

Conséquences moléculaires des expositions aiguë
et chronique à l'uranium sur le transcriptome murin

THÈSE

Magali TAULAN

Thèse soutenue à l'Université de Montpellier I

18 juin 2004

Laboratoire de Radiotoxicologie expérimentale (LRTOX)

Réf : ISRN IRSN - 2004/44 - FR

Financement : IRSN - Région Languedoc- Roussillon

UNIVERSITE MONTPELLIER I
U.F.R. de MEDECINE

Année 2004

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I

*Ecole doctorale : Biologie Santé
Discipline : Génétique*

Présentée et soutenue publiquement

Par

MAGALI TAULAN

le 18 juin 2004

*Analyse du transcriptome rénal murin dans des conditions
d'exposition aiguë et chronique à l'uranium*

Directeur de thèse :
Jacques Demaille

JURY

Mme. Mireille Claustres	PU-PH (Montpellier)	Président
M. Jean Marc Elalouf	CR (Paris)	Rapporteur
M. Alain Boudou	PU (Bordeaux)	Rapporteur
Mme. Marie-Catherine Romey	MCU (Montpellier)	Examineur
M. François Paquet	CR (Pierrelatte)	Examineur
M. Jacques Demaille	PU-PH (Montpellier)	Directeur de thèse

J'adresse tous mes sincères remerciements à **Madame le Professeur Mireille Claustres** qui me fait l'honneur de présider le jury de thèse et qui m'a accueilli au sein de son laboratoire à de nombreuses reprises.

J'exprime toute ma reconnaissance à **Monsieur le Professeur Jacques Demaille** qui a accepté la responsabilité de cette thèse et qui m'a prodigué de précieux conseils tout au long de celle-ci. Qu'il soit assuré de mon profond respect.

Je tiens à remercier **Monsieur le Docteur Jean-Marc Elalouf**, je lui suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Je tiens également à remercier **Monsieur le Professeur Alain Boudou** pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'évaluer cette thèse et en participant au jury.

Je remercie vivement **Monsieur le Docteur François Paquet** pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Radiotoxicologie de Pierrelatte, d'avoir mis à ma disposition l'infrastructure nécessaire pour mener à bien ce travail et pour avoir accepté de participer à mon jury.

Je tiens tout particulièrement à témoigner ma plus vive reconnaissance à **Madame le Docteur Marie-Catherine Romey** pour tous les conseils avisés que tu m'as donné tout au long de ce travail, pour ton immense disponibilité malgré tes occupations et pour ton soutien constant. Tu as guidé la réalisation de cette thèse avec efficacité et compétence. Sois assurée de ma profonde gratitude.

J'adresse tous mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse.

A Olivia, Sandrine, Christophe et Thierry pour leur aide, leur soutien et pour tous les bons moments passés ensemble au labo et à l'extérieur. Olivia, ce fut un réel plaisir de partager ce bureau durant ces trois années (je ne l'aurais partagé avec personne d'autre) et pour tout le reste : les soirées, les moments de folies, les week-ends... Et Christophe, qui a tenu compagnie à Olivier toutes ces soirées où j'étais absente...mais je n'oublierai pas non plus toutes les sorties "sportives", ballades, visites ... Thierry, tu vas enfin pouvoir faire tout le vacarme que tu veux...mais tes entrées bruyantes me manqueront quand même... Enfin Sandrine, qui a un gros défaut, son tigre...Mais non je plaisante, merci pour les

Table des matières :

Abréviations	4
Présentation du sujet	6
Etat de l'art	8
I. Les métaux et leur toxicité	9
I-1 Les métaux dans l'environnement	10
I-1-1. Les métaux essentiels : exemple du cuivre	11
I-1-2. Les métaux non essentiels : exemple du mercure, du plomb, du cadmium, de l'arsenic et du nickel	11
I-2. Le cas de l'uranium	15
I-2-1. Généralités	15
I-2-2. La toxicité de l'uranium	18
I-2-2-1. Biocinétique de l'uranium	19
I-2-2-1-1. Des voies d'entrée vers le compartiment sanguin	19
I-2-2-1-2. Du compartiment sanguin au stockage dans les organes et/ou à l'élimination des composés uranifères	21
I-2-2-2. La distribution tissulaire	22
I-2-2-2-1. L'uranium et les os	23
I-2-2-2-2. L'uranium et les poumons	23
I-2-2-2-3. L'uranium et le foie	24
I-2-2-2-4. L'uranium et les reins	24
I-2-2-3. Toxique chimique ou radiologique	26
I-2-2-3-1. La toxicité radiologique de l'uranium	26
I-2-2-3-2. La toxicité chimique de l'uranium	27
I-3. L'uranium et le rein	30
I-3-1. Généralités : le rein	30
I-3-1-1. Fonctions et structures du rein	30
I-3-1-2. Le rein et l'insuffisance rénale	33
I-3-2. Toxicité rénale de l'uranium	34
I-3-2-1. Les données connues sur la toxicité après exposition aiguë à l'uranium	34
I-3-2-1-1. Physiopathologie associée à la néphrotoxicité de l'uranium	34
I-3-2-1-2. Les sites d'accumulation de l'uranium	36

I-3-2-1-3. Mécanismes de toxicité de l'uranium	38
I-3-2-1-4. Mort cellulaire et résistance acquise induite par l'uranium ..	40
I-3-2-2. Les données connues sur la toxicité après une exposition chronique à l'uranium	43
I-3-2-2-1. Expérimentation animale	44
I-3-2-2-2. Approche épidémiologique	45
II. Les Approches récentes dans le domaine de la toxicocologie	47
II-1. La toxicogénomique	48
II-2. Les techniques d'étude du transcriptome	50
II-2-1. Les puces à ADN	50
II-2-2. La méthode <i>SAGE</i>	53
Résultats	62
I. Conséquences moléculaires résultantes d'une contamination aiguë à l'uranium	64
Article soumis à " <i>Laboratory Investigation</i> "	66
<i>Comprehensive analysis of the toxicogenomic renal response to uranyl nitrate.</i>	
II. Conséquences moléculaires résultantes d'une contamination chronique à l'uranium.	70
Article soumis à " <i>Environmental Health Perspectives</i> "	71
<i>Toxicogenomics profiles of uranyl nitrate toxicant: long-term renal molecular effects in mice.</i>	
III. Analyse globale des données obtenues par la technique <i>SAGE</i>	75
III-1. Analyse bio-informatique des données <i>SAGE</i>	75
III-1-1. Extraction et traitement des informations	75
III-1-2. Identification des étiquettes	76
III-1-3. Qualité des banques	78
III-2. Les atteintes biologiques observées consécutives à une exposition à l'uranium	83
III-2-1. L'inflammation	83
III-2-2. Voie du stress oxydant : maintien de la balance par les antioxydants..	85
III-2-3. La mort cellulaire : apoptose ou nécrose ?	87
III-2-4. Transporteurs d'électrolyte	88
III-2-5. L'homéostasie cellulaire	89
III-2-6. Le métabolisme Cellulaire	90
III-2-7. Autres processus cellulaire	94

Bilan et perspectives	_____	95
Liste des figures	_____	103
Glossaire	_____	104
Références	_____	105

Abréviations :

AU :	Acétate d'Uranyle
ADNc :	ADN complémentaire
ARNm :	ARN messenger
Calm2:	Calmoduline 2
CIPR :	Commission Internationale de Protection Radiologique
Ftl1:	<i>Ferritin light chain 1</i>
Gal-3:	Galectine-3
γ GT:	gamma-Glutamyltranspeptidase
GPx :	Gluthation peroxydase
IGFBP7:	<i>Insulin like Growth Factor Binding Protein 7</i>
IR :	Ischémie/Reperfusion
IRA :	Insuffisance Rénale Aiguë
IRC :	Insuffisance Rénale Chronique
KAP:	<i>Kidney Androgen regulated Protein</i>
KPA:	Kinetic Phosphorescence Analyzer
NaPi-II:	Solute carrier family 34 (sodium phosphate member 1)
NU :	Nitrate d'Uranyle
ODC:	Ornithine Decarboxylase
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
OPN:	Osteopontin
PCR :	Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne
ROS :	Reactive Oxygen Species, espèces oxygénées activées EOA

Rps29:	<i>Ribosomal protein S29</i>
RT :	Reverse transcriptase, transcription inverse
SAGE :	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SOD :	Superoxide dismutase
TCTP:	<i>Translationally Controlled Tumor Protein</i>
THP:	<i>Tamm-Horsfall Protein</i>
U :	Uranium
UA :	Uranium Appauvri
UMOD:	Uromoduline
UN :	Uranium Naturel

Présentation du sujet

La présence de l'uranium dans l'environnement est une source de contamination pour la population générale. Ce métal peut être trouvé dans l'environnement de manière naturelle (depuis la formation de la terre, période radioactive de $4,5.10^9$ années), dans les roches, les sols ou encore dans l'eau. Mais, la présence de ce toxique dans l'environnement peut être la conséquence d'une pollution résultant des différentes étapes du cycle du combustible de l'uranium (de l'extraction des composés uranifères, au retraitement des déchets nucléaires) ou de l'utilisation militaire de ce métal. C'est un actinide qui peut être considéré comme un métal lourd de part sa forte densité.

Les effets de l'uranium sont bien décrits après intoxication aiguë sur des modèles animaux ou chez l'homme. Il a été établi que les reins sont le siège de l'action chimiotoxique de l'uranium. Cette chimiotoxicité s'exerce à court terme *via* une altération de la fonction rénale allant d'une simple perturbation des processus rénaux de réabsorption, jusqu'à l'insuffisance rénale aiguë. Les tissus osseux sont les compartiments de stockage à long terme et les cibles potentielles des effets radiotoxiques du fait du caractère radioactif de certains isotopes de l'uranium.

Concernant les conséquences d'une exposition chronique à l'uranium, bien que certaines données suggèrent des altérations de la fonction rénale, aucune réelle évidence n'a pu à ce jour être établie.

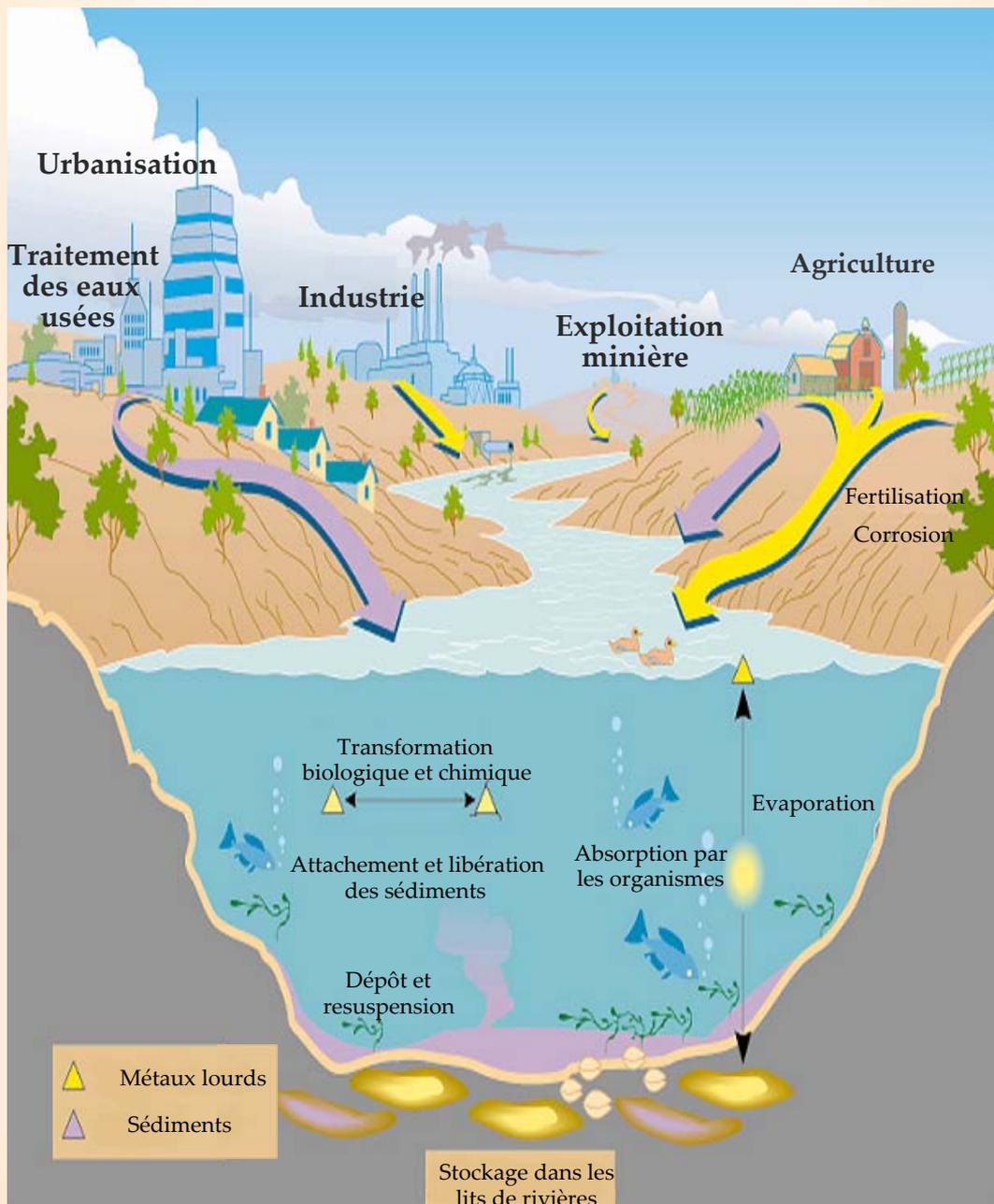
Du fait de ce manque de données et suite aux progrès réalisés ces dernières années dans le domaine de la toxicogénomique, nous avons choisi d'utiliser une approche d'analyse globale pour répondre à cette question. Nous avons réalisé une cartographie des événements moléculaires consécutifs aux expositions à l'uranium, *via* l'utilisation du *SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)*.

La première partie de ce travail est dédiée à un résumé des données de la littérature sur la toxicité de l'uranium, et à une introduction à la toxicogénomique. Ensuite, l'étude des effets génomiques résultant d'une contamination aiguë, nous a permis (i) de valider l'utilisation de cette approche globale dans le cadre des études toxicologiques, et (ii) de mieux comprendre les conséquences d'une intoxication par cet élément au niveau moléculaire. Les données obtenues après une contamination aiguë à l'uranium ont fait l'objet d'un premier article (*Detection of putative indicators in predicting renal response to acute toxicant insult: TCTP, IGFBP7 and Rps29*). Nous avons également exploré le transcriptome de souris contaminées quotidiennement, durant une période de quatre mois, par ingestion d'eau supplémentée avec de l'uranium. Bien que nous n'ayons observé aucune modification des paramètres biochimiques et histologiques caractérisant la fonction rénale, nous avons mis en évidence des variations de l'expression transcriptionnelle de nombreux gènes. Cette étude a fait l'objet d'un second article (*Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice*). La dernière partie de ce manuscrit examine l'importance de ces nouvelles données de toxicogénomique après exposition à l'uranium.

ETAT DE L'ART



Les métaux et leur toxicité



1. Les métaux et leur toxicité :

De nombreux toxiques, polluants chimiques présents dans l'environnement, induisent une toxicité au niveau des organismes vivants. Parmi ces polluants, nous pouvons trouver des métaux lourds tels que le plomb, le nickel, le cadmium, l'uranium et le mercure, des éléments connus pour générer des altérations diverses au niveau du tissu rénal (1-3). D'autres tissus et systèmes biologiques peuvent également être la cible des effets toxiques de ces métaux, comme le foie, les os, les poumons, le système nerveux central, le système immunitaire et le système reproducteur.

Cette section n'est pas destinée à établir une liste exhaustive des différents métaux présents dans l'environnement, elle relate simplement les données concernant quelques toxiques présents dans l'environnement, et illustre les dangers potentiels encourus par l'homme.

I-1 Les métaux dans l'environnement :

Les conséquences résultant d'une intoxication par les différents métaux présents dans l'environnement ont largement été étudiées.

Il est important de différencier les métaux qui sont essentiels pour l'organisme de ceux qui ne le sont pas. Les métaux essentiels pour l'organisme comme le cuivre, le fer et le sélénium, peuvent devenir toxiques pour les cellules lorsque les concentrations dépassent le niveau naturel. Les métaux non essentiels peuvent cependant être absorbés par l'organisme de part leur présence dans l'environnement ; c'est le cas du mercure, du cadmium, du nickel, du plomb ou encore de l'arsenic.

I-1-1. Les métaux essentiels : exemple du cuivre :

Le cuivre, un élément essentiel présent à l'état de trace dans le corps humain, est un constituant indispensable des chaînes enzymatiques. En effet, il a été rapporté que des rats déficients en cuivre, développent des anémies (4). De plus, certaines pathologies caractéristiques sont attribuées à cet élément (Table 1). Ainsi, il a été démontré que la présence anormale de cuivre dans de l'eau de boisson peut entraîner des altérations du foie pouvant aller jusqu'au développement d'une cirrhose chez les jeunes enfants (5). Une des fonctions majeures du cuivre dans les complexes biologiques est son implication dans les réactions d'oxydation et de réduction : il réagit directement avec les formes oxygénées (6) pour produire les radicaux libres. Un autre rôle du cuivre est qu'il fait partie de nombreuses métalloenzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD) (7). La perturbation de la concentration de cet élément peut donc engendrer de fortes perturbations de la balance oxydante, associées à de nombreuses pathologies.

I-1-2. Les métaux non essentiels : cas du mercure, du plomb, du cadmium, de l'arsenic et du nickel :

Le mercure fait partie des déchets industriels "classiques", il est retrouvé dans les colorants, la composition de certaines peintures, les ordures ménagères comme les piles électriques et autres accumulateurs. La principale propriété du mercure, est de fixer les thiols expliquant sa distribution tissulaire et à sa toxicité (8). Le mercure est non seulement un neurotoxique mais peut aussi entraîner des troubles du système cardiaque (9). C'est aussi un néphrotoxique avec des effets principalement dirigés contre les cellules épithéliales des tubules proximaux et plus précisément au niveau des segments S3 de la pars recta (1).

Le plomb, un des métaux lourds ($11,35 \text{ g/cm}^3$) qui présente une période biologique longue dans l'organisme (20-30 ans), est fortement retrouvé dans l'environnement. Du fait de ces propriétés détonantes, le plomb a longtemps été utilisé comme additif dans les carburants. Le plomb, encore présent dans certaines canalisations anciennes ou dans certaines peintures, est aussi utilisé dans des procédés industriels (sidérurgie, traitement des métaux, cimenteries) (10). La toxicité de ce métal engendre le saturnisme qui se manifeste par des troubles rénaux, digestifs, vasculaires et du système nerveux (11-13). Les enfants sont particulièrement vulnérables au plomb (14).

Le cadmium, un métal toxique présent dans des composés très variés, a une génotoxicité bien établie. Une exposition chronique à cet élément résulte en une variété de conditions pathologiques touchant particulièrement la fonction rénale et le métabolisme osseux. Les sources majeures d'exposition par le cadmium pour l'homme sont la fumée de tabac, la pollution industrielle (traitement des ordures ménagères, industrie métallurgique, peintures, plastiques, combustion de combustibles fossiles) et la production de certaines batteries (15,16). Ce métal peut être absorbé par inhalation et/ou par ingestion. De plus, le cadmium présente une période biologique relativement longue dans l'organisme (>10 ans) (17). Il est admis que les principaux organes cibles où s'exerce la toxicité du cadmium sont les reins et le foie (17,18). Cependant, des dommages au niveau du thymus et un taux de prolifération modifié au niveau des thymocytes ont pu être observés (19). Le cadmium est considéré comme un carcinogène entraînant l'apparition de cancers du rein, du poumon, du foie, de l'estomac, du système hématopoïétique et du pancréas (15,16,18,20,21).

L'arsenic est omniprésent dans l'environnement, se trouvant sous forme d'arsenite ou d'arsenate. Il est libéré dans l'environnement lors de la production d'énergie à partir de charbon, de pétrole ou de sources géothermales. Des études épidémiologiques ont montré que l'exposition chronique à l'arsenic peut induire des lésions du foie, des neuropathies périphériques et une augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires, du diabète et du cancer des reins, du poumon, de la peau, de la vessie, du foie et du colon (22-29). Alors qu'une seule exposition à l'arsenic apparaît pour être non-mutagène, ensemble avec des radiations UV à longueur d'ondes courtes, il agit comme un promoteur de tumeur dans le processus carcinogène (30).

Le nickel, un métal connu pour être carcinogène, est fortement répandu dans les industries modernes. Plusieurs procédés industriels peuvent être à l'origine de la présence du nickel dans l'environnement, dont l'exploitation et le raffinage de ce dernier, la production de batteries de longue durée cadmium/nickel, la combustion des composés fossiles et l'incinération des déchets solides contenant du nickel. Ces différentes utilisations peuvent entraîner certains risques de cancer du poumon dans le cas d'inhalation (31,32). De plus, le nickel fait partie des chimiques les plus allergènes (33-35) ; ce problème n'est pas lié à une exposition naturelle au nickel mais à son utilisation dans l'industrie.

Table.1 : Exemples de métaux dans l'environnement et leur toxicité.

Métal	organes cibles	Risques associés
Cuivre	rein , foie	IRA, cirrhose infantile
Mercure	rein , foie, SN, SC poumon	IRA, hépatotoxicité
Plomb	rein , sang, SN, poumon	saturnisme, néphropathie, anémie, encéphalopathie, carcinogène
Cadmium	rein , os, foie, poumon	IRA, IRC, ostéoporose, ostéomalacie, carcinogène
Arsenic	rein , SC, poumon peau, vessie	maladie cardiovasculaire, diabète, carcinogène
Nickel	rein , foie, poumon Peau	anémie, allergie, carcinogène
Uranium (UN ou UA)	rein , foie, SN os, poumon	IRA

SN : système nerveux ; SC : Système cardiaque ; IRA : Insuffisance rénale aiguë ; IRC : Insuffisance rénale chronique ; UN : uranium naturel ; UA : uranium appauvri.

