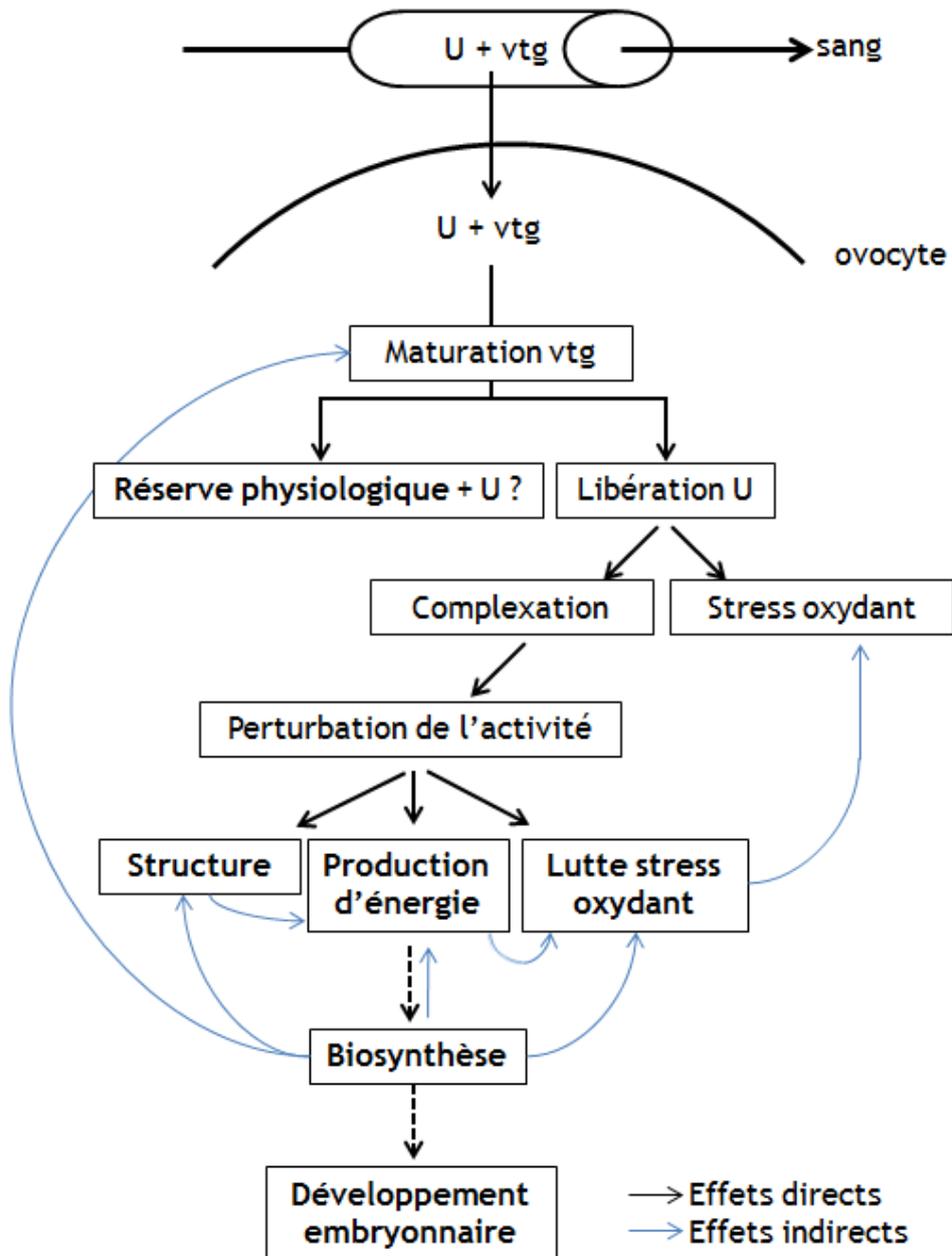


Figure 47 : Hypothèse de mécanismes moléculaires liés à la contamination de l'uranium.

Conclusions générales et perspectives

Ces travaux de thèse ont permis d'étudier plus finement la spéciation biologique de l'uranium ainsi que les effets moléculaires associés, après internalisation dans les ovaires de poissons zèbres exposés par voie directe à des concentrations environnementales réalistes rencontrées dans des milieux aquatiques sous influence de rejets de mines uranifères.

Pour ce faire, à partir des développements précédemment réalisés dans le cadre du programme ST MALO pour l'étude des complexes uranium-protéines en condition non dénaturante, de nouveaux développements analytiques complémentaires ont été menés. Au niveau de la préparation d'échantillon, l'objectif était d'identifier la fraction enrichie en protéines, en particulier en vitellogénine contenue dans les vésicules vitellines. L'ensemble des optimisations a montré que la centrifugation à 900 g était la plus pertinente dans notre étude. Au niveau de la technique OGE, des développements analytiques pour le fractionnement par focalisation isoélectrique ont permis une augmentation du taux de recouvrement en uranium d'une part (~ 30 % contre ~ 20 % dans les études précédentes (Bucher et al. 2014)), et l'utilisation du même tampon physiologique et non dénaturant que pour l'extraction des protéines, d'autre part.

Les études de distribution de l'U ont été menées, à l'échelle individuelle, dans les organes et dans les protéines du cytoplasme des ovaires. Au niveau de l'organe, le dosage de l'uranium a permis de montrer que la gonade est un organe bioaccumulateur, avec une concentration significativement plus élevée chez les femelles contaminées par rapport aux témoins. L'étude de la distribution de l'uranium sur les protéines par SEC-ICP MS a montré que près de 90 % de l'uranium est complexé par des protéines de masse moléculaire comprise entre 10 et 40 kDa, quelles que soient les conditions d'expositions. Cette protéine impliquée dans le complexe pourrait également être principalement présente dans les ovocytes matures. De plus, la coélution entre l'uranium et des protéines contenant du phosphore a été mise en évidence. Enfin, d'après les différences R/NR, ces protéines pourraient être plus abondantes dans des ovocytes matures, libérés lors de la reproduction.

L'approche métallomique a permis d'identifier des protéines susceptibles de complexer l'uranium et de mettre en évidence que certaines d'entre elles (SOD, GST, GAPDH, ...) avaient déjà été proposées comme cibles de l'uranium dans d'autres organes (branchies de poisson zèbre (Bucher et al. 2016), hépatopancréas d'écrevisse (Xu et al. 2014)) ; ceci semblerait suggérer un mécanisme générique de toxicité de l'uranium, en particulier via la génération de stress oxydant, déjà mis en évidence chez le poisson zèbre par d'autres méthodes (Gagnaire et al. 2014). Cette étude a également permis d'identifier de nouvelles

cibles (VTG, MDH, ...), ce qui pourrait indiquer une autre voie de toxicité plus spécifique de la gonade.

De façon complémentaire, les résultats issus de l'approche protéomique ont pu montrer que plusieurs processus biologiques étaient perturbés : réserve physiologique, lutte contre le stress oxydant, structure, production d'énergie, biosynthèse des protéines et préservation des ARNm et développement embryonnaire. De plus, près des deux tiers des protéines dont l'expression est modulée ont également été proposées comme cibles potentielles de l'uranium par l'approche métallomique, ce qui suggérerait un effet direct par complexation de l'uranium, qui pourrait entraîner une perturbation de la fonction de ces protéines.

En synthèse, une proposition de mécanisme impliquant les différentes fonctions biologiques perturbées a été présentée. Dans ce mécanisme, la vitellogénine jouerait un rôle important dans l'entrée de l'uranium dans la cellule, ce qui pourrait affecter d'autres fonctions biologiques directement par complexation de l'uranium avec les protéines ou indirectement en perturbant les interactions entre les protéines et produisant des espèces réactives de l'oxygène. Cette perturbation liée à la contamination pourrait résulter en une maturation incomplète de l'ovocyte, ce qui pourrait conduire à un défaut de reproduction et expliquerait la reprotoxicité de l'uranium.

En perspectives, il pourrait être intéressant de transposer cette double approche, métallomique et protéomique, aux embryons. Ainsi, il pourrait être possible de déterminer si les cibles protéiques et les mécanismes proposés (perturbation du développement embryonnaire, faible qualité des réserves vitellogéniques) sont effectivement la cause de la reprotoxicité observée chez le poisson zèbre après contamination. L'identification de ces mécanismes de reprotoxicité, de l'ovocyte à l'embryon, pourrait permettre de comprendre les effets de l'uranium sur la génération suivante, et d'appréhender les conséquences à l'échelle d'une population.

Un autre point de recherche pourrait être de comparer les résultats de ces études en laboratoire menées sur un poisson modèle avec des études sur des poissons autochtones contaminés *in situ*, dans leur environnement sous influence de mines uranifères. En effet, si les mécanismes biologiques principaux de reprotoxicité peuvent être retrouvés parmi les différentes espèces de poissons, le mode de reproduction peut être différent (reproduction synchrone ou asynchrone) ; c'était le 3^{ème} volet du projet NEEDS-TARGETS qui n'a pas pu être abordé (hormis la collecte d'échantillons de gardons *rutilus rutilus* et quelques

analyses préliminaires). Dans le cas d'une étude de contamination chronique *in situ* sur plusieurs générations d'individus, des mécanismes d'adaptation des organismes à la contamination seraient également à prendre en compte.

En perspective analytique, il serait intéressant d'étudier la détection et l'identification des complexes uranium-protéines par spectrométrie de masse non dénaturante. En plus du défi de la préservation des complexes dans le vide de l'appareil, cette analyse nécessiterait une forte sensibilité afin de détecter des traces de complexes dans un échantillon protéique. Toutefois, les informations telles que la preuve de complexation de l'uranium par la protéine, la possibilité de déterminer la stœchiométrie du complexe voire sa constante de complexation, pourraient s'avérer utile pour comprendre le devenir de l'uranium au sein de la cellule et élucider des mécanismes de toxicité associés.

Production scientifique

Publication

- ***In vivo* identification of potential uranium protein targets in zebrafish ovaries after chronic waterborne exposure.**

Y. Eb-Levadoux, S. Frelon, O. Simon, C. Arnaudguilhem, R. Lobinski, & S. Mounicou.
Metallomics, 2017
DOI : 10.1039/C6MT00291A

- Publications prévues : partie protéomique, analyse des ampholytes porteurs.

Communications orales

- **Identification des ligands biologiques de l'uranium dans les gonades de *Danio rerio*.**

Y. Eb-Levadoux, S. Mounicou, O. Simon, C. Arnaudguilhem, R. Lobinski & S. Frelon
Spectr'atom : 23-27 Mai 2016, Pau

- **Identification of biologic binding of uranium in *Danio rerio* gonads. Impact on their functionality.**

Y. Eb-Levadoux, S. Mounicou, O. Simon, C. Arnaudguilhem, P. Fourquet, R. Lobinski, S. Frelon
SETAC World 7^{ème} édition : 6-10 Nov. 2016, Orlando, FL, USA

Références bibliographiques

- Aebersold, R. and M. Mann (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." Nature **422**(6928): 198-207.
- Aebersold, R. and M. Mann (2016). "Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function." Nature **537**(7620): 347-355.
- Agarwal, A. R., L. Zhao, H. Sancheti, I. K. Sundar, I. Rahman and E. Cadenas (2012). "Short-term cigarette smoke exposure induces reversible changes in energy metabolism and cellular redox status independent of inflammatory responses in mouse lungs." American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology **303**(10): L889-L898.
- Al Kaddissi, S., A. Legeay, P. Gonzalez, M. Floriani, V. Camilleri, R. Gilbin and O. Simon (2011). "Effects of uranium uptake on transcriptional responses, histological structures and survival rate of the crayfish *Procambarus clarkii*." Ecotoxicology and Environmental Safety **74**(7): 1800-1807.
- Arukwe, A. and A. Goksøyr (2003). "Eggshell and egg yolk proteins in fish: Hepatic proteins for the next generation: Oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption." Comparative Hepatology **2**.
- Arukwe, A., F. R. Knudsen and A. Goksøyr (1997). "Fish zona radiata (eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens." Environmental Health Perspectives **105**(4): 418.
- Averseng, O., A. Hagège, F. Taran and C. Vidaud (2010). "Surface plasmon resonance for rapid screening of uranyl affine proteins." Analytical Chemistry **82**(23): 9797-9802.
- Aytekin, Y. and R. Yüce (2008). "Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*)." Brazilian Archives of Biology and Technology **51**(3): 513-522.
- Barillet, S., C. Adam-Guillermin, O. Palluel, J. M. Porcher and A. Devaux (2011). "Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure." Environmental Pollution **159**(2): 495-502.
- Barillet, S., C. Adam, O. Palluel and A. Devaux (2007). "Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium." Environmental Toxicology and Chemistry **26**(3): 497-505.
- Barillet, S., V. Larno, M. Floriani, A. Devaux and C. Adam-Guillermin (2010). "Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure." Aquatic Toxicology **100**(3): 295-302.
- Basset, C., O. Averseng, P. J. Ferron, N. Richaud, A. Hagège, O. Pible and C. Vidaud (2013). "Revision of the biodistribution of uranyl in serum: Is fetuin-A the major protein target?" Chemical Research in Toxicology **26**(5): 645-653.
- Basset, C., A. Dedieu, P. Guérin, E. Quéméneur, D. Meyer and C. Vidaud (2008). "Specific capture of uranyl protein targets by metal affinity chromatography." Journal of Chromatography A **1185**(2): 233-240.
- Bateman, A., M. J. Martin, C. O'Donovan, M. Magrane, R. Apweiler, E. Alpi, R. Antunes, J. Arganiska, B. Bely, M. Bingley, C. Bonilla, R. Britto, B. Bursteinas, G. Chavali, E. Cibrian-Uhalte, A. Da Silva, M. De Giorgi, T. Dogan, F. Fazzini, P. Gane, L. G. Castro, P. Garmiri, E. Hatton-Ellis, R. Hieta, R. Huntley, D. Legge, W. Liu, J. Luo, A. Macdougall, P. Mutowo, A. Nightingale, S. Orchard, K. Pichler, D. Poggioli, S. Pundir, L. Pureza, G. Qi, S. Rosanoff, R. Saidi, T. Sawford, A. Shypitsyna, E. Turner, V. Volynkin, T. Wardell, X. Watkins, H. Zellner, A. Cowley, L. Figueira, W. Li, H. McWilliam, R. Lopez, I. Xenarios, L. Bougueleret, A. Bridge, S. Poux, N. Redaschi, L. Aimo, G. Argoud-Puy, A. Auchincloss, K. Axelsen, P. Bansal, D. Baratin, M. C. Blatter, B. Boeckmann, J. Bolleman, E. Boutet, L. Breuza, C. Casal-Casas, E. De Castro, E. Coudert, B. Cuche, M. Doche, D. Dornevil, S. Duvaud, A. Estreicher, L. Famiglietti, M. Feuermann, E. Gasteiger, S. Gehant, V. Gerritsen, A. Gos, N. Gruaz-Gumowski, U. Hinz, C. Hulo, F. Jungo, G. Keller, V. Lara, P. Lemerrier, D. Lieberherr, T. Lombardot, X. Martin, P. Masson, A. Morgat, T.

- Neto, N. Nospikel, S. Paesano, I. Pedruzzi, S. Pilbout, M. Pozzato, M. Pruess, C. Rivoire, B. Roechert, M. Schneider, C. Sigrist, K. Sonesson, S. Staehli, A. Stutz, S. Sundaram, M. Tognolli, L. Verbregue, A. L. Veuthey, C. H. Wu, C. N. Arighi, L. Arminski, C. Chen, Y. Chen, J. S. Garavelli, H. Huang, K. Laiho, P. McGarvey, D. A. Natale, B. E. Suzek, C. R. Vinayaka, Q. Wang, Y. Wang, L. S. Yeh, M. S. Yerramalla and J. Zhang (2015). "UniProt: A hub for protein information." Nucleic acids research **43**(D1): D204-D212.
- Becker, J. S., M. Zoriy, J. Dobrowolska and A. Matusch (2007). "Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) in elemental imaging of biological tissues and in proteomics." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **22**(7): 736-744.
- Benesch, J. L. P., B. T. Ruotolo, D. A. Simmons and C. V. Robinsons (2007). "Protein complexes in the gas phase: Technology for structural genomics and proteomics." Chemical Reviews **107**(8): 3544-3567.
- Betcher, R. N., M. Gascoyne and D. Brown (1988). "Uranium in groundwaters of southeastern Manitoba, Canada." Canadian journal of earth sciences **25**(12): 2089-2103.
- Bleise, A., P. R. Danesi and W. Burkart (2003). "Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): A general overview." Journal of Environmental Radioactivity **64**(2-3): 93-112.
- Bourrachot, S. (2009). "Etude des effets biologiques de l'exposition à l'uranium chez le poisson zèbre (*D. rerio*). Impact sur les stades de vie." Thèse de Doctorat.
- Bourrachot, S., F. Brion, S. Pereira, M. Floriani, V. Camilleri, I. Cavalié, O. Palluel and C. Adam-Guillermin (2014). "Effects of depleted uranium on the reproductive success and F1 generation survival of zebrafish (*Danio rerio*)." Aquatic Toxicology **154**: 1-11.
- Bourrachot, S., O. Simon and R. Gilbin (2008). "The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*)." Aquatic Toxicology **90**(1): 29-36.
- Boyle, D., K. V. Brix, H. Amlund, A. K. Lundebye, C. Hogstrand and N. R. Bury (2008). "Natural arsenic contaminated diets perturb reproduction in fish." Environmental Science and Technology **42**(14): 5354-5360.
- Bresson, C., E. Ansoborlo and C. Vidaud (2011). "Radionuclide speciation: A key point in the field of nuclear toxicology studies." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **26**(3): 593-601.
- Breton, C., L. Šnajdrová, C. Jeanneau, J. Koča and A. Imberty (2006). "Structures and mechanisms of glycosyltransferases." Glycobiology **16**(2): 29-37R.
- Bucher, G. (2013). "Développements analytiques pour la spéciation de l'uranium dans les branchies du poisson zèbre (*Danio rerio*)." PhD thesis - IRSN/LCABIE UMR 5254.
- Bucher, G., S. Frelon, O. Simon, R. Lobinski and S. Mounicou (2014). "Development of non-denaturing off-gel isoelectric focusing for the separation of uranium-protein complexes in fish." Analytical and Bioanalytical Chemistry **406**(14): 3517-3520.
- Bucher, G., S. Mounicou, O. Simon, M. Floriani, R. Lobinski and S. Frelon (2014). "Different uranium distribution patterns in cytosolic protein pool of zebrafish gills after chronic and acute waterborne exposures." Chemosphere **111**: 412-417.
- Bucher, G., S. Mounicou, O. Simon, M. Floriani, R. Lobinski and S. Frelon (2016). "Insights into the nature of uranium target proteins within zebrafish gills after chronic and acute waterborne exposures." Environmental Toxicology and Chemistry **35**(3): 736-741.
- Carneiro, M., B. Reis, J. Azevedo, A. Campos, H. Osório, V. Vasconcelos and J. C. Martins (2015). "Glutathione transferases responses induced by microcystin-LR in the gills and hepatopancreas of the clam *Venerupis philippinarum*." Toxins **7**(6): 2096-2120.
- Carnevali, O., R. Carletta, A. Cambi, A. Vita and N. Bromage (1999). "Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: Involvement of two lysosomal proteinases." Biology of Reproduction **60**(1): 140-146.
- Cooley, H. M. and J. F. Klaverkamp (2000). "Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*)." Aquatic Toxicology **48**(4): 477-494.