Les points communs de ces différents toxiques avec l'uranium, sont qu'ils sont présents dans l'environnement de façon naturelle ou consécutive à leur utilisation dans l'industrie, et que le rein peut être le siège de la toxicité qu'ils engendrent. De plus, hormis les pathologies qu'ils induisent (Table 1), ils sont capables d'activer différents processus cellulaires tels que l'apoptose, le stress oxydant (pour revues : (36-41), l'activation de mécanismes de détoxification cellulaire comme la synthèse de métallothionéine (pour revue : (42,43).

La connaissance des données relatives sur la toxicité générée par ces différents toxiques, connus pour présenter une toxicité chimique de part leur aspect de métal lourd, devrait permettre de mieux situer et comprendre celle qui est induite par l'uranium.

I-2. Le cas de l'uranium :

I-2-1. Généralités:

L'uranium dans l'environnement.

L'uranium (U) est présent dans l'environnement, en particulier dans les sols, les eaux, chez les végétaux et chez les êtres vivants. C'est un élément radioactif qui doit son nom à la planète Uranus. La toxicité qu'il entraîne peut avoir une origine radiologique ou chimique. L'uranium appauvri, faiblement radioactif, a une toxicité essentiellement d'origine chimique, comme la plupart des métaux lourds (cadmium, mercure, plomb).

Il est rare que l'on découvre des dépôts à haute teneur d'uranium, même si cet élément est plus abondant que l'argent, le cadmium ou le mercure. La concentration de l'uranium dans le sol varie en fonction de la constitution des roches (les concentrations les plus élevées étant rencontrées dans les granites et dans les schistes) ; sa concentration moyenne dans la croûte terrestre est de 2 à 4 mg/kg (44). Dans les eaux, des concentrations d'uranium de 700 µg/L ont été détectées dans des approvisionnements privés d'eau souterraine au Canada (45), de 2020 µg/L (46) en Colombie et atteignant 20 mg/L en Finlande (47). D'après l'étude réalisée à Ontario par le Ministère de l'environnement et de l'énergie de l'Ontario, l'apport quotidien d'uranium provenant de l'eau potable pour un adulte qui consomme 1,5 L/j d'eau est estimé à 0,6 µg. De plus, l'apport quotidien moyen d'uranium dans l'alimentation peut aller de 1,5 à 3 µg (48,49). Dans ses recommandations, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini un seuil maximal admissible de 140µg/L pour l'uranium dans les eaux (50).

L'uranium, ses caractéristiques chimiques et son utilisation.

L'uranium est un métal gris blanc, de numéro atomique 92 appartenant à la famille des actinides. Il est classé parmi les éléments les plus lourds et sa densité est de l'ordre de 19. Il existe 14 isotopes de l'uranium allant de U-227 à U-240, tous radioactifs (Figure 1) (pour revue générale : (51)). L'origine de leur énergie provient d'une part de leurs désintégrations radioactives spontanées et d'autre part du caractère fissile (^{235}U ou ^{233}U) ou fertile (^{238}U) de certains de ces isotopes. L'uranium naturel est principalement constitué de trois isotopes : ^{238}U , ^{235}U et ^{234}U , tous émetteurs alpha. L'activité spécifique de l'uranium naturel est égale à $2,5 \cdot 10^4$ Bq/g. L'uranium appauvri (UA) se différencie de l'uranium naturel (UN) par un taux plus faible en uranium 235, de l'ordre de 0,2% à 0,3%, contre 0,7% pour l'UN (51,52). C'est un sous-produit des usines d'enrichissement de l'UN. L'activité spécifique de UA à 0,2% d'uranium 235 provenant d'UN est de l'ordre de $1,4 \cdot 10^4$ Bq/g et donc moins radioactif que l'UN (0,7% d'U-235) (51). L'UA peut également provenir du retraitement du combustible nucléaire irradié. Cet uranium contient un taux plus élevé d'uranium 235 et d'uranium 236 ainsi que des traces de produits de fission, en particulier de ruthénium et de technétium.

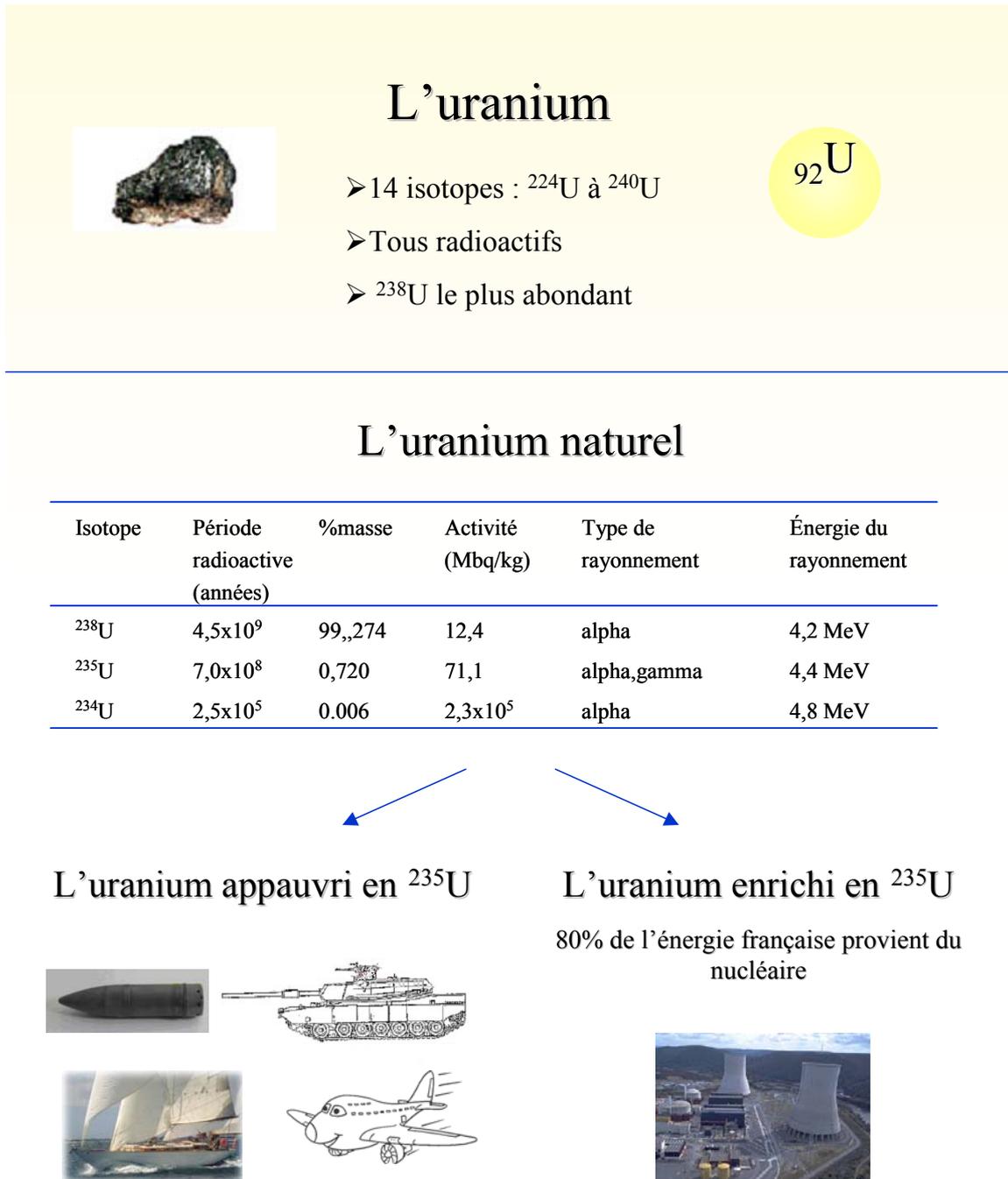


Figure 1 : les caractéristiques générales de l'uranium

L'uranium a des propriétés mécaniques très intéressantes (notamment en terme de résistance), une densité élevée, une forte pyrophoricité (capacité à s'enflammer quand il est sous forme de poudre) et son prix est très compétitif par rapport aux autres métaux du même type (tungstène, osmium). Sur le plan industriel, il entre dans la fabrication d'ailes et de gouvernails d'avions, de quilles de voiliers, de protections contre les effets biologiques des rayons X et dans celle de collimateurs pour les appareils d'irradiation médicale. Sur le plan militaire, il est utilisé pour la fabrication d'obus perforants et celle de plaques de blindage équipant les chars (Figure 1) (51).

I-2-2. La toxicité de l'uranium :

La toxicité de l'U dépend des quantités et des formes physico-chimiques au moment de l'incorporation, ainsi que la durée d'exposition (51,53,54). L'U présente deux types de toxicité radiologique et chimique. La prépondérance de l'une ou de l'autre, dépend des isotopes de l'uranium et de l'organe considéré. Lorsque l'activité spécifique du composé uranifère est faible, comme pour l'UN ou UA, la toxicité chimique est prépondérante. Lorsque l'activité spécifique est plus importante, comme dans le cas de l'U enrichi, le risque radiotoxique sera plus important. Il est généralement admis que le rein, véritable appareil d'épuration de l'organisme est le siège de la chimiotoxicité de l'U et que les os, tissus de rétention à long terme, sont la cible potentielle de la radiotoxicité.

I-2-2-1. Biocinétique de l'uranium :

I-2-2-1-1. Des voies d'entrée vers le compartiment sanguin :

Les biocinétiques de l'U dépendent de sa voie d'entrée dans l'organisme ainsi que de sa solubilité (Figure 2). Si on considère le cas des travailleurs du cycle du combustible, le risque majeur d'exposition à l'U est la voie pulmonaire ou cutanée. En ce qui concerne l'exposition de la population générale, le risque principal est une exposition par voie orale, lié à la prise alimentaire.

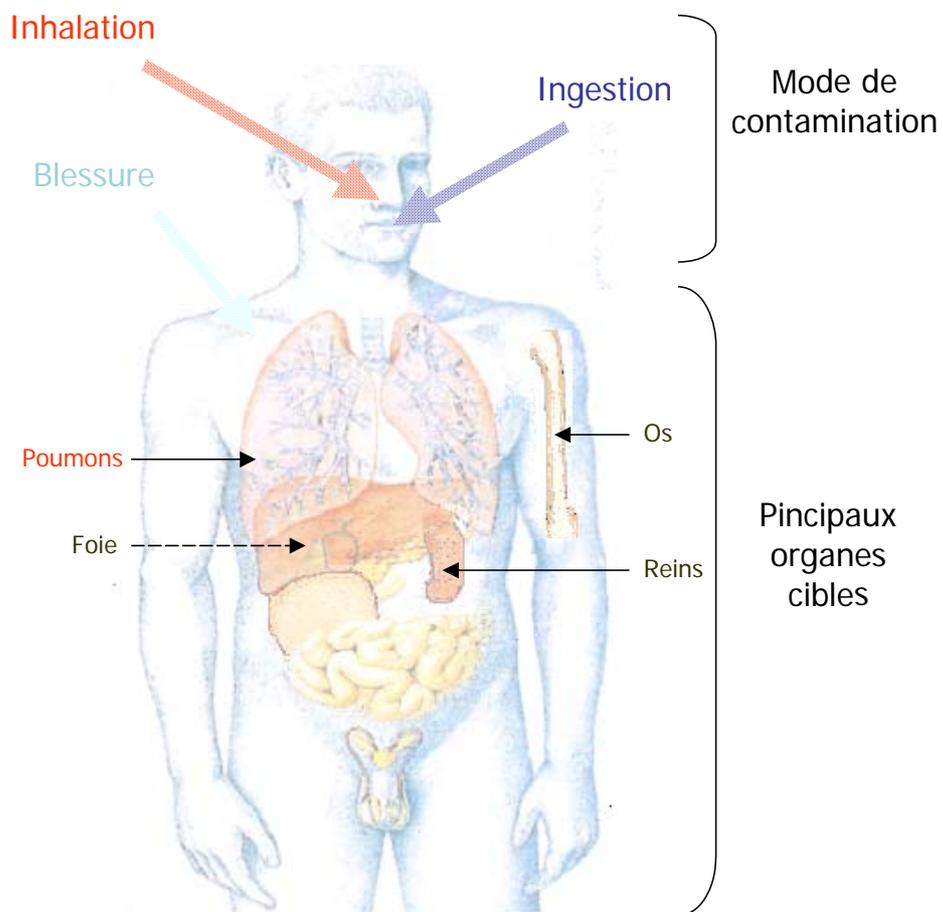


Figure 2 : Les voies d'entrée de l'uranium et ses organes cibles

L'inhalation d'aérosols conduit à un dépôt de particules au niveau des poumons (Figure 2). Selon le diamètre de ces particules, le dépôt est plus au moins profond dans le tractus pulmonaire. L'élimination des particules se fait soit par dissolution vers le compartiment sanguin, selon la taille et la solubilité des particules inhalées, soit par clairance *via* les macrophages alvéolaires (51,53,54). Un composé d'U soluble sera donc plus ou moins rapidement éliminé vers le compartiment sanguin alors qu'un composé insoluble pourra stagner sur son site de dépôt et, de ce fait, délivrer des doses radioactives pouvant induire un effet radiotoxique. Pour le phénomène de clairance, il est directement lié à la profondeur à laquelle se sont déposées les particules. Par conséquent, le temps d'élimination de particules, présentes au niveau des bronchioles, sera beaucoup plus important que celui nécessaire à l'élimination des particules situés au niveau du compartiment extrathoracique du pharynx, du larynx et de la bouche (de 8 h à 23 jours, et de l'ordre de 10 minutes, respectivement). De nombreuses données ont été émises par la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) et décrivent tous les taux de clairance selon le compartiment où se situent les particules d'U (55).

La contamination par blessure ne pose un réel danger qu'en cas de lésion de la peau. En effet, l'U est un émetteur alpha et les particules émises ne peuvent pas traverser l'épiderme qui constitue la couche supérieure du tissu cutané. De plus, ces particules peuvent parcourir une distance de 30 à 40 μm dans un tissu biologique et l'épaisseur de l'épiderme est de l'ordre de 100 à 400 μm . De ce fait, le dépôt de composés uranifères sur la peau non lésée ne semble pas générer de réel danger. Peu de données sont disponibles sur la biocinétique de diffusion percutanée de l'U. Cependant, une étude récente considère que les réglementations actuelles sous-estiment les risques de diffusion transcutanée de l'U (56).

La contamination par ingestion est la voie d'entrée principale de l'U pour la population générale. Le principal facteur, auquel il faut s'intéresser, est le taux d'absorption gastro-intestinal du composé chimique ingéré. Il est en moyenne de 1 à 3 % de l'apport initial, selon la solubilité du composé et l'espèce considérée (57-59). En effet, Karpas *et al.* (59) ont déterminé, pour l'homme, que le transfert gastro-intestinal d'U ingéré pouvait être de 0,1 à 0,5 % et aller jusqu'à 1,5 %.

Les données de la littérature, qui relatent de ce mode de contamination, seront davantage décrites dans la section "*I-3. L'uranium et le rein*".

I-2-2-1-2. Du compartiment sanguin au stockage dans les organes et/ou à l'élimination des composés uranifères :

Après translocation et passage dans le sang, l'U hydrosoluble est complexé avec des ligands de faibles poids moléculaires tels que les bicarbonates et les citrates, et avec des protéines comme la transferrine (en majorité), l'albumine ou encore les lipoprotéines des globules rouges (60-64). L'U est éliminé rapidement du compartiment sanguin (53,65). En effet, vingt-quatre heures après une injection intraveineuse d'U hexavalent (VI), 99,9 % de l'U ont disparu du sang. Selon Durbin *et al.* (62), 40 à 60 % de l'U sont éliminés dans les urines. La quantité restante se dépose dans les deux principaux tissus cibles qui sont les reins (20 à 30 %) et les os (15 à 30 %), mais aussi dans des concentrations négligeables dans d'autres organes (62).

La filtration de l'U par les reins au niveau du glomérule conduit à un appauvrissement du plasma en ce dernier, puis une fraction de l'U (VI) revient dans la circulation à partir des fluides extracellulaires. La partie liée aux protéines est sans cesse convertie au profit de la forme ultrafiltrable jusqu'à élimination de ce métal de la circulation sanguine. La rétention rénale de l'U varie en fonction inverse de l'excrétion urinaire et l'actinide déposé dans le tissu

rénal s'élimine rapidement (62). Par exemple, après une injection intraveineuse de 0,52 mg U/Kg de nitrate d'uranyle (NU), la quantité d'U présente dans le parenchyme rénal, qui est de 40 % au terme du premier jour, n'est plus que de 7 % au vingtième jour (64).

Stevens *et al.* (63) ont mesuré la distribution, la rétention et l'excrétion de l'U après une injection intraveineuse d'U-233. Vingt-deux pourcent de l'U injecté ont été retrouvés dans les reins, un jour après l'injection avec une forte concentration localisée au niveau des tubules proximaux rénaux. Dans une autre étude, où des animaux ont été exposés oralement à du NU hexahydraté à une concentration de 462 mg/kg/jour, l'accumulation moyenne d'U était de 6 µg pour les deux reins, 46 µg/mg dans le tissu osseux, et 0,5 µg/mg dans le foie entier (66).

I-2-2-2. La distribution tissulaire

En considérant les données de la littérature énoncées précédemment, les os et les reins sont considérés comme les principaux sites de l'accumulation et de l'action toxique de l'U. Cependant, des atteintes au niveau du système reproducteur (67) et du système nerveux (68,69) ont été montrées ces dernières années. De plus, Novikov *et al.* (70) ont mis en évidence qu'une exposition, aiguë ou chronique, à l'U produit des altérations, non seulement au niveau du rein, mais aussi au niveau du système cardiovasculaire, des systèmes hématopoïétiques et immunitaires, de la thyroïde, des glandes surrénales, du foie et du métabolisme basal.

I-2-2-2-1. L'uranium et les os :

Les os représentent un site de stockage à long terme de l'U qui a transité dans le sang (51,53). La répartition de cet élément n'est pas uniforme dans tout le squelette. Des études d'autoradiographie sur des rats Sprague-Dawley ont montré que, dans les os, l'U s'accumule majoritairement dans l'os trabéculaire et au niveau des surfaces osseuses (66). Sa fixation à la surface de l'os se ferait par échange d'ions uranyle UO_2^{2+} avec les ions Ca^{2+} présents dans les cristaux d'hydroxyapatite (71,72). Cependant, il n'est pas encore clair si l'U est réellement incorporé au sein même du cristal d'hydroxyapatite ou s'il se dépose sous la forme de microcristaux insolubles de phosphate d'uranyle. L'U présent dans les os est surtout concentré à proximité des zones vascularisées et dans les zones de croissance (66).

L'élimination de l'U, stocké dans les os, a été étudiée chez les mammifères ; cette élimination semble s'effectuer en deux temps : approximativement la moitié de l'U est éliminée après une période biologique d'environ 50 jours et l'autre moitié avec une période de plus de 300 jours (73). Une fraction résiduelle de l'U reste piégée dans l'os pendant plusieurs années (57,74).

I-2-2-2-2. L'uranium et les poumons :

Comme nous l'avons vu précédemment, le poumon est le principal site de rétention de l'U en cas d'inhalation. Les poumons et les ganglions lymphatiques bronchiques sont les organes de stockage des composés d'U peu transférables (51,54). Ce sont principalement les travailleurs du cycle du combustible qui peuvent être inquiétés par le risque d'inhalation. Dans les mines uranifères, il a été observé une augmentation du risque de maladies pulmonaires pouvant aboutir à des cancers (75,76). Cependant ces effets ont plus été attribués aux descendants de l'U comme le radon qu'à un effet direct.

I-2-2-2-3. L'uranium et le foie :

Très peu de données sont disponibles sur la toxicité de ce métal au niveau du tissu hépatique. Cependant, après inhalation de ce dernier, il a été observé une modification de l'activité enzymatique au niveau hépatique de certains Cytochromes P-450 (Cyp) (77). Une étude histologique a permis de mettre en évidence des lésions telles que des changements morphologiques du cytoplasme et du noyau, à différentes concentrations d'U (78). De plus, les travaux de Moon *et al.* (79) montrent des modifications de l'expression de certains gènes codant principalement pour les Cyp impliqués dans le métabolisme des stéroïdes et la détoxification de l'organisme.

I-2-2-2-4. L'uranium et les reins :

Quelle que soit l'espèce animale étudiée, les reins constituent le deuxième site majeur de rétention de l'U présent dans le milieu systémique. L'U, filtré au niveau des glomérules, est déposé à la surface des cellules tubulaires rénales, au niveau cortical et au niveau de la région juxtamédullaire (Figure 3) (66,80). Il est continuellement excrété vers la lumière tubulaire et in fine vers l'urine (62).

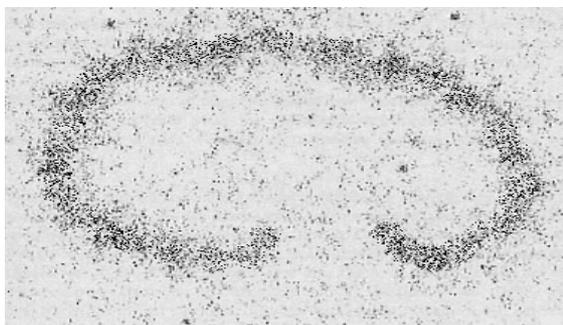


Figure 3 : Autoradiographie d'une coupe longitudinale de rein de rat contaminé à l'uranium-233. L'analyse des données montre que 80 à 90 % de l'uranium sont déposés dans la zone corticale du rein (80).

Les reins sont particulièrement sensibles aux effets chimiotoxiques de l'U. Les lésions rénales dues à l'incorporation de ce dernier sont essentiellement des nécroses (81). Ces altérations peuvent être accompagnées d'anomalies fonctionnelles telles qu'une glycosurie, une protéinurie, une diminution de la filtration glomérulaire et une augmentation de la créatinémie et de l'urémie. La sévérité et la réversibilité des lésions dépendent de la concentration en U dans les reins. Chez le rat, des lésions histologiques sont décelables dès 0,7 à 1,4 μg d'U par gramme de rein ; elles sont plus sévères au-delà de 3 μg d'U par gramme de rein. Ces concentrations correspondent à des quantités injectées, cumulées pendant un mois, de 0,66 à 1,32 mg d'U par kg de poids corporel (CIPR).

Une description plus détaillée, des données de la littérature sur la toxicité de l'U au niveau rénal, est présentée dans la section "*I-3. L'uranium et le rein*".

I-2-2-3. Toxique chimique ou radiologique :

I-2-2-3-1. La toxicité radiologique de l'uranium :

Bien que les agents qui émettent des radiations ionisantes soient considérés comme mutagènes et tératogènes, le cas de l'UN et UA reste très controversé (voir section suivante, (82-87). Comme il a été décrit précédemment, les trois principaux isotopes qui constituent l'UN et l'UA sont tous des émetteurs alpha. Les particules alpha, émises par ces isotopes, présentent une forte énergie (4 à 5 MeV), et comme toute particule alpha, parcourent une faible distance (quelques millimètres dans l'air, 40 µm dans l'eau et les tissus biologiques). Cependant, Chen *et al.* (88) ont conclu que U-238 ne présentait pas de réel risque radiologique, car la quantité d'U nécessaire pour induire des effets radiologiques entraînerait en premier lieu des dommages rénaux qui seraient létaux.

Une autre étude, devant déterminer si l'UN peut être considéré comme un toxique chimique et/ou radiologique, a été réalisée. Neuf jours après des injections intraveineuses uniques de la même dose d'U-233 ou d'UN, une forte augmentation d'urée dans le sang a été observée (63). Deux phases d'azotémie ont été notées ; la première a été attribuée à une toxicité chimique, et la deuxième à une toxicité radiologique puisqu'elle n'a été observée que chez les animaux ayant reçu l'injection d'U-233. Les auteurs ont suggéré que le squelette est la principale cible avec l'apparition d'ostéosarcomes, probablement responsables de la mort des individus (63). De plus, Filiposa *et al.* (89) ont étudié les effets carcinogènes après injection d'U enrichi en U-235, avec l'apparition d'une variété de cancers comme les ostéosarcomes, les carcinomes du poumon et des reins, et des leucémies. Les conséquences radiotoxiques d'une exposition à l'U semblent être évidentes pour certains isotopes de cet actinide (U-235, U-233, U-232), mais ne sont pas admises et restent controversées pour l'UN et/ou l'UA.

I-2-2-3-2. La toxicité chimique de l'uranium :

La néphrotoxicité de l'U est considérée comme l'effet toxique majeur. La lésion rénale la plus courante est l'altération des tubes contournés proximaux, principalement au niveau des segments S3 (pars recta) (90-93). L'intensité et la multiplicité des effets est fonction de la quantité d'U incorporé.

Cependant, certaines études décrivent des effets neurotoxiques, génotoxiques, tératogènes et une toxicité embryonnaire (68,81,94-98).

Les effets neurologiques ont été observés après l'injection de quelques mg d'U, avec une paralysie des membres inférieurs, une perte de la vue et de la coordination des mouvements (81). De plus, une étude visant à observer les effets d'un fragment d'uranium implanté en sous-cutané au niveau du cerveau, a mis en évidence des modifications physiologiques de l'hippocampe montrant l'apparition d'une défaillance au niveau de la fréquence et de l'amplitude des signaux enregistrés (99). Une autre étude montre que 7 ans après une exposition à l'U, des vétérans de la guerre du golfe continuent à excréter de l'U dans leur urine. Bien que ces individus ne présentent pas d'altération rénale, ils montrent une déficience du comportement cognitif (69). Récemment, Abou-Donia *et al.* (98) ont mis en évidence, qu'une injection répétée d'U peut induire des déficiences neuro-comportementales.

L'U a aussi été rapporté pour avoir une certaine toxicité sur le développement et la reproduction (67), résultant d'une diminution du taux de gestation. Dans une autre étude, Domingo *et al.* (100) ont évalué la toxicité de l'U (gavage journalier de 5 à 50 mg acétate d'uranyle (AU) par kg de poids corporel par jour) sur le développement de l'animal. Ils ont noté une réduction de la prise de poids maternelle, ainsi qu'une diminution de la prise alimentaire et une augmentation du poids du foie. Chez le fœtus, ils ont également observé des malformations. Une seconde étude a permis d'évaluer les effets de l'U (gavage journalier

de 0,05 à 50 mg AU/kg de poids corporel par jour) sur le développement, à un stade plus tardif (parturition, lactation, viabilité post-natale), en montrant une légère diminution de la lactation et de la viabilité (101). Enfin, une étude menée par Paternain *et al.* (102) a étudié les conséquences d'une contamination par ce métal (de 5 à 25 mg AU/kg de poids corporel par jour par voie orale) sur la reproduction, la gestation et la survie post-natale chez l'animal. Aucune modification sur l'accouplement ou la fertilité n'a été remarquée. En revanche, une augmentation de la létalité des embryons et de la néomortalité ainsi qu'une perturbation de la croissance et du développement des souriceaux ont été notés pour des fortes concentrations d'U (102). Dans le même sens, des altérations interstitielles et une vacuolisation des cellules de Leydig ont été observées. De plus, une diminution du nombre de naissance a été enregistrée après exposition à l'U *via* l'eau de boisson pendant 64 jours avant l'accouplement (103). Ces différentes données suggèrent que l'UA pourrait induire des effets tératogènes.

Les études de génotoxicité associées à l'U ont été effectuées par différentes équipes. Des effets génotoxiques ont été observés dans des cellules germinales de souris males exposées à de l'U enrichi (18,9 % en U-235) (104). Cependant, de cette dernière étude, il n'est pas possible de distinguer les dommages chromosomiques induits par les effets chimiques de ceux radiologiques. Trois études ont tenté de discriminer la chimiotoxicité de la radiotoxicité de l'U. L'UN induit des micronoyaux, des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatine entre les chromatides sœurs dans les cellules CHO (96). Les auteurs ont attribué les dommages cytogénétiques directement à l'action chimique du métal, plutôt qu'à l'émission des particules alpha. En effet, aux concentrations utilisées, la radioactivité n'est pas détectable par Geiger ou par comptage en scintillation. Une autre étude s'est intéressée à la génotoxicité de l'U en mesurant directement la transformation des cellules TE85 d'ostéosarcome humain induite par un complexe d'AU. L'exposition au chlorure d'uranyle a produit une augmentation de la transformation cellulaire et des échanges de chromatides

sœurs, par comparaison avec les cellules non traitées (105) ; ces effets sont comparables à ceux obtenus à partir d'autres métaux tels que le nickel (106). Par évaluation microdosimétrique et simulation par ordinateur, les auteurs ont pu calculer que seulement 0,0014 % des noyaux cellulaires sont frappés par des particules alpha, éliminant donc les effets des radiations sur les dommages cellulaires observés. Plus récemment, une étude a exploré les effets de l'AU sur la formation de chromosomes dicentriques et la transformation néoplasique dans les cellules d'ostéoblastes humaines (107). Utilisant des concentrations équivalentes de NU avec 3 différents niveaux de radioactivité, Miller *et al.* (107) ont démontré que les transformations néoplasiques étaient proportionnelles au taux de radioactivité. Cependant, ils suggèrent que la génotoxicité chimique du cation uranyle ne peut être éliminée. Dans le même sens, Miller *et al.* (107) ont montré que la transformation des cellules HOS (*Human Osteosarcoma*) est associée à une sur-expression de l'oncogène ras codant pour la protéine p21 (108), et plus récemment que l'UA induit une instabilité génomique sur ces mêmes cellules (85). Yazzie *et al.* (109) ont montré que le cation uranyle induit des cassures des brins d'ADN en présence d'ascorbate, et suggèrent que les aberrations chromosomiques observées dans les précédents rapports pourraient être au moins en partie dues à des origines non radiologiques. Ces différentes études suggèrent que l'UA serait génotoxique et mutagène *in vitro*, et que ces effets seraient principalement d'origine non radiologique.

I-3. L'uranium et le rein :

La toxicité rénale de l'U a été largement étudiée chez l'animal et même parfois chez l'homme. Cette néphrotoxicité se manifeste par des atteintes structurales et physiologiques, et peut aboutir à une insuffisance rénale aiguë voire chronique. Nous allons donc voir dans un premier temps et de manière succincte, l'anatomie générale et fonctionnelle du rein et dans un second temps l'état des connaissances actuelles sur l'exposition de ce métal au niveau rénal.

I-3-1. Généralités : le rein.

I-3-1-1. : Fonctions et structures du rein :

Principales fonctions du rein :

Le rein joue un rôle central dans le maintien du volume et de la composition ionique des fluides de l'organisme. Cette homéostasie est assurée par la filtration glomérulaire et les modifications tubulaires (réabsorption et sécrétion). Les modifications importantes du débit urinaire et celles de la composition des urines traduisent les capacités du rein à s'adapter à une situation physiologique ou pathologique donnée (110).

Le rein est la principale voie d'excrétion des déchets métaboliques (potentiellement toxiques comme l'urée, l'acide urique, la créatinine et l'acide oxalique) et des produits chimiques exogènes (toxines, médicaments). Il participe également au catabolisme des protéines de faible poids moléculaire et à l'interconversion métabolique (néoglucogenèse, métabolisme lipidique) qui régule la composition des fluides biologiques. Enfin, le rein participe aux fonctions endocrines de l'organisme. Il est le site de production de nombreuses hormones et différents autacoïdes. Il est aussi la cible et l'effecteur endocrine d'hormones fabriquées dans l'organisme ou dans le rein lui-même.

Anatomie fonctionnelle du rein :

Chez un homme adulte d'environ 70 kg, chaque rein pèse environ 150 g. Le rein comporte 2 régions bien distinctes : le cortex où se trouve tous les glomérules, et la médullaire dont l'extrémité interne (papille) se projette dans la cavité excrétrice (petit calice). L'urine sort du tube collecteur et s'écoule dans le calice, le bassinet puis l'uretère. Les 2 uretères débouchent dans la vessie (Figure 4).

Le rein est un organe particulièrement vascularisé qui reçoit environ $\frac{1}{4}$ du débit cardiaque. L'artère rénale principale se divise pour traverser le cortex jusqu'à sa périphérie en donnant naissance aux artéριοles afférentes et se terminant par un fin réseau capillaire, le glomérule. Cette structure est drainée par les artéριοles efférentes qui se ramifient pour soit entourer tous les segments tubulaires du cortex, soit atteindre la médullaire ; l'ensemble finissant par rejoindre la veine rénale.

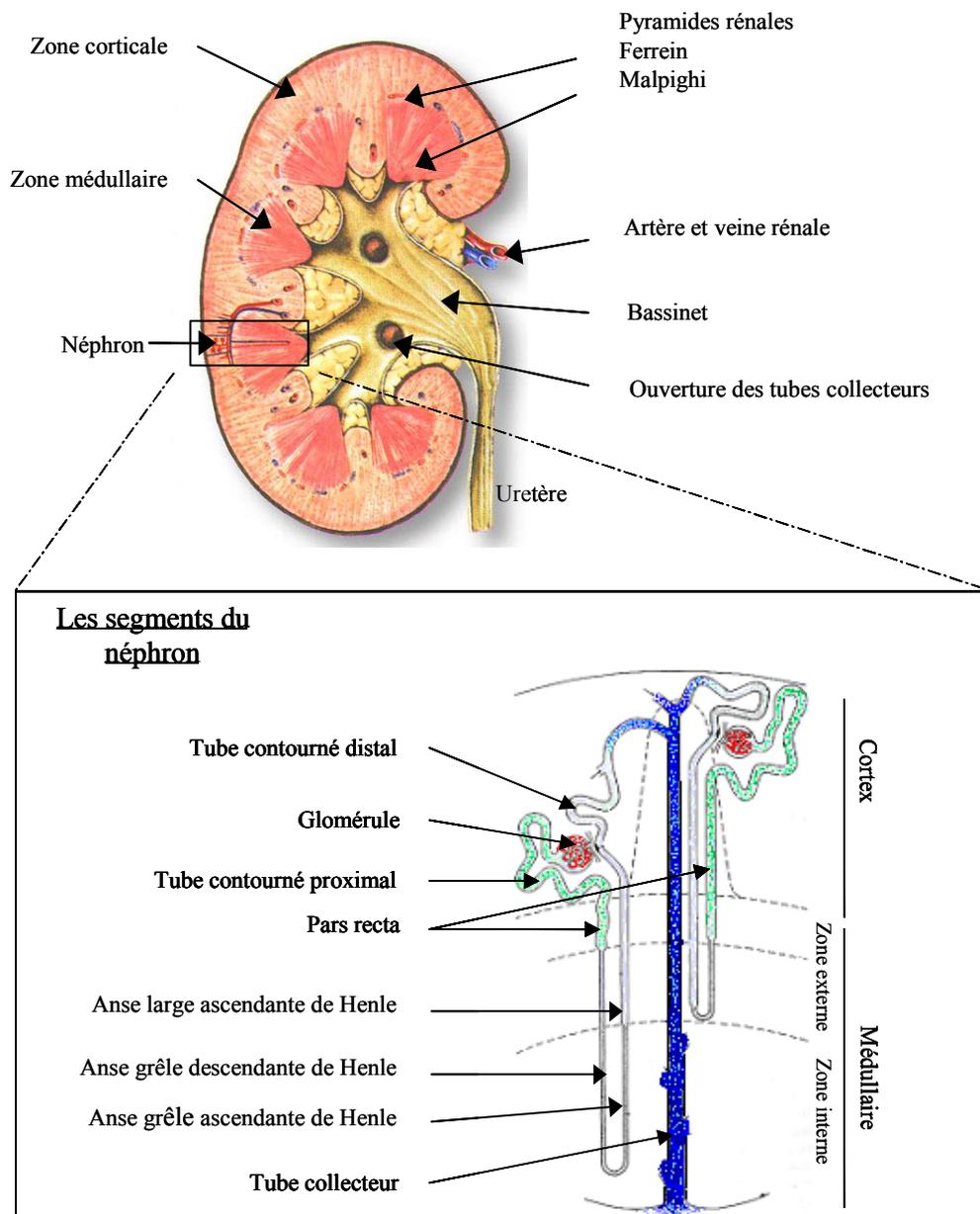


Figure 4 : Anatomie du rein et du néphron

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein (Figure 4). Chaque rein comprend environ un million de néphrons. Chaque néphron est composé d'un glomérule et de sa capsule, et d'un tubule attaché. Ce dernier est formé d'un tube proximal constitué de 3 segments finissant par la pars recta, d'une anse de Henle, d'un tube distal et d'un tube collecteur. L'ultrafiltrat d'origine glomérulaire est modifié tout au long de son parcours tubulaire.

I-3-1-2. Le rein et l'insuffisance rénale :

Le rein est un organe particulièrement sensible aux toxiques. L'insuffisance rénale est un syndrome qui exprime les conséquences sur l'organisme de la suppression plus ou moins totale du fonctionnement rénal. Cliniquement, une agression brutale (quelques heures) peut entraîner une insuffisance rénale aiguë (IRA), qui peut être réversible. L'agression progressive (mois, années), va plutôt induire une insuffisance rénale chronique (IRC). L'IRA rend compte de la diminution de débit urinaire et de l'altération des fonctions d'excrétion et de régulation métabolique. Il s'ensuit l'augmentation dans le sang des principaux marqueurs fonctionnels : urée, créatinine, acide urique. La régulation de l'élimination des électrolytes est perturbée, ce qui constitue une acidose métabolique. Lorsque le parenchyme rénal ne souffre pas trop de cette ischémie, qui peut être rapidement corrigée, le fonctionnement du néphron reste conservé. Lorsque l'ischémie rénale est trop profonde et prolongée, le parenchyme rénal va être altéré par l'hypoxie. Plus celle-ci sera intense, plus les cellules tubulaires seront détruites (nécrose ischémique), constituant l'atteinte organique du parenchyme rénal où les néphrons perdent leur capacité fonctionnelle. L'IRA peut être "fonctionnelle", dans le cas de déshydratation ou du collapsus cardio-vasculaire ; la pression de perfusion des reins diminue et le rein fonctionne moins bien. L'IRA n'est donc pas le résultat d'une lésion anatomique au niveau des reins. L'IRA "organique" correspond à des lésions rénales qui peuvent toucher les glomérules, les tubules ou bloquer complètement l'excrétion urinaire, ce qui est le cas après administration d'un toxique comme l'U.

I-3-2. Toxicité rénale de l'uranium :

I-3-2-1. Les données connues sur la toxicité après exposition aiguë à l'uranium.

Il est généralement admis que des concentrations en U de l'ordre de 0,5 mg/kg de poids corporel, et même aussi faibles que 0,01 mg/kg (111), sont suffisantes pour induire un effet toxique au niveau du rein chez de nombreuses espèces animales. Les effets toxiques de l'U s'exercent sur les cellules tubulaires proximales à des concentrations de l'ordre de 0,2 à 3 µg/g de tissu et peuvent aboutir à une insuffisance rénale aiguë en cas d'incorporation massive. La CIPR a adopté une valeur de concentration maximale en U de 3µg/g de rein (91). Il semblerait que cette concentration soit le seuil tissulaire au delà duquel des atteintes toxiques apparaissent (112).

I-3-2-1-1. Physiopathologie associée à la néphrotoxicité de l'uranium :

Les conséquences d'une atteinte rénale sont donc dépendantes de la dose et peuvent amener à une nécrose rénale sévère au niveau des portions droites et contournées du tubule proximal et plus précisément au niveau des segments S2 et S3 de la *pars recta* (91,93,113,114). Les dommages peuvent ensuite se propager de part et d'autres de ces segments (93,113-115). L'action toxique de l'U est aussi liée à l'accumulation de ce dernier dans l'épithélium des tubules rénaux induisant une diminution de l'efficacité de la réabsorption des néphrons. Au niveau cellulaire, une atteinte sévère s'accompagne, entre autres, d'une perte de la bordure en brosse, d'un gonflement cellulaire et d'une hypertrophie vacuolaire, allant jusqu'à la mort des cellules épithéliales. A ce jour, même s'il est admis que cette mort cellulaire est associée à la nécrose du tissu épithélial tubulaire, la participation du processus apoptotique (mort cellulaire programmée) ne peut être ignorée (116,117).

Parallèlement aux dommages tubulaires, des changements glomérulaires se produisent principalement au niveau de la membrane basale des capillaires qui constituent le glomérule. Ceci se traduit par des dommages des cellules endothéliales du glomérule avec une réduction de la densité et du diamètre des fenêtrures endothéliales, un aplatissement des podocytes, ainsi que des défauts de filtration et de perfusion entraînant une diminution du taux de filtration glomérulaire (TFG) (118-123). A tout cela, se rajoute une perturbation des systèmes rénine-angiotensine avec une augmentation de l'angiotensine II, de la rénine rénale et de la rénine plasmatique (118,124-126). L'activation de ce système conduisant à une vasoconstriction glomérulaire, est certainement due à la diminution du TFG (120). Récemment, l'action directe de l'uranium sur les cellules glomérulaires a été mise en évidence dans notre laboratoire, sur des glomérules isolés de rein de rat. Cette étude a montré que l'U peut aussi avoir un effet vasoconstricteur sur des glomérules isolés, de manière similaire à l'angiotensine II (127).

D'un point de vue physiologique, des lésions au niveau du filtre glomérulaire et des épithéliums tubulaires entraînent une augmentation des concentrations de la créatinine et de l'urée plasmatique. La fonction rénale ainsi atteinte peut être le reflet d'une insuffisance rénale aiguë. L'atteinte de la fonction rénale se traduit aussi par une polyurie, une glucosurie, une protéinurie (albumine, β_2 microglobuline), une augmentation du taux d'excrétion des acides aminés et une enzymurie (phosphatase alcaline, lactate deshydrogénase, aminopeptidase, γ -glutamyl transpeptidase (γ GT)) (92,111,128-131). Les γ GT catalysent la première étape du catabolisme du glutathion. En effet, l'augmentation des γ GT urinaires a été utilisée comme un indicateur sensible des dommages des tubules proximaux rénaux, mais l'interprétation de ses modifications doit être considérée avec prudence étant donné les fortes variations intra- et interindividuelles (132). Enfin, après un dommage sévère, la clairance de l'inuline et de la créatinine diminue (133).

I-3-2-1-2. Sites d'accumulations de l'uranium :

Malgré les résultats énoncés précédemment, les mécanismes mis en œuvre par l'uranium pour induire sa toxicité ne sont pas bien définis. Il n'est même pas établi si l'uranium peut pénétrer dans les cellules rénales. Or, il a été montré qu'il peut s'accumuler dans certains organites cellulaires tels que les lysosomes et les mitochondries. De plus, des études récentes ont mis en évidence que l'uranium peut être internalisé d'une part par endocytose et d'autre part *via* un cotransporteur sodium/phosphate, et plus précisément le NaPi II (134). Les lysosomes des cellules tubulaires rénales semblent être les principales structures intracellulaires qui concentrent l'uranium (53,135). Ce moyen de détoxification de l'organisme semble être un processus ubiquitaire, connu pour de nombreux métaux lourds comme le mercure, le chrome, l'or ou le cuivre (135-138). Après une injection intraveineuse unique de 10 mg de NU/ kg de poids corporel, des précipités de phosphate d'uranyle au sein des lysosomes de cellules tubulaires proximales d'un rein de rat ont été observés au microscope électronique à transmission ainsi que par microanalyse aux rayons X (135). Le nombre de micro-aiguilles de phosphate d'uranyle au sein du lysosome peut augmenter, jusqu'à remplir complètement ce dernier. A ce stade, la membrane du lysosome est généralement détruite, libérant ainsi des enzymes protéolytiques lysosomiales dans la cellule et amenant à la mort cellulaire. L'uranium, ainsi séquestré par ces structures, est éliminé dans la lumière du néphron et excrété *via* le flux urinaire. Bien que les lysosomes représentent le site majeur d'accumulation de l'uranium, il semble qu'il puisse s'accumuler dans d'autres organites comme le noyau et les mitochondries. Les travaux de Ghadially *et al.* (137) ont mis en évidence qu'après injection AU, les polyribosomes cytoplasmiques sont remplacés par des monoribosomes, suggérant une diminution de la production d'ARNm et une accumulation de l'uranium dans le noyau. Différents travaux suggèrent que l'uranium peut s'accumuler au

niveau des mitochondries (135,139), et pourrait induire une vacuolisation de l'espace intramitochondriale (114).