- Coppin, F., J. Michon, C. Garnier and S. Frelon (2015). "Fluorescence quenching determination of uranium (VI) binding properties by two functional proteins: Acetylcholinesterase (AChE) and vitellogenin (Vtg)." Journal of Fluorescence **25**(3): 569-576.
- Dai, Y. J., Y. F. Jia, N. Chen, W. P. Bian, Q. K. Li, Y. B. Ma, Y. L. Chen and D. S. Pei (2014). "Zebrafish as a model system to study toxicology." Environmental Toxicology and Chemistry **33**(1): 11-17.
- De Souza, A. G., T. J. MacCormack, N. Wang, L. Li and G. G. Goss (2009). "Large-scale proteome profile of the zebrafish (*Danio rerio*) gill for physiological and biomarker discovery studies." Zebrafish **6**(3): 229-238.
- Dedieu, A., F. Bérenguer, C. Basset, O. Prat, E. Quéméneur, O. Pible and C. Vidaud (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**(28): 5365-5376.
- Denison, F. H. and J. Garnier-Laplace (2005). "The effects of database parameter uncertainty on uranium(VI) equilibrium calculations." Geochimica et Cosmochimica Acta **69**(9): 2183-2191.
- Deschamps D., Morales J., Mazabraud A., Le Maire M., Denis H. and B. D. (1991). "Two forms of elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha O and 42Sp50), present in oocytes, but absent in somatic cells of *Xenopus laevis*." The Journal of Cell Biology **114**(6): 1109-1111.
- Drevnick, P. E. and M. B. Sandheinrich (2003). "Effects of dietary methylmercury on reproductive endocrinology of fathead minnows." Environmental Science and Technology **37**(19): 4390-4396.
- Fenn J.B., M. M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." Science **246**(4926): 64-71.
- Finn, R. N. and B. A. Kristoffersen (2007). "Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the "3R hypothesis": Correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts." PLoS ONE **2**(1).
- Finn, R. N., G. C. Ostby, B. Norberg and H. J. Fyhn (2002). "In vivo oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*); proteolytic liberation of free amino acids, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx." Journal of Experimental Biology **205**(2): 211-224.
- Frelon, S., O. Guipaud, S. Mounicou, R. Lobinski, O. Delissen and F. Paquet (2009). "In vivo screening of proteins likely to bind uranium in exposed rat kidney." Radiochimica Acta **97**(7): 367-373.
- Frelon, S., S. Mounicou, R. Lobinski, R. Gilbin and O. Simon (2013). "Subcellular fractionation and chemical speciation of uranium to elucidate its fate in gills and hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii*." Chemosphere **91**(4): 481-490.
- Gabelica, V., E. Schulz and M. Karas (2004). "Internal energy build-up in matrix-assisted laser desorption/ionization." Journal of Mass Spectrometry **39**(6): 579-593.
- Gagnaire, B., A. Bado-Nilles and W. Sanchez (2014). "Depleted Uranium Disturbs Immune Parameters in Zebrafish, *Danio rerio*: An Ex Vivo/In Vivo Experiment." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **67**(3): 426-435.
- Gagnaire, B., I. Cavalie, V. Camilleri and C. Adam-Guillermin (2013). "Effects of depleted uranium on oxidative stress, detoxification, and defence parameters of zebrafish *danio rerio*." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **64**(1): 140-150.
- Garnier, C. (2004). "Modélisation et évaluation des équilibres de complexation entre la matière organique naturelle, les métaux traces et le proton. Application aux eaux naturelles."
- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. e. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel and A. Bairoch (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server. The Proteomics Protocols Handbook. J. M. Walker. Totowa, NJ, Humana Press: 571-607.
- Geffard, A., H. Sartelet, J. Garric, S. Biagianti-Risbourg, L. Delahaut and O. Geffard (2010). "Subcellular compartmentalization of cadmium, nickel, and lead in *Gammarus fossarum*: Comparison of methods." Chemosphere **78**(7): 822-829.
- Gombeau, K., J. P. Bourdineaud, J. L. Ravanat, O. Armant, V. Camilleri, I. Cavalie, M. Floriani and C. Adam-Guillermin (2017). "Epigenetic, histopathological and transcriptomic effects following

- exposure to depleted uranium in adult zebrafish and their progeny." *Aquatic Toxicology* **184**: 14-25.
- Gombeau, K., S. Pereira, J. L. Ravanat, V. Camilleri, I. Cavalie, J. P. Bourdineaud and C. Adam-Guillermin (2016). "Depleted uranium induces sex- and tissue-specific methylation patterns in adult zebrafish." *Journal of Environmental Radioactivity* **154**: 25-33.
- Goulet, R. R., C. Fortin and D. J. Spry (2011). 8 - Uranium. *Fish Physiology*. A. P. F. Chris M. Wood and J. B. Colin, Academic Press. **Volume 31, Part B**: 391-428.
- Groh, K. J., V. J. Nesatyy, H. Segner, R. I. L. Eggen and M. J. F. Suter (2011). "Global proteomics analysis of testis and ovary in adult zebrafish (*Danio rerio*)." *Fish Physiology and Biochemistry* **37**(3): 619-647.
- Grubhofer, N. and P. Pogacar (1973). Ampholytes for focusing electrophoresis, US Patents.
- Grunwald, D. J. and J. S. Eisen (2002). "Headwaters of the zebrafish—emergence of a new model vertebrate." *Nature Reviews Genetics* **3**(9): 717-724.
- Gündel, U., D. Benndorf, M. Von Bergen, R. Altenburger and E. Küster (2007). "Vitellogenin cleavage products as indicators for toxic stress in zebra fish embryos: A proteomic approach." *Proteomics* **7**(24): 4541-4554.
- Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1974). "Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation." *Journal of Biological Chemistry* **249**(22): 7130-7139.
- Hanna, R. N. and Y. Zhu (2011). "Controls of meiotic signaling by membrane or nuclear progesterin receptor in zebrafish follicle-enclosed oocytes." *Molecular and cellular endocrinology* **337**(1): 80-88.
- Hara, A., N. Hiramatsu and T. Fujita (2016). "Vitellogenesis and choriogenesis in fishes." *Fisheries Science* **82**(2): 187-202.
- Haraguchi, H. (2004). "Metallomics as integrated biometal science." *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **19**(1): 5-14.
- Hill, A. J., H. Teraoka, W. Heideman and R. E. Peterson (2005). "Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity." *Toxicological Sciences* **86**(1): 6-19.
- Hong, S. K. and I. B. Dawid (2008). "Alpha2 macroglobulin-like is essential for liver development in zebrafish." *PLoS ONE* **3**(11).
- Howe, K., M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Tarrance, C. Berthelot, M. Muffato, J. E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J. C. Barrett, R. Koch, G.-J. Rauch, S. White, W. Chow, B. Kilian, L. T. Quintais, J. A. Guerra-Assuncao, Y. Zhou, Y. Gu, J. Yen, J.-H. Vogel, T. Eyre, S. Redmond, R. Banerjee, J. Chi, B. Fu, E. Langley, S. F. Maguire, G. K. Laird, D. Lloyd, E. Kenyon, S. Donaldson, H. Sehra, J. Almeida-King, J. Loveland, S. Trevanion, M. Jones, M. Quail, D. Willey, A. Hunt, J. Burton, S. Sims, K. McLay, B. Plumb, J. Davis, C. Clee, K. Oliver, R. Clark, C. Riddle, D. Elliott, G. Threadgold, G. Harden, D. Ware, B. Mortimer, G. Kerry, P. Heath, B. Phillimore, A. Tracey, N. Corby, M. Dunn, C. Johnson, J. Wood, S. Clark, S. Pelan, G. Griffiths, M. Smith, R. Glithero, P. Howden, N. Barker, C. Stevens, J. Harley, K. Holt, G. Panagiotidis, J. Lovell, H. Beasley, C. Henderson, D. Gordon, K. Auger, D. Wright, J. Collins, C. Raisen, L. Dyer, K. Leung, L. Robertson, K. Ambridge, D. Leongamornlert, S. McGuire, R. Gilderthorp, C. Griffiths, D. Manthavadi, S. Nichol, G. Barker, S. Whitehead, M. Kay, J. Brown, C. Murnane, E. Gray, M. Humphries, N. Sycamore, D. Barker, D. Saunders, J. Wallis, A. Babbage, S. Hammond, M. Mashreghi-Mohammadi, L. Barr, S. Martin, P. Wray, A. Ellington, N. Matthews, M. Ellwood, R. Woodmansey, G. Clark, J. Cooper, A. Tromans, D. Grafham, C. Skuce, R. Pandian, R. Andrews, E. Harrison, A. Kimberley, J. Garnett, N. Fosker, R. Hall, P. Garner, D. Kelly, C. Bird, S. Palmer, I. Gehring, A. Berger, C. M. Dooley, Z. Ersan-Urun, C. Eser, H. Geiger, M. Geisler, L. Karotki, A. Kirn, J. Konantz, M. Konantz, M. Oberlander, S. Rudolph-Geiger, M. Teucke, K. Osoegawa, B. Zhu, A. Rapp, S. Widaa, C. Langford, F. Yang, N. P. Carter, J. Harrow, Z. Ning, J. Herrero, S. M. J. Searle, A. Enright, R. Geisler, R. H. A. Plasterk, C. Lee, M. Westerfield, P. J. de Jong, L. I. Zon, J. H. Postlethwait, C. Nusslein-Volhard, T. J. P. Hubbard, H. R. Crollius, J. Rogers and D. L. Stemple (2013). "The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome." *Nature* **496**(7446): 498-503.

- Iavicoli, I., L. Fontana and A. Bergamaschi (2009). "The effects of metals as endocrine disruptors." Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews **12**(3): 206-223.
- Jaenisch, R. and A. Bird (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals." Nature Genetics **33**(3S): 245-254.
- Jaquinod, M., E. Leize, N. Potier, A. M. Albrecht, A. Shanzer and A. Van Dorsselaer (1993). "Characterisation of non-covalent complexes by electrospray mass spectrometry." Tetrahedron Letters **34**(17): 2771-2774.
- Jeziarska, B., K. Ługowska and M. Witeska (2009). "The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review)." Fish Physiology and Biochemistry **35**(4): 625-640.
- Just, W. (1978). Preparation of carrier ampholyte mixtures, US Patents.
- Kebarle, P. (2000). "A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry." Journal of Mass Spectrometry **35**(7): 804-817.
- Kondo, T., T. Yanagawa, N. Yoshida and M. Yamashita (1997). "Introduction of cyclin B induces activation of the maturation-promoting factor and breakdown of germinal vesicle in growing zebrafish oocytes unresponsive to the maturation-inducing hormone." Developmental Biology **190**(1): 142-152.
- Krenkova, J. and F. Foret (2012). "On-line CE/ESI/MS interfacing: Recent developments and applications in proteomics." Proteomics **12**(19-20): 2978-2990.
- Lakowicz, J. R. (1983). Quenching of fluorescence. Principles of fluorescence spectroscopy, Springer: 257-301.
- Lam, H.-T. (2008). "Of gels, offgel and off with the gel : development of isoelectric focusing tools for proteomics."
- Le Guernic, A., W. Sanchez, A. Bado-Nilles, O. Palluel, C. Turies, E. Chadili, I. Cavalié, L. Delahaut, C. Adam-Guillermin, J. M. Porcher, A. Geffard, S. Betoulle and B. Gagnaire (2016). "In situ effects of metal contamination from former uranium mining sites on the health of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.)." Ecotoxicology **25**(6): 1234-1259.
- Lerebours, A., C. Adam-Guillermin, D. Brèthes, S. Frelon, M. Floriani, V. Camilleri, J. Garnier-Laplace and J. P. Bourdineaud (2010). "Mitochondrial energetic metabolism perturbations in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium." Aquatic Toxicology **100**(1): 66-74.
- Lerebours, A., J. P. Bourdineaud, K. Van Der Ven, T. Vandenbrouck, P. Gonzalez, V. Camilleri, M. Floriani, J. Garnier-Laplace and C. Adam-Guillermin (2010). "Sublethal effects of waterborne uranium exposures on the zebrafish brain: Transcriptional responses and alterations of the olfactory bulb ultrastructure." Environmental Science and Technology **44**(4): 1438-1443.
- Lerebours, A., P. Gonzalez, C. Adam, V. Camilleri, J. P. Bourdineaud and J. Garnier-Laplace (2009). "Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles, and gills of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant waterborne uranium concentrations." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(6): 1271-1278.
- Levi, L., I. Pekarski, E. Gutman, P. Fortina, T. Hyslop, J. Biran, B. Levavi-Sivan and E. Lubzens (2009). "Revealing genes associated with vitellogenesis in the liver of the zebrafish (*Danio rerio*) by transcriptome profiling." BMC Genomics **10**.
- Li, B., J. Raff, A. Barkleit, G. Bernhard and H. Foerstendorf (2010). "Complexation of U(VI) with highly phosphorylated protein, phosvitin. A vibrational spectroscopic approach." Journal of Inorganic Biochemistry **104**(7): 718-725.
- Lienesch, L. A., J. N. Dumont and J. A. Bantle (2000). "The effect of cadmium on oogenesis in *Xenopus laevis*." Chemosphere **41**(10): 1651-1658.
- Łobiński, R., D. Schaumlöffel and J. Szpunar (2006). "Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry." Mass Spectrometry Reviews **25**(2): 255-289.
- Loo, J. A. (1997). "Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry." Mass Spectrometry Reviews **16**(1): 1-23.

- Lourenço, J., B. B. Castro, R. MacHado, B. Nunes, S. Mendo, F. Gonçalves and R. Pereira (2010). "Genetic, biochemical, and individual responses of the teleost fish *carassius auratus* to uranium." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **58**(4): 1023-1031.
- Lubzens, E., G. Young, J. Bobe and J. Cerdà (2010). "Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed." General and comparative endocrinology **165**(3): 367-389.
- Malard, V., O. Prat, E. Darrouzet, F. Bérenguer, N. Sage and E. Quéméneur (2005). "Proteomic analysis of the response of human lung cells to uranium." Proteomics **5**(17): 4568-4580.
- Mangos, S., B. Vanderbeld, R. Krawetz, K. Sudol and G. M. Kelly (2001). "Ran binding protein RanBP1 in zebrafish embryonic development." Molecular Reproduction and Development **59**(3): 235-248.
- Maret, W. and M. Copsey (2012). "Metallomics: Whence and whither." Metallomics **4**(10): 1017-1019.
- Markich, S. J. (2002). "Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview." TheScientificWorldJournal [electronic resource] **2**: 707-729.
- Marlow, F. L. and M. C. Mullins (2008). "Bucky ball functions in Balbiani body assembly and animal-vegetal polarity in the oocyte and follicle cell layer in zebrafish." Developmental Biology **321**(1): 40-50.
- McGeer, J. C., C. Szedbedinszky, D. G. McDonald and C. M. Wood (2000). "Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs." Aquatic Toxicology **50**(3): 231-243.
- Meador, J. P., W. J. Adams, B. I. Escher, L. S. McCarty, A. E. McElroy and K. G. Sappingtony (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**(1): 2-6.
- Menke, A. L., J. M. Spitsbergen, A. P. M. Wolterbeek and R. A. Woutersen (2011). "Normal anatomy and histology of the adult zebrafish." Toxicologic Pathology **39**(5): 759-775.
- Michon, J., S. Frelon, C. Garnier and F. Coppin (2010). "Determinations of uranium(VI) binding properties with some metalloproteins (transferrin, albumin, metallothionein and ferritin) by fluorescence quenching." Journal of Fluorescence **20**(2): 581-590.
- Minárik, P., N. Tomaásková, M. Kollárová and M. Antalík (2002). "Malate Dehydrogenases - Structure and function." General Physiology and Biophysics **21**(3): 257-265.
- Mounicou, S., L. Ouerdane, Béatrice'Azou, I. Passagne, C. Célineohayon, J. Szpunar and R. Lobinski (2010). "Identification of metallothionein subisoforms in HPLC using accurate mass and online sequencing by electrospray hybrid linear ion trap-orbital ion trap mass spectrometry." Analytical Chemistry **82**(16): 6947-6957.
- Mounicou, S., J. Szpunar and R. Lobinski (2009). "Metallomics: The concept and methodology." Chemical Society Reviews **38**(4): 1119-1138.
- Nilsson, J., J. Sengupta, J. Frank and P. Nissen (2004). "Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: A platform for signalling molecules on the ribosome." EMBO Reports **5**(12): 1137-1141.
- Nordberg, G. F., T. Jin and M. Nordberg (1994). "Subcellular targets of cadmium nephrotoxicity: Cadmium binding to renal membrane proteins in animals with or without protective metallothionein synthesis." Environmental Health Perspectives **102**(SUPPL. 3): 191-194.
- Nukada, Y., M. Horie, A. Fukui, T. Kotani and M. Yamashita (2015). "Real-time imaging of actin filaments in the zebrafish oocyte and embryo." Cytoskeleton **72**(9): 491-501.
- Olech, L. (2006). Carrier ampholytes of high pH range, US Patents.
- Oliveira, R., I. Domingues, C. K. Grisolia and A. M. V. M. Soares (2009). "Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults." Environmental Science and Pollution Research **16**(6): 679-688.
- Padhi, A., M. A. Buchheim and B. Verghese (2008). "Dynamic evolutionary pattern of α 2-macroglobulin in a model organism, the zebrafish (*Danio rerio*)." Molecular Immunology **45**(11): 3312-3318.

- Parreiras-E-Silva, L. T., A. D. Luchessi, R. I. Reis, C. Oliver, M. C. Jamur, R. G. P. Ramos, E. B. Oliveira, R. Curi and C. M. Costa-Neto (2010). "Evidences of a role for eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in mouse embryogenesis and cell differentiation." Journal of Cellular Physiology **225**(2): 500-505.
- Patino, R. and C. V. Sullivan (2002). "Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish." Fish Physiology and Biochemistry **26**(1): 57-70.
- Pelegri, F. (2003). "Maternal Factors in Zebrafish Development." Developmental Dynamics **228**(3): 535-554.
- Petitot, F., S. Frelon, C. Chambon, F. Paquet and O. Guipaud (2016). "Proteome changes in rat serum after a chronic ingestion of enriched uranium: Toward a biological signature of internal contamination and radiological effect." Toxicology Letters **257**: 44-59.
- Pittman, Y. R., K. Kandl, M. Lewis, L. Valente and T. G. Linzy (2009). "Coordination of eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) function in actin organization and translation elongation by the guanine nucleotide exchange factor eEF1B α ." Journal of Biological Chemistry **284**(7): 4739-4747.
- Prat, O., F. Berenguer, V. Malard, E. Tavan, N. Sage, G. Steinmetz and E. Quemeneur (2005). "Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity." Proteomics **5**(1): 297-306.
- Qin, Z., L. K. Barthel and P. A. Raymond (2009). "Genetic evidence for shared mechanisms of epimorphic regeneration in zebrafish." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(23): 9310-9315.
- Reed, B. and M. Jennings (2010). "Guidance on the housing and care of Zebrafish." Danio rerio, RSPCA.
- Righetti, P. G. (2006). "The Alpher, Bethe, Gamow of isoelectric focusing, the alpha-Centauri of electrokinetic methodologies. Part I." Electrophoresis **27**(5-6): 923-938.
- Righetti, P. G., C. Simo, R. Sebastiano and A. Citterio (2007). "Carrier ampholytes for IEF, on their fortieth anniversary (1967-2007), brought to trial in court: The verdict." Electrophoresis **28**(21): 3799-3810.
- Safi, S., G. Creff, A. Jeanson, L. Qi, C. Basset, J. Roques, P.L. Solari, E. Simoni, C. Vidaud and C. Den Auwer (2013) "Osteopontin: A Uranium Phosphorylated Binding-Site Characterization." Chemistry European Journal **19** 11261-11269
- Scapolan, S., E. Ansoberlo, C. Moulin and C. Madic (1998). "Investigations by time-resolved laser-induced fluorescence and capillary electrophoresis of the uranyl-phosphate species: Application to blood serum." Journal of Alloys and Compounds **271-273**: 106-111.
- Schiene-Fischer, C. (2015). "Multidomain Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerases." Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects **1850**(10): 2005-2016.
- Sebastiano, R., C. Simo, M. E. Mendieta, P. Antonioli, A. Citterio, A. Cifuentes, G. Peltre and P. G. Righetti (2006). "Mass distribution and focusing properties of carrier ampholytes for isoelectric focusing: I. Novel and unexpected results." Electrophoresis **27**(20): 3919-3934.
- Sheppard, S. C., M. I. Sheppard, M. O. Gallerand and B. Sanipelli (2005). "Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium." Journal of Environmental Radioactivity **79**(1): 55-83.
- Shi, Y. (2009). "Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure." Cell **139**(3): 468-484.
- Simo, C., M. E. Mendieta, P. Antonioli, R. Sebastiano, A. Citterio, A. Cifuentes, G. Peltre and P. G. Righetti (2006). "Mass distribution, polydispersity and focusing properties of carrier ampholytes for IEF II: pH 4-6 intervals." Electrophoresis **27**(23): 4849-4858.
- Simon, O., E. Floc'h, B. Geffroy and S. Frelon (2014). "Exploring ecotoxicological fish bioassay for the evaluation of uranium reprotoxicity." Environmental Toxicology and Chemistry **33**(8): 1817-1824.
- Simon, O., M. Floriani, I. Cavalie, V. Camilleri, C. Adam, R. Gilbin and J. Garnier-Laplace (2011). "Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages in the chronically exposed bivalve *Corbicula fluminea*." Journal of Environmental Radioactivity **102**(8): 766-773.

- Simon, O., E. Mottin, B. Geffroy and T. Hinton (2011). "Effects of dietary uranium on reproductive endpoints-fecundity, survival, reproductive success-of the fish *Danio rerio*." Environmental Toxicology and Chemistry **30**(1): 220-225.
- Sims Iii, R. J., R. Belotserkovskaya and D. Reinberg (2004). "Elongation by RNA polymerase II: The short and long of it." Genes and Development **18**(20): 2437-2468.
- Sjöblom, B., A. Salmazo and K. Djinović-Carugo (2008). "α-Actinin structure and regulation." Cellular and Molecular Life Sciences **65**(17): 2688-2701.
- Smith, R. D., J. A. Olivares, N. T. Nguyen and H. R. Udseth (1988). "Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface." Analytical Chemistry **60**(5): 436-441.
- Soderberg, J. L. (1982). Ampholyte and its use in separation processes, US Patents.
- Sperling, M. and U. Karst (2013). "Metalomics: an emerging interdisciplinary science." Analytical and Bioanalytical Chemistry **405**(6): 1789-1790.
- Streisinger, G., C. Walker, N. Dower, D. Knauber and F. Singer (1981). "PRODUCTION OF CLONES OF HOMOZYGOUS DIPLOID ZEBRA FISH (*BRACHYDANIO-RERIO*)." Nature **291**(5813): 293-296.
- Svensson, H. (1961). "Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. I. The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases." Acta chem. scand **15**: 325-341.
- Svensson, H. (1962). "Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. II. Buffering capacity and conductance of isoionic ampholytes." Acta chem. scand **16**(2): 456-466.
- Szpunar, J. (2004). "Metalomics: A new frontier in analytical chemistry." Analytical and Bioanalytical Chemistry **378**(1): 54-56.
- Szpunar, J. (2005). "Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: Metalomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics." Analyst **130**(4): 442-465.
- Tainer, J. A., V. A. Roberts and E. D. Getzoff (1991). "Metal-binding sites in proteins." Current Opinion in Biotechnology **2**(4): 582-591.
- Tan, Q., A. Balofsky, K. Weisz and C. Peng (2009). "Role of activin, transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein 15 in regulating zebrafish oocyte maturation." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **153**(1): 18-23.
- Tay, T. L., Q. Lin, T. K. Seow, K. H. Tan, C. L. Hew and Z. Gong (2006). "Proteomic analysis of protein profiles during early development of the zebrafish, *Danio rerio*." Proteomics **6**(10): 3176-3188.
- Thompson, J. and J. Bannigan (2008). "Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo." Reproductive Toxicology **25**(3): 304-315.
- Thompson, J. R. and L. J. Banaszak (2002). "Lipid-protein interactions in lipovitellin." Biochemistry **41**(30): 9398-9409.
- Tyler, C. R. and J. P. Sumpter (1996). "Oocyte growth and development in teleosts." Reviews in Fish Biology and Fisheries **6**(3): 287-318.
- Tyler, C. R., B. Van Der Eerden, S. Jobling, G. Panter and J. P. Sumpter (1996). "Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish." Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology **166**(7): 418-426.
- Van Den Heuvel, R. H. H. and A. J. R. Heck (2004). "Native protein mass spectrometry: From intact oligomers to functional machineries." Current Opinion in Chemical Biology **8**(5): 519-526.
- Van Horn, J. D. and H. Huang (2006). "Uranium(VI) bio-coordination chemistry from biochemical, solution and protein structural data." Coordination Chemistry Reviews **250**(7-8): 765-775.
- Vesterberg, Y. O. A. (1969). Method of isoelectric fractionation, US Patents.
- Vidaud, C., A. Dedieu, C. Basset, S. Plantevin, I. Dany, O. Pible and E. Quemeneur (2005). "Screening of human serum proteins for uranium binding." Chemical Research in Toxicology **18**(6): 946-953.

- Vidaud, C., S. Gourion-Arsiquaud, F. Rollin-Genetet, C. Torne-Celer, S. Plantevin, O. Pible, C. Berthomieu and E. Quemeneur (2007). "Structural consequences of binding of UO₂²⁺ to apotransferrin: Can this protein account for entry of uranium into human cells?" Biochemistry **46**(8): 2215-2226.
- Vinogradov, S. N., D. Hoogewijs, X. Bailly, K. Mizuguchi, S. Dewilde, L. Moens and J. R. Vanfleteren (2007). "A model of globin evolution." Gene **398**(1-2 SPEC. ISS.): 132-142.
- W.H.O (2001). "Depleted uranium : Sources, Exposure and Health Effects."
- Wang, H. and Z. Gong (1999). "Characterization of two zebrafish cDNA clones encoding egg envelope proteins ZP2 and ZP3." Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression **1446**(1-2): 156-160.
- Wang, H., J. T. Tan, A. Emelyanov, V. Korzh and Z. Gong (2005). "Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*." Gene **356**: 91-100.
- Wang, H., T. Yan, J. T. T. Tan and Z. Gong (2000). "A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosphotyrosine domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene." Gene **256**(1-2): 303-310.
- Wang, Y. J. and W. Ge (2003). "Spatial expression patterns of activin and its signaling system in the zebrafish ovarian follicle: Evidence for paracrine action of activin on the oocytes." Biology of Reproduction **69**(6): 1998-2006.
- Weiner, A. M. J., M. A. Sdrigotti, R. N. Kelsh and N. B. Calcaterra (2011). "Deciphering the cellular and molecular roles of cellular nucleic acid binding protein during cranial neural crest development." Development Growth and Differentiation **53**(8): 934-947.
- Williams, R. J. P. (2001). "Chemical selection of elements by cells." Coordination Chemistry Reviews **216-217**: 583-595.
- Wu, S. M., P. J. Tsai, M. Y. Chou and W. D. Wang (2013). "Effects of maternal cadmium exposure on female reproductive functions, gamete quality, and offspring development in Zebrafish (*Danio rerio*)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **65**(3): 521-536.
- Xu, M., S. Frelon, O. Simon, R. Lobinski and S. Mounicou (2014). "Development of a non-denaturing 2D gel electrophoresis protocol for screening in vivo uranium-protein targets in *Procambarus clarkii* with laser ablation ICP MS followed by protein identification by HPLC-Orbitrap MS." Talanta **128**: 187-195.
- Xu, M., S. Frelon, O. Simon, R. Lobinski and S. Mounicou (2014). "Non-denaturing isoelectric focusing gel electrophoresis for uranium-protein complexes quantitative analysis with LA-ICP MS." Analytical and Bioanalytical Chemistry **406**(4): 1063-1072.
- Zampolla, T., E. Spikings, D. Rawson and T. Zhang (2011). "Cytoskeleton proteins F-actin and tubulin distribution and interaction with mitochondria in the granulosa cells surrounding stage III zebrafish (*Danio rerio*) oocytes." Theriogenology **76**(6): 1110-1119.
- Zhou, M., W. W. Tu and J. Xu (2015). "Mechanisms of microcystin-LR-induced cytoskeletal disruption in animal cells." Toxicol **101**: 92-100.
- Ziv, T., T. Gattegno, V. Chapovetsky, H. Wolf, E. Barnea, E. Lubzens and A. Admon (2008). "Comparative proteomics of the developing fish (zebrafish and gilthead seabream) oocytes." Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics **3**(1): 12-35.

Annexe 1 : publication



Cite this: DOI: 10.1039/c6mt00291a

***In vivo* identification of potential uranium protein targets in zebrafish ovaries after chronic waterborne exposure**

Y. Eb-Levadoux,^{a,b} S. Frelon,^{a*} O. Simon,^a C. Arnaudguilhem,^b R. Lobinski^b and S. Mounicou^{a,b}

Ecotoxicological studies have indicated the reprotoxicity of uranium (U) in zebrafish, but its molecular mechanisms remain unclear. Due to the non-covalent nature of U–protein complexes, canonical proteomics approaches are often not relevant as they usually use denaturing reagents or solvents. In this study, non-denaturing (ND) methods were used to obtain insight into the nature of U potential targets in ovaries of reproduced and non-reproduced zebrafish after 20 days of exposure to an environmentally relevant U concentration (20 µg L⁻¹). After the ND sample preparation, 1-dimensional (SEC) and 2-dimensional (OGE × SEC) separations followed by ICP-sector-field MS measurements (U, P, Fe, Cu, and Zn) enabled the determination of chemical characteristics (MW, pI) of the metal–protein complexes. Phosphorus and U coelution confirmed the affinity of U for P-containing proteins. In addition, 2D separation allowed the discrimination of Fe-metalloproteins as potential U targets. Finally, 2D protein candidates for U complexation were identified after tryptic digestion conditions by LC-ESI FT MS and a database search. Potential U targets were mainly involved in three biological processes: oxidative stress regulation (SOD, GST), cytoskeleton structure (actin) and embryo early development (vtg, initiation factor).

Received 9th December 2016,
Accepted 22nd February 2017

DOI: 10.1039/c6mt00291a

rsc.li/metallomics

Significance to metallomics

Reproduction disorders in fish have been reported after chronic exposure to uranium in their aquatic environment. The purpose of this study is to identify proteins complexed by uranium to better understand reprotoxicity mechanisms. The results indicate that uranium is likely to bind phosphorylated proteins. No target differences were observed between contaminated and non-contaminated environments. Proteins identified showed that three biological processes are more likely to be disrupted by the presence of uranium in the ovary: oxidation balance, cell and tissue structure and embryo early development.

Introduction

Uranium (U) is naturally found at trace levels (µg L⁻¹) in aquatic environments. Its concentration in water can be as high as 2 mg L⁻¹ due to geological or anthropogenic factors,^{1,2} inducing a potential risk of chronic exposure for aquatic organisms.

The accumulation of U by aquatic animals and its subsequent toxicity in organs has been reported in various fish (goldfish *Carassius auratus*³ stickleback *Gasterosteus aculeatus*,⁴ whitefish *Coregonus clupeaformis*⁵), molluscs (bivalve *Corbicula fluminea*⁶) and crustaceans (crayfish *Procambarus clarkii*⁷).

In addition, some ecotoxicological studies were conducted on zebrafish *Danio rerio*, a fish model recommended to study organic contaminants and metals toxicity.^{8,9} Zebrafish offers several advantages from the experimental point of view including: (i) a small sized animal with a short spawn frequency and large spawning¹⁰ and (ii) a sequenced genome¹¹ which allows high throughput protein identification by mass spectrometry.¹² In zebrafish, U exposure has already been found to cause biological effects, such as DNA damage in blood cells,¹³ imbalance of the redox enzymatic system,¹⁴ induction of oxidative stress in the liver,¹³ and perturbation of mitochondrial energetic metabolism in the brain and muscles.¹⁵ Moreover, a reprotoxic effect has been observed after waterborne chronic exposure to environmentally relevant concentrations (20–250 µg L⁻¹)^{16–18} or with U-contaminated food.¹⁹ Indeed, among individual effects, the reproductive success (the number of spawning events and the number of eggs per spawn) was lowered,^{15,17} and, at the organ

^a IRSN/FRP-ENV/SERIS, LECO, BP3, 13115 St Paul lez Durance Cedex, France.

E-mail: sandrine.frelon@irsn.fr

^b CNRS/IPREM UMRS254, LCABIE, Technopôle Hélioparc Pau Pyrénées,

2 avenue du Président Angot, 64053 Pau Cedex 09, France.

E-mail: sandra.mounicou@univ-pau.fr

level, ultrastructural disorders were observed in the ovaries by transmission electron microscopy.¹⁶ High accumulation of U was measured in this organ (around 20% of the total U burden).¹⁹ However, the cause and mechanisms of such reprotoxicity remain unknown. As ovaries accumulate U, speciation studies can be a key to elucidate this toxicity.^{20,21}

In aerobic water, the predominant species of U is the uranyl ion (UO_2^{2+}), a hard cation likely to bind oxygen- and nitrogen-containing molecules, such as proteins or nucleic acid.^{22,23} Many *in vitro* studies reported such complexation with proteins such as albumin,²⁴ ferritin,²⁴ metallothionein,²⁴ phosvitin²⁵ or vitellogenin,²⁶ and its potential consequence for the protein structure.²⁷ In addition, *in vivo* studies conducted using immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) or other separation techniques, determined the potential target proteins in human plasma,²³ human kidney cells²⁸ and rat kidneys²⁹ after U exposure. However, due to the non-covalent binding of U-protein complexes, most analytical techniques cannot be directly applied for the *in vivo* investigation of intact complexes.

Recently, non-denaturing methods have been developed to avoid the disruption of native complexes. Sample preparation was designed to avoid organic solvents and molecules likely to chelate U, *i.e.* proteins were extracted with a non-denaturing buffer composed of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethane-sulfonic acid (HEPES)³⁰ and sucrose to maintain the physiological pH and osmolarity, respectively.³¹ Removing the denaturing chemicals (carrier ampholytes, dithiothreitol, urea, ...), native mono- and bi-dimensional gel separations were developed³² and applied to crayfish hepatopancreas³³ to achieve multi-elemental $\text{pI} \times \text{MW}$ (isoelectric point and molecular weight) cartography. A 2D liquid separation method was also reported by the off-line coupling of off-gel electrophoresis (OGE) and size exclusion chromatography (SEC) to be applied to male zebrafish gills.³⁴

Based on these recent analytical developments, the objectives of this study were (i) to characterize, in terms of molecular weight (MW), isoelectric point (pI) and metallic presence, U-protein complexes in ovaries of zebrafish and (ii) to propose candidate proteins for U complexation to elucidate the potential cause of toxicity. 1D (SEC) and 2D (OGE \times SEC) separations of proteins followed by ICPMS (multielemental) or ESIMS (identification) detection were performed on ovary extracts from control and U-contaminated groups, each containing non-reproduced (NR) and reproduced (R) females.

Materials and methods

Zebrafish exposure

Adult zebrafish (6 months old, males, 0.347 ± 0.054 mg, and females, 0.507 ± 0.109 mg) were first acclimated for 1 week in synthetic water ($[\text{Mg}^{2+}] = 4.7$, $[\text{Cl}^-] = 32.3$, $[\text{SO}_4^{2-}] = 9.6$, $[\text{Na}^+] = 7.4$, $[\text{NO}_3^-] = 19.2$, $[\text{Ca}^{2+}] = 11.6$, $[\text{CO}_3^{2-}] = 1.6$, $[\text{K}^+] = 5.9$ mg L⁻¹ and pH = 6.5 ± 1.0). The fish were fed with commercial flake food three times per day. Four groups of zebrafish were used during the experiment: one control group and one U-contaminated group exposed to 20 $\mu\text{g U L}^{-1}$ in synthetic water for either sex.

After 20 days of exposure, half of the females in each group were placed in contact with the males to induce reproduction. Overall, four female zebrafish groups were obtained: control (reproduced and non-reproduced) and contaminated (reproduced and non-reproduced). The fish were anesthetized in ice-cold water, exsanguinated and dissected out. The female gonads were weighed, immediately quick frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

All procedures used in this experiment were approved by the Animal User and Ethical Committee at the Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (Comité d'éthique IRSN No. 81).

Non-denaturing extraction of metal-protein complexes

A sample of 58 ± 18 mg of frozen gonads was homogenized in 1500 μL of 25 mM HEPES, 250 mM sucrose, pH 7.4 buffer with a Potter-Elvehjem grinder for 3 min. 25 μL of the homogenate was sampled to measure the U concentration in the ovary. The homogenates were then centrifuged at 900 g for 20 min at 4 °C to sediment membrane debris and tissue fragments. The supernatant containing cytoplasm was collected.