Les conséquences d'une intoxication à l'uranium au niveau des différentes organites cellulaires sont représentées dans la figure 5.



Figure 5 : Conséquences cellulaires d'une intoxication à l'uranium, d'après les données de la littérature (58,92,113,152,256). RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux.

I-3-2-1-3. Mécanismes de toxicité de l'uranium :

La toxicité de l'U peut être attribuée à son action sur les membranes cellulaires. Une des propriétés communes à la plupart des agents toxiques, est leur forte affinité pour les sites anioniques des membranes plasmiques (140,141). Un mécanisme d'action possible proposé par différents auteurs, est que l' UO_2^{2+} peut entrer en compétition avec Mg^{2+} et Ca^{2+} au niveau des sites de fixation de l'ATP pour ces métaux, entraînant donc une perturbation des transports actifs à travers la membrane cellulaire (81,142,143). De plus, Kato *et al.* (144) ont montré que l'injection d'une molécule (DMTU) connue pour piéger les radicaux libres, a fortement réduit la toxicité rénale de l'U. Ces données suggèrent que l'action toxique pourrait être liée, en partie, à une peroxydation lipidique. De plus, Leggett *et al.* (58) suggèrent que la perturbation du métabolisme des phospholipides induite par l'U pourrait être un élément précoce dans la pathogenèse associée à ce toxique. En dehors des membranes cellulaires, les mitochondries peuvent aussi être la cible de l'action toxique de l'U. Cet organe est le siège de la production d'énergie nécessaire au bon fonctionnement cellulaire. De manière intéressante, il a été montré que l'uranyle inhibe l'utilisation d'ATP, qu'elle soit dépendante ou non du transport du Na^+ , ainsi que la phosphorylation oxydative des mitochondries dans les tubes proximaux rénaux (58,145). En effet, l'altération des fonctions mitochondriales est une manifestation commune générée par les métaux lourds (135,146-148). Les perturbations, au niveau membranaire et mitochondrial, notées dans les différents articles présentés précédemment, semblent mettre en évidence un rôle des mécanismes oxydants après intoxication à l'uranium. En effet, le stress oxydant a été suggéré par Pavlovic *et al.* (149), pour jouer un rôle dans la physiopathologie rénale induite par le NU. Ils ont observé une augmentation plasmatique de la concentration de malondialdéhyde, un marqueur du stress oxydatif, dans le sang et dans le cortex rénal (149). De plus, Schramm *et al.* (150) ont montré qu'une injection de NU induit une diminution du niveau d'expression de la superoxyde

dismutase (SOD), une enzyme clé du stress oxydant, et une augmentation de la protéine immunoréactive nitrotyrosine (NT-IR), un indicateur de l'action pathologique du monoxyde d'azote (NO). Les auteurs suggèrent que l'élévation du niveau de NT-IR est probablement due à une diminution de la défense oxydative mise en évidence par la réduction de l'expression de la SOD (150). Ces données semblent indiquer que l'action toxique de l'U peut également passer par une perturbation de la balance oxydative cellulaire. La figure 7 présente un aperçu des mécanismes cellulaires mis en jeu dans le processus oxydant avec la formation de certaines espèces oxygénées activées (EOA) comme l'anion superoxyde (O_2°), le radical hydroxyle (OH°) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ainsi que l'implication d'antioxydants comme la SOD, la catalase et la glutathione peroxydase (GPx) (151). Un déséquilibre entre la balance des pro-oxydants et les systèmes de défense peut aboutir à l'accumulation des EAO dans les mitochondries induisant un stress oxydant, avec l'apparition par exemple, d'une oxydation des lipides membranaires et d'une altération de la perméabilité membranaire.

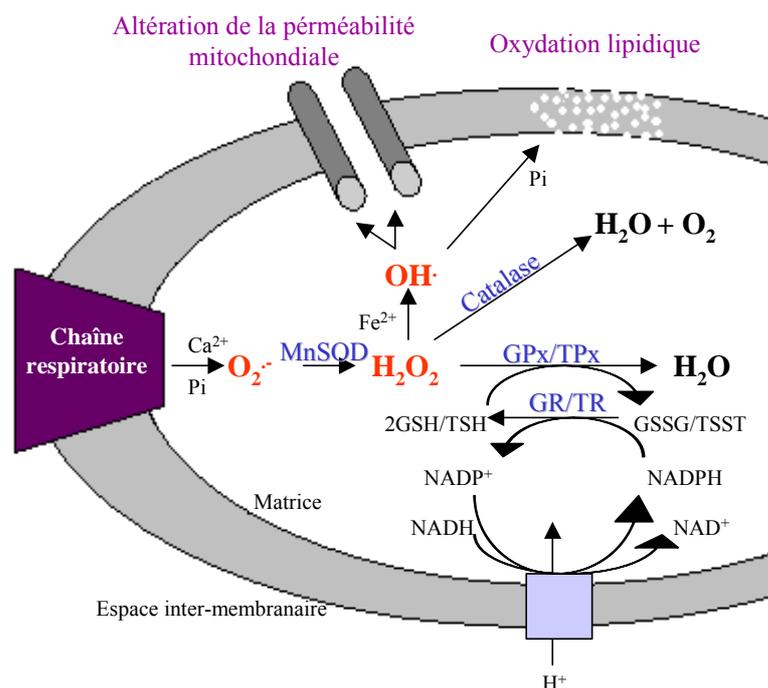


Figure 6 : Accumulation des espèces oxygénées activées au sein des mitochondries. La chaîne respiratoire génère continuellement des petites quantités de radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), qui sont normalement éliminées par la MnSOD, qui a son tour synthétise le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). H_2O_2 est alors réduit en eau par la glutathione peroxydase (GPx), la thioredoxin peroxydase (TPx) et la catalase. En présence de Fe^{2+} , H_2O_2 peut générer les radicaux OH^{\bullet} . Ces derniers peuvent induire des altérations de la perméabilité membranaire et une peroxydation lipidique. GR : Glutathione Réductase, TR : Thioredoxin Réductase (151).

I-3-2-1-4. Mort cellulaire et résistance acquise induite par l'uranium :

Comme nous l'avons décrit précédemment, les lésions rénales dues à l'incorporation de l'uranium sont essentiellement des nécroses (81). Cependant certaines études suggèrent que le processus apoptotique pourrait également jouer un rôle dans la génération des altérations observées (116,117,134). La figure 7 présente les deux modes possibles de mort cellulaire après intoxication par un toxique, en l'occurrence la nécrose et l'apoptose.

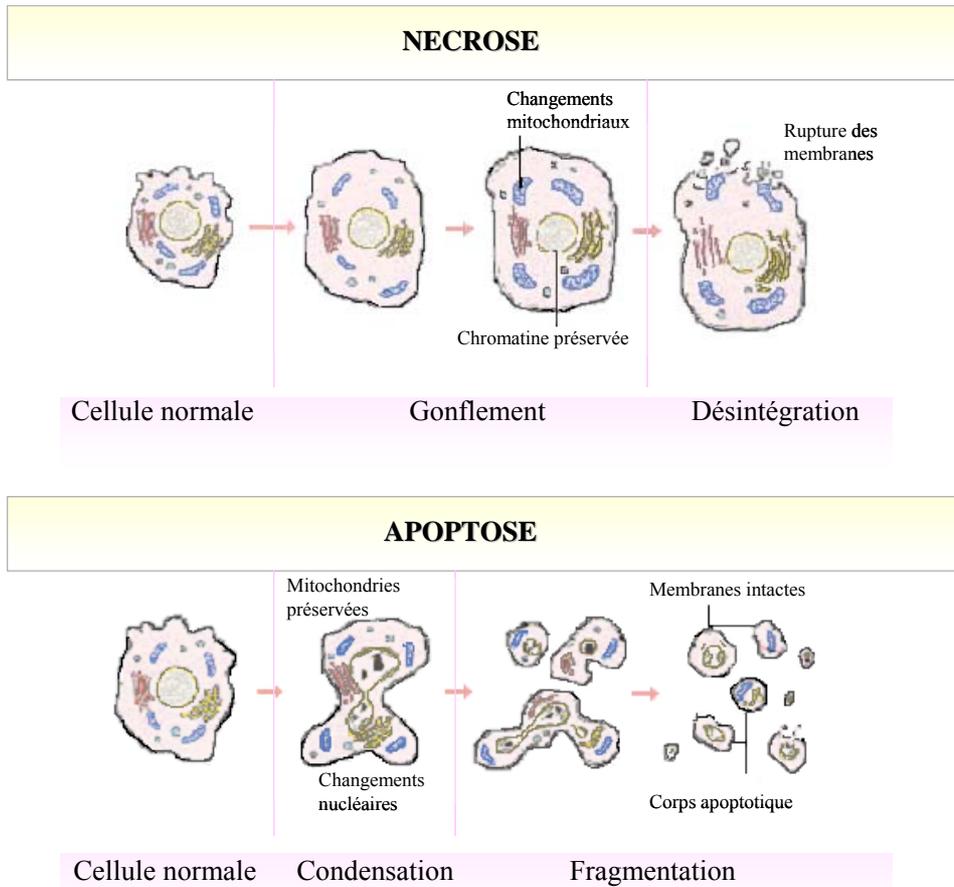


Figure 7 : Représentation schématique des deux modes de mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose. La nécrose, ou "mort cellulaire accidentelle", est un processus qui se caractérise par l'altération de l'homéostasie cellulaire et une lésion, plus ou moins importante, de la membrane plasmique. Ces altérations sont associées à un gonflement des mitochondries et de la cellule. A terme, ce phénomène se traduit par une rupture des membranes de la cellule et conduit au déversement du contenu cytoplasmique dans les fluides extracellulaires, ce qui génère des lésions tissulaires sévères associées à une réponse inflammatoire importante.

L'apoptose, ou "mort cellulaire programmée", est un processus physiologique compliqué grâce auquel les cellules âgées ou lésées sont éliminées. Ce phénomène est associé à une agrégation de la chromatine, une condensation du noyau et du cytoplasme, ainsi qu'à la formation de corps apoptotiques qui contiennent une fraction de l'ADN et des organites cellulaires. L'ensemble de ces modifications peuvent provenir de l'activation des récepteurs de "mort" et/ou de l'altération des fonctions physiologiques des mitochondries.

Si la quantité d'uranium est sub-létale, une régénération des épithéliums endommagés peut commencer deux ou trois jours après l'exposition (93). A des concentrations, qui ne sont pas suffisamment importantes pour détruire une masse critique de cellules rénales, l'effet toxique semble être réversible car certaines cellules sont remplacées. Le nouveau revêtement épithélial diffère toutefois de celui de l'épithélium normal sur le plan morphologique et peut-être sur le plan fonctionnel (57,71). Sur le plan histologique, les cellules régénérées sont de simples cellules aplaties présentant moins de microvillosités et moins de mitochondries (58). Il semble que l'exposition répétée à l'uranium peut créer une tolérance (62). Cette tolérance ne semble pas prévenir les dommages des reins, car les cellules régénérées sont très différentes. Bien que le processus de réparation semble très perfectionné sur le plan histopathologique, les changements biochimiques urinaires ne reviennent que lentement à la normale (58,81). Les altérations provoquant un épaississement de la membrane basale glomérulaire du rein, causé par l'accumulation prolongée de l'uranium, peuvent être relativement graves et entraîner des dommages permanents (121). Plus récemment, il a été signalé que les changements ultrastructuraux persistants dans les tubules proximaux étaient liés à la capacité du rein à stocker l'uranium (152). De plus, Gilman *et al.* (153) ont décrit que les dommages cellulaires dans les tubules proximaux peuvent être aussi sévères chez les animaux qui ont eu une période de récupération de 91 jours que chez ceux qui ont été euthanasiés à la fin de la période d'exposition (après 91 jours de contamination). La tolérance acquise ne semble donc pas être un mode de protection contre l'intoxication à l'uranium. Cependant, l'étude de Sano *et al.* (116) semble suggérer, au contraire, que l'épithélium tubulaire régénéré devient plus résistant à une nouvelle intoxication par l'uranium. Les auteurs, ont d'autre part, suggéré que cette résistance acquise est directement associée à la perte substantielle des microvillosités des membranes de la bordure en brosse. Récemment, les travaux de Furuya *et al.* (154) indiquent que la tolérance acquise à la suite d'une première intoxication des cellules LLCPK1 à

l'uranium, partage le même processus cellulaire que celui qui est impliqué dans la thermo-tolérance, *i.e.* la stimulation de l'expression des protéines HSPs (Heat Shock Protein). Ces protéines dites "protéines de stress", sont fortement exprimées en réponse aux stress thermique et oxydant, mais aussi en réponse à la néphrotoxicité induite par les métaux lourds (155). De plus, Mizuno *et al.* (156) ont suggéré que l'augmentation du taux rénal de Hsp73, observée après une première contamination à l'uranium, est directement liée à la résistance acquise par les cellules proximales lors d'une deuxième intoxication.

I-3-2-2. Les données connues sur la toxicité après une exposition chronique à l'uranium :

A ce jour, peu de données sont disponibles sur une exposition chronique à l'uranium par ingestion. Cependant cette exposition est celle que peut rencontrer la population dite générale par ingestion de ce métal *via* l'apport alimentaire. Les seuls travaux disponibles après ingestion chronique d'uranium sont listés dans la table 3.

Table 3 : Etudes menées sur l'intoxication chronique d'uranium *via* l'eau de boisson.

Approches	Temps	Concentrations	Etudes
<i>Modèle animal</i>			
Reproduction	64 j	10-80 mg AU/kg/j	Llobet (1991)
Reproduction	14 à 60 j	5-25 mg AU/kg/j	Paternain (1989)
Biochimie et histologie	28 j	2-16 mg AU/kg/j	Ortega (1989)
Biochimie et histologie	28 et 91 j	0,96-600 mg NU/L	Gilman (1998a)
Biochimie et histologie	91 j	0,96-600 mg NU/L	Gilman (1998b)
Biochimie et histologie	91 j	24-600 mg NU/L	Gilman (1998c)
Biochimie et histologie	45 et 91 j	24-600 mg NU/L	MacDonald (1997)
Biocinétique	28 et 91 j	nd	Tracy (1992)
Biochimie et histologie	30 j à 2 ans	nd	Maynard (1949)
<i>Modèle humain</i>			
Biochimie	nd	28µg U/L (moyenne)	Kurttio (2002)
Biochimie	1-59 ans	2-781 µg U/L	Zamora (1998)
Biochimie	nd	nd	Camargo (1998)
Biochimie	nd	19,6 µg U/L	Mao (1995)

ND : durée de l'exposition non déterminée. NU : nitrate d'uranyle. AU : acétate d'uranyle

I-3-2-2-1. Expérimentation animale :

Gilman *et al.* (78) ont étudié les effets toxiques de l'uranium administré *via* l'eau de boisson. Des groupes de mâles et de femelles ont été exposés pendant 91 jours à du NU dans l'eau de boisson à des concentrations allant de 0,96 à 600 mg NU/L. Aucun effet sur les paramètres hématologiques et biochimiques n'a été observé. Cependant des lésions histopathologiques ont été notées sur les reins et le foie de tous les animaux (pour les différentes concentrations et pour les deux sexes). Des lésions tubulaires (déplacement des

noyaux de la position apicale et vésiculation, vacuolisation cytoplasmique, et dilatation), glomérulaires (sclérose vasculaire), et du tissu interstitiel ont été observées pour les groupes exposés aux concentrations les plus faibles. Cependant, ces observations n'étaient pas dépendantes de la concentration d'uranium administrée. Les auteurs ont identifié de faibles effets pour des concentrations de 0,96 mg NU/L d'eau de boisson, correspondant à des doses moyennes de 0,06 et 0,09 mg U/kg/jour pour les mâles et les femelles, respectivement. Une autre étude a été menée par Gilman *et al.* (157) pour caractériser les effets d'une incorporation des mêmes concentrations d'U (0,96 à 600 mg/L dans l'eau de boisson) pendant 91 jours. Comme pour l'étude précédente, aucun changement n'est trouvé associé à l'administration d'uranium au niveau hématologique ou biochimique. Cependant des effets dose dépendante ont été observés, au niveau des reins avec des changements dans les tubules rénaux caractéristiques de la toxicité de l'uranium. Une troisième étude a porté sur la réversibilité des lésions rénales, induite par une exposition à l'uranium dans l'eau de boisson durant 91 jours (153). La gamme des concentrations d'uranium était identique aux deux autres études et les périodes d'observation de la guérison se sont étalées jusqu'à 91 jours après l'exposition. Pour les fortes concentrations, des lésions similaires ont été observées même après la période de rétablissement de 91 jours.

I-3-2-2-2. Approche épidémiologique :

Chez l'homme, en dehors des études menées sur les travailleurs de l'industrie nucléaire, ayant été exposés lors d'un accident, seules cinq études ont été réalisées sur les conséquences d'une intoxication par l'uranium par voie orale (Table 3). Une des premières études menée a été celle de Mao *et al.* (158) qui a noté une corrélation entre la présence d'uranium et une augmentation de l'albumine dans les urines. Les auteurs suggèrent que la micro-albuminurie est un indicateur sensible d'une pathologie rénale précoce. Zamora *et al.*

(159) ont étudié les effets d'une exposition à l'uranium sur 50 sujets dans deux communautés Canadiennes. Les sources d'eau, utilisées pour cette étude, ont été soit fournies par des puits privés où la concentration en uranium était supérieure aux recommandations préconisées (100 µg U/L, (159)), soit fournies par une autre communauté où l'eau contenait une concentration en U <1 µg/L (population peu exposée). Les auteurs rapportent une glycosurie significative et une augmentation de la phosphatase alcaline et de la β2-microglobuline, par rapport aux populations peu exposées et corrélient ces augmentations avec l'absorption d'uranium (159). Les auteurs suggèrent que les tubules proximaux sont principalement touchés et que les effets représentent une toxicité sub-clinique qui n'aboutiront pas forcément à des dysfonctionnements rénaux ou à des maladies. Cependant, ces effets peuvent être liés à un processus conduisant à des perturbations rénales progressives et irréversibles (159). Récemment, une autre étude a permis d'examiner la fonction rénale chez plus de 300 personnes exposées à l'uranium *via* l'ingestion d'eau contaminée (160). Les données ont mis en évidence des signes d'une altération tubulaire, sans aucune indication d'une modification sur la fonction glomérulaire (160). Cependant, les auteurs n'ont pas établi de conséquences cliniques significatives, vraisemblablement à cause des variations inter-individuelles notées et des faibles dysfonctionnements tubulaires observés.

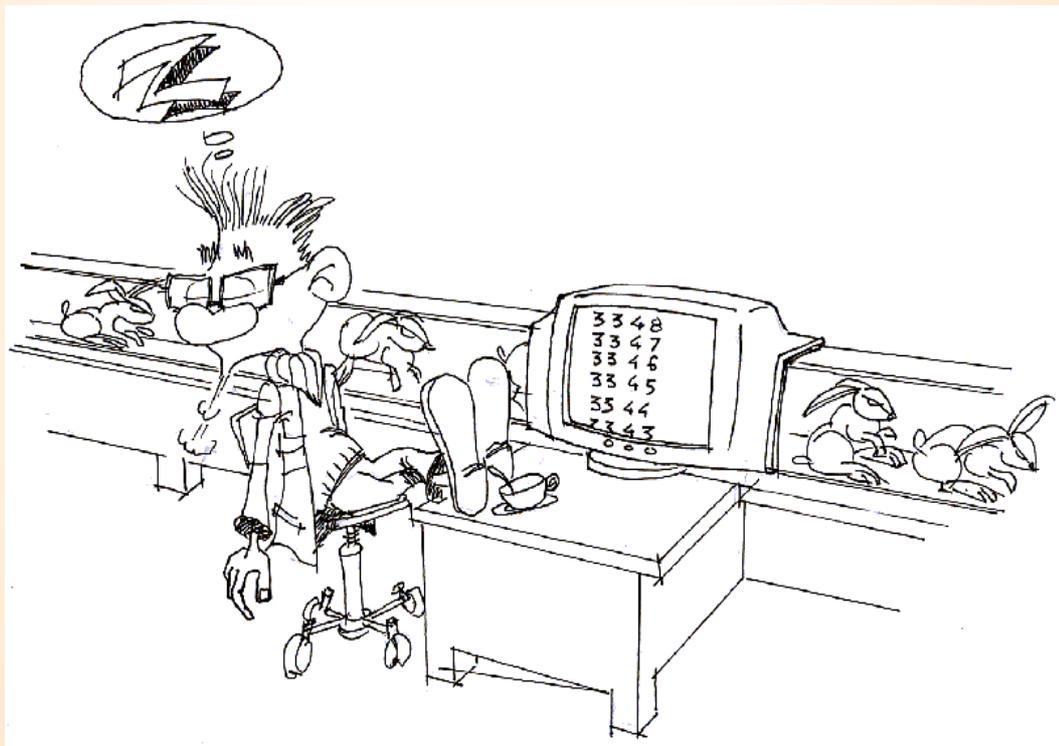
L'ensemble de ces études suggèrent que les rongeurs restent le modèle de choix pour des études de toxicologie. En l'occurrence, le modèle murin est le plus utilisé pour les études sur la reproduction (67,102). La souris est également le modèle animal sur lequel les données de génétique sont les plus avancées, étant donné l'état des connaissances sur le génome murin (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/UGOrg.cgi?TAXID=10090>).

Avant...



Les approches récentes dans le domaine de la toxicologie

Après...



II. Approches récentes dans le domaine de la toxicologie : notion de toxicogénomique

II-1. La toxicogénomique :

Classiquement, les toxicologistes évaluent les risques potentiels résultants de l'exposition à un produit chimique par l'observation de paramètres généraux tels que le changement du poids de l'individu ou des organes et les modifications fonctionnelles et tissulaires de certains organes (exemple de la fonction rénale). Ces approches donnent des indications sur les conséquences d'une intoxication mais ne renseignent pas sur les mécanismes d'action du toxique ou sur les conséquences cellulaires et moléculaires que peut induire le toxique. Depuis plusieurs décennies, les effets des produits chimiques sur l'expression génétique sont étudiés. Des techniques comme le "*northern blot*" ont permis de déterminer les effets des polluants, d'un médicament ou d'une hormone sur quelques gènes. A ce jour des techniques plus sensibles s'intéressant à l'expression de la totalité des gènes, qui constituent le génome, sont disponibles. Si le génome est identique dans chacune des cellules d'un organisme donné, en revanche, les gènes, eux, peuvent avoir une expression génique spécifique différenciée dans le temps (propre à un stade du développement), dans l'espace (propre à un type cellulaire, tissulaire ou d'un organe) et/ou caractéristique d'un état donné (normal, pathologique ou en réponse à un stimulus particulier). L'étude de l'expression génique consiste à caractériser et quantifier les produits d'expression de l'ADN (correspondant aux ARN messagers (ARNm) et qui constituent le transcriptome), de manière à identifier dans un tissu, dans un état et à un moment donné du développement, les séquences actives et donc à révéler ainsi le niveau d'expression des gènes dont elles sont issues.

Le séquençage entier de génomes modèles (levure, nématode, drosophile) et du génome humain (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) est sans doute un des faits les plus marquants de la génomique. Les apports de cette dernière sont très importants, grâce aux caractères systématiques des études, à l'utilisation de systèmes d'analyse à haut débit, et l'établissement de liens de plus en plus étroits entre la génétique moléculaire et l'informatique. La génomique a ainsi fait naître de nouveaux termes, comme le transcriptome et le protéome, qui vont progressivement changer la conception de certains domaines comme celui de la toxicologie. En effet, on parle de post-génomique (ou génomique fonctionnelle) pour désigner les recherches de biologie fonctionnelle où les produits des gènes (ARNm et protéines) sont au cœur des analyses et non plus, seulement, les gènes et leur séquence.

L'évaluation de l'impact de l'exposition à divers toxiques sur la santé publique et la progression vers une pathologie est complexe. La connaissance des modes d'action, tout comme les mécanismes qui contribuent à la toxicité et à la progression vers une pathologie donnée, est importante pour la détermination de la véritable toxicité de composés variés (chimiques, médicaments...).

La toxicogénomique, une discipline qui allie la génomique et la toxicologie, tente d'élucider les mécanismes par l'analyse des effets des toxiques au niveau du génome entier.

Dans le cadre de ce travail, cette approche a été envisagée pour définir les événements moléculaires impliqués, dans les réponses résultantes d'une exposition à l'U.

II-2. Les techniques d'étude du transcriptome :

Bien que le "*northern blot*" soit la méthode standard utilisée pour étudier les changements dans l'expression des transcrits, cette méthode est relativement laborieuse lorsqu'elle est utilisée en systématique, et est donc seulement utilisable pour l'analyse des changements d'expression pour un nombre limité de gènes. Les avancées dans le séquençage du génome ont apporté l'opportunité aux chercheurs d'étudier les altérations dans l'expression du génome dans sa globalité. Deux stratégies dominantes peuvent actuellement être envisagées pour réaliser une analyse quantitative et qualitative de l'expression génétique : les méthodes d'hybridation (puces à ADN) et celles de séquençage d'étiquettes (méthode *SAGE*).

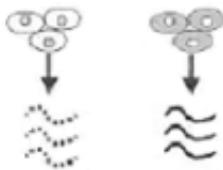
II-2-1. Les puces à ADN :

Définition. La puce à ADN est définie comme une technique d'hybridation permettant une analyse génomique comparative de l'expression d'un grand nombre de profils de l'ARNm. Des oligonucléotides (simples brins de quelques dizaines de bases) spécifiques de différents gènes ou ADN complémentaire (ADNc) connus, et immobilisés sur un support solide (matrice), constituent les sondes. Le rôle de ces dernières, est de détecter les cibles complémentaires marquées, présentes dans le mélange complexe à analyser (ARNm extraits de cellules, tissus ou organismes entiers et convertis en ADNc). Les sondes sont soit greffées sur le support (membrane de nylon ou lame de verre), soit synthétisées in situ (unité d'hybridation appelée plot). Les signaux d'hybridation sont détectés selon le type de marquage, radioactivité ou fluorescence.

Principe. Le fonctionnement des puces est basé sur le phénomène d'hybridation entre les bases des oligonucléotides immobilisés (les sondes) sur le support et les ADNc marqués (les cibles) (Figure 8). La mise en présence des sondes immobilisées et de l'échantillon contenant les cibles marquées conduit à la formation d'hybrides moléculaires. Après une étape de lavage, une analyse de la surface permet de détecter les hybridations effectives grâce aux signaux émis par les marqueurs présents sur les cibles. Cette analyse permet d'identifier les transcrits et leur niveau d'expression *via* un traitement informatique.

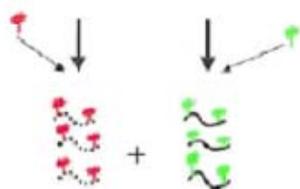
A. Purification des ARN

Echantillon A Echantillon B

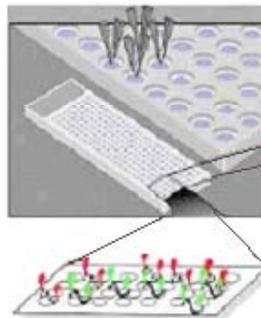


B. Synthèse des cDNA

C. Marquage des sondes



D. Hybridation sur les puces



E. Détection

● Echantillon A>B
● Echantillon A=B
● Echantillon B>A

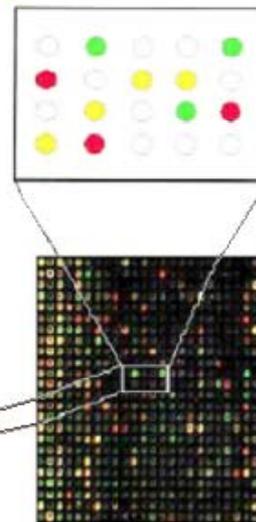


Figure 8 : Principe des puces à ADN (détection des signaux d'hybridation par fluorescence).

Avantages. Le principal avantage de ce type de technologie pour l'analyse globale du génome est la capacité qu'elle offre pour étudier des milliers de gènes, simultanément, dans une condition donnée. Sous l'appellation de puce à ADN, nous pouvons distinguer les réseaux d'ADN "*macro*" ou "*micro arrays*" et les puces "*oligos chips*". Les "*macro arrays*" désignent des supports contenant quelques dizaines de sondes par cm² alors que les "*micro arrays*", comme les "*oligo chips*", peuvent contenir plusieurs milliers de sondes au cm² (Table 4).

Table 4 : Comparaison des différents systèmes analytiques, d'après B. Jordan (161).

	<i>Macro arrays</i> sur Nylon	<i>Micro arrays</i> sur Nylon (radioactivité)	<i>Micro arrays</i> sur Nylon (colorimétrie)	<i>Micro arrays</i> sur verre	<i>Oligo chips</i>
Cibles	ADNc (Colonies ou produit PCR)	ADNc (produit PCR)	ADNc (produit PCR)	ADNc (produit PCR)	Oligonucléotides de 20-mer synthétisés in situ
Support et format	50-2.000 dépôts sur une membrane Nylon de 8x12 cm ²	200 dépôts sur une membrane Nylon de 5x4 mm ²	9.600 dépôts sur une membrane Nylon de 2,7x1,8 cm ²	50-6.400 dépôts sur une lame de verre de 1,8x1,8 cm ²	64.000 dépôts sur une lame de verre de 1,28x1,28 cm ²
Quantité de matériel	25 µg ARN totaux	0,1 µg ARN totaux	1 µg ARNm	2 µg ARNm	10 µg ARNm
Détection	³³ P	³³ P	Colorimétrique	Fluorescence	Fluorescence
Volume d'hybridation	40 ml	100 µl	10 µl	2-10 µl	200 µl
Acquisition de l'image	Ecran Phosphore	Ecran Phosphore (scanner haute résolution)	Scanner à plat	Confocal	Confocal
Limite de détection (abondance du messager)	1/20.000	1/10.000	1/20.000	1/100.000	1/300.000
Quantité de matériel minimum pour détection	25x10 ⁶ molécules	0,2x10 ⁶ molécules	60x10 ⁶ molécules	20x10 ⁶ molécules	30x10 ⁶ molécules

Limites. Les inconvénients majeurs de ce type de technologie sont paradoxalement liés aux avantages qu'elle peut offrir. La bonne qualité d'une réaction dépend en partie de la stabilité de l'hybridation sonde-cibles. Le taux de bases GC dans les séquences cibles et la longueur des séquences ont un rôle déterminant sur la stabilité de l'hybridation. Cette différence de stabilité peut donner lieu à une mauvaise interprétation des résultats avec la présence de faux positifs ou faux négatifs.

Cependant, l'utilisation de cette technique a connu un essor phénoménal ces dernières années dans de nombreux domaines, comme par exemple dans la toxicologie.

II-2-2. La méthode *SAGE* (*Serial Analysis of Gene Expression*) :

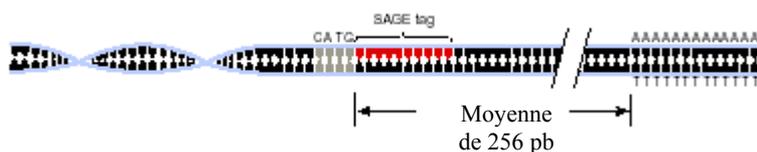
Définition. La méthode *SAGE*, décrite pour la première fois en 1995, par Velculescu (162), est basée sur l'analyse quantitative et qualitative en série de l'expression génétique d'un grand nombre de transcrits. Le *SAGE*, extension logique du séquençage par EST (*Expressed Sequence Tag*), consiste à réaliser un inventaire des transcrits (ARNm présents dans un échantillon de cellules, tissus ou organes et convertis en ADNc) au moyen de courts fragments d'ADNc de 9 à 14 pb, nommés étiquettes ("*tag*"). Toutes les étiquettes d'un transcrit donné (jusqu'à une cinquantaine) sont ensuite assemblées sous forme de longue séquence appelée concatémère. Le séquençage de ces concatémères permet d'établir l'identité de chaque étiquette (et donc du gène dont elle est issue). L'analyse informatisée des séquences permet d'extraire les différentes étiquettes, de les classer et de les dénombrer. Enfin, l'interrogation des banques de données permet de les identifier. En générant ainsi un grand nombre de séquences à partir d'un échantillon donné, il est possible de mesurer la fréquence des différentes étiquettes et finalement de réaliser une mesure quantitative du profil d'expression.

Principe du SAGE. (Figure 9). La technique est basée sur trois principes.

- Le premier étant qu'une étiquette peut théoriquement discriminer 4^{10} (10^6) molécules différentes, est suffisamment longue pour être spécifique du transcrite dont elle est issue.



- Le second repose sur le fait que la condensation de l'information par la ligation de nombreuses étiquettes en une seule molécule d'ADN (concatémère), qui peut être facilement manipulé, permet une plus grande efficacité dans l'analyse des données.



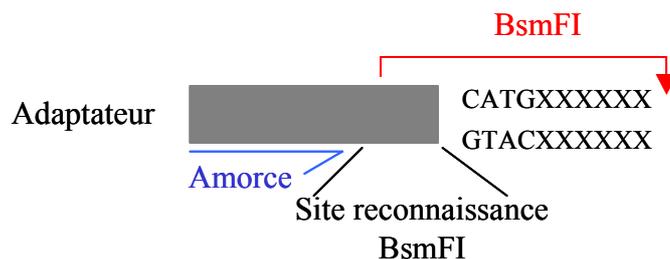
- Le dernier admet que la proportion relative des différentes étiquettes dans la librairie est le reflet de l'abondance des transcrits correspondants dans l'échantillon biologique.

✓ *De l'extraction des ARNm au séquençage des concatémères :*

Le matériel de départ correspond à de l'ADNc double brin, synthétisé à partir des différents ARNm extraits des tissus d'intérêt, grâce à l'utilisation d'amorces oligo d(T) immobilisés sur des billes magnétiques. Les ADNc sont ensuite clivés avec une enzyme de restriction, *NlaIII*, dite enzyme d'ancrage, qui coupe régulièrement tous les 250 pb, chaque fois qu'elle reconnaît le site CATG. Les ADNc généralement plus longs que 250 pb sont de ce fait coupés plusieurs fois. Cependant certains ADNc ne contiennent pas de site de coupure pour l'enzyme d'ancrage et sont par conséquent exclus de l'analyse.

Après coupure par l'enzyme d'ancrage, la partie la plus 3' des ADNc est séparée en deux fractions distinctes, qui sont ensuite liées à un adaptateur spécifique et différent pour chacune de ces fractions. Une deuxième enzyme de restriction, ici *BsmFI*, est utilisée. Cette

enzyme, dite "enzyme d'étiquetage", coupe après les 10 à 13 nucléotides qui suivent son site de reconnaissance, séquence intégrée à celle de l'adaptateur.



La séquence obtenue après digestion enzymatique, d'approximativement de 50 bp, correspond à une étiquette. Cette séquence est ensuite liée à d'autre séquence pour former des doubles étiquettes d'environ 100 bp ("*ditags*" 100 bp). Ces dernières sont alors amplifiées grâce à des amorces judicieusement choisies, les amorces 1 et 2, qui s'hybrident spécifiquement aux adaptateurs et qui permettent l'amplification par *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) des "*ditags*" de 100 bp. Après purification des doubles étiquettes sur gel de polyacrylamide 12 %, une digestion avec la même enzyme de restriction de départ (*NlaIII*), permet de libérer les doubles étiquettes des adaptateurs. Ces étiquettes de 26 bp sont alors purifiées sur gel de polyacrylamide 12 %, et associées entre elles pour former des oligomères d'ADN appelés concatémères. Ces derniers sont également purifiés sur gel de polyacrylamide 10 % et insérés dans des vecteurs spécifiques pour être clonés.

La séquence de chaque clone peut donc résulter de l'association de 30 ou 40 étiquettes *SAGE*. Les concatémères les plus longs sont clonés et séquencés. De plus, le séquençage de ces polymères de "*tag*" donne accès à des informations sur de nombreux gènes, *via* le décryptage des séquences qui constituent ce "*polytag*".

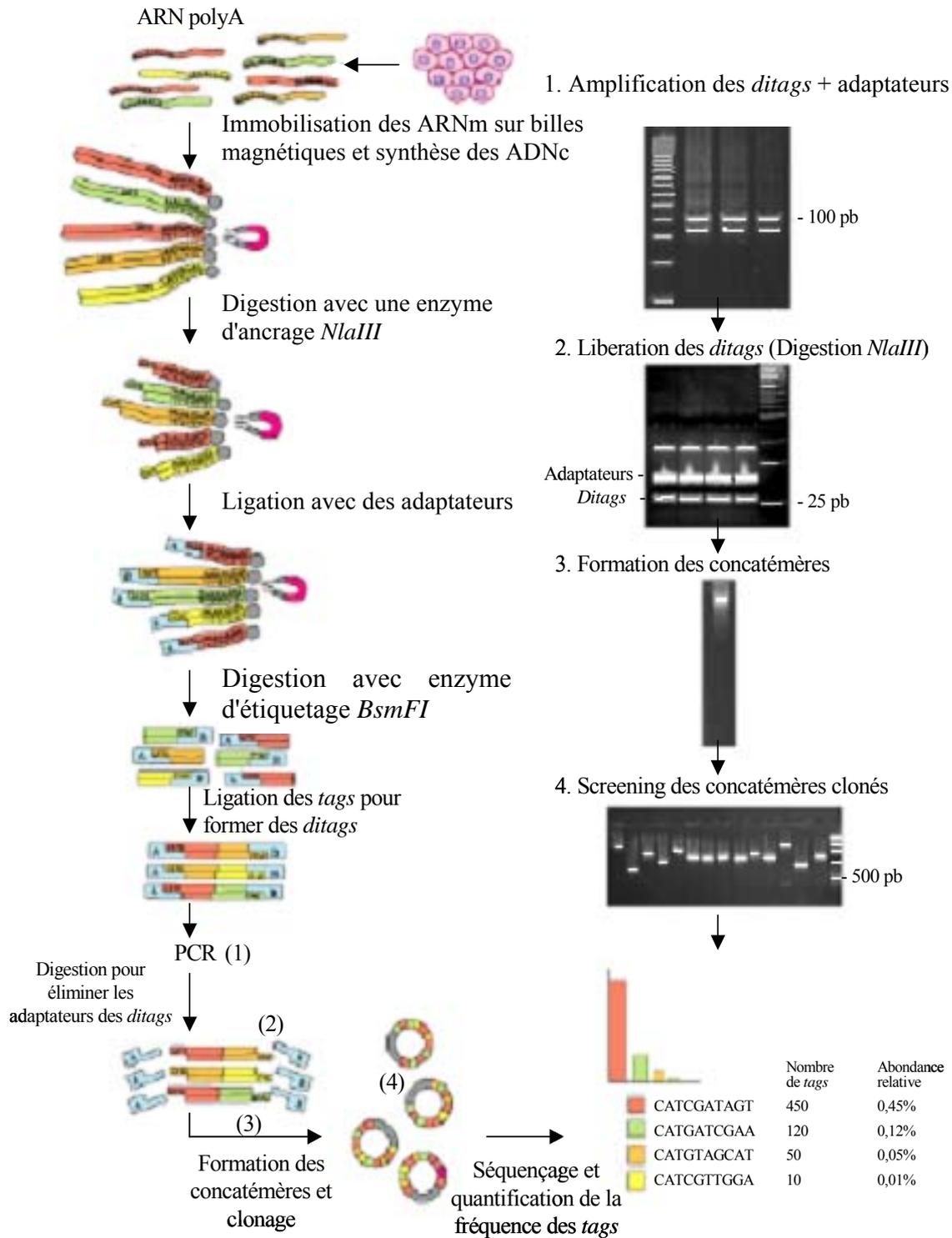


Figure 9 : Principe du SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*).
Description des étapes clés du kit *I-SAGE* (commercialisé par *Invitrogen*).

✓ *L'analyse informatisée :*

La séquence de reconnaissance de l'enzyme de restriction *NlaIII* (CATG), qui permet la séparation des doubles étiquettes de 26 pb, sert également de marqueur de ponctuation pour orienter et délimiter les étiquettes. L'utilisation de ce dernier paramètre permet une extraction des séquences totalement informatisée, pour pouvoir réaliser un inventaire de tous les transcrits cellulaires. L'abondance relative de chaque étiquette fournit une information directe sur le niveau d'expression des transcrits correspondants. La quantité d'étiquettes à séquencer dépend du but recherché.

Avantages. Cette technique permet l'étude des transcrits rares. A ce jour, on dénombre plus de 200 études réalisées *via* l'utilisation de cette approche. La méthode *SAGE* a déjà fait l'objet de différentes applications chez l'homme (163,164), les levures (165), les plantes (166), (167) et les souris (168), comme l'identification de marqueurs de cellules cancéreuses (169,170), l'étude de la capacité des levures à croître sur différentes sources de carbone (171), la description du profil d'expression des cellules dans le système immunitaire (172,173), ou encore l'identification et la classification de gènes régulés par p53 (174-176). Cette technique semble être particulièrement bien adaptée pour les organismes dont le génome n'est pas complètement séquencé, puisque contrairement aux puces à ADN, elle ne nécessite aucune connaissance *a priori* sur les séquences à analyser, et permet de ce fait l'identification de nouvelles séquences.

Les limites. Cette technique n'est pas adaptée à l'étude de nombreux échantillons du fait du séquençage qui est extrêmement onéreux. Par ailleurs, elle requiert l'existence de bases de données de séquences génomiques les plus complètes possibles pour l'analyse des séquences. En effet, les gènes correspondant aux étiquettes, obtenues expérimentalement, sont

recherchés par une requête dans une banque de données comme "UniGene" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>). L'identité d'une étiquette lorsqu'elle correspond, par exemple, à une séquence RIKEN peut être définie par une interrogation du site "Mouse Genome Informatics" (MGI) (<http://www.informatics.jax.org/>).

Pour les étiquettes ne correspondant à aucune séquence connue, l'expérimentateur n'a pas trop d'autre choix que d'attendre l'accroissement des données génomiques. Une fois que les banques sont établies, une interrogation régulière au niveau des banques de données devra être réalisée. La caractérisation des étiquettes reste donc entièrement dépendante de l'état d'avancement des connaissances des génomes.

Les difficultés et les modifications apportées à la méthode SAGE. Bien que le SAGE soit considéré comme une approche puissante pour l'analyse à grande échelle de l'expression des génomes, la méthode initiale, décrite par Velculescu *et al.* (162) présente de nombreuses difficultés expérimentales, comme la quantité d'ARNm à fournir, l'efficacité de coupure des enzymes de restriction, la présence d'adaptateurs dans les concatémères, la perte importante de matériel durant les différentes étapes de purification, les efficacités de clonage, la taille des concatémères ...

Depuis, de nombreuses modifications ont été réalisées (177-180) pour palier à ces diverses difficultés. Par exemple, l'utilisation d'une autre enzyme d'ancrage, comme *Sau3A*, permet de contourner le fait que le site de reconnaissance de l'enzyme d'ancrage *NlaIII*, qui sert à récupérer les extrémités 3' des ARNm, n'est pas présent sur tous les transcrits.

Une autre amélioration de la technique a été apportée par Powell *et al.* (181) qui utilisent des adaptateurs biotynilés pour les éliminer par adsorption sur des billes magnétiques couvertes de streptavidine, et évite ainsi les contaminations potentielles des "ditags" par les adaptateurs.

Par ailleurs, l'évaluation des "*ditags*" permet de vérifier qu'il n'y ait pas d'amplifications préférentielles au cours de la *PCR*, étant donné que la probabilité de trouver deux fois ou plus le même "*ditag*" est extrêmement faible.