20 μL were used to determine the protein concentration, and 80 μL to monitor the metal distribution by SEC-ICP SF MS. The remaining volume was aliquoted and quick frozen for subsequent analyses (SEC-ICP SF MS and OGE experiments). Associated protocols are described in the following sections.

Protein and metal quantification and statistical analyses

The protein concentration in the extracts was assessed by the Coomassie-based colorimetric Bradford method.³⁵

U bioaccumulation in the gonads was determined by inductively coupled plasma sector field mass spectrometry (ICP SF MS). The homogenate was first mineralized at 80 °C with 150 μL of 70% nitric acid overnight in a laboratory oven and then resuspended in 5 mL of water. The resuspended samples were analysed by ICP SF MS as described in ref. 36.

Statistical analyses were done using R software (v3.0.1). Data were obtained for each condition with $n = 5$ to 7 per group. Normality and variance homogeneity for multi-variables were first tested with analysis of variance (ANOVA) followed by the Shapiro-Wilk and Levene test, respectively ($\alpha = 0.05$). Non-parametric Kruskal-Wallis tests followed by group-to-group Wilcoxon tests were used to assess statistical differences.

Size exclusion chromatography - ICP SF MS

Immediately after protein extraction, an aliquot of 80 μL of the homogenised sample was injected into a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare), and eluted with 100 mM ammonium acetate pH 7.4 buffer at 0.7 mL min⁻¹ with an Agilent 1200 series HPLC system and UV detection at 280 nm. The column was calibrated with a mixture of standard proteins (670 kDa thyroglobulin, 474 kDa ferritin, 80 kDa transferrin, 40 kDa Mn-superoxide dismutase, 16 kDa myoglobin, 6.8 kDa metallothionein 2a and 1.3 kDa cobalamin). The ICP mass spectrometer (Element XR, Thermo Fisher Scientific, Germany) was coupled to the HPLC system to detect and quantify ²³⁸U in

low resolution ($R = 300$) mode and ^{63}Cu , ^{56}Fe , ^{31}P and ^{64}Zn in medium resolution ($R = 4000$) mode. After a 30 min run, three injections of 3 min of 200 mM ammonium carbonate and 40 mM EDTA were applied to release free U bound to the column stationary phase and to maintain a low U background (ca. 100 counts).

Off-gel electrophoresis

A 3 mL mixture containing $0.5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ of protein (equivalent volume from 6 contaminated females per group) and 1.5% commercial carrier ampholytes (40% Biolyte 3/10 Ampholyte, Biorad) was isoelectrically separated on MicroRotor apparatus (Biorad, Hercules, CA) for 1.5 h at 1 W (limit 1000 V) and 4°C in a cold room. Ten fractions of 250–300 μL were collected. For each fraction, 40 μL was used to determine the pH, 20 μL to assess the protein concentration, 25 μL to measure the metal concentration, 80 μL for metal–protein complex mapping and the remaining volume to identify potential protein targets.

Metal–protein complex mapping (pI \times MW)

Bi-dimensional separation of metal-complexes was performed by off-line coupling of off-gel electrophoresis (OGE) and size exclusion chromatography (SEC). 80 μL of each OGE fraction were injected into SEC-ICP SF MS as described in the “Size exclusion chromatography” section. Heat maps of UV and metals (pH as the x-axis, MW as the y-axis and signal intensity as the z-axis) were plotted using Origin software (Origin 2016 Sr1, version b9.3.1.273).

Protein identification in off-gel electrophoresis fractions

A 50 μL sample of each OGE fraction was first filtered with a 10 kDa cut-off for 15 min at 14 000 g. After pH adjustment with 20 μL of 50 mmol L^{-1} ammonium carbonate (pH 8), proteins were reduced with 5 μL of 45 mmol L^{-1} dithiothreitol for 15 min at 50°C and alkylated with 5 μL of 100 mmol L^{-1} iodoacetamide for 15 min in the dark at room temperature. Proteins were digested overnight with 1 μg of trypsin. Peptides were filtered through a 10 kDa cut-off and speed-vacuum concentrated for 30 min at 30°C . An 8 μL aliquot was injected into a 300SB-C18 150 mm \times 1 mm i.d. \times 3.5 μm Zorbax column and eluted with a 0.05% formic acid/acetonitrile buffer gradient at 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ with an Agilent 1100 capillary HPLC system (Agilent, Tokyo, Japan). High resolution mass spectrometry measurements were performed in MS and MS/MS modes with an ESI-LTQ FT MS (Fourier transform Velos Orbitrap mass spectrometer, ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). Spectra were *de novo* sequenced and proteins were identified in the UniProtKB Database using PEAKS Mass Spectrometry 6.5 software (Bioinformatics Solution Inc., USA). Search parameters included: (i) tryptic proteolysis with up to 4 missed cleavages, (ii) 20 ppm and 0.5 Da tolerance for the precursor and secondary ion respectively, (iii) up to 3 post-translational modifications per peptide (including phosphorylation, carbamylation, deamidation, and oxidation) and (iv) up to 5 positive ionizations per peptide.

Results and discussion

Uranium bioaccumulation in ovaries

Uranium bioaccumulation in ovaries was monitored after 20 days of exposure. The results are presented in Fig. 1. The U concentration was 0.054 ± 0.042 and $2.2 \pm 1.3 \mu\text{g g}^{-1}$ dry weight in the control and exposed non-reproduced groups, respectively, and the U concentration was 0.043 ± 0.016 and $0.96 \pm 0.35 \mu\text{g g}^{-1}$ dry weight in the control and exposed reproduced zebrafish groups, respectively. These concentration levels are consistent with the results of similar low concentration chronic exposure experiments.³⁷ Inter-individual variation of the U content, mainly observed for non-reproduced females can be due to the reproductivity status of the females of this non-reproduced group. Indeed, preliminary studies have shown a wider inter-individual variation of the gonad weight and cell distribution in non-reproduced *versus* reproduced zebrafish.

In addition, the ovarian U content in reproduced females (R) tends to be 55% lower than the U content in non-reproduced females (NR), as if the reproduction event could be a way to eliminate U. This phenomenon has already been observed in a previous study.¹⁶ However, in our case, this trend is unfortunately non-significant and therefore no conclusion can be drawn.

MW distribution of metal–protein complexes in ovaries

After non-denaturing sample preparation the metal and U complex molecular weight distribution, in each zebrafish gonad, was studied by SEC-UV-ICP SF MS. Typical chromatograms are shown in Fig. 2 for a contaminated non-reproduced female zebrafish. Protein and metal elution patterns were similar (*i.e.* peaks with the same retention time and relative intensities) for all samples under each condition (data not shown).

The analysis of the U chromatogram (Fig. 2, panel A) allows 4 fractions to be determined, labelled as 1–4: high MW > 600 kDa and 150–400 kDa, medium MW 10–40 kDa and low MW < 4 kDa. Complexes over 600 kDa are most likely to be protein clusters, whereas complexes under 4 kDa are made of peptides or small organic molecules, which are likely to interact with the stationary

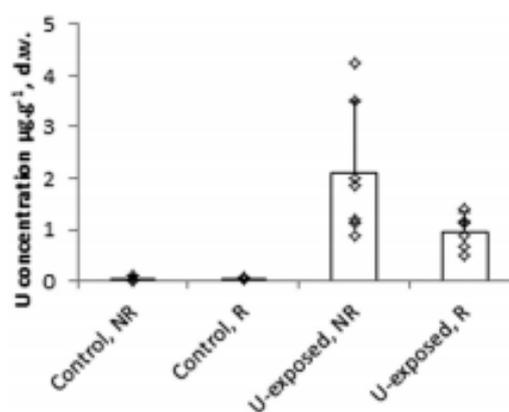


Fig. 1 Individual concentration (empty squares, $n = 5\text{--}7$ per group) and mean concentration of uranium expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight (d.w.) in ovaries after exposure for 20 days. Bioaccumulation is shown for reproduced (R) and non-reproduced (NR) female zebrafish.

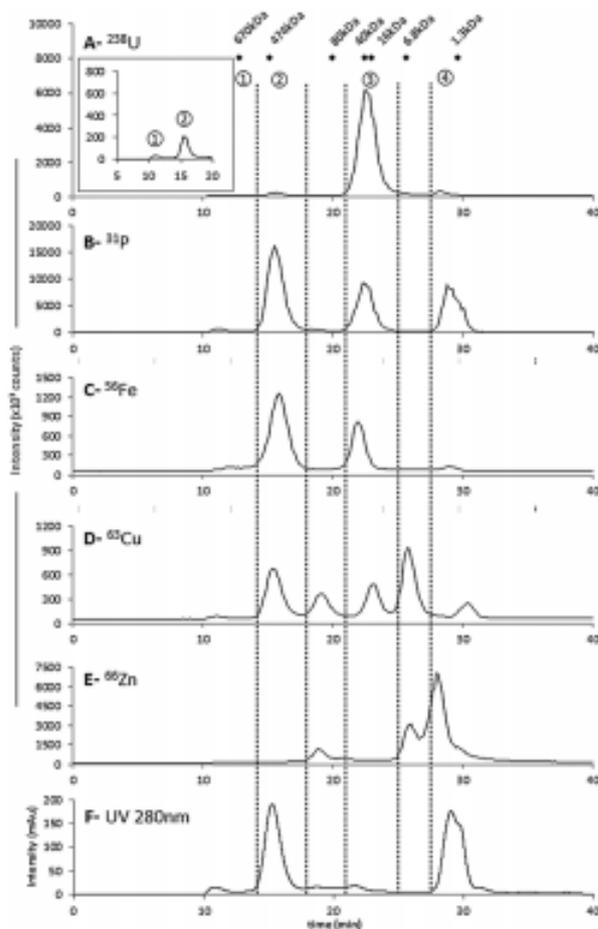


Fig. 2 Metal distribution in the protein extract of non-reproduced female zebrafish gonads contaminated with $20 \mu\text{g L}^{-1}$ uranium in water. Panels from A to E represent ICP-MS intensities (in counts) for ^{238}U , ^{31}P , ^{56}Fe , ^{63}Cu and ^{66}Zn , respectively, and panel F represents UV intensities at 280 nm (in mAu).

phase of the column and not elute anymore in relation to their molecular weight.

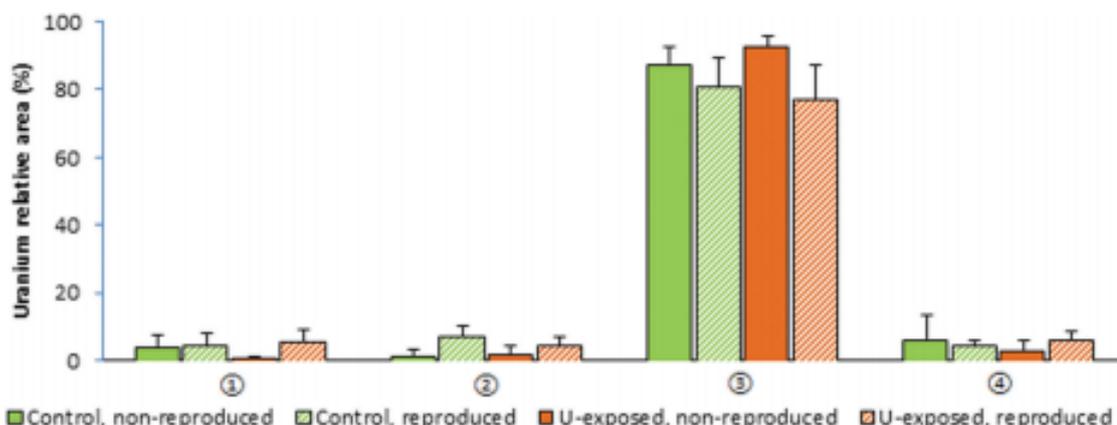


Fig. 3 Relative distribution of uranium-protein complexes in female zebrafish gonads measured by SEC-ICP SFMS. Replicates range from 5 to 7 for each condition: control non-reproduced, control reproduced, U-exposed non-reproduced and U-exposed reproduced zebrafish.

The relative proportion of each peak was determined by calculating the ratio of the peak area to the chromatogram total area as presented in Fig. 3. Comparing all the conditions, no additional peak of U was present after exposure (vs. control conditions). Therefore, the main proteins likely to chelate U may be the same in the control and contaminated zebrafish groups. In addition, whatever the conditions, most of the U, *i.e.* $87 \pm 8\%$, binds the 10–40 kDa proteins, *i.e.* peak 3. With $20 \mu\text{g U L}^{-1}$ concentration exposure, no saturation effect was observed for this peak. A decrease from $88 \pm 5\%$ to $81 \pm 9\%$ in U repartition was observed after the reproduction event in the control groups and from $93 \pm 3\%$ to $77 \pm 10\%$ in the contaminated groups. No statistical differences were shown probably due to inter-individual dispersion of the reproduction, *i.e.* the number of eggs laid. In non-reproduced groups, peaks 1, 2 and 4 represent 1.9 ± 2.0 , 2.0 ± 0.5 and $3.1 \pm 1.7\%$ respectively. In comparison, a slight increase in U repartition for the reproduced groups was observed with 5.3 ± 2.3 , 5.6 ± 2.9 and $5.5 \pm 2.3\%$ for peaks 1, 2 and 4, respectively. This overall increase in the percentage of smaller peaks corresponds to the counterpart of the peak 3 decrease after reproduction (due to the mode of calculation).

Multi-elemental detection by ICP SF MS allowed the determination of U coelution with P, and other metals: Fe, Cu and Zn.

Phosphorus was present in all 4 fractions determined based on the U chromatogram (Fig. 2, panel B).

Uranium coelution with P-containing proteins is consistent with previous studies²³ reporting the affinity of uranyl ions for phosphorylated proteins.

Fe was mostly present in fraction 2 (Fig. 2C). Coelution in fraction 3 can be questionable as the apex of the Fe peak is different to those of the U and P peaks (21.6 min vs. 22.6 min). Therefore, the Fe-complex may be different from the U-complex but size exclusion chromatography is unable to separate them due to insufficient resolution.

The Cu chromatogram showed 6 peaks, four of them coeluting with U peaks. Some of the Cu-metalloproteins may be a good

target for U but the coelution pattern is not as straightforward as that of P. The best correspondence is observed for the U peaks 2 and 3.

The Zn chromatogram (Fig. 2, panel E) does not show any peak in fractions 2 and 3 whereas a large peak is observed in fraction 4. It can be assumed that Zn-containing metallo-proteins were disrupted due to HEPES molecules used as a non-denaturing buffer for U but that can complex Zn.³⁸ Therefore, more complexes than those observed by SEC-ICP SF MS may contain Zn.

The UV chromatogram (Fig. 2F) shows that proteins are mostly present in fraction 2, about 150–400 kDa, which corresponds to large proteins (over 1300 amino acids) or clusters of several smaller proteins. Macro-complexes are also observed in fraction 1 and molecules in peak 4 may be small peptides or aromatic molecules. In contrast, little to no signal was observed in fraction 3. It is worth noting that 280 nm UV detection, usually used to detect proteins, corresponds to tryptophan (Trp) absorption; consequently, the 280 nm signal depends on the Trp content in proteins. Therefore, at that level of investigation, proteins in fractions 3 are present in small amounts and/or the proteins do not contain tryptophan.

From the protein molecular weight and metallic coelution, first assumptions about the nature of the U ligand can be drawn based on the ovary biology literature and *in vitro* studies.

However SEC does not have sufficiently high resolution and a second separation dimension is required to discriminate metallic complexes.

2D separation (pI × MW) of metal-protein complexes under non-denaturing conditions

Evaluation of carrier ampholyte impact on uranium-protein complexes. The additional separation dimension was carried out by off-gel electrophoresis fractionation prior to SEC-ICP MS analysis. Complexes and proteins are separated according to their pI, in electric equilibrium with the pH gradient created by carrier ampholytes. Chemical groups present in these ampholytes include sulfonic acid, carboxylic acid, phosphonic acid and amino acid, depending on the commercial mixture,^{39,40} which can bind U and therefore disrupt the U-protein complexes. Assessment of this complex dissociation was done by addition of 1.5% carrier ampholytes to 0.5 μg μL⁻¹ protein extract and SEC ICP MS analysis (Fig. 4). Two solutions of carrier ampholytes (pharmalyte 40%, broad range of pH 3–10, GE Healthcare and biolyte 40%, 3/10 Ampholyte, Biorad) with 2 concentrations have been tested and the best result (*i.e.* the best isoelectric separation by OGE and the lowest complex disruption) was obtained with the solution of 1.5% Biolyte. The recovery values correspond to the typical one for size exclusion chromatography considered as a non-denaturing separation technique, *i.e.* around 40%.³⁶ No decrease in the signal was observed for the largest peak (peak 3), but a 52% and 40% decrease was noticed for peaks 1 and 2, respectively. An increase in peak 4 corresponds to U initially present in peaks 1 and 2 and complexed by competition with smaller molecules. These observations prove that even under these mild conditions, carrier ampholytes can disrupt weak complexes. Further 2D analysis will then be focused on the

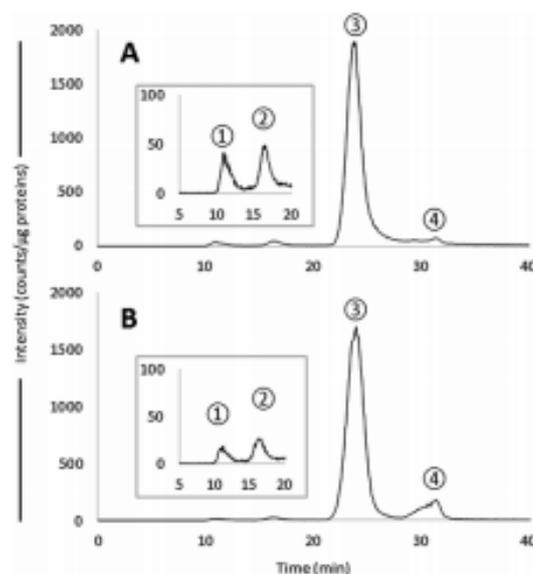


Fig. 4 Uranium recovery evaluation. (A) Represents the size-exclusion chromatogram of a protein extract from non-reproduced female zebrafish. (B) represents the same protein extract with 15% carrier ampholyte addition to evaluate uranium-protein complex disruption.

strongest complexes. Based on technical issues, *i.e.* SEC buffer salinity being incompatible with OGE isoelectrical focusing, OGE fractionation was carried out before the SEC-ICP MS analysis to obtain UV and metal heat maps.