Une autre amélioration consiste à enrichir la population de transcrits rares, en associant au *SAGE*, la technique d'hybridation soustractive, ce qui permet de détecter les ARNm spécifiques d'une cellule particulière par différence avec les ARNm d'une cellule prise comme référence. Cette modification, décrite par Wang *et al.* (182), induit une augmentation de la proportion des séquences rares en diminuant celles des séquences les plus abondantes. Cependant, l'utilisation de cette technique additionnelle (hybridation soustractive), amène d'autres inconvénients comme l'absence d'une vue d'ensemble du profil d'expression des gènes dans une cellule ou des altérations survenant lors d'un événement biologique.

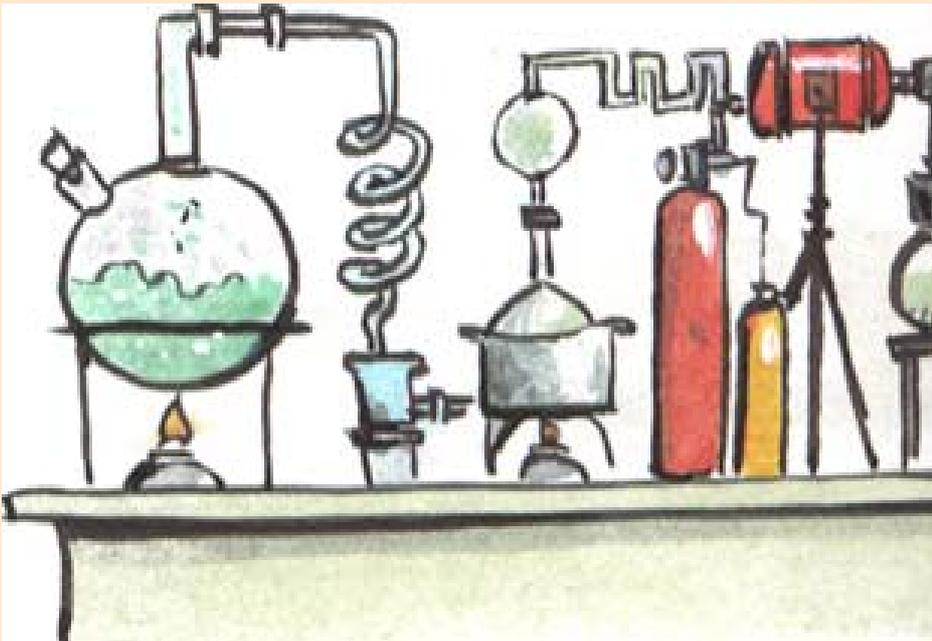
Un autre inconvénient de la méthode *SAGE* initiale est la quantité importante d'ARNm qui est nécessaire (2,5 à 5 µg d'ARN polyA⁺). Afin de dépasser ce problème, des changements ont été apportés. Par exemple, Datsun *et al.* (183) ont simplifié le protocole de départ en n'utilisant qu'un seul tube pour toutes les étapes, de l'isolement des ARN à la libération des étiquettes, permettant une nette diminution de la perte du matériel biologique. En effet, l'ARN de départ et l'ADNc plus tard restent immobilisés sur les parois du tube tout au long de l'expérience *via* l'interaction streptavidine/biotine. En 1999, ils ont donc décrit la "*microSAGE*" qui nécessite 500 à 5000 fois moins d'ARN de départ et peut donc être utilisée pour l'analyse de tissus hétérogènes (1-5 ng d'ARNm). Peters *et al.* (184) ont parallèlement décrit la méthode "*SAGE-Lite*" (50-100 ng d'ARNs), qui repose elle simplement sur une première amplification des ARNm de départ, et qui aboutit à la synthèse d'une grande quantité d'ADNc. Une des dernières améliorations, concernant la quantité d'ARN à fournir, repose sur l'isolement direct des ARNm à partir du tissu grâce à des oligos (dT) directement couplés à des billes magnétiques, en éliminant l'étape d'extraction des ARN totaux (ARNs),

et nécessite une quantité de matériel de départ moins importante (50.000 cellules) que pour réaliser un *SAGE* classique ($0,5-2,5 \times 10^7$ cellules) (185). Cette amélioration, reconnu comme une variante du *SAGE* et nommé la *SADE* (*SAGE adaptation for downsized extracts*), a été appliquée pour l'analyse du transcriptome sur des tubules rénaux microdisséqués.

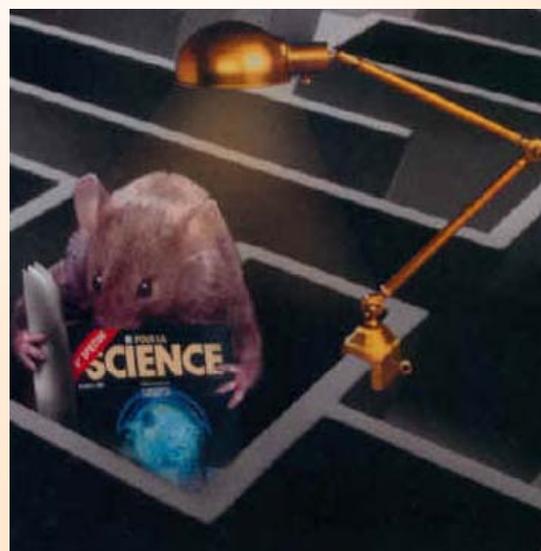
La société Invitrogen a commercialisé un kit, le kit *I-SAGE* (http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/SAGE_man.pdf), qui repose sur ces dernières modifications apportées par les travaux de Virlon *et al.* (185), et qui comprend toutes les enzymes et réactifs nécessaires pour l'obtention de banques d'étiquettes.

L'exploitation des données *SAGE* rencontre également d'autres types de difficultés. Par exemple, certaines étiquettes peuvent correspondre à plusieurs ARNm. D'autres étiquettes ne correspondent à aucun gène connu répertorié dans les banques de données. Ces problèmes pouvant être en partie dus à une séquence "*tag*" trop courte, certaines améliorations ont été apportées pour directement utiliser les étiquettes comme amorces "sens" afin d'amplifier le ADNc correspondant (178) ou pour augmenter directement la taille des étiquettes (180). L'obtention d'étiquettes de plus grande taille, *i.e.* d'une vingtaine de bases, a aussi permis de rechercher un ARNm par la technique *RACE* (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) (186), et de ce fait obtenir la séquence complète de l'ADNc, puis la séquence du gène correspondant. La société *Invitrogen* a récemment mis sur le marché une optimisation de leur kit initial, avec ces dernières améliorations (*I-SAGE long kit*), grâce à l'utilisation de l'enzyme d'étiquetage *MmeI*, qui coupe 17 à 21 pb après son site de reconnaissance qui permettent une plus grande spécificité de l'identification des étiquettes.

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé le kit *I-SAGE*, la dernière amélioration n'étant pas commercialisée au moment de l'initiation de nos travaux. Dans la section *III*, intitulé "*Analyse globale des données obtenues par la technique SAGE*", nous verrons plus en détail les différentes difficultés rencontrées lors de la préparation des banques *SAGE*.



RESULTATS



De nombreux et variés toxiques, comme l'U, sont présents dans l'environnement soit de façon naturelle, soit introduits accidentellement après son utilisation intempestive par l'homme. L'évaluation des réponses toxicogénomiques à ces toxiques, devrait permettre une meilleure compréhension de la toxicité de l'U.

Lors de ce travail, nous nous sommes particulièrement focalisés sur l'étude d'une exposition aiguë et chronique à l'U. Bien que de nombreux travaux aient été réalisées après une contamination aiguë à l'U, les événements moléculaires impliqués dans la réponse au toxique restent mal définis. L'utilisation d'outil de toxicologie combiné à des techniques d'analyse à grande échelle du génome, a permis d'appréhender ces mécanismes.

Lors d'une exposition chronique à l'U, les conséquences éventuelles de l'incorporation de ce métal restent très controversées. De récentes études ont mis en évidence des altérations des marqueurs biochimiques de la fonction rénale et des lésions au niveau histologique (78,152,153,157,159,160). Cependant l'étiologie de ces effets est incertaine et nécessite l'établissement de nouvelles études pour confirmer et déterminer la pertinence de ces observations. Etant donné que les changements de l'expression des gènes associés à une toxicité, sont souvent plus sensibles et spécifiques aux réponses des toxiques, que les techniques de toxicologie couramment utilisées, nous avons évalué le profil d'expression génique suite à une exposition chronique à l'U *via* le *SAGE*.

I. Conséquences moléculaires d'une contamination aiguë à l'uranium.

Comme nous l'avons vu précédemment (*cf chapitre I-3. L'uranium et le rein, p25*), l'U est un métal néphrotoxique. Lors des différentes étapes du cycle du combustible, allant de l'exploitation du minerai au recyclage des déchets nucléaires, les travailleurs de l'industrie nucléaire sont particulièrement exposés à des risques de contamination par l'U. L'administration de ce dernier peut entraîner des altérations du parenchyme rénal pouvant aboutir à une insuffisance rénale aiguë (IRA) (92,93,128,150) et voire à un insuffisance rénale chronique (IRC) (187). Bien qu'il était suspecté que des processus tels que l'inflammation, l'apoptose ou le stress oxydatif sont potentiellement impliqués dans les phénomènes d'altération et de régénération tissulaire après une administration d'U, la plupart des études ont uniquement examiné les modifications induites au niveau de la filtration glomérulaire, la réabsorption tubulaire et les altérations histologiques résultantes ((92,118,119,128,133,188). L'utilisation de la génomique fonctionnelle a permis, ces dernières années, des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes associés à l'IRA. En effet, différentes expérimentations menées après induction de l'IRA, soit par ischémie soit après administration d'un toxique, ont permis de mieux définir les phénomènes moléculaires liés à l'IRA.

Après exposition aiguë à l'U, la seule étude disponible, à ce jour, est celle réalisée par Fleck *et al.* (187), qui ont observé des variations de profils génique, seulement 10 semaines après une injection unique à l'U. Pour étayer davantage ces premières observations et valider notre modèle d'étude (évaluation de la toxicité chronique de l'U *via* le *SAGE*), nous avons donc étudié le transcriptome murin après une exposition aiguë au NU. Pour réaliser cette étude, nous avons choisi d'utiliser la méthode *SAGE* qui permet de réaliser l'étude des événements moléculaires consécutifs à l'exposition d'U sans à priori de départ.

Une injection unique intra-péritonéale de 5 ou 20 mg de NU/kg a été effectuée pour induire une contamination aiguë. Pour confirmer l'état de contamination, nous avons examiné plusieurs paramètres comme le poids et la quantité d'U dans les reins (Table 5).

Table 5. Paramètres généraux, physiologiques dans le sang et les urines et quantité d'uranium dans le rein des animaux témoins (UN(-)) et contaminés (UN(+)), 48 heures après l'injection d'U.

Paramètres	UN(-) (n=4)	UN(+) (n=4)	
		5 mg/kg	20 mg/kg
<u>Reins</u>			
Poids (g)	0.439±0.024	0.486±0.017	0.575±0.011*
Quantité d'uranium (µg/g)	0.31±0.08	18.84±4.85*	85.95±11.67*
<u>Sang</u>			
Urée (mg/dL)	47.0±3.2	135.3±12.8*	424.0±31.1*
Créatinine (mg/dL)	0.20±0.06	0.55±0.11*	2.80±0.20*
<u>Urine</u>			
Glucose (g/L)	0.26±0.03	11.70±0.35*	10.71±0.81*
GammaGT (U/L)	38±11	558±123*	212±79*

*p<0.05

Les variations observées au niveau des différents paramètres semblent être dépendantes de la concentration d'U injecté, ce qui est en accord avec une étude précédente (92).

Dans un premier temps, nous avons réalisé le transcriptome rénal pour les animaux ayant reçu une seule injection de 5mg de NU/kg en IP. Les résultats sont présentés dans l'article intitulé : *Detection of putative indicators in predicting renal response to acute toxicant insult: TCTP, IGFBP7 and Rps29.*

Article

Detection of putative indicators in predicting renal response to acute toxicant insult: TCTP, IGFBP7 and Rps29

Magali Taulan, François Paquet, Àngel Argilés, Jacques Demaille

and Marie-Catherine Romey

Soumis à American Journal of Physiology - Renal Physiology

Detection of putative indicators in predicting renal response to acute toxicant insult: TCTP, IGFBP7 and Rps29

Magali Taulan^{‡¶}, François Paquet[‡], Àngel Argilés[†], Jacques Demaille^{§¶} and Marie-Catherine Romey^{§¶*}

[‡]Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

DRPH / SRBE / LRTOX

Laboratoire de radiotoxicologie expérimentale

Site du Tricastin - BP 166 - 26702 Pierrelatte Cedex, France.

[¶]Institut de Génétique Humaine

Laboratoire de Génétique Moléculaire et Chromosomique.

CNRS UPR 1142

141, Route de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex 05, France.

[†]Laboratoire de Génomique Fonctionnelle

LGF-CNRS UPR 2580

141, rue de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex 5, France.

[§] Both authors contributed equally to this work.

Running title: Assessment of UN-induced ARF by SAGE

***Corresponding author:**

Marie-Catherine Romey

Laboratoire de Génétique Moléculaire et Chromosomique.

Institut de Génétique Humaine

141, Route de la Cardonille

34396 Montpellier Cedex 05

phone: (33) 4 67 41 53 60

Fax: (33) 4 67 41 53 65

E-mail: Marie-Catherine.Romey@igh.cnrs.fr

Abstract

Chemical and radiological toxicity related to uranium acute exposure has been widely studied in nuclear fuel workers and military personnel. It is well known that uranyl nitrate induces acute renal failure (ARF). However, the mechanisms of this metal-induced injury are not well defined at the molecular level. Renal function and histology were assessed in mice receiving uranyl nitrate (UN(+)) and controls (UN(-)). To identify the genomic response to uranium exposure, serial analysis gene expression (SAGE) of the kidney was performed in both groups. Over 43,000 mRNA SAGE tags were sequenced. A selection of the differentially expressed transcripts was validated by real-time quantitative PCR and Western blotting. UN(+) animals developed renal failure and displayed the characteristic histological lesions of UN nephropathy. Of the >14,500 unique tags identified in both libraries, 224 had a modified expression level; they are known to participate in inflammation, ion transport, signal transduction, oxidative stress, apoptosis, metabolism, and catabolism. Among these genes, we identified for the first time in UN induced nephropathy an increased transcription of translationally controlled tumor protein, insulin like growth factor binding protein 7 and ribosomal protein S29, all apoptosis related genes. We report a comprehensive description of the UN induced modifications in gene expression levels, including the identification of genes previously unrelated to this model of ARF. The study of these genes and the metabolisms they control should improve our understanding of toxic ARF and enlighten on the molecular targets for potential therapeutic interventions.

Keywords: acute exposure, nephrotoxic acute renal failure, SAGE, transcriptome, uranyl nitrate

Introduction

Uranium (U) is a heavy metal which has a wide range of uses that invariably carry an exposure risk for industrial workers as well as for the general population. After an accidental absorption of U compounds, the soluble form of U is carried in the blood, filtered by the glomerulus and partly excreted in the urine. Therefore, the kidney is an important organ in heavy metal toxicity because both, it is a target tissue of the toxic and it participates in metal catabolism and excretion. Uranyl nitrate (UN) induces acute renal failure (ARF). UN-induced nephropathy has been extensively studied in animal models (Anthony et al. 1994; Sun DF et al. 2000; Schramm et al. 2002). It mainly involves the S3 segment of the proximal tubule (Sun DF et al. 2000).

Much effort has been devoted in elucidating the pathogenesis of ARF. Many studies have provided data demonstrating the participation of a wide range of compounds that are known to modulate several different functions of the cell in ARF. Galectin-3, a β -galactosidase-binding protein, known to be involved in multiple biological processes such as nephrogenesis (Winyard et al. 1997) and inflammation has been shown to be markedly up-regulated in ischemic ARF (Nishiyama et al. 2000). Osteopontin (OPN) has also been observed to be up-regulated during toxic ARF in the rat (Verstrepen et al. 2001). Other molecules such as EGF have been observed to be down-regulated during toxic or ischemia-induced ARF (Leonard et al. 1994; Toubeau et al. 1994). Many other compounds have been shown to participate in ARF (Safirstein 1994; Nigam and Lieberthal 2000). However, the bulk of knowledge on ARF at the molecular level, has been achieved with work that focused on a single molecule or pathway characterization (Verstrepen et al. 2001; Nigam and Lieberthal 2000).

The tremendous progress recently accomplished in biotechnology has made possible to analyze thousands of transcripts in a single experiment, thereby offering a powerful

strategy in the study of transcriptome. Some studies have been already performed to analyze the genomic responses in various types of ARF (table 1) (Huang et al. 2001; Yoshida et al. 2002a; Yoshida et al. 2002b; Supavekin et al. 2003; Mishra et al. 2003; Kieran et al. 2003; Devarajan et al. 2003; Hauser et al. 2004). However, many aspects remain to be unraveled in ARF and there is no study with a global assessment of the renal transcriptome in UN-induced ARF. Here, we used for the first time the SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) approach to define the renal toxicogenomic effects of UN. We have been able to provide a comprehensive view of the molecular events involved in the early phase of UN-induced ARF. Our results demonstrate a variation in the expression rate of i) genes previously related to both, ischemic and toxic ARF (including UN-induced ARF), ii) genes that were known to be related to the various types of ARF, but not to participate in UN-induced ARF and iii) genes that were not known to participate in either type of ARF.

Among the genes of the first group, we identified OPN (a marker of the inflammatory response) and SOD (a marker of the oxidative response). This group of genes represents an internal positive control of our study (Fujigaki et al. 2003; Schramm et al. 2002). In the second group of genes, we identified for the first time in UN-induced ARF, Galectin-3 (Gal-3), uromodulin (UMOD), ornithine decarboxylase (ODC) and kidney androgen regulated protein (KAP), that had been previously related to other forms of ARF (Nishiyama et al. 2000; Supavekin et al. 2003; Huang et al. 2001; Yoshida et al. 2002a). Finally, among the third group of genes, we identified for the first time in ARF, translationally controlled tumor protein (TCTP), insulin like growth factor binding protein 7 (IGFBP7) and ribosomal protein S29 (Rps29).

Materials and Methods

Animals.

Twenty male C57 Bl/6J mice, weighing 25-30 g (Harlan, France) were housed in light controlled rooms with 12-h periods of light and darkness and free access to food and water. They were randomly divided into two groups: controls (UN(-)) and Uranyl nitrate-treated (UN(+)) mice.

Uranyl nitrate-induced acute renal failure.

A single dose of 5 mg/Kg of Uranyl nitrate (Merck, France) in 0.9% NaCl, or the vehicle alone, was given intraperitoneally (Anthony et al. 1994). The animals were euthanized by exsanguination using cardiac puncture 48 hours after the injection to evaluate early renal injury (Sun et al. 2002). Uranium residues were examined in samples of kidney using a kinetic phosphorescence analyzer (KPA) (Ejnik et al. 2000). Serum creatinine and urea level and urinary concentrations of glucose, gamma-glutamyltranspeptidase (γ GT) were measured by routine methods.

Sample preparation. The kidneys were either embedded in epon for morphological examination or snap-frozen in liquid nitrogen and then stored at -70°C until further study.

Preparation of kidney samples for morphological examination.

Preparation. Kidney specimens were cut into 1 mm cubes and fixed with 3% gluteraldehyde in aqueous solution. Following post-fixation, the cubes were dehydrated in ascending grades of ethanol and absolute ethanol for 1h30, infiltrated with propylene oxide and propylene oxide-epoxy resin, and finally embedded in Epon.

Morphology. For light microscopy, $1\mu\text{m}$ sections were cut from tissue blocks using a Leica ultramicrotome. The sections were mounted on glass slides and stained with toluidine blue (1%), basic fuchsine dye solution (1%) and examined under a Zeiss optical microscope.

For electron microscopy, sections of 90 nm (gold and silver interference colours) were collected on copper grids (200 mesh). The sections were examined and photographed under a Philips Biotwin CM120 transmission electron microscope, using Soft imaging system.

Score. Tubular injury was ranked according to tubular cells desquamation in grade 0 (normal tissue), grade 1, 2, 3, 4 (cells desquamation <25, 25-50, 50-75, 75-100% respectively).

RNA isolation.

Total RNAs, extracted from the renal tissue using the RNA isolation mini kit (Qiagen, France) were pooled and stored at -70°C until further study. The amount of total RNA was determined using a fluorescent nucleic acid stain (RiboGreen RNA Quantitation kit, Molecular Probes).

a- Analysis of gene expression.

Production of kidney library. Kidney libraries were generated from 50 μg of total RNA using I-SAGE kit (Invitrogen, France) following the manufacturer's instructions (http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/sage_man.pdf), adapted from initial description ((Velculescu et al. 1995), <http://www.sagenet.org>).

Tag quantification. Concatemer sequences were analyzed by using SAGE software v4.0 (provided by Invitrogen, France) which automatically detects and counts tags from sequence files. It excludes replicate ditags from the tag sequence catalogue, because the probability of any two tag being coupled in the same ditag is small, even for abundant transcripts. For tag identification, the tag list of each library was matched against a mouse tag database extracted by SAGE software from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Usually, SAGE tag sequences matched more than one transcript. The average p value computed by the SAGE software, based on a Monte Carlo analysis (Zhang et al. 1997), serves as ranking parameter to produce a list of differentially expressed genes. SAGE data for the libraries, described here, are available at GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) (accession nos. GSM24251 and GSM24255).

Real-time RT-PCR.

Total RNAs (1µg) from UN(-) and UN(+) renal tissue (extracted as described above *RNA isolation*) were used to generate cDNA using M-MLV-RT (Invitrogen) according to the manufacturer's conditions. Primers and probes specifically designed for selected cDNA using PRIMER EXPRESS software version 2.0 (PE, Applied Biosystems), are listed in table 2. The ABI PRISM 7000 sequence detection system was used for detected real-time RT-PCR products with the SYBR Green I assay according to recommendations of the manufacturer (PE, Applied Biosystems). For three cases, in which we encountered difficulties with the SYBR Green I assay, we used the TaqMan probe assays (table 2). Each PCR reaction was optimized to ensure that a single band of the appropriate size was amplified and that no bands corresponding to genomic DNA amplification or primer-dimer pairs were present. The PCR cycling conditions were performed for all samples as follows: 50°C, 2min for AmpErase UNG incubation, 95°C, 10min for AmpliTaq Gold activation, and 40 cycles for the melting (95°C, 15s) and annealing/extension (60°C for 1min) steps. PCR reactions for each template were done in triplicate in 96-well plates. The comparative $\Delta\Delta C_t$ method (PE, Applied Biosystems) was used to determine relative quantitation of gene expression for each gene compared to the HPRT control (listed in table 2).

Western blotting.

Cytoplasmic proteins were extracted from UN(-) and UN(+) tissues using nuclear extraction kit (Panomics) according to the manufacturer's instructions. Forty micrograms of cytoplasmic proteins were subjected to SDS-PAGE, and then electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Quantitative protein and even transfer in each lane was verified by reversible protein staining of the membranes with 0.1% Ponceau S in 5% acetic acid. After blocking in 5% non-fat dry milk, 0.1% Tween 20 blots were incubated with specific antibodies against Gal-3 (1:100 dilutions, Interchim) and ODC (1:200 dilutions, Sigma) ON at 4°C, and with

peroxidase-conjugated anti-mouse from goat in a dilution of 1:20.000 (Sigma) for 1h. All antibodies were dissolved in PBS containing 5% non-fat dry milk. Immunodetection of transferred proteins was achieved using enhanced chemiluminescence (Roche).

Peroxides level assessment.

To determine the impact of UN on the oxidative balance status, we measured peroxides levels by using enzymatic treatment. Kidney samples were homogenized on ice using a potter in the phosphate buffer (10mM KH_2PO_4 , 40mM Na_2HPO_4 , 0.01mM EDTA, pH 7.5). The homogenates were centrifuged at 15,000g for 15 min at 4°C to discard all cell debris. The supernatants were immediately used for protein estimation according to the method of Bradford. 300 μg of total protein were used for each assay. Spectrometric analyses were used to measure the production of peroxides. All experiments were carried out in triplicates using a Beckman DU 7500 UV/Vis Spectrophotometer.

Results

Characterization of UN-induced ARF.

All the animals included in the study survived either the UN or vehicle injections. As expected, only the animals receiving UN injections developed ARF. Tissue levels of uranium were significantly increased in UN(+) group compared to UN(-) group ($0.02 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$ vs. $15.8 \pm 5.6 \mu\text{g/g}$, $p < 0.001$).

Renal Function. Urea and creatinine serum levels significantly increased in UN(+) group as early as day 2 (figure 1A). Urinary γGT also significantly increased and glucose was detected in UN(+) group (figure 1A).

Morphological changes. UN injected animals displayed an important tubular vacuolization (figure 1B) and a focal loss of brush border in proximal tubular cells (figure 1C). The score of proximal tubules (PT) damage in outer stripe of outer medulla (S3 segments) compared to

UN(-) tissue was increased as early as by day 2 (between 25 and 50% of PT damaged). Cellular debris were observed in the tubular lumen (figure 1C). The overall structure of the kidney was preserved and glomerulae were intact in appearance. These findings are well in keeping with previous reports (McDonald-Taylor et al. 1997).

Global gene expression in UN-induced ARF.

The sequence analysis of \approx 43,000 transcripts from the kidneys of UN(-) and UN(+) tags was performed. The vast majority of these tags represent distinct transcripts. However, some tags, especially those detected only once, may result from PCR or sequencing errors (Zhang et al. 1997). More than 7,900 and 6,800 distinct tags were obtained in UN(-) and UN(+) animals, respectively.

The good quality of the obtained libraries could be confirmed based on the previously reported renal transcriptomes (table 1) (Virlon et al. 1999; El-Meanawy et al. 2000; Yano et al. 2000; Schelling et al. 2002; Elalouf et al. 2002; Cheval et al. 2002; Chabardes-Garonne et al. 2003). As expected, we predominantly found, tags specific for proximal tubule, as it represents the bulk of kidney's weight. Further, a large fraction of the most abundant tags matches with widely expressed mitochondrial genes or ribosomal proteins. Indeed, in agreement with previous data, the most frequently observed tags corresponded to glutathione peroxidase3 (GPx3) (2.1%) and KAP (1.4%) genes (El-Meanawy et al. 2000).

Data analyses showed that 2,518 tags (61.4%) match with known genes, 223 retained tags (5.4%) do not match with characterized mouse genes or cDNAs. When considering EST databases, 347 tags (8.5%) match with anonymous sequences. One thousand and sixteen tags (24.7%) are assigned to RIKEN sequence in the UniGene database. Monte Carlo simulations were used to determine the statistical significance of differentially expressed genes from both libraries (figure 2). As expected, the expression level was unmodified after UN injection for

the majority of transcripts. Interestingly, 224 transcripts were significantly over-expressed (116) or under-expressed (108) in UN(+) animals (listed in table 3). After exclusion of tags matching mitochondrial sequences, and those with multiple and non-reliable matches, only tags with a significant expression change (p -values <0.05) were retained and arbitrarily grouped according to their function. SAGE analysis revealed an overexpression of genes related to the release of inflammatory mediators, such as the secreted phosphoprotein 1 (Spp1 or OPN 7/104), UMOD (which encodes for the Tamm-Horsfall protein, 23/69), lectin galactose binding (Gal-3, 1/13), tumor necrosis factor alpha-induced protein (12/21) and TCTP (listed as translationally regulated transcript, 149/263) gene. Many genes involved in signaling were down-regulated such as hormonal receptors (growth hormone receptor, 15/3; parathyroid hormone receptor, 17/8) and transcripts encoding for chaperone proteins including heat shock 70 kD protein 8 (Hsp70, 52/29) and heat shock protein, 60 kDa (13/4). IGFBP7 (45/85), also known as IGFBP-rP1/mac25 was found to be increased. The UN-induced transcripts mainly consist of gene encoding proteins associated with lipid metabolism (hydroxysteroid dehydrogenase, 25/10 and alcohol dehydrogenase, 7/1), amino acid metabolism (glutamate dehydrogenase, 4/16 and ODC, 53/14) and carbohydrate metabolism (fructose biphosphate, 25/8; glucose phosphate isomerase, 0/6). UN exposure also increased the expression of a number of genes related to oxidative process and detoxification, including cytochrome P450 (Cyp4b1, 16/7) that catalyses the oxidation of a wide variety of substrates (Heng et al. 1997). Other enzymes, such as peroxiredoxin 1 (29/15), SOD1 (19/6), peroxiredoxin 2 (1/8), thioredoxin-like 2 (2/9), ferritin light chain (32/62) were significantly under- or overexpressed. We also observed down-regulation of genes related with ion transporters including solute carrier family 22 (organic cation transporter)-like2 (57/23) and 34 (sodium phosphate), member1 (23/8) according with previous studies (Kwon et al. 2000). Numerous transcripts encoding for ribosomal proteins were up-regulated, such as Fau gene

that encodes an ubiquitin-like protein fused to the ribosomal S30 protein (the cellular homolog of the fox sequence of the Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV)) (Kas et al. 1995), L9 (21/52), L19 (77/131), Large P1 (55/124) and S29 (37/81).

Confirmation of SAGE data.

Real-time quantitative PCR analysis. We performed real-time quantitative PCR analyses of eleven selected genes to validate the differential expression observed by SAGE. KAP was chosen because of its abundance in normal (1.4%) and in contaminated (0.38%) kidney. OPN was chosen because we observed an increase in its expression rate in UN-ARF and it had been previously related to uranyl acetate-induced ARF (Fujigaki et al. 2003). UMOD was chosen as it was increased in our SAGE data while it was previously reported to decrease in ARF (Yoshida et al. 2002a). SOD1, ODC, Calmodulin 2 (Calm2), Solute carrier family 34 (sodium phosphate) member1 (NaPi-II) and Ferritin light chain 1 (Ftl1) were chosen as they were modified in ARF (Schramm et al. 2002; Huang et al. 2001; Kwon et al. 2000; Mavromatidis et al. 1998). Results for all these transcripts corroborated the expression differences observed in our SAGE analysis (Figure 3 A). TCTP, IGFBP7 and Rps29 were included in the RT PCR analysis since they were observed to vary in ARF for the first time in our study. Real-time confirmed the SAGE results, as it showed an increase in the expression of PCR, OPN, UMOD, Ftl1, Calm2, TCTP, IGFBP7 and Rps29 and a decrease in the expression of KAP, NaPi-II, ODC and SOD in ARF induced by UN.

Western blotting. To determine whether the gene expression changes were apparent at the protein level, we performed Western blotting experiments. The protein products of one gene with increased expression level (Gal-3) and one with decreased expression level (ODC) were selected. Western blot analysis confirmed the accuracy of the differences in expression level observed in our SAGE analysis (Figure 3 B).

Peroxides level measurement.

To evaluate whether the altered level of SOD and GPx mRNA, observed by SAGE, may reflect a potential oxidative stress, we examined the production of H₂O₂. The concentration of H₂O₂ in the kidney was measured and found to be significantly reduced in UN(+) compared to UN(-) group (0.26±0.04 vs. 0.10±0.04) (Figure 4).

Discussion

The kidney is a complex organ consisting of well-defined components that function in a highly coordinated fashion. When a segment of the functional unit of the kidney is altered, ARF may occur. Tubules are the most frequently damaged area in ARF. Some mechanisms responsible for tubular damage are already well described such as inflammation, apoptosis and oxidative stress. However, the molecular events involved in the cellular response to renal injury are not completely elucidated, neither those participating in inflammation, apoptosis and oxidative stress, nor those participating in other cell metabolisms that might also be involved in ARF. To obtain a holistic view of the molecular processes involved in nephrotoxic ARF, we studied the changes in the transcriptome of kidney after UN treatment.

More than 200 transcripts out of the >14,500 unique transcripts observed were differentially expressed in UN(+) and in UN(-) animals. The differentially regulated genes could be distributed into three groups: group 1 including those genes that had been previously identified to participate in all forms of ARF, group 2 which encloses those genes participating in ARF but not previously related to the UN-induced form of ARF, and group 3 that includes those genes that had not been previously suspected to participate in any form of ARF. All three groups of genes are relevant in our study, since the group 1 genes validate our system in relation to previous reports (they represent an appropriate internal positive control). Group 2 genes demonstrate that some of the molecules participating in UN-induced ARF are shared

with other forms of ARF. Finally, group 3 genes provide evidence for involvement in ARF of newly identified genes.

The identification by SAGE of the genes related to UN-induced ARF has been informative on the possible endeavors that may be taken to extend our research on the understanding of this form of ARF. Supplementary studies with other techniques should follow. To choose the ways to focus our future efforts, it is capital to evaluate each gene that has been identified according to the metabolic systems it participates and the relevance it may have on the events observed in ARF. Following, we will include a brief analysis of those genes retaining our attention on these grounds.

Among the group 1 genes, OPN is the most differentially expressed gene (15-fold increase). Osteopontin is involved in inflammation (Verstrepen et al. 2001) and in proximal tubule regeneration (Fujigaki et al. 2003), and has been proposed as a marker for renal injury (Sun et al. 2002). Also among the genes of group 1, Cu, Zn-SOD, a key enzyme against oxidative stress, was underexpressed in UN-induced ARF, in agreement with a previous study (Schramm et al. 2002). Nevertheless, consistent with these data, we observed a decrease of peroxides levels in UN(+) compared to UN(-) animals. One explanation of the peroxide level observed, could be related to the loss of expression of SOD mRNA, involved in reactive species detoxification *via* H₂O₂ formation. Taken together, these data suggest that UN induces an oxidative stress, but the impact of these changes require further investigation.

Gal-3, a gene of group 2, was up-regulated (1/13). Gal-3 is a pro-inflammatory molecule (Rabinovich et al. 2002) containing in its sequence the asparagine-tryptophan-glycine-arginine motif, highly conserved in the BH1 domain of the Bcl-2, a well characterized suppressor of apoptosis (Liu et al. 2002). A decrease in apoptosis is known to be related to an increase in mitochondrial integrity, a diminution in cytochrome C release, and caspase activation; three features that have been described for Gal-3 (Liu et al. 2002). However, the

mechanisms by which Gal-3 participates in UN-induced ARF are not known. Exploring this point seems of interest in ARF. Another interesting gene of this group 2 is UMOD. It encodes for Tamm-Horsfall protein and has been reported to be down-regulated in ischemia-induced ARF (Yoshida et al. 2002a). Our SAGE analysis surprisingly showed an up-regulation of UMOD expression. This increase was also confirmed by our RT-PCR studies, suggesting that THP behaves differently in ischemia- and UN-induced ARF. THP has been related to inflammation and showed to participate in hyperuricemic nephropathy as well as in medullary cystic disease (Bleyer AJ et al. 2003). In addition, an up-regulation of UMOD has been observed in the progression of nephrolithiasis (Katsuma S et al. 2002). The similarity between renal stone formation and UN crystal deposition, as well as the putative role of THP in these forms of ARF certainly deserves further study. Another interesting family of genes is constituted by the NaPi-II transporters, which are mainly expressed on the brush border of PT and modulate tubular reabsorption of inorganic phosphate (Kwon et al. 2000). Their renal expression was decreased in UN(+) animals, in keeping with the tubular damage and increased γ GT urinary levels. Also among the genes of group 2, ODC, the rate-limiting enzyme of polyamine biosynthesis, was down-regulated in UN-induced ARF. Studying a model of chronic renal failure, Fleck *et al.* also observed a decrease in ODC expression level 10 weeks after a single injection of UN (Fleck et al. 2003). Kramer *et al.* have obtained a depletion of polyamine pool using a specific biosynthetic enzyme inhibitor of ODC, resulting in p21-mediated G1 cell cycle arrest (Kramer et al. 2001). Therefore, the decrease in ODC mRNA level might be related to an arrest of cell cycle following UN treatment. The putative role of ODC and the participation of the cell cycle on UN induced ARF also appear important. Finally in this group 2, we observed a decrease in the expression level of KAP gene. While its expression in S1 and S2 segments is androgen dependent, no androgen is required for KAP expression in S3 segment. KAP is then observed in S3 of female and

castrated males (Cebrian et al. 2001) and has been used as a S3 marker (El-Meanawy et al. 2000). It participates in thyroid and growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis, known to be involved in other forms of ARF.

The most novel part of our results concern group 3 genes: those that had not been previously related to ARF. Three genes were identified RPS29, IGFBP7 and TCTP and all of them are markedly up-regulated in UN induced ARF. RPS29 is a potent apoptosis-inducing agent (Khanna et al. 2003), and its over expression further supports the participation of apoptosis in UN-induced ARF. IGFBP7 is a potential transcription factor (Wilson et al. 2001) with a variable distribution along the renal tubular epithelium. It could be involved in the regulation of cell growth and differentiation (Degeorges et al. 2000). In addition, it may have a tumor suppressor activity through the induction of cell senescence (Degeorges et al. 2000). Therefore, the study of the participation of this protein in UN-induced ARF is also of interest. Finally, TCTP is a protein usually found in the cytoplasm of both normal and tumor cells lines. This findings provide additional evidence for an up-regulation of TCTP in animals treated by heavy metal exposure (Sturzenbaum et al. 1998). However, it is the first time that enhanced TCTP expression results from UN exposure. TCTP has been previously characterized as an inflammatory molecule with an IgE-dependent histamine-releasing capacity (MacDonald et al. 1995). It was also described as an antiapoptotic protein (Li et al. 2001). TCTP, a tubulin-binding like protein is associated with microtubules in a cell cycle dependent manner (Gachet et al. 1999) and is associated with components of the translational machinery (Cans et al. 2003). Moreover, its expression is regulated by Ca^{2+} (Xu et al. 1999). Thus, TCTP is implicated in cell growth and differentiation, acute allergic response, apoptosis and other various processes (MacDonald et al. 1995; Xu et al. 1999; Gachet et al. 1999; Li et al. 2001) and may be a central protein in the phenomena observed in UN-induced ARF.

In summary, UN-induced renal injury is associated with dramatic alterations in gene expression profile. UN up- or down-regulates genes involved in inflammatory, in oxidative response, in protein and lipid metabolism, in androgenic response and in solute transporters. Changes in expression of a selected group of genes, known to participate in ischemic and toxic ARF (OPN and SOD) and also in genes known to be linked to ischemic or toxic ARF but not previously described in UN-induced ARF (KAP, UMOD, Calm2, Ftl1, NaPi-II and ODC), were validated by quantitative RT-PCR and confirmed at the protein level (Gal-3 and ODC). Our study, in addition to showing the global changes in transcriptome, using a SAGE approach, enabled us to identify new genes associated to UN-induced ARF (e.g. TCTP, IGBFP7 and Rps29) and previously not described in any ARF. Further global analyses of gene expression changes associated with different types of ARF will be necessary to define which genes are potential hallmarks of specific mechanisms of UN-renal injury and which are more general markers of renal damage. Apoptosis, oxidative stress, cell cycle and inflammation appear as the main features in UN-induced ARF. Further study of the genes implicated in these processes should shed light on our understanding of the physiopathology of toxic ARF; a mandatory step in identifying new markers and/or treatment targets of the disease.

Acknowledgements

The authors would like to thank Christophe Maubert for technical support. We also thank Marie Claraz-Donnadieu and Fabrice Petitot for helpful discussion and Christophe Bonaldi provided stimulating discussion about Monte Carlo analysis.

Reference

1. Anthony ML, Gartland KP, Beddell CR, Lindon JC, and Nicholson JK. Studies of the biochemical toxicology of uranyl nitrate in the rat. *Arch Toxicol.* 68(1): 43-53, 1994.
2. Bleyer AJ, Trachtman H, Sandhu J, Gorry MC, and Hart TC. Renal manifestations of a mutation in the uromodulin (Tamm Horsfall protein) gene. *Am J Kidney Dis.* 42(2): E20-6, 2003.
3. Cans C, Passer BJ, Shalak V, Nancy-Portebois V, Crible V, Amzallag N, Allanic D, Tufino R, Argentini M, Moras D, Fiucci G, Goud B, Mirande M, Amson R, and Telerman A. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(24): 13892-7, 2003.
4. Cebrian C, Areste C, Nicolas A, Olive P, Piulats J, and Meseguer A. Kidney androgen-regulated protein interacts with cyclophilin B and reduces cyclosporine A-mediated toxicity in proximal tubule cells. *J Biol Chem.* 276(31): 29410-9, 2001.
5. Chabardes-Garonne D, Mejean A, Aude JC, Cheval L, Di Stefano A, Gaillard MC, Imbert-Teboul M, Wittner M, Balian C, Anthouard V, Robert C, Segurens B, Wincker P, Weissenbach J, Doucet A, and Elalouf JM. A panoramic view of gene expression in the human kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(23): 13710-5, 2003.
6. Cheval L, Virlon B, Billon E, Aude JC, Elalouf JM, and Doucet A. Large-scale analysis of gene expression: methods and application to the kidney. *J Nephrol.* 15 Suppl 5: S170-83, 2002.
7. Degeorges A, Wang F, Frierson HF Jr, Seth A, and Sikes RA. Distribution of IGFBP-rP1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 48(6): 747-54, 2000.

8. Devarajan P, Mishra J, Supavekin S, Patterson LT, and Steven Potter S. Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. *Mol Genet Metab.* 80(4): 365-76, 2003.
9. Ejniak JW, Hamilton MM, Adams PR, and Carmichael AJ. Optimal sample preparation conditions for the determination of uranium in biological samples by kinetic phosphorescence analysis (KPA). *J Pharm Biomed Anal.* 24(2): 227-35, 2000.
10. El-Meanawy MA, Schelling JR, Pozuelo F, Churpek MM, Ficker EK, Iyengar S, and Sedor JR. Use of serial analysis of gene expression to generate kidney expression libraries. *Am J Physiol Renal Physiol.* 279(2): F383-92, 2000.
11. Elalouf JM, Aude JC, Billon E, Cheval L, Doucet A, and Virlon B. Renal transcriptomes: segmental analysis of differential expression. *Exp Nephrol.* 10(2): 75-81, 2002.
12. Fleck C, Sutter L, Appenroth D, Koch B, Meinhold T, Pitack M, and Gasser R. Use of gene chip technology for the characterisation of the regulation of renal transport processes and of nephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 54(5-6): 401-10, 2003.
13. Fujigaki Y, Sun DF, Goto T, and Hishida A. Temporary changes in macrophages and MHC class-II molecule-expressing cells in the tubulointerstitium in response to uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. *Virchows Arch.* 443(2): 206-16, 2003.
14. Gachet Y, Tournier S, Lee M, Lazaris-Karatzas A, Poulton T, and Bommer UA. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J Cell Sci.* 112(Pt 8): 1257-71, 1999.