Heat map of metal-protein complexes under non-denaturing conditions. The heat map shown in Fig. 5 is a representation of ten SEC-UV-ICP SF MS chromatograms (as described in the “MW distribution of metal-protein complexes in ovaries” section) corresponding to each 10 OGE fraction of a female gonad extract and merged using Origin software. Due to the protein amount required to obtain a sufficient U signal, 6 zebrafish gonads were pooled per condition (see Materials and methods section). The results are presented in Fig. 5, panels A, B, C and D correspond to U, P, Fe and UV heat maps of reproduced zebrafish protein extracts, respectively; panel E, F, G and H correspond to U, P, Fe and UV heat maps of non-reproduced zebrafish protein extracts, respectively. No spot was observed for Zn and Cu (data not shown). This observation can be explained by two main reasons. Firstly, in order to achieve isoelectric focusing, the protein concentration was adjusted to 0.5 μg μL⁻¹, corresponding to 4.2 and 4.6 dilution factors for reproduced and non-reproduced groups, respectively, lowering Zn and Cu signals that were already close to the background in the SEC-UV-ICP SF MS chromatograms. Secondly, carrier ampholytes can disrupt metallic complexes as previously shown for U ones (Fig. 4).

For each heat map, the signal observed at 30 min, as for SEC-ICP MS, corresponds to small ligands such as solvent, small peptides or carrier ampholytes. Thus this signal was not considered as a spot of interest.

The U heat map indicates the presence of three spots (Fig. 5A, spots “a”, “b” and “c”), corresponding to fractions 2 and 3 in

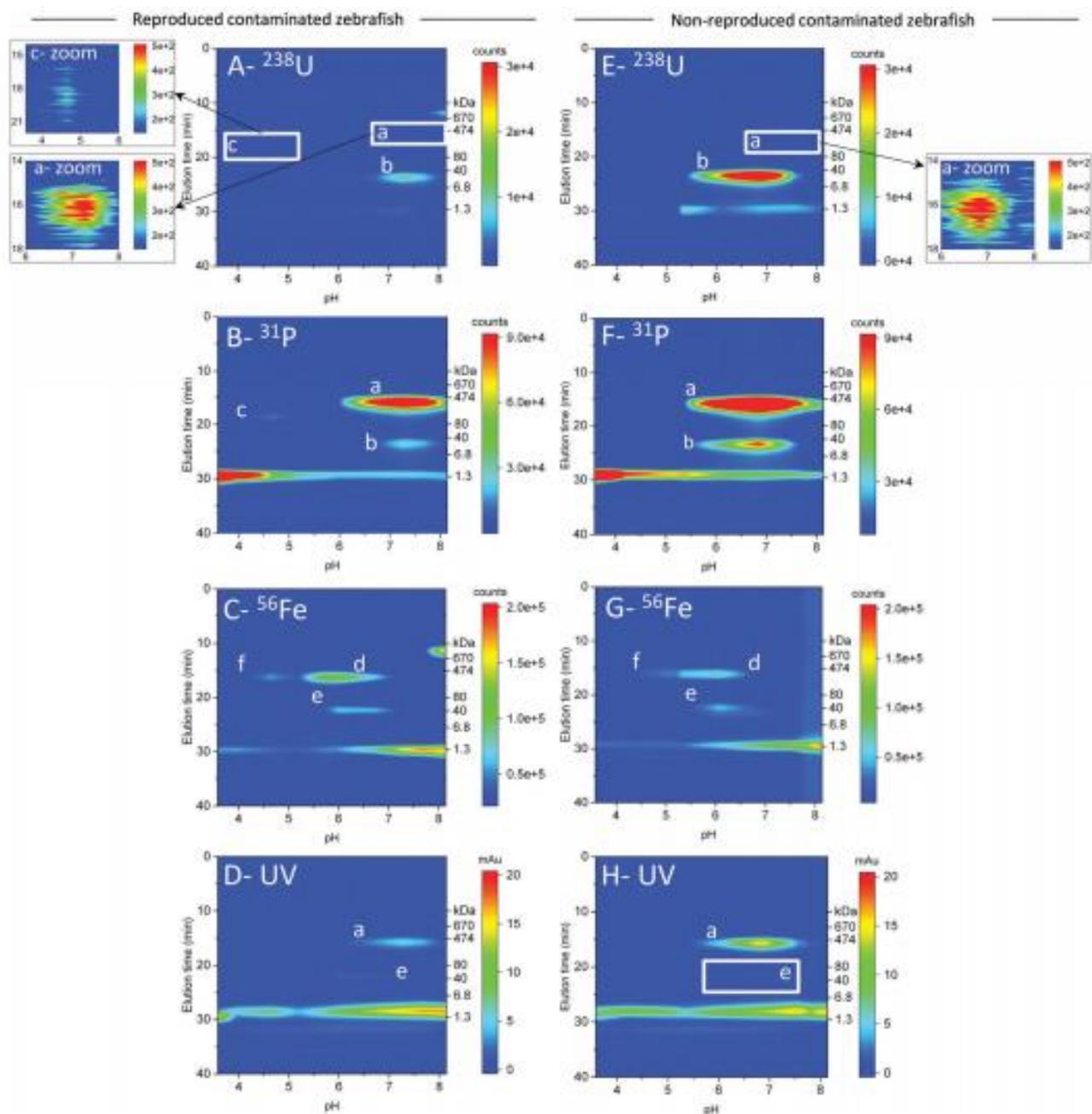


Fig. 5 Heat map of metals (uranium, phosphorus, iron) and protein (UV 280 nm) for contaminated reproduced (panel A–D) and non-reproduced (panel E–H) female zebrafish monitored by off-line coupling of OGE and SEC-UV-ICP SFMS. Complexes are separated according to their pI (x-axis) and MW (y-axis). Metal intensities are given in counts for uranium (panels A and E), phosphorus (panels B and F) and iron (panels C and G); UV intensities are given in mAu (panels D and H). Low intensity spots (white border empty squares) of uranium and phosphorus heat maps are magnified on the side of the corresponding panel. No extra spots were observed for iron and UV cartographies. Coelutions of spots of interest are annotated (a–f) to compare heat maps.

the SEC-ICP SF MS chromatograms (Fig. 2). Spot “a” is characterized by a pH ranging from 6 to 8 and molecular weight in the 150–400 kDa range. This spot corresponds to the most intense signal in both the UV and phosphorus heat maps (Fig. 5 panels D and B, respectively). Interestingly, coelution with Fe that was observed with 1-dimensional separation (SEC) is no longer observed with 2-dimensional separation (OGE × SEC).

Iron shown in fraction 2 (Fig. 2C) was present in two complexes around pH 6 and 4.5 (Fig. 5C, spots “d” and “f”, respectively). This observation confirms the need for the second dimension of separation in order to better determine the complexes identity.

Spot “b” was isoelectrically separated at pH 6–8 and MW 10–40 kDa. This spot contains P but is not visible in UV as in 1D (Fig. 2F, peak 3, and Fig. 5D). As for spot “a”, Fe observed in

Table 1 Proteins identified by LC-ESI FT MS after tryptic digestion. Mass spectra were processed using PEAKS software and referenced with the UniProtKB database. Protein candidates are organized into spots: spot "a", pH 6–8 × MW 100–400 kDa, spot "b", pH 6–8 × MW 10–40 kDa and spot "c", pH 4–5 × MW 80–150 kDa

| Protein ID | UniProtKB ID | −10 lg P | Coverage (%) | #Peptides | #Unique | Mass |
|--|--------------|----------|--------------|-----------|---------|---------|
| Spot a | | | | | | |
| Vitellogenin 1 type I | Q1LWN2 | 400.86 | 78 | 268 | 23 | 149 234 |
| Vitellogenin 4 type I | F1Q7L0 | 401.3 | 73 | 249 | 0 | 149 297 |
| Vitellogenin 5 type I | F1R2S5 | 399.86 | 75 | 249 | 1 | 148 706 |
| Vitellogenin 6 type I | F1QV15 | 392.07 | 71 | 235 | 8 | 150 022 |
| Vitellogenin 7 type I | F1R2T3 | 384.78 | 64 | 216 | 3 | 148 990 |
| Vitellogenin 2 type II | Q1MTC4 | 352.08 | 54 | 142 | 77 | 179 896 |
| α-Macroglobulin | E7F3L3 | 97.93 | 7 | 8 | 2 | 156 996 |
| Spot b | | | | | | |
| Initiation factor 5A2 | B0UY94 | 71.98 | 20 | 3 | 2 | 14 059 |
| Glutathione S-transferase π | Q9DDU5 | 94.99 | 23 | 5 | 5 | 23 526 |
| Glutathione S-transferase ρ1 | Q1L907 | 81.35 | 19 | 4 | 4 | 26 409 |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | Q5XJ10 | 195.09 | 56 | 16 | 16 | 35 784 |
| Superoxide dismutase [Cu-Zn] | B2GRH9 | 115.61 | 30 | 3 | 3 | 15 953 |
| Peptidylprolyl cis-trans isomerase Aa | B8JKN6 | 84.95 | 26 | 4 | 3 | 17 404 |
| Peptidylprolyl cis-trans isomerase Ab | Q6PC53 | 111.73 | 38 | 6 | 5 | 17 489 |
| Malate dehydrogenase 2 | Q7T334 | 109.7 | 24 | 7 | 7 | 35 420 |
| Nucleic binding protein cnbpa | F1Q6Z5 | 112.77 | 26 | 4 | 4 | 18 015 |
| Hemoglobin α1 | Q1JQ69 | 161.21 | 62 | 14 | 4 | 15 522 |
| Globin Ba1 | B3DG37 | 190.96 | 83 | 16 | 14 | 16 389 |
| Spot c | | | | | | |
| Actin 2 | Q7ZVI7 | 166.75 | 30 | 11 | 1 | 41 753 |
| Dipeptidylpeptidase 3 | Q6DI20 | 114.18 | 6 | 4 | 4 | 81 877 |

fraction 3 (Fig. 2C) of 1D separation is discriminated from U by 2D OGE × SEC (Fig. 5C, spot "e"): the Fe pH spot is more acidic, around pH 6–7 and therefore does not coelute with U.

Spot "c" is characterized by a pI ranging from 4 to 5 and molecular weight in the range of 80–150 kDa. The U signal is close to the background and U still seems to coelute with P in the same area (Fig. 5A and B, box "c"). It is worth noting that spot "c" does not coelute with the Fe-containing spot "f": both complexes separate in the same OGE fraction, but spot "f" elutes before spot "c" with a retention time of around 17 min and 19 min, respectively.

The comparison of reproduced (Fig. 5, panels A–D) and non-reproduced (Fig. 5, panels E–H) contaminated groups showed differences in intensities between the spots.

The maximal intensity of spot "b", the most abundant one for U, decreased 5-fold for the reproduced group (Fig. 5A) compared to the non-reproduced group (Fig. 5E). In addition, the pH range of the spot seems wider for the NR group compared to the R one, as if the protein relative composition could be different between the two groups. The same observations are made with the analysis of the P heat map (Fig. 5B and F). In contrast, spot "a" does not show any U intensity difference but shows a 40% decrease in both P and protein signals (UV heat map, Fig. 5D and H) for the reproduced group compared to the non-reproduced group.

Spot "c" noticed in the U and P heat maps for the reproduced group (Fig. 5A and B, respectively) is no longer observed in the corresponding heat map for non-reproduced zebrafish (Fig. 5E and F). This absence may be explained by the relative protein distribution in each protein extract: with the same

global protein concentration, the increase in spots "a" and "b" is counterbalanced by a decrease in spot "c" intensity. Consequently, spot "c" may not be detected because the signal is too close to the background level in the U and P heat maps. In addition, the signal decrease in non-reproduced female ovaries containing a higher reproduction protein concentration than the reproduced ones, shows that these proteins are unlikely to be related to reproduction and may more likely be related to the gonad structure or matrix.

2D-separation allows better discrimination between metal-protein complexes and therefore enables the identification of proteins in the different spots "a", "b" and "c" containing U.

Direct determination of proteins complexing U was not possible due to the low concentration of U-protein complexes and their low abundance compared to protein alone. Several μmol L^{−1} of purified complexes is typically required for native mass spectrometry measurements.^{41,42} To compare, the total concentration of U in the contaminated samples ranged from 2 to 100 nmol L^{−1}.

Therefore, protein candidates for U complexation were proposed with a first screening of proteins in the OGE U-rich fractions and a restriction of the number of targets by the MW to focus on U-rich SEC peaks. A further comparison to the literature was also done to discuss the plausibility of the candidates.

Identification of protein candidates by LC-ESI FT MS

Protein identification was carried out in each OGE fraction. In all the 10 fractions, more than 200 proteins were identified. After restriction by the molecular weight of the potential targets assessed with the previous heat map analysis (Fig. 5), candidates were selected. The results are given in Table 1.

In spot "a", vitellogenin was identified by LC-ESI FT MS. *De novo* sequencing of the peptides also showed post-translational phosphorylation modifications, which makes vitellogenin a probable candidate since a P signal was observed by SEC-ICP SF MS detection. In zebrafish, Vtg is a large phospholipoprotein (150 kDa) containing a highly enriched phosphorylated serine sequence called the phosvitin (Pv) domain, likely to complex U.²⁶ The study on *Xenopus laevis* also showed that vitellogenin contained Zn, Cu and Fe.⁴³ Among the proteins identified in this fraction, α -macroglobulin is also a candidate with a molecular weight of 150 kDa. This protein was also identified in *P. clarkii* gills after waterborne exposure to U and non-denaturing PAGE separation analysis.³²

For spot "b", more potential candidate proteins were identified in the OGE fractions. Among them some of these proteins have already been identified as potential U targets in other studies and then seem to be generic targets: enzymes implied in oxidative stress and redox balance such as SOD, already suspected in 1D by coelution of U/Zn/Cu, and GST were observed in both gills and hepatopancreas of *P. clarkii*.^{32,34} Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, an enzyme implicated in glucose catabolism and NADH production, was also reported as a candidate for human hepatic cells²⁸ and *P. clarkii* hepatopancreas.³³ This NADH production could be used to regenerate oxidized GST and therefore contributes to the redox balance. Oxygen carrier hemoglobin has been reported in *P. clarkii* and *D. rerio* gills;^{32,34} this protein could contribute to uranium transfer to and accumulation at target organs *via* the blood.

Among the new candidates for complexation are malate dehydrogenase, involved in glycogenesis and NADH production⁴⁴ and above all proteins related to the early development of the embryo. Indeed, the initiation factor 5A2 has a ribosome binding domain and is involved in protein biosynthesis.⁴⁵ Some studies showed its implication in organ differentiation in mice.⁴⁶ Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases (ppia) are involved in numerous physiological processes *via* catalytic activities including cell differentiation.⁴⁷ Nucleic acid binding protein (cnbpa) was also reported in the early development of the head with the formation of the neural crest.⁴⁸

In this MW range, phosvitin has not been formally identified, as no peptide covering its sequence was found. Other proteomics studies have also shown a lack of coverage for this sequence in vitellogenin.^{49,50} Thus even though phosvitin could be a good candidate for U complexation because of its MW,⁵¹ highly phosphorylated sequence,^{52,53} low tryptophan content¹¹ and ability to complex U,²⁵ in the absence of peptide identification, no conclusions can be drawn.

For spot "c", actin peptides were identified. Among the 11 peptides covering the actin amino acid sequence, 1 peptide was unique (instead of 2, as usually recommended). Further data analyses have shown that 6 peptides were in fact shared between actin isoforms only; therefore, this protein was considered as fully identified. *In vivo* free actin is present as a monomer, a dimer, and a trimer before polymerization into cytoskeleton filaments.⁵⁴ Consequently, the MW of each actin structure was taken into account during the MW restriction

process (*i.e.*, 41.7 kDa, 83.4 kDa and 125.1 kDa). Dimer and trimer complexes are in good agreement with the MW range of spot c. Compared to the literature, actin has been shown to be a candidate protein for *D. rerio*⁵⁴ and *P. clarkii*³² gills and set as a potential target for U in human kidney cells by IMAC metal affinity chromatography.²⁸ Moreover during oocyte growth, the actin network is actively remodeled⁵⁵ and ultrastructural disorders have been observed by electronic microscopy after U exposure.¹⁶ A new candidate identified in this spot is dipeptidyl-peptidase 3; this enzyme includes a Zn binding domain in its catalytic site that could also bind U.⁴⁵

Conclusions

Non-denaturing separation and detection methods were successfully applied to female zebrafish ovaries for the determination of U-protein complexes. Whatever the group (non-reproduced vs. reproduced, control vs. contaminated), the nature of the targeted proteins seems to be the same.

In this study, coelution of U and P was observed. Oxidation related proteins (GST, SOD) and structural proteins (α -macroglobulin and actin) were identified as potential targets joining the general trend for uranium toxicity *via* oxidative stress and structural disorders. Specifically to the ovary, novel protein candidates identified were related to embryo early development (initiation factor 5A, ppia, cnbpa, vtg and pw) which could explain organ disorders but cannot be directly linked to reprotoxicity as complexation is not fully linked to a loss of function.

Finally, no U-protein complexes were directly identified by mass spectrometry. Therefore, protein identified can only be considered as potential protein targets. However, the strong correlation between ICP MS observations, ESI MS protein and post-translational modification identifications and the good agreement with *in vitro* studies offer plausible protein candidates to better understand U reprotoxicity mechanisms.

Acknowledgements

The authors acknowledge the NEEDS-Environment program for funding the TARGETS project supporting this work and the IRSN for funding Yvan Eb-Levadoux's salary. The contribution of the Region of Aquitaine and the FEDER funds *via* the CPER A2E (31486/08011464) project is acknowledged.

Notes and references

- 1 WHO, *Depleted uranium: Sources, Exposure and Health Effects*, 2001.
- 2 R. N. Betcher, M. Gascoyne and D. Brown, Uranium in groundwaters of southeastern Manitoba, Canada, *Can. J. Earth Sci.*, 1988, 25(12), 2089–2103.
- 3 J. Lourenço, *et al.*, Genetic, biochemical, and individual responses of the teleost fish *carassius auratus* to uranium, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2010, 58(4), 1023–1031.

- 4 A. Le Guernic, *et al.*, *In situ* effects of metal contamination from former uranium mining sites on the health of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.), *Ecotoxicology*, 2016, 25(6), 1234–1259.
- 5 H. M. Cooley and J. F. Klaverkamp, Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*), *Aquat. Toxicol.*, 2000, 48(4), 477–494.
- 6 O. Simon, *et al.*, Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages in the chronically exposed bivalve *Corbicula fluminea*, *J. Environ. Radioact.*, 2011, 102(8), 766–773.
- 7 S. Al Kaddissi, *et al.*, Effects of uranium uptake on transcriptional responses, histological structures and survival rate of the crayfish *Procambarus clarkii*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2011, 74(7), 1800–1807.
- 8 B. Reed and M. Jennings, *Guidance on the housing and care of Zebrafish*, *Danio rerio*, RSPCA, 2010.
- 9 A. J. Hill, *et al.*, Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity, *Toxicol. Sci.*, 2005, 86(1), 6–19.
- 10 G. Streisinger, *et al.*, PRODUCTION OF CLONES OF HOMOZYGOUS DIPLOID ZEBRA FISH (*BRACHYDANIO-RERIO*), *Nature*, 1981, 291(5813), 293–296.
- 11 K. Howe, *et al.*, The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome, *Nature*, 2013, 496(7446), 498–503.
- 12 R. Aebersold and M. Mann, Mass spectrometry-based proteomics, *Nature*, 2003, 422(6928), 198–207.
- 13 S. Barillet, *et al.*, Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure, *Environ. Pollut.*, 2011, 159(2), 495–502.
- 14 S. Barillet, *et al.*, Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2007, 26(3), 497–505.
- 15 A. Lerebours, *et al.*, Mitochondrial energetic metabolism perturbations in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium, *Aquat. Toxicol.*, 2010, 100(1), 66–74.
- 16 S. Bourrachot, *et al.*, Effects of depleted uranium on the reproductive success and F1 generation survival of zebrafish (*Danio rerio*), *Aquat. Toxicol.*, 2014, 154, 1–11.
- 17 O. Simon, *et al.*, Exploring ecotoxicological fish bioassay for the evaluation of uranium reprotoxicity, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2014, 33(8), 1817–1824.
- 18 S. Bourrachot, O. Simon and R. Gilbin, The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*), *Aquat. Toxicol.*, 2008, 90(1), 29–36.
- 19 O. Simon, *et al.*, Effects of dietary uranium on reproductive endpoints-fecundity, survival, reproductive success-of the fish *Danio rerio*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2011, 30(1), 220–225.
- 20 J. Szpunar, Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques, *Analyst*, 2000, 125(5), 963–988.
- 21 J. Szpunar, Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: Metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics, *Analyst*, 2005, 130(4), 442–465.
- 22 R. R. Goulet, C. Fortin and D. J. Spry, *Uranium*, 2011, 391–428.
- 23 C. Basset, *et al.*, Specific capture of uranyl protein targets by metal affinity chromatography, *J. Chromatogr. A*, 2008, 1185(2), 233–240.
- 24 J. Michon, *et al.*, Determinations of uranium(VI) binding properties with some metalloproteins (transferrin, albumin, metallothionein and ferritin) by fluorescence quenching, *J. Fluoresc.*, 2010, 20(2), 581–590.
- 25 B. Li, *et al.*, Complexation of U(VI) with highly phosphorylated protein, phosvitin. A vibrational spectroscopic approach, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, 104(7), 718–725.
- 26 F. Coppin, *et al.*, Fluorescence quenching determination of uranium (VI) binding properties by two functional proteins: Acetylcholinesterase (AChE) and vitellogenin (Vtg), *J. Fluoresc.*, 2015, 25(3), 569–576.
- 27 C. Vidaud, *et al.*, Structural consequences of binding of UO₂²⁺ to apotransferrin: Can this protein account for entry of uranium into human cells?, *Biochemistry*, 2007, 46(8), 2215–2226.
- 28 A. Dedieu, *et al.*, Identification of uranyl binding proteins from human kidney-2 cell extracts by immobilized uranyl affinity chromatography and mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216(28), 5365–5376.
- 29 S. Frelon, *et al.*, *In vivo* screening of proteins likely to bind uranium in exposed rat kidney, *Radiochim. Acta*, 2009, 97(7), 367–373.
- 30 S. Scapolan, *et al.*, Investigations by time-resolved laser-induced fluorescence and capillary electrophoresis of the uranyl-phosphate species: Application to blood serum, *J. Alloys Compd.*, 1998, 271–273, 106–111.
- 31 S. Frelon, *et al.*, Subcellular fractionation and chemical speciation of uranium to elucidate its fate in gills and hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii*, *Chemosphere*, 2013, 91(4), 481–490.
- 32 M. Xu, *et al.*, Non-denaturing isoelectric focusing gel electrophoresis for uranium-protein complexes quantitative analysis with LA-ICP MS, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, 406(4), 1063–1072.
- 33 M. Xu, *et al.*, Development of a non-denaturing 2D gel electrophoresis protocol for screening *in vivo* uranium-protein targets in *Procambarus clarkii* with laser ablation ICP MS followed by protein identification by HPLC-Orbitrap MS, *Talanta*, 2014, 128, 187–195.
- 34 G. Bucher, *et al.*, Insights into the nature of uranium target proteins within zebrafish gills after chronic and acute waterborne exposures, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2016, 35(3), 736–741.
- 35 M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 1976, 72(1–2), 248–254.
- 36 G. Bucher, *et al.*, Different uranium distribution patterns in cytosolic protein pool of zebrafish gills after chronic and

- acute waterborne exposures, *Chemosphere*, 2014, **111**, 412–417.
- 37 K. Gombeau, *et al.*, Depleted uranium induces sex- and tissue-specific methylation patterns in adult zebrafish, *J. Environ. Radioact.*, 2016, **154**, 25–33.
- 38 V. Tõugu, A. Karafin and P. Palumaa, Binding of zinc(II) and copper(II) to the full-length Alzheimer's amyloid- β peptide, *J. Neurochem.*, 2008, **104**(5), 1249–1259.
- 39 N. Grubhofer and P. Pogacar, *Ampholytes for focusing electrophoresis*, US Pat., 3770603, 1973.
- 40 J. L. Soderberg, *Ampholyte and its use in separation processes*, US Pat., 4334972, 1982.
- 41 F. Tisato, *et al.*, Interaction products of cytotoxic Cu(I) complexes with different solvent mixtures: an electrospray ionization mass spectrometry and density functional theory study, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2017, **31**(2), 179–192.
- 42 V. Vivat Hannah, *et al.*, Native MS: An ESI way to support structure- and fragment-based drug discovery, *Future Med. Chem.*, 2010, **2**(1), 35–50.
- 43 M. Montorzi, K. H. Falchuk and B. L. Vallee, Vitellogenin and lipovitellin: Zinc proteins of *Xenopus laevis* oocytes, *Biochemistry*, 1995, **34**(34), 10851–10858.
- 44 P. Minárik, *et al.*, Malate Dehydrogenases – Structure and function, *Gen. Physiol. Biophys.*, 2002, **21**(3), 257–265.
- 45 A. Bateman, *et al.*, UniProt: A hub for protein information, *Nucleic Acids Res.*, 2015, **43**, D204–D212.
- 46 L. T. Parreiras-E-Silva, *et al.*, Evidences of a role for eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in mouse embryogenesis and cell differentiation, *J. Cell. Physiol.*, 2010, **225**(2), 500–505.
- 47 C. Schiene-Fischer, Multidomain Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerases, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 2015, **1850**(10), 2005–2016.
- 48 A. M. J. Weiner, *et al.*, Deciphering the cellular and molecular roles of cellular nucleic acid binding protein during cranial neural crest development, *Dev., Growth Differ.*, 2011, **53**(8), 934–947.
- 49 U. Gündel, *et al.*, Vitellogenin cleavage products as indicators for toxic stress in zebra fish embryos: A proteomic approach, *Proteomics*, 2007, **7**(24), 4541–4554.
- 50 T. L. Tay, *et al.*, Proteomic analysis of protein profiles during early development of the zebrafish, *Danio rerio*, *Proteomics*, 2006, **6**(10), 3176–3188.
- 51 E. Gasteiger, *et al.*, Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, in *The Proteomics Protocols Handbook*, ed. J. M. Walker, 2005, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 571–607.
- 52 R. Patino and C. V. Sullivan, Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish, *Fish Physiol. Biochem.*, 2002, **26**(1), 57–70.
- 53 T. Matsubara, *et al.*, Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts, *Fish Physiol. Biochem.*, 2003, **28**(1), 295–299.
- 54 B. Sjöblom, A. Salmazo and K. Djinović-Carugo, α -Actinin structure and regulation, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008, **65**(17), 2688–2701.
- 55 Y. Nukada, *et al.*, Real-time imaging of actin filaments in the zebrafish oocyte and embryo, *Cytoskeleton*, 2015, **72**(9), 491–501.

Annexe 2 : liste des protéines OGE

Liste des protéines identifiées dans les fractions OGE d'un mélange d'extrait de poissons zèbres contaminés non reproduits.

Les protéines sont regroupées par famille et sont identifiées par leur numéro d'accèsion à partir de la base de données Ensembl. Les fractions sont numérotées 1 à 10 avec leur pH associé, les nombres indiqués dans les colonnes correspondantes correspondent au nombre de peptides identifiées dans la protéine.

| Famille | Proteine | Accession | N° fraction et pH : | | | | | | | | | | MM kDa | |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|--------|
| | | | 1 3,96 | 2 4,18 | 3 5,01 | 4 5,21 | 5 5,34 | 6 6,08 | 7 6,85 | 8 7,55 | 9 7,81 | 10 8,24 | | pl |
| vitellogenine | vtg1 | tr Q1LWN2 Q1LWN2_DANRE | 116 | 85 | 11 | 10 | 14 | 260 | 299 | 185 | 268 | 307 | 8,8 | 149234 |
| | vtg5 | tr F1R2S5 F1R2S5_DANRE | 102 | 72 | 8 | 8 | 10 | 239 | 294 | 161 | 248 | 264 | 9 | 149382 |
| | | tr F1QHH9 F1QHH9_DANRE | 102 | 72 | 8 | 8 | 10 | 239 | 293 | 162 | 249 | 263 | 8,9 | 148706 |
| | vtg4 | tr E9QFD8 E9QFD8_DANRE | 100 | 72 | 7 | 8 | 12 | 232 | 290 | 165 | 249 | 273 | 8,8 | 149297 |
| | | tr F1RBA0 F1RBA0_DANRE | 91 | 64 | | | 10 | 224 | 287 | 158 | 239 | 257 | 9 | 148832 |
| | | tr F1Q7L0 F1Q7L0_DANRE | 89 | 66 | | 8 | 11 | 222 | 285 | 155 | 237 | 255 | 9,1 | 149356 |
| | vtg6 | tr F1QV15 F1QV15_DANRE | 99 | 67 | | | 11 | 225 | 272 | 159 | 235 | 259 | 9 | 150022 |
| | vtg7 | tr A0A0R4IUA0 A0A0R4IUA0_DANRE | 78 | 57 | 7 | 7 | | 241 | 241 | 143 | 222 | 248 | 8,9 | 148918 |
| | | tr F1R2T3 F1R2T3_DANRE | 74 | 53 | | | | | 237 | 141 | 216 | 241 | 8,9 | 148990 |
| | | tr Q1MTC6 Q1MTC6_DANRE | 74 | 53 | | | | 240 | | 141 | 216 | 241 | 8,8 | 147177 |
| tr A0A0R4IY49 A0A0R4IY49_DANRE | | 75 | 53 | | | | 235 | 240 | 141 | 216 | 243 | 9 | 148971 | |
| vtg2 | tr Q1MTC4 Q1MTC4_DANRE | 40 | 33 | | | | 82 | 125 | 129 | 142 | 160 | 8,6 | 179896 | |
| vtg3 | tr F1QPC0 F1QPC0_DANRE | | | | | | | 1 | | | | 7,4 | 140769 | |
| Actine | actb2 | tr A8WG05 A8WG05_DANRE | 14 | 11 | 2 | | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 5,2 | 41753 |
| | | tr F1QC15 F1QC15_DANRE | | | 2 | | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 5,5 | 14116 |
| | actbb | Q7ZVF9 ACTB2_DANRE | 14 | 11 | 2 | | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 5,2 | 41753 |
| | actb1 | tr E9QBP3 E9QBP3_DANRE | | | 2 | 2 | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 5,6 | 14245 |
| | | tr E9QH14 E9QH14_DANRE | | | 2 | | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 4,9 | 25950 |
| | | tr E9QD59 E9QD59_DANRE | | | 2 | | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 4,7 | 33606 |
| | actba | Q7ZV17 ACTB1_DANRE | | 11 | 2 | | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 5,2 | 41767 |
| | acta2 | tr F8W3L1 F8W3L1_DANRE | | | | 1 | | | | | | | 5,3 | 37519 |
| | | tr Q6DHS1 Q6DHS1_DANRE | | | 2 | | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 5 | 41995 |
| | acta1a | tr F1QUN8 F1QUN8_DANRE | | | 2 | 1 | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 5 | 42019 |
| | | tr Q6IQL9 Q6IQL9_DANRE | | | 2 | | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 5 | 42005 |
| | acta1b | tr Q6XNL8 Q6XNL8_DANRE | | | 2 | | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 5 | 41975 |
| | actc1b | tr F1RCB6 F1RCB6_DANRE | | | 2 | | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 5 | 41976 |
| | | tr Q9I8V1 Q9I8V1_DANRE | | | 2 | | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 5 | 41973 |
| tr X1WEN2 X1WEN2_DANRE | | | | 2 | | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 5 | 9311 | |
| tr Q6IQR3 Q6IQR3_DANRE | | | | 2 | | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 5 | 41975 | |
| - | tr A0A0R4IBT5 A0A0R4IBT5_DANRE | | | 2 | | 2 | | 3 | 5 | 5 | 3 | 5 | 42160 | |
| actin binding | profilin 2 | tr Q802D5 Q802D5_DANRE | | | | | | 3 | | | | | 7,7 | 15233 |
| | cofilin 2 | tr Q6TH32 Q6TH32_DANRE | | | | | | | 5 | | | | 7,2 | 18771 |

| Familie | Proteine | Accession | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | pI | MM kDa | |
|------------------------------------|---|--------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----------|--------|
| | | | 3,96 | 4,18 | 5,01 | 5,21 | 5,34 | 6,08 | 6,85 | 7,55 | 7,81 | 8,24 | | | |
| Enzymes | ckbb | tr Q8AY63 Q8AY63_DANRE | | 11 | | | | | | | | | 5,6 | 42884 | |
| | p4hb | tr A0A0R4ISX6 A0A0R4ISX6_DANRE | | 6 | | | | | | | | | 4,3 | 56634 | |
| | | tr A0A0R4IPV5 A0A0R4IPV5_DANRE | | 6 | | | | | | | | | 4,3 | 57007 | |
| | dpp3 | tr Q6DI20 Q6DI20_DANRE | | 4 | | | | | | | | | | 4,8 | 81877 |
| | | tr E9QBF0 E9QBF0_DANRE | | 3 | | | | | | | | | | 7,9 | 21811 |
| | tpi1 | tr A0A0R4I9C4 A0A0R4I9C4_DANRE | | 3 | | | | | | | | | | 7,2 | 26827 |
| | | Q90XG0 TPISB_DANRE | | 3 | | | | | | | | | | | 26828 |
| | | Q1MTI4 TPISA_DANRE | | 3 | | | | | | | | | | 4,6 | 26853 |
| | | tr A0A0R4IGG3 A0A0R4IGG3_DANRE | | 3 | | | | | | | | | | 6,8 | 26526 |
| | impa1 | tr Q6DGB2 Q6DGB2_DANRE | | 1 | | | | | | | | | | 4,6 | 30579 |
| | | tr B0S5J9 B0S5J9_DANRE | | 1 | | | | | | | | | | 4,5 | 25905 |
| | | tr B0S5J8 B0S5J8_DANRE | | 1 | | | | | | | | | | 5,5 | 2227 |
| | gapdh | tr A0A0R4IGI1 A0A0R4IGI1_DANRE | | 1 | | | 1 | 16 | 12 | | | 9 | 7 | | 36099 |
| | | tr E9QGA9 E9QGA9_DANRE | | 1 | | | 1 | | | | | | | 8,9 | 23789 |
| | | Q5XJ10 G3P_DANRE | | | | | | | 16 | 12 | | 9 | 7 | 8,1 | 35784 |
| | | tr E9QIH5 E9QIH5_DANRE | | | | | 1 | | | | | | | 9,5 | 25488 |
| | glo1 | tr Q6P696 Q6P696_DANRE | | 3 | | | | | | | | | | 5 | 20301 |
| | | tr Q504C0 Q504C0_DANRE | | 3 | | | | | | | | | | 4,6 | 25927 |
| | uchl | tr E7EZW7 E7EZW7_DANRE | | 3 | | | | | | | | | | 4,7 | 25930 |
| | | tr Q6YI49 Q6YI49_DANRE | | 20 | | | | | | | | | | 5 | 24248 |
| | atpif1 | A3KNL5 ATF1A_DANRE | | | 1 | 1 | | | | | 1 | | | 10,5 | 11944 |
| | ahcy | tr Q803T5 Q803T5_DANRE | | | | | | | 11 | | | | | 6,8 | 47964 |
| | aldh9a1a | Q7ZVB2 A9A1A_DANRE | | | | | | | 10 | | | | | 6,5 | 55262 |
| | | tr B0S7W4 B0S7W4_DANRE | | | | | | | 10 | | | | | 6,5 | 55262 |
| | aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1a, tandem duplicate 2 | tr B0S7W5 B0S7W5_DANRE | | | | | | | | | 1 | | | 6,5 | 55169 |
| | adh5 | tr A0A0R4IUR6 A0A0R4IUR6_DANRE | | | | | | | 3 | | | | | | 40328 |
| | | tr Q6NXA6 Q6NXA6_DANRE | | | | | | | 3 | | | | | 7,1 | 40032 |
| | nme2b.2 | tr F1RBS6 F1RBS6_DANRE | | | | | | | 3 | | | | | 7,8 | 17262 |
| | sod1 | O73872 SODC_DANRE | | | | | | | | 3 | | | | 6,6 | 15953 |
| | | tr B2GRH9 B2GRH9_DANRE | | | | | | | | 3 | | | | 6,6 | 15953 |
| | cat | tr A0A0R4ICK7 A0A0R4ICK7_DANRE | | | | | | | | 2 | | | | 8,1 | 59602 |
| | | tr A0A0R4IGK9 A0A0R4IGK9_DANRE | | | | | | | | 2 | | | | 8,1 | 57123 |
| | | tr A0A0R4I89 A0A0R4I89_DANRE | | | | | | | | 2 | | | | 8,1 | 59702 |
| | | Q9PT92 CATA_DANRE | | | | | | | | 2 | | | | | 59654 |
| | ppi | tr Q6PC53 Q6PC53_DANRE | | | | | | | | | 6 | 3 | 4 | 8 | 17489 |
| | | tr B8JKN6 B8JKN6_DANRE | | | | | | | | | 4 | | | 8,6 | 17404 |
| | | tr A0A0R4INB7 A0A0R4INB7_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | | 22456 |
| | | tr F6NLI6 F6NLI6_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | 9,7 | 22884 |
| | mdh2 | tr Q7T334 Q7T334_DANRE | | | | | | | | 7 | 5 | 5 | 8,2 | 35420 | |
| | gstp1 | tr Q9DDU5 Q9DDU5_DANRE | | | | | | | | 5 | | 5 | 8 | 23526 | |
| | atp5a1 | tr Q08BA1 Q08BA1_DANRE | | | | | | | | | | 1 | 9,4 | 59744 | |
| | aldo1 | tr A0A0G2KWP7 A0A0G2KWP7_DANRE | | 2 | | | | | | | | | | | 30968 |
| | esterase D/formylglutathione hydrolase | tr E9QG87 E9QG87_DANRE | | 5 | | | | | | | | | | 5,4 | 29375 |
| | prostaglandin reductase 2 protease, serine, 16 | tr X1WFL9 X1WFL9_DANRE | | 1 | | | | | | | | | | 5,9 | 37672 |
| | | tr F1Q7G9 F1Q7G9_DANRE | | 1 | | | | | | | | | | 7 | 54524 |
| | phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked | tr E9QCT8 E9QCT8_DANRE | | 1 | | | | | | | | | | 4,8 | 32315 |
| | Rho GTPase activating protein 33 | tr X1WC05 X1WC05_DANRE | | 1 | | | | | | | | | | 7 | 128597 |
| glutathione S-transferase rho | tr Q1L907 Q1L907_DANRE | | | | | | 4 | | | | | | 7,2 | 26409 | |
| carbonyl reductase 1-like | tr A8KC02 A8KC02_DANRE | | | | | | 1 | | | | | | 6,8 | 29979 | |
| alanyl (membrane) aminopeptidase a | tr Q1LWJ7 Q1LWJ7_DANRE | | | | | | | 2 | | | | | 4,9 | 108519 | |
| cathepsin Ba | tr Q6PH75 Q6PH75_DANRE | | 5 | | | | | | | | | | 6 | 36329 | |
| cathepsin Ba | tr E9QDX8 E9QDX8_DANRE | | 5 | | | | | | | | | | 6,9 | 31048 | |
| cathepsin D | tr Q8AWD9 Q8AWD9_DANRE | | | | | | | 3 | | | | | 6,6 | 43200 | |
| cathepsin D | tr A0A0R4IBQ0 A0A0R4IBQ0_DANRE | | | | | | | 3 | | | | | | 43183 | |
| enolase 3 | tr F1QBW7 F1QBW7_DANRE | | | | | | | 15 | 8 | | | | 6,7 | 51327 | |
| transketolase b | tr Q6PHI8 Q6PHI8_DANRE | | | | | | | | | | 3 | 1 | 7,2 | 67838 | |
| beta-carotene oxygenase 2a | tr F1QU45 F1QU45_DANRE | | | | | | | | | 1 | | | 7,3 | 65277 | |
| xylosyltransferase II | tr E7F216 E7F216_DANRE | | | | | | | | | 1 | | | 8,7 | 99551 | |

| Famille | Proteine | Accession | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | pl | MM | | |
|---|---|--------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|-------|-------|-------|
| | | | 3,96 | 4,18 | 5,01 | 5,21 | 5,34 | 6,08 | 6,85 | 7,55 | 7,81 | 8,24 | | kDa | | |
| Elongation factor | eef1a | Q92005 EF1A_DANRE | | 3 | | | | | 3 | 5 | 9 | 8 | 8 | 9,6 | 50048 | |
| | eef1a1a | tr A0A0R4IJ37 A0A0R4IJ37_DANRE | | | | | 1 | | 4 | | | | | | 49414 | |
| | | tr F1QQW9 F1QQW9_DANRE | | | | | | | | | | 6 | | 10,4 | 53634 | |
| | | tr Q6P969 Q6P969_DANRE | | | | | | | | 4 | | | | | 9,6 | 50339 |
| | eef1a1l1 | tr E7FD96 E7FD96_DANRE | | | | | | 1 | 3 | 5 | | 8 | | | 9,7 | 50134 |
| | | tr A0A0R4IE10 A0A0R4IE10_DANRE | | | | | | 1 | 3 | 5 | 8 | 8 | 8 | | 50066 | |
| | | tr F1QI74 F1QI74_DANRE | | | | | | 1 | 3 | 5 | | 8 | | | 9,7 | 50150 |
| | eef1a1b | tr Q568F0 Q568F0_DANRE | | | | | | | 4 | | | | | | 9,6 | 50371 |
| | eefa1a2 | tr Q6DHT2 Q6DHT2_DANRE | | | | | | | 4 | | | | | | 9,5 | 50659 |
| eef1g | tr A0A0R4IP07 A0A0R4IP07_DANRE | | | | | | | | | 2 | | 1 | | 50028 | | |
| | Q6PE25 EF1G_DANRE | | | | | | | | | 2 | | 1 | | 7,2 | 50457 | |
| eef2b | tr Q6P3J5 Q6P3J5_DANRE | | | | | | | 4 | | | 1 | | | 6,7 | 95498 | |
| eef2l2 | tr A2CE51 A2CE51_DANRE | | | | | | | | 1 | | | | | 6,8 | 95885 | |
| tubuline | tubb4b | tr A0A0R4IXL7 A0A0R4IXL7_DANRE | 1 | | | | | | | | | | | | 12744 | |
| | | tr A0A0R4IPH2 A0A0R4IPH2_DANRE | 1 | | | | | | | | | | | | 49789 | |
| | | tr Q6P5M9 Q6P5M9_DANRE | 1 | | | | | | | | | | | | 4,5 | 49787 |
| | tubb1 | tr E7FC32 E7FC32_DANRE | 1 | | | | | | | | | | | | 4,6 | 52578 |
| | tubb2 | tr F1QKY8 F1QKY8_DANRE | 1 | | | | | | | | | | | | 4,5 | 50507 |
| | tubb5 | tr Q6NW90 Q6NW90_DANRE | 1 | | | | | | | | | | | | 4,5 | 49673 |
| | tubb6 | tr A0A0R4IXC8 A0A0R4IXC8_DANRE | 1 | | | | | | | | | | | | 50091 | |
| | tubb | tr Q6IQJ2 Q6IQJ2_DANRE | 1 | | | | | | | | | | | | 4,5 | 49801 |
| | | tr F1R4K1 F1R4K1_DANRE | 1 | | | | | | | | | | | | 4,5 | 49647 |
| tr Q6PE34 Q6PE34_DANRE | | 1 | | | | | | | | | | | | 4,5 | 49635 | |
| stathmin | stmn1a | tr Q1RLQ1 Q1RLQ1_DANRE | | | | | | | 3 | 1 | | 1 | | 6,9 | 17055 | |
| | | tr A0A0R4II97 A0A0R4II97_DANRE | | | | | | | | 3 | 1 | | 1 | | 18518 | |
| | stmn1b | tr Q568Q7 Q568Q7_DANRE | | | | | | | | 1 | | 1 | | 6,3 | 17067 | |
| serotransferrine | tfa | tr F1R858 F1R858_DANRE | | | | 12 | 35 | | | | | | | 6,9 | 73717 | |
| | | tr B8JL43 B8JL43_DANRE | | | | | 35 | | | | | | | | 6,9 | 73282 |
| hemoglobine | hbaa1 | Q90487 HBA_DANRE | | | | 2 | 6 | 14 | 6 | | 6 | | | 8,5 | 15522 | |
| | | tr Q1JQ69 Q1JQ69_DANRE | | | | 2 | 6 | 14 | 6 | | 6 | 6 | | 8,5 | 15522 | |
| | | tr Q6ZM17 Q6ZM17_DANRE | | | | 5 | 15 | 7 | | | 7 | | | | 9,4 | 15565 |
| | ba1 | Q90486 HBB1_DANRE | | | | | | | 16 | 11 | 3 | 8 | 8 | 7,7 | 16389 | |
| | | tr B3DG37 B3DG37_DANRE | | | | | | | 16 | 11 | 3 | 8 | 8 | 7,7 | 16389 | |
| | hbbe2 | Q90485 HBB2_DANRE | | | | | | | | | 3 | 8 | | | 16389 | |
| tr Q7T1B0 Q7T1B0_DANRE | | | | | | | | 3 | | | | | | 6,6 | 16533 | |
| initiation factor | eif5a2 | tr Q7ZUP4 Q7ZUP4_DANRE | | | | | | | | 1 | 2 | | 3 | 5 | 16852 | |
| | | tr B0UY94 B0UY94_DANRE | | | | | | | | 1 | 2 | | 3 | 6,5 | 14059 | |
| | eif5a | tr E9QD54 E9QD54_DANRE | | | | | | | | | 2 | 2 | 2 | 6,5 | 12787 | |
| | | tr A7MC10 A7MC10_DANRE | | | | | | | | | 2 | 2 | 2 | 6,5 | 14985 | |
| | | tr Q6NX89 Q6NX89_DANRE | | | | | | | | | 2 | 2 | 2 | 5 | 16879 | |
| Ribosomal protein | rps18 | tr E9QHH6 E9QHH6_DANRE | | | | | | | | | 1 | | | 12 | 9781 | |
| | rps18 | tr A0A0R4IIP6 A0A0R4IIP6_DANRE | | | | | | | | | 1 | | | | 11861 | |
| | rps18 | tr A3KQW5 A3KQW5_DANRE | | | | | | | | | | | | 11,6 | 17732 | |
| | rps18 | Q8JGS9 RS18_DANRE | | | | | | | | | 1 | | | 11,6 | 17732 | |
| Chaperonine | HSP | tr Q5RKM3 Q5RKM3_DANRE | | | | | | 3 | | | | | | 6,8 | 61668 | |
| | HSP | tr Q7T3L3 Q7T3L3_DANRE | | | | | | | | | 1 | | | 4,5 | 91282 | |
| | HSP | tr Q6P3L3 Q6P3L3_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | 4,8 | 71991 | |
| Ubiquitine | 31996 | Q6DHL4 SUMO2_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | 6,2 | 11029 | |
| | 31993 | Q6NV25 SMO3L_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | 5,2 | 10683 | |
| | 31994 | Q6DI05 SUMO3_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | 5,2 | 10725 | |
| | 31995 | tr F1QRX2 F1QRX2_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | 5,2 | 10697 | |
| binding protein | cold induced RNA binding protein b | tr A0A0R4ITM4 A0A0R4ITM4_DANRE | | 6 | | | | | | | | | | | 19392 | |
| | cold induced RNA binding protein b | tr A0A0R4IMS2 A0A0R4IMS2_DANRE | | 6 | | | | | | | | | | | 19937 | |
| | cold induced RNA binding protein b | tr F1R6L4 F1R6L4_DANRE | | 6 | | | | | | | | | | 8,6 | 23161 | |
| | cold induced RNA binding protein b | tr F1R6L3 F1R6L3_DANRE | | 6 | | | | | | | | | | 9 | 23613 | |
| COUNTING FACTOR ASSOCIATED D | | tr A0A0G2KEK2 A0A0G2KEK2_DANRE | 1 | | | | | | | | | | | 6,9 | 29612 | |
| | | tr F1R8R0 F1R8R0_DANRE | 1 | | | | | | | | | | | 7 | 37609 | |
| | | tr A0A0N4SU18 A0A0N4SU18_DANRE | 1 | | | | | | | | | | | | 40004 | |
| | | tr A0A0N4STQ7 A0A0N4STQ7_DANRE | 1 | | | | | | | | | | | | 36135 | |
| zona pellucida glycoprotein 2, tandem duplicate | zona pellucida glycoprotein 2, tandem duplicate 1 | tr F1R003 F1R003_DANRE | | | | | 1 | | | | | | | 6,5 | 47096 | |
| | zona pellucida glycoprotein 2, tandem duplicate 3 | tr F1QMZ0 F1QMZ0_DANRE | | | | | 1 | | | | | | | 6,3 | 47250 | |
| | zona pellucida glycoprotein 2, tandem duplicate 2 | tr F1QNI8 F1QNI8_DANRE | | | | | 1 | | | | | | | 6,1 | 47446 | |
| missing oocyte, meiosis regulator, homolog | | tr A0A0G2KHH5 A0A0G2KHH5_DANRE | | | | | | | | 1 | | | | 6,7 | 82948 | |
| | | tr A0A0G2KK88 A0A0G2KK88_DANRE | | | | | | | | | 1 | | | | 6,7 | 84912 |
| | | Q802U2 MIO_DANRE | | | | | | | | | 1 | | | | 98182 | |

| Familie | Proteine | Accession | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | pI | kDa |
|---------------------------------------|---|--------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|
| | | | 3,96 | 4,18 | 5,01 | 5,21 | 5,34 | 6,08 | 6,85 | 7,55 | 7,81 | 8,24 | | |
| | alpha-2-macroglobulin-like | tr E7F8T4 E7F8T4_DANRE | | | | | | | | | | 1 | 5,8 | 136623 |
| | alpha-2-macroglobulin-like | tr X1WBT0 X1WBT0_DANRE | | | | | | | | | | 1 | 6,2 | 160164 |
| | alpha-2-macroglobulin-like | tr F6NTZ9 F6NTZ9_DANRE | | | | | | | | | | 1 | 5,1 | 160540 |
| | thymosin, beta 4 x | tr Q45QT2 Q45QT2_DANRE | | 13 | 2 | | | | | | | | 5 | 4981 |
| | 44030 | Q568V3 FBX50_DANRE | | 2 | | | | | | | | | 5,8 | 27256 |
| | 44042 | tr Q6XG62 Q6XG62_DANRE | | 1 | | | | | | | | | 4,8 | 10407 |
| | 44032 | tr Q6NV37 Q6NV37_DANRE | | 2 | | | | | | | | | 5,5 | 36967 |
| | 44023 | tr Q503D8 Q503D8_DANRE | | 3 | | | | | | | | | 5,1 | 19060 |
| | 44049 | tr A0A0J9YJ23 A0A0J9YJ23_DANRE | | 1 | | | | | | | | | | 15861 |
| | 44050 | tr Z4YIG5 Z4YIG5_DANRE | | 1 | | | | | | | | | 5,4 | 20803 |
| | 44051 | Q6TEN1 RAP1B_DANRE | | 1 | | | | | | | | | 5,4 | 20828 |
| | 44052 | tr Q6IQP4 Q6IQP4_DANRE | | 1 | | | | | | | | | 6,4 | 21041 |
| | 44055 | tr B8JLK7 B8JLK7_DANRE | | 1 | | | | | | | | | 4,7 | 49286 |
| | 44056 | Q803J8 ZC3HF_DANRE | | 1 | | | | | | | | | 4,7 | 49214 |
| | 31660 | tr A0A0R4IH08 A0A0R4IH08_DANRE | | | | 1 | | | | | | | | 287654 |
| | 22499 | tr F1R1L5 F1R1L5_DANRE | | | | 1 | | | | | | | 5,7 | 263564 |
| | 43490 | tr E7F017 E7F017_DANRE | | 5 | | | | | | | | | 4,6 | 220482 |
| | 43491 | tr F1RA25 F1RA25_DANRE | | 3 | | | | | | | | | 7,1 | 52717 |
| | 31826 | tr I3ISU7 I3ISU7_DANRE | | 2 | 1 | | | | | | | | 3,4 | 140898 |
| | 31812 | tr Q1LVW4 Q1LVW4_DANRE | | 4 | | | | | | | | | 10,1 | 14817 |
| | 31813 | tr F1QL37 F1QL37_DANRE | | 4 | | | | | | | | | 10,2 | 15205 |
| | 31820 | tr F1QIR8 F1QIR8_DANRE | | 4 | | | | | | | | | 9,4 | 15590 |
| | 31814 | tr H0WEG1 H0WEG1_DANRE | | 4 | | | | | | | | | 10,2 | 15605 |
| | 31815 | tr H0WEB6 H0WEB6_DANRE | | 4 | | | | | | | | | 10,1 | 15645 |
| | 31816 | tr H0WEG6 H0WEG6_DANRE | | 4 | | | | | | | | | 10,2 | 15587 |
| | 31817 | tr H0WF65 H0WF65_DANRE | | 4 | | | | | | | | | 10,1 | 15597 |
| | 31819 | tr E9QCA5 E9QCA5_DANRE | | 4 | | | | | | | | | 9,7 | 14760 |
| | 44021 | tr Q566W6 Q566W6_DANRE | | 4 | | | | | | | | | 9 | 18454 |
| binding protein | Y box binding protein ! | tr A1A605 A1A605_DANRE | | 9 | | | | | | | | | 10,1 | 34925 |
| | high mobility group nucleosomal binding domain 2 | tr Q3B732 Q3B732_DANRE | | 1 | | | | | | | | | 11 | 7915 |
| | 31988 | tr E9QJP3 E9QJP3_DANRE | | 6 | | | | | | | | | 7,7 | 25329 |
| | nothepsin | tr A0A0R4IA33 A0A0R4IA33_DANRE | | 5 | | | | | | | | | 7,3 | 48296 |
| | apolipoprotein 1 | tr A0A0R4IKF0 A0A0R4IKF0_DANRE | | 4 | | | | | | | | | 6,4 | 30140 |
| | 44019 | tr F1QPC7 F1QPC7_DANRE | | 4 | | | | | | | | | 9,1 | 74558 |
| | 46058 | tr F1QIH9 F1QIH9_DANRE | | | | | 6 | | | | | | 5 | 47210 |
| | 46060 | tr E7F720 E7F720_DANRE | | | | | 1 | | | | | | 8,6 | 44551 |
| | nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) | tr F1QNE0 F1QNE0_DANRE | | 2 | | | | | | | | | 4,1 | 67998 |
| | glycogenin 1a | tr A0A0R4IDW2 A0A0R4IDW2_DANRE | | 2 | | | | | | | | | 5,5 | 37184 |
| member RAS oncogene family a | tr B8JLC8 B8JLC8_DANRE | | 1 | | | | | | | | | 6,5 | 22314 | |
| 46063 | tr F1QYE3 F1QYE3_DANRE | | | | | 1 | | | | | | 5,2 | 47478 | |
| 46062 | tr Q5TYX2 Q5TYX2_DANRE | | | | | 1 | | | | | | 5,7 | 104860 | |
| host cell factor C1b | tr A8WIP5 A8WIP5_DANRE | | | | | 1 | | | | | | 5,8 | 203781 | |
| fetuin B | tr E7FE90 E7FE90_DANRE | | | | | | 7 | | | | | | 6,8 | 56750 |
| complement component c3a, duplicate 2 | tr F1QV29 F1QV29_DANRE | | | | | | 1 | | | | | | 6,8 | 185432 |
| PQ loop repeat containing 2 | tr Q5CZR6 Q5CZR6_DANRE | | | | | | 1 | | | | | | 8,6 | 25238 |
| PQ loop repeat containing 2 | tr E7FD49 E7FD49_DANRE | | | | | | 1 | | | | 1 | | 8,8 | 25204 |
| PQ loop repeat containing 2 | tr A0A0R4IU7 A0A0R4IU7_DANRE | | | | | | 1 | | | | 1 | | 7,1841 | |
| LSM family member 14B | tr F1Q898 F1Q898_DANRE | | | | | | | 2 | 1 | 1 | | | 10 | 41540 |
| 15054 | tr F1RED5 F1RED5_DANRE | | | | | | | 3 | 7 | 3 | | | 6,6 | 158281 |
| 15059 | tr E7FEK4 E7FEK4_DANRE | | | | | | | 3 | | 3 | | | 6,8 | 158312 |
| 15058 | tr E7FFZ3 E7FFZ3_DANRE | | | | | | | 3 | 7 | 3 | | | 7 | 158362 |
| 15055 | tr E7F3L3 E7F3L3_DANRE | | | | | | | 3 | 7 | 3 | | | 6,8 | 159409 |
| 15073 | tr E7FFL8 E7FFL8_DANRE | | | | | | | 2 | | | | | 7,9 | 44460 |
| 15064 | tr A0A0R4FW1 A0A0R4FW1_DANRE | | | | | | | 2 | 8 | 3 | | | 156996 | |
| 15065 | tr B7ZVK0 B7ZVK0_DANRE | | | | | | | 2 | 8 | 3 | | | 6,5 | 158708 |
| 15066 | tr A0A0R4IGR4 A0A0R4IGR4_DANRE | | | | | | | 2 | 8 | 3 | | | 158995 | |
| 19393 | tr Q5RG14 Q5RG14_DANRE | | | | | | | 3 | 2 | 3 | 3 | | 3,9 | 17063 |
| 19391 | tr A0A0N4STR3 A0A0N4STR3_DANRE | | | | | | | | | 3 | 2 | 3 | | 17263 |
| 19394 | tr X1WFN2 X1WFN2_DANRE | | | | | | | | | 3 | 2 | 3 | 4,9 | 17162 |
| 19395 | tr Q5RG15 Q5RG15_DANRE | | | | | | | | | 3 | 2 | 3 | 6,1 | 17289 |
| checkpoint suppressor 1 | tr Q5TYT5 Q5TYT5_DANRE | | | | | | | | 1 | | | | 10 | 48231 |
| checkpoint suppressor 1 | tr F1QZ26 F1QZ26_DANRE | | | | | | | | 1 | | | | 7 | 48460 |
| 30750 | tr F1QF63 F1QF63_DANRE | | | | | | | | | 6 | 4 | | 6,5 | 158042 |
| 15097 | tr F1QIP9 F1QIP9_DANRE | | | | | | | | | 6 | 4 | | 6,7 | 158198 |
| 19390 | tr Q5RG08 Q5RG08_DANRE | | | | | | | | | 3 | | | 5,7 | 17363 |
| 19392 | tr Q5RG16 Q5RG16_DANRE | | | | | | | | | 3 | | | 6,2 | 17348 |
| 23023 | tr A0A0N4SU14 A0A0N4SU14_DANRE | | | | | | | | | 1 | | | 6,7 | 27549 |
| 50140 | tr A0A0N4SU62 A0A0N4SU62_DANRE | | | | | | | | | 1 | | | 6,7 | 28074 |
| 23024 | tr F1QID9 F1QID9_DANRE | | | | | | | | | 1 | | | 6,7 | 28057 |
| 50141 | tr F1QV16 F1QV16_DANRE | | | | | | | | | 1 | | | 7,1 | 28646 |
| 26 | 50143 | tr Q1RMB1 Q1RMB1_DANRE | | | | | | | | 1 | | | 7,1 | 28191 |
| 31 | coiled-coil domain containing 142 | tr E7EYV9 E7EYV9_DANRE | | | | | | | | 1 | | | 6,8 | 115709 |
| 29 | fatty acid binding protein 11a | tr Q66I80 Q66I80_DANRE | | | | | | | | | 1 | | 7,7 | 15116 |
| 12 | 15049 | tr A0A0G2KTK1 A0A0G2KTK1_DANRE | | | | | | | | | | 40 | 7,2 | 66281 |
| 25 | programmed cell death 5 | tr Q7ZU24 Q7ZU24_DANRE | | | | | | | | | | 1 | 5,1 | 14588 |

Liste des protéines identifiées dans les fractions OGE d'un mélange d'extrait de poissons zèbres contaminés reproduits.

Les protéines sont regroupées par famille et sont identifiées par leur numéro d'accèsion à partir de la base de données Ensembl. Les fractions sont numérotées 1 à 10 avec leur pH associé, les nombres indiqués dans les colonnes correspondantes correspondent au nombre de peptides identifiées dans la protéine.

| Famille | Proteine | Accession | N° fraction et pH : | | | | | | | | | | MM | | |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|--------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | | |
| Vitellogénine | vtg 1 | tr Q1LWN2 Q1LWN2_DANRE | 3,96 | 4,18 | 5,01 | 5,21 | 5,34 | 6,08 | 6,85 | 7,55 | 7,81 | 8,24 | 8,8 | 149234 | |
| | vtg5 | tr F1R2S5 F1R2S5_DANRE | 3 | 5 | | | | | | | | 37 | 48 | 8,8 | 149382 |
| | | tr F1QHH9 F1QHH9_DANRE | 3 | 5 | | | 1 | 2 | | 1 | 32 | 44 | 8,9 | 148706 | |
| | vtg4 | tr F1RBA0 F1RBA0_DANRE | 3 | 5 | | | 1 | 3 | | 1 | 34 | 46 | 9 | 148832 | |
| | | tr E9QFD8 E9QFD8_DANRE | 3 | 5 | | | | 3 | | 1 | 36 | 46 | 8,8 | 149297 | |
| | vtg6 | tr F1Q7L0 F1Q7L0_DANRE | 3 | 5 | | | | | | | 32 | 44 | 9,1 | 149356 | |
| | | tr F1QV15 F1QV15_DANRE | 3 | 5 | | | | | | | 35 | 45 | 9 | 150022 | |
| | vtg7 | tr A0A0R4IY49 A0A0R4IY49_DANRE | 3 | 5 | | | | | | | 31 | 38 | | 148971 | |
| | | tr A0A0R4IUA0 A0A0R4IUA0_DANRE | | 5 | | | | | | | 31 | 38 | | 148918 | |
| | | tr F1R2T3 F1R2T3_DANRE | | 5 | | | | 2 | | | 29 | 35 | 8,9 | 148990 | |
| tr Q1MTC6 Q1MTC6_DANRE | | | 5 | 2 | | | | | | | | | 8,8 | 147177 | |
| vtg2 | tr Q1MTC4 Q1MTC4_DANRE | | | | | | | | | 14 | 20 | 8,6 | 179896 | | |
| Actine | - | tr X1WEN2 X1WEN2_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | | | 4,6 | 9311 | |
| | - | tr F1RCB6 F1RCB6_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | | | 5 | 41976 | |
| | béta 2 | tr F1QC15 F1QC15_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | | | 5,5 | 14116 | |
| | | tr A8WG05 A8WG05_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | 4 | 4 | 5,2 | 41753 | |
| | - | tr Q7ZVF9 ACTB2_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | 4 | 4 | 5,2 | 41753 | |
| | | tr E9QBP3 E9QBP3_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | | | 5,6 | 14245 | |
| | béta 1 | tr Q7ZV17 ACTB1_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | 4 | 4 | 5,6 | 41767 | |
| | | tr E9QD59 E9QD59_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | | | 4,7 | 33606 | |
| | - | tr E9QH14 E9QH14_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | | | 4,9 | 25950 | |
| | alpha 2 | tr Q6DHS1 Q6DHS1_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | | | 5 | 41995 | |
| | alpha 1b | tr Q9I8V1 Q9I8V1_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | | | 5 | 41973 | |
| | alpha 1a | tr Q6IQR3 Q6IQR3_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | | | 5 | 41975 | |
| | - | tr Q6IQL9 Q6IQL9_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | | | 5 | 42005 | |
| | alpha 1b | tr Q6XNL8 Q6XNL8_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | | | 5 | 41975 | |
| alpha 1a | tr F1QUN8 F1QUN8_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | | | 5 | 42019 | | |
| - | tr A0A0R4IBT5 A0A0R4IBT5_DANRE | 2 | 2 | | | | | | | | | | 42160 | | |
| Rhamnose binding lectin family | tr Q1LVW4 Q1LVW4_DANRE | 11 | | | | | | | | | | | 10,1 | 14817 | |
| | tr F1QL37 F1QL37_DANRE | 11 | | | | | | | | | | | 10,2 | 15205 | |
| | tr H0WEG1 H0WEG1_DANRE | 11 | | | | | | | | | | | 10,2 | 15605 | |
| | tr H0WEB6 H0WEB6_DANRE | 11 | | | | | | | | | | | 10,1 | 15645 | |
| | tr H0WEG6 H0WEG6_DANRE | 11 | | | | | | | 1 | | | | 10,1 | 15587 | |
| | tr H0WF65 H0WF65_DANRE | 11 | | | | | | | 1 | | | | 10,1 | 15597 | |
| | tr E9QJP3 E9QJP3_DANRE | | | | | | | | | 2 | 2 | | 7,7 | 25329 | |
| | tr E9QCA5 E9QCA5_DANRE | 8 | | | | | | | | | | | 9,7 | 14760 | |
| | tr H0WED7 H0WED7_DANRE | 9 | | | | | | | | | | | 9,9 | 15618 | |
| | tr A3KQR6 A3KQR6_DANRE | 5 | | | | | | | | | | | 9,2 | 15342 | |
| | tr A8HAI7 A8HAI7_DANRE | 5 | | | | | | | | | | | 8,9 | 15502 | |
| | tr E7EZV4 E7EZV4_DANRE | 5 | | | | | | | | | | | 8,9 | 15484 | |
| | tr A3KQR5 A3KQR5_DANRE | 5 | | | | | | | | | | | 9,2 | 17420 | |
| | facteur d'élongation | tr E7FD96 E7FD96_DANRE | | | | | | | | | | 3 | 3 | 9,7 | 50134 |
| tr F1QI74 F1QI74_DANRE | | | | | | | | | | | 3 | 3 | 9,7 | 50150 | |
| tr A0A0R4IE10 A0A0R4IE10_DANRE | | | | | | | | | | | 3 | 3 | | 50066 | |
| tr A0A0R4IJ37 A0A0R4IJ37_DANRE | | | | | | | | | | | 3 | 3 | | 49414 | |
| tr Q6P969 Q6P969_DANRE | | | | | | | | | | | 3 | 3 | 9,6 | 50339 | |
| tr Q568F0 Q568F0_DANRE | | | | | | | | | | | 3 | 3 | 9,6 | 50371 | |
| tr Q92005 EF1A_DANRE | | | | | | | | | | | 3 | 3 | 9,6 | 50048 | |
| tr Q6DHT2 Q6DHT2_DANRE | | | | | | | | | | | 3 | 3 | 9,5 | 50659 | |
| tr A0A0R4IA30 A0A0R4IA30_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | | | 27501 | |
| tr A0A0R4IS28 A0A0R4IS28_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | | | 28793 | |
| tr A0A0R4IK64 A0A0R4IK64_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | | | 28619 | |
| tr A0A0R4IGB6 A0A0R4IGB6_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | | | 28296 | |
| tr A0A0R4IA64 A0A0R4IA64_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | | | 32484 | |
| tr Q5SPD1 Q5SPD1_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | | | 4,4 | 30327 |
| tr Q5SPD0 Q5SPD0_DANRE | | | | | | | | | | 1 | | | 4,6 | 32761 | |
| tr Q6IQE2 Q6IQE2_DANRE | | | | | | | | | | 2 | | | 4,3 | 24534 | |
| tr F1QQW9 F1QQW9_DANRE | | | | | | | | | | | 4 | 10,4 | 53634 | | |
| tr A2CE51 A2CE51_DANRE | | | | | | | | | | 1 | 2 | 6,8 | 95885 | | |
| tr Q6P3J5 Q6P3J5_DANRE | | | | | | | | | | 1 | 1 | 6,7 | 95498 | | |

| Famille | Proteine | Accession | N° fraction et pH : | | | | | | | | | | pI | MM kDa | |
|-------------------------------|---|------------------------------------|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----|-----------|--------|
| | | | 1 3,96 | 2 4,18 | 3 5,01 | 4 5,21 | 5 5,34 | 6 6,08 | 7 6,85 | 8 7,55 | 9 7,81 | 10 8,24 | | | |
| facteur d'initiation | eif5a | tr E9QD54 E9QD54_DANRE | | | | | | | | | 2 | | 6,5 | 12787 | |
| | | tr A7MCI0 A7MCI0_DANRE | | | | | | | | | 2 | | 6,5 | 14985 | |
| | | tr Q6NX89 Q6NX89_DANRE | | | | | | | | | 2 | | 5 | 16879 | |
| | eif5a2 | tr B0UY94 B0UY94_DANRE | | | | | | | | | 2 | | 6,5 | 14059 | |
| | | tr Q7ZUP4 Q7ZUP4_DANRE | | | | | | | | | 2 | | 5 | 16852 | |
| Hémoglobine | Hbaa1 | tr Q6ZM17 Q6ZM17_DANRE | | | | | | | | | 4 | 3 | 9,4 | 15565 | |
| | - | tr Q6ZM13 Q6ZM13_DANRE | | | | | | | | | | 2 | 9,8 | 15413 | |
| Ubiquitine-like | 2b | Q6DHL4 SUMO2_DANRE | | | | | | | | | 1 | 1 | 6,2 | 11029 | |
| | | Q6NV25 SMO3L_DANRE | | | | | | | | | 1 | 1 | 5,2 | 10683 | |
| | | Q6DI05 SUMO3_DANRE | | | | | | | | | | 1 | 1 | 5,2 | 10725 |
| | | tr F1QRX2 F1QRX2_DANRE | | | | | | | | | | 1 | 1 | 5,2 | 10697 |
| Ubiquitine ligase | uhrf1 | tr A0A0R4IAR5 A0A0R4IAR5_DANRE | | | | 1 | | | | | | | | 87064 | |
| | | E7EFZ3 UHRF1_DANRE | | | | 1 | | | | | | | | 7 | 87091 |
| Récepteur acide retinoïque | béta | tr B3DG77 B3DG77_DANRE | | | | | | | 1 | | | | | 7 | 46675 |
| | alpha | tr F1R1Y8 F1R1Y8_DANRE | | | | | | | 1 | | | | | 8,1 | 54405 |
| enzyme | gapdh | Q5XJ10 G3P_DANRE | | | | | | | | | 4 | | 8,1 | 35784 | |
| | | tr A0A0R4IG1 A0A0R4IG1_DANRE | | | | | | | | | 4 | | | 36099 | |
| | | tr E9QGA9 E9QGA9_DANRE | | | | | | | | | | 1 | 8,9 | 23789 | |
| | enolase | tr F1QBW7 F1QBW7_DANRE | | | | | | | | | 2 | | 6,7 | 51327 | |
| | transferase | tr Q9DDU5 Q9DDU5_DANRE | | | | | | | | | | 5 | 8 | 23526 | |
| | SOD | tr B2GRH9 B2GRH9_DANRE | | | | | | | | | 1 | | 6,6 | 15953 | |
| | isomerase | tr Q6PC53 Q6PC53_DANRE | | | | | | | | | | 6 | 8 | 17489 | |
| | | tr B8JKN6 B8JKN6_DANRE | | | | | | | | | | 1 | 8,6 | 17404 | |
| mitofusïn-2 | tr F1QWA9 F1QWA9_DANRE | | | 1 | | | | | | | | | 6 | 83204 | |
| créatine kinase | tr R4GE87 R4GE87_DANRE | | | | 2 | | | | | | | | 6,2 | 27560 | |
| Binding protein | nucleic acid binding protein a | tr F1Q6Z5 F1Q6Z5_DANRE | | | | | | | | | | 4 | 8 | 18015 | |
| | xin actin binding repeat containing 2a | tr F8W4U4 F8W4U4_DANRE | | | | | | | | | | | | 5,2 | 372583 |
| adhésion | sdk1a | tr F1QC95 F1QC95_DANRE | | | 1 | | | | | | | | | 233644 | |
| Chaperonine | HSP | tr F1QDM6 F1QDM6_DANRE | | | | | | | | | | 2 | | 9187 | |
| | | tr Q6IQI7 Q6IQI7_DANRE | | | | | | | | | | 2 | 5,8 | 11020 | |
| macroglobulin | a2m1 | tr E7F3L3 E7F3L3_DANRE | | | | | | | | | | 1 | 6,8 | 159409 | |
| | | tr A0A0G2KTK1 A0A0G2KTK1_DANRE | | | | | | | | | | 10 | | 66281 | |
| | - | tr I3ISU7 I3ISU7_DANRE | | | 1 | | | | | | | | | 3,4 | 140898 |
| | - | tr E9QHT6 E9QHT6_DANRE | | | 1 | | | | | | | | | 8,3 | 13133 |
| | - | tr F1QQM1 F1QQM1_DANRE | | | | 1 | | | | | | | | 8,8 | 60350 |
| | - | Q6NZ18 K0907_DANRE | | | | 1 | | | | | | | | 8,8 | 60376 |
| | - | tr A0A0R4IGB2 A0A0R4IGB2_DANRE | | | | | | | | | | 1 | | | 60437 |
| | - | A2BGR3 ERC6L_DANRE | | | | | | | | | | 1 | | 4,2 | 163226 |
| | a2m1 | tr E7FFZ3 E7FFZ3_DANRE | | | | | | | | | | 1 | 1 | 7 | 158362 |
| a2m1 | tr F1QIP9 F1QIP9_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | 6,7 | 158198 | |
| protéine transmembranaire | | A3KPL7 T170A_DANRE | | | | 1 | | | | | | | 9,2 | 15696 | |
| Energie | guanine nucleotide exchange factor | tr F1R423 F1R423_DANRE | | | | 1 | | | | | | | | 7,8 | 119846 |
| | | tr F1Q618 F1Q618_DANRE | | | | | | | | | | | | 7,7 | 347713 |
| canal | canal K, 10a | tr A3QJX1 A3QJX1_DANRE | | | | | | | | | 1 | | 9,5 | 63800 | |
| | - | G protein-coupled receptor 155b | tr E7FDX1 E7FDX1_DANRE | | | | | | | | 1 | | 6,1 | 82349 | |
| - | G protein-coupled receptor 155a | tr E9QEQ9 E9QEQ9_DANRE | | | | | | | | | 1 | | 6,8 | 90489 | |
| | | tr F1Q898 F1Q898_DANRE | | | | | | | | | | 1 | | 10 | 41540 |
| - | - | tr Q5RG08 Q5RG08_DANRE | | | | | | | | | | 3 | 3 | 5,7 | 17363 |
| | | tr A0A0N4STR3 A0A0N4STR3_DANRE | | | | | | | | | | 3 | 3 | | 17263 |
| | | tr Q5RG16 Q5RG16_DANRE | | | | | | | | | | 3 | 3 | 6,2 | 17348 |
| | | tr Q5RG14 Q5RG14_DANRE | | | | | | | | | | 2 | 2 | 4,9 | 17063 |
| | | tr X1WFN2 X1WFN2_DANRE | | | | | | | | | | 2 | 2 | 4,9 | 17162 |
| | | tr Q5RG15 Q5RG15_DANRE | | | | | | | | | | 2 | 2 | 6,1 | 17289 |
| | | tr A0A0R4INW5 A0A0R4INW5_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | | 51880 |
| | | tr F1QQK6 F1QQK6_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | 9,1 | 85300 |
| | | tr F1RAU3 F1RAU3_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | 9,4 | 85459 |
| | | tr F1R3X6 F1R3X6_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | 9,1 | 85284 |
| | | tr A0A0R4IKL6 A0A0R4IKL6_DANRE | | | | | | | | | | | 1 | | 85202 |