15. Hauser P, Schwartz C, Mitterbauer C, Regele HM, Muhlbacher F, Mayer G, Perco P, Mayer B, Meyer TW, and Oberbauer R. Genome-wide gene-expression patterns of donor kidney biopsies distinguish primary allograft function. *Lab Invest* 84(3): 353-61, 2004.
16. Heng YM, Kuo CS, Jones PS, Savory R, Schulz RM, Tomlinson SR, Gray TJ, and Bell DR. A novel murine P-450 gene, Cyp4a14, is part of a cluster of Cyp4a and Cyp4b, but not of CYP4F, genes in mouse and humans. *Biochem J.* 325(Pt 3): 741-9, 1997.
17. Huang Q, Dunn RT2, Jayadev S, DiSorbo O, Pack FD, Farr SB, Stoll RE, and Blanchard KT. Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology. *Toxicol Sci.* 63(2): 196-207, 2001.
18. Kas K, Stickens D, and Merregaert J. Characterization of a processed pseudogene of human FAU1 on chromosome 18. *Gene.* 160(2): 273-6, 1995.
19. Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, Takagaki K, Kaminishi Y, Koba M, Hagidai Y, Murai M, Ohgi T, Yano J, and Tsujimoto G. Global analysis of differentially expressed genes during progression of calcium oxalate nephrolithiasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 296(3): 544-52, 2002.
20. Khanna N, Sen S, Sharma H, and Singh N. S29 ribosomal protein induces apoptosis in H520 cells and sensitizes them to chemotherapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 304(1): 26-35, 2003.
21. Kieran NE, Doran PP, Connolly SB, Greenan MC, Higgins DF, Leonard M, Godson C, Taylor CT, Henger A, Kretzler M, Burne MJ, Rabb H, and Brady HR. Modification of

- the transcriptomic response to renal ischemic/reperfusion injury by lipoxin analog. *Kidney Int.* 64: 480-92, 2003.
22. Kramer DL, Chang BD, Chen Y, Diegelman P, Alm K, Black AR, Roninson IB, and Porter CW. Polyamine depletion in human melanoma cells leads to G1 arrest associated with induction of p21WAF1/CIP1/SDI1, changes in the expression of p21-regulated genes, and a senescence-like phenotype. *Cancer Res.* 61(21): 7754-62, 2001.
 23. Kwon TH, Froklaer J, Huan JS, and Knepper MA. Decreased abundance of major Na⁺ transporters in kidneys of rats with ischemia-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 278: F925-39, 2000.
 24. Leonard I, Zanen J, Nonclercq D, Toubreau G, Heuson-Stiennon JA, Beckers JF, Falmagne P, Schaudies RP, and Laurent G. Modification of immunoreactive EGF and EGF receptor after acute tubular necrosis induced by tobramycin or cisplatin. *Ren Fail.* 16(5): 583-608, 1994.
 25. Li F, Zhang D, and Fujise K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem.* 276(50): 47542-9, 2001.
 26. Liu FT, Patterson RJ, and Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta.* 1572: 263-273, 2002.
 27. MacDonald SM, Rafnar T, Langdon J, and Lichtenstein LM. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science.* 269(5224): 688-90, 1995.
 28. Mavromatidis K, Fytil C, Kynigopoulou P, Fragia T, and Sombolos K. Serum ferritin levels are increased in patients with acute renal failure. *Clin Nephrol.* 49(5): 296-8, 1998.

29. McDonald-Taylor CK, Singh A, and Gilman A. Uranyl nitrate-induced proximal tubule alterations in rabbits: a quantitative analysis. *Toxicol.Pathol.* 25: 381-9, 1997.
30. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, and Devarajan P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 14(10): 2534-43, 2003.
31. Nigam S and Lieberthal W. Acute renal failure. III. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. *Am J Physiol Renal Physiol.* 279(1): F3-F11, 2000.
32. Nishiyama J, Kobayashi S, Ishida A, Nakabayashi I, Tajima O, Miura S, Katayama M, and Nogami H. Up-regulation of galectin-3 in acute renal failure of the rat. *Am J Pathol.* 157(3): 815-23, 2000.
33. Rabinovich GA, Baum LG, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, and Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol.* 23(6): 313-20, 2002.
34. Safirstein R. Gene expression in nephrotoxic and ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 4(7): 1387-95, 1994.
35. Schelling JR, El-Meanawy MA, Barathan S, Dodig T, Iyengar SK, and Sedor JR. Generation of kidney transcriptomes using serial analysis of gene expression. *Exp Nephrol.* 10(2): 82-92, 2002.
36. Schramm L, La M, Heidbreder E, Hecker M, Beckman JS, Lopau K, Zimmermann J, Rendl J, Reiners C, Winderl S, Wanner C, and Schmidt HH. L-arginine deficiency and

- supplementation in experimental acute renal failure and in human kidney transplantation. *Kidney Int.* 61(4): 1423-32, 2002.
37. Sturzenbaum SR, Kille P, and Morgan AJ. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Biochim Biophys Acta.* 1398(3): 294-304, 1998.
 38. Sun DF, Fujigaki Y, Fujimoto T, Yonemura K, and Hishida A. Possible involvement of myofibroblasts in cellular recovery of uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. *Am J Pathol.* 157(4): 1321-34, 2000.
 39. Sun DF, Fujigaki Y, Fujimoto T, Goto T, Yonemura K, and Hishida A. Relation of distal nephron changes to proximal tubular damage in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. *Am J Nephrol.* 22(5-6): 405-16, 2002.
 40. Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC, and Devarajan P. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int.* 63(5): 1714-24, 2003.
 41. Toubeau G, Nonclercq D, Zanen J, Laurent G, Schaudies PR, and Heuson-Stiennon JA. Renal tissue expression of EGF and EGF receptor after ischaemic tubular injury: an immunohistochemical study. *Exp Nephrol.* 2(4): 229-39, 1994.
 42. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, and Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science.* 270(5235): 484-7, 1995.

43. Verstrepen WA, Persy VP, Verhulst A, Dauwe S, and De Broe ME. Renal osteopontin protein and mRNA upregulation during acute nephrotoxicity in the rat. *Nephrol Dial Transplant.* 16(4): 712-24, 2001.
44. Virlon B, Cheval L, Buhler JM, Billon E, Doucet A, and Elalouf JM. Serial microanalysis of renal transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(26): 15286-91, 1999.
45. Wilson EM, Oh Y, Hwa V, and Rosenfeld RG. Interaction of IGF-binding protein-related protein 1 with a novel protein, neuroendocrine differentiation factor, results in neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(9): 4504-11, 2001.
46. Winyard PJ, Bao Q, Hughes RC, and Woolf AS. Epithelial galectin-3 during human nephrogenesis and childhood cystic diseases. *J Am Soc Nephrol.* 8(11)(1647): 57, 1997.
47. Xu A, Bellamy AR, and Taylor JA. Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochem J.* 342(Pt 3): 683-9, 1999.
48. Yano N, Endoh M, Fadden K, Yamashita H, Kane A, Sakai H, and Rifai A. Comprehensive gene expression profile of the adult human renal cortex: analysis by cDNA array hybridization. *Kidney Int.* 57(4): 1452-9, 2000.
49. Yoshida T, Kurella M, Beato F, Min H, Ingelfinger JR, Stears RL, Swinford RD, Gullans SR, and Tang SS. Monitoring changes in gene expression in renal ischemia-reperfusion in the rat. *Kidney Int.* 61(5): 1646-54, 2002a.

50. Yoshida T, Tang SS, Hsiao LL, Jensen RV, Ingelfinger JR, and Gullans SR. Global analysis of gene expression in renal ischemia-reperfusion in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 291(4): 787-94, 2002b.
51. Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, and Kinzler KW. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science.* 276(5316): 1268-72, 1997.

Table 1: List of global analysis studies on the kidney

Study	Methods	Conditions Injury or physiologic	Species and tissue
<i>A. Global analysis studies in ARF</i>			
Huang <i>et al.</i> (2001)	microarray	cisplatin	Rat kidney
Yoshida <i>et al.</i> (2002)	microarray	ischemia-reperfusion	Rat kidney
Yoshida <i>et al.</i> (2002)	microarray	ischemia-reperfusion	Mouse kidney
Supavekin <i>et al.</i> (2003)	microarray	ischemia-reperfusion	Mouse kidney
Mishra <i>et al.</i> (2003)	microarray	ischemia-reperfusion	Rat kidney
	microarray	cisplatin	Mouse kidney
Kieran <i>et al.</i> (2003)	microarray	ischemia-reperfusion	Mouse kidney
Devarajan <i>et al.</i> (2003)	microarray	ischemia-reperfusion	Rat kidney
Hauser <i>et al.</i> (2004)	microarray	ischemia	human kidney
<i>B. Global analysis providing control positive data to validate our SAGE libraries</i>			
Virlon <i>et al.</i> (1999)	SADE*	normal	Mouse kidney
El-Meanawy <i>et al.</i> (2000)	SAGE	normal/ glomerulosclerosis-prone	Mouse kidney
Yano <i>et al.</i> (2002)	microarray	normal	Human kidney
Schelling <i>et al.</i> (2002)	SAGE	normal	Mouse Kidney
Elalouf <i>et al.</i> (2002)	SADE*	normal	Mouse kidney
Cheval <i>et al.</i> (2002)	SADE*	normal	Mouse kidney
Chabardés-Garonne <i>et al.</i> (2003)	SADE*	normal	Human kidney

*SAGE Adaptation for Downsized Extracts

Table 2: SYBR Green (a) and Taq Man primers (b) sequences used for RT PCR reactions.

GeneSymbol	Accession No.	Primer 5' -> 3' sequence	Amplicon size (bp)
<i>a. Primers using SYBR Green detection</i>			
HPRT	NM_013556	Forward 5'-TTGCTGACCTGCTGGATTAC-3' Reverse 5'-CCCGTTGACTGATCATTACA-3'	112
SOD1	XM_128337	Forward 5'-TGGTGGTCCATGAGAAACAA-3' Reverse 5'-TCCCAGCATTTCCAGTCTTT-3'	75
Ftl1	NM_010240	Forward 5'-TGTGCAGAAGCCATCTCAAG-3' Reverse 5'-AGATCCAAGAGGGCCTGATT-3'	99
OPN	NM_009263	Forward 5'-GACCATGAGATTGGCAGTGA-3' Reverse 5'-GGTGCAGGCTGTAAAGCTTC-3'	110
ODC	NM_013614	Forward 5'-TTGCCACTGATGATTCCAAA-3' Reverse 5'-CATGGAAGCTCACACCAATG-3'	129
Calm2	NM_007589	Forward 5'-CATGGCTGACCAACTGACTG-3' Reverse 5'-CCCCAGCTCCTTTGTTGTTA-3'	103
IGFBP7	NM_008048	Forward 5'-GCATCCAGCCACCTTATGAT-3' Reverse 5'-ATCCGAAGAGGAGGAAGAGG-3'	105
Rps29	NM_009093	Forward 5'-ACGGTCTGATCCGCAAATAC-3' Reverse 5'-CATGATCGGTTCCACTTGGT-3'	138
TCTP	NM_009429	Forward 5'-CCGGGAGATCGCGGAC-3' Reverse 5'-TTCCACCGATGAGCGAGTC-3'	92
<i>b. Primers using Taq Man technology</i>		<i>Assay ID (Assay On Demand, Applied Biosystems)</i>	
HPRT	NM_013556	Mm00446968m1	
KAP	NM_010594	Mm00495104m1	
UMOD	NM_009470	Mm00447649m1	
NaPi-II	NM_011392	Mm00441450m1	

Table 3: List of tags with significant variation in expression level induced by UN injection (p<0.05). The table includes their frequency and their relevant accession number.

I.I.a..1.1.1	Tag sequence symbol	Count	Gene name	Accession No.	Regulation (up: +, down: -)	Gene
Apoptosis						
	TGACACAGGA	4 0	cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector B	NM_009894	-	Cideb
	TAGGGCAATC	2 12	SMT3 (supressor of mif two, 3) homolog 2, pseudogene 4	NG_001516	+	Smt3h2-ps4
Amino acid metabolism						
	ATTAACCTGG	4 16	glutamate dehydrogenase	NM_008133	+	Glud
	ATACTAACGT	53 14	ornithine decarboxylase, structural	NM_013614	-	Odc
Carbohydrate metabolism						
	TGGATGCCTT	7 1	alcohol dehydrogenase 1, complex	NM_007409	-	Adh1
	TGGATCTCTG	5 0	carbonic anhydrase 4	NM_007607	-	Car4
	CTATAATGCC	25 8	fructose biphosphatase 1	NM_019395	-	Fbp1
	TTGTTCTGAC	0 6	glucose phosphate isomerase 1 complex	NM_008155	+	Gpi
	CAGTTTGTA	4 0	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1	NM_008810	-	Pdaha1
	ATAAGGGATT	0 6	UDP-galactose translocator 2	NM_016752	+	Ugalt2
Cell adhesion						
	GAAGAAAGGG	10 1	platelet/endothelial cell adhesion molecule	NM_008816	-	Pecam
Cell cycle/mitosis						
	GCGAGGGAGC	4 0	dim1 (S. pombe)	NM_025299	-	Dim-pending
	TGCTGCCATT	0 6	tubulin alpha 6	NM_009448	+	Tuba6
Homeostasis						
	CCCTGGGTTC	32 62	ferritin light chain 1	NM_010240	+	Ftl1
Immunity and defense						
Immunity						
	TTATGGAAT	0 7	CD24a antigen	NM_009846	+	Cd24a
	GTTCAAGTGA	1 9	Ia-associated invariant chain Ag CD74 classe II	NM_010545	+	Ii/CD74
	TAGGGAATGG	0 5	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	NM_010501	+	Ift3
	CTGAGAGATA	1 13	lectin, galactose binding, soluble 3	NM_010705	+	Lgals3/Gal-3
	ATTGGGGGAG	6 18	osteoclast inhibitory lectin	NM_053109	+	ocil-pending
	CAAACACCGT	7 104	secreted phosphoprotein 1	NM_009263	+	Spp1
	TGGGTTGTCT	149 263	translationally regulated transcript (21 kDa),	NM_009429	+	Trt, Tpt1, TCTP
	TTTTATGTTT	12 21	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	NM_009395	+	Tnfaip1
	TATACATCCA	23 69	uromodulin	NM_009470	+	Umod
Antioxidant and free radical removal						
	CTATCCTCTC	419 537	glutathione peroxidase 3	NM_008161	+	Gpx3
	ATGTGGGTG	29 15	peroxiredoxin 1	NM_011034	-	Prdx1
	GGTGAGCCTG	1 8	peroxiredoxin 2	NM_011563	+	Prdx2
	TATCTGTGCA	28 16	selenoprotein P, plasma, 1	NM_009155	-	Sepp1
	AGAAACAAGA	19 6	superoxide dismutase 1, soluble	XM_128337	-	Sod1
	TTGCTTCTAT	12 0	thioether S-methyltransferase	NM_009349	-	Temt
	CTACGTCTC	2 9	thioredoxin-like 2	NM_023140	+	Txn2
Lipid fatty acid and steroid metabolism						
	AGCCCTCGGA	5 0	acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	NM_007383	-	Acads
	TTAAGACCTG	10 21	crystallin, zeta	NM_009968	+	CryZ
	TAGAATAAAC	4 0	cytochrome P450, 2d9	NM_080006	-	Cyp2d9
	TGTGTGGAAT	16 7	cytochrome P450, subfamily IV B, polypeptide 1	NM_007823	-	Cyp4b1
	TGCCAACGCA	25 10	hydroxysteroid dehydrogenase-4	NM_008292	-	Hsd17b4
	AATTTAATTA	5 0	phytanoyl-CoA hydroxylase	NM_010726	-	Phyh

Muscle contraction

TGCAGTCATC	8	1	transgelin	NM_011526	-	Tagln
CTCTGGGGCT	0	6	transgelin 2	NM_178598	+	Tagln2

Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism

CTAGATTGCG	4	0	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	NM_007647	-	Entpd5
AAGAAACCAG	33	16	expressed in non-metastatic cells 2, protein (NM23B) (nucleoside diphosphate kinase)	NM_008705	-	Nme2
GTGTAATAAG	2	8	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	NM_016806	+	Hnrpa2b1
GGGAGCGAAA	16	8	inhibitor of DNA binding 2	NM_010496	-	Idb2
TACTGTCCTG	5	0	RNA polymerase 1-3 (16 kDa subunit)	NM_009087	-	Rpo1-3

Oxydoreductase

AATGGCTAGC	13	5	cytochrome c, somatic	NM_025567	-	Cycc
------------	----	---	-----------------------	-----------	---	------

Protein metabolism and modification

Amino acid activation

GCCAAATAGTG	0	5	endothelial monocyte activating polypeptide 2	NM_007926	-	Emap2/Scye1
-------------	---	---	---	-----------	---	-------------

Protein biosynthesis

TCACCAATA	64	44	eukaryotic translation elongation factor 2	NM_007907	-	Eef2
CTAATAAAGC	34	68	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived)	NM_007990	+	Fau
AGATCTATAC	13	4	ribosomal protein L7	NM_011291	-	Rpl7
AACAATTTG	21	52	ribosomal protein L9	NM_011292	+	Rpl9
GGCAAGCCCC	20	42	ribosomal protein L10A	NM_011287	+	Rpl10a
TGGATCAGTC	77	131	ribosomal protein L19	NM_009078	+	Rpl19
ATTCTCCAGT	13	36	ribosomal protein L23	NM_022891	+	Rpl23
CCCACAAGGT	16	6	ribosomal protein L27	NM_011289	-	Rpl27
GGCTTCGGTC	55	124	ribosomal protein, large, P1	NM_018853	+	Rplp1
TGTAGTGTA	26	52	ribosomal protein S8	NM_009098	+	Rps8
TGGCCCAAA	2	12	ribosomal protein S16	NM_013647	+	Rps16
GCCTTTATGA	24	14	ribosomal protein S24	NM_011297	+	Rps24
TAAAGAGGCC	21	48	ribosomal protein S26	NM_013765	+	Rps26
CTAGTCTTTG	35	81	ribosomal protein S29	NM_009093	+	Rps29

Protein folding

TAAACAGTTGT	5	16	calnexin	NM_007597	+	Canx
GATTGTCAAA	1	11	FK506 binding protein 3 (25kD)	NM_013902	+	Fkbp3
AGAGTTCAGA	13	4	heat shock protein, 60 kDa	NM_010477	-	Hspd1/Hsp60
GAATAATAAA	52	29	heat shock 70kD protein 8	NM_031165	-	Hspa8/Hsp73

Proteolysis

CCTTGCTCAA	11	27	cystatin C	NM_009976	+	Cst3
GAGAGTGTA	13	5	kidney-derived aspartic protease-like protein	NM_008437	-	Kdap
ACCATTATAA	14	7	lysosomal membrane glycoprotein 2	NM_010685	-	Lamp2
TAGCTTCCTC	15	37	sequestosome 1	NM_011018	+	Sqstm1/p62
TGACCCCGGG	51	88	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	NM_019883	+	Uba52
CAGATCTTTG	6	19	ubiquitin C	NM_145578	+	Ubc

Translation regulation

TGAAATACTT	31	15	heat-responsive protein 12	NM_008287	-	Hrsp12
------------	----	----	----------------------------	-----------	---	--------

Signal transduction system, receptor

GCACAACCTG	3	15	calmodulin 2	NM_007589	+	Calm2
GGCTGTTGAA	0	10	cysteine rich protein	NM_007791	+	csrcp1
CATACGCATA	15	3	growth hormone receptor	NM_010284	-	Ghr
GCTGCAGTTG	0	5	guanine nucleotide binding protein, beta 2, related sequence 1	NM_008143	+	Gnb2-rs1
AGAGACAAGG	23	4	N-myc downstream regulated 1	NM_006096	-	Ndrp1
ATCTCCTAGC	0	10	matrix gamma-carboxyglutamate (gla) protein	NM_008597	+	Mglap
AGCACTTTCG	1	10	Mus musculus, serine threonine kinase pim3, clone MGC:27707 IMAGE:4924687		+	
GGCAGATGGA	17	8	parathyroid hormone receptor, PTH R	NM_011199	-	Pthr
TGGGGAAGAG	1	8	phosphatidylethanolamine binding protein	NM_018858	+	Pbp
TAACCAATCA	7	19	RAB5C	NM_004583	+	Rab5c
AAAATTGCTT	14	0	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase	NM_011740	-	Ywhaz

Transport

Electron transport

GCTTTGAATG	40	19	ATPase inhibitor	NM_007512	-	Atpi
GAAGGAAACC	4	0	ATP synthase, H+ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit	NM_016774	-	Atp5b
GCATACGGC	5	12	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1F0	NM_007507	+	Atp5k

		complex, subunit e				
TTATGAAATG	31	58	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1	NM_019443	+	Ndufa1
CTTGCAAGTG	40	26	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 9	NM_023172	-	Ndufb9
Ion transport						
ATGGGATTGA	0	21	glutamate receptor, ionotropic, kainate 1	NM_146072	+	Grik1
AGAGGCTACA	4	0	solute carrier family 21 (organic anion transporter), member 1	NM_013797	-	Slc21a1
GACACATAAC	57	23	solute carrier family 22 (organic cation transporter)-like 2	NM_009203	-	Slc22a2
ACATTTCCAG	5	0	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	NM_011978	-	Slc27a2
TTGTGAGCCA	23	8	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 1	NM_011392	-	Slc34a1
Lipid and fatty acid transport						
GCTCTGATAC	5	0	sterol carrier protein 2, liver	NM_138508	-	Sep2
Others						
GAACCTCTCC	0	5	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) homolog (human)	NM_028717	+	Als2
GAAGATCTAA	5	0	DNA segment, Chr 10, Johns Hopkins University 81 expressed	NM_138601	-	D10jhu81e
GTCGTGCCAT	59	12	DNA segment, Chr 7, Roswell Park 2 complex, expressed	NM_033080	-	D7rp2e
TCATTCTCCA	9	0	erythrocyte protein band 4.1-like 4a	NM_013512	-	Epb4.114a
CTCCTGCAGC	18	41	esterase 10	NM_016903	+	Es10
CTTCTTCTG	0	7	growth arrest specific 6	NM_019521	+	Gas6
TAGCTTTAAA	45	85	insulin-like growth factor binding protein 7	NM_008048	+	Igfbp7
GACTTCACGC	283	91	kidney androgen regulated protein	NM_010594	-	Kap
GCATAGAAAT	22	8	kidney-specific membrane protein	NM_020626	-	Nx17-pending
TAACTGACAA	4	20	metallothionein 2	NM_008630	+	Mt2
TGACCACGGG	1	9	myeloid differentiation primary response gene 88	NM_010851	+	Myd88
GCCCCAATAA	20	12	phosphatidylcholine transfer protein-like	NM_019990	-	Pctpl/Sdccagg28
TAATACTCAA	73	49	upregulated during skeletal muscle growth 5	NM_023211	-	Usmg5

Figure 1: Characterization of UN-induced ARF. (A) Influence of UN on renal function. Blood levels of urea and creatinine and urinary levels of glucose and γ GT are plotted. The bars represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs control. (B) Light micrographs of renal tissue from UN(-) (left panel) and UN(+) (right panel) group given 5 mg/kg UN intraperitoneally. Proximal tubules (PT), sectioned transversely, are lined by high cuboidal or pyramidal epithelium. A slight loss in the brush border (BB), and large vacuoles (arrow) in proximal tubular cells in comparison with control group are depicted (x40). (C) Electron micrographs of tubular cells from UN treated animals are presented. Cellular debris are present in the tubular lumen. Areas with preserved brush border structures (right panel) alternate with areas with a disorganized brush border structures (left panel). Original print magnification was x5,400.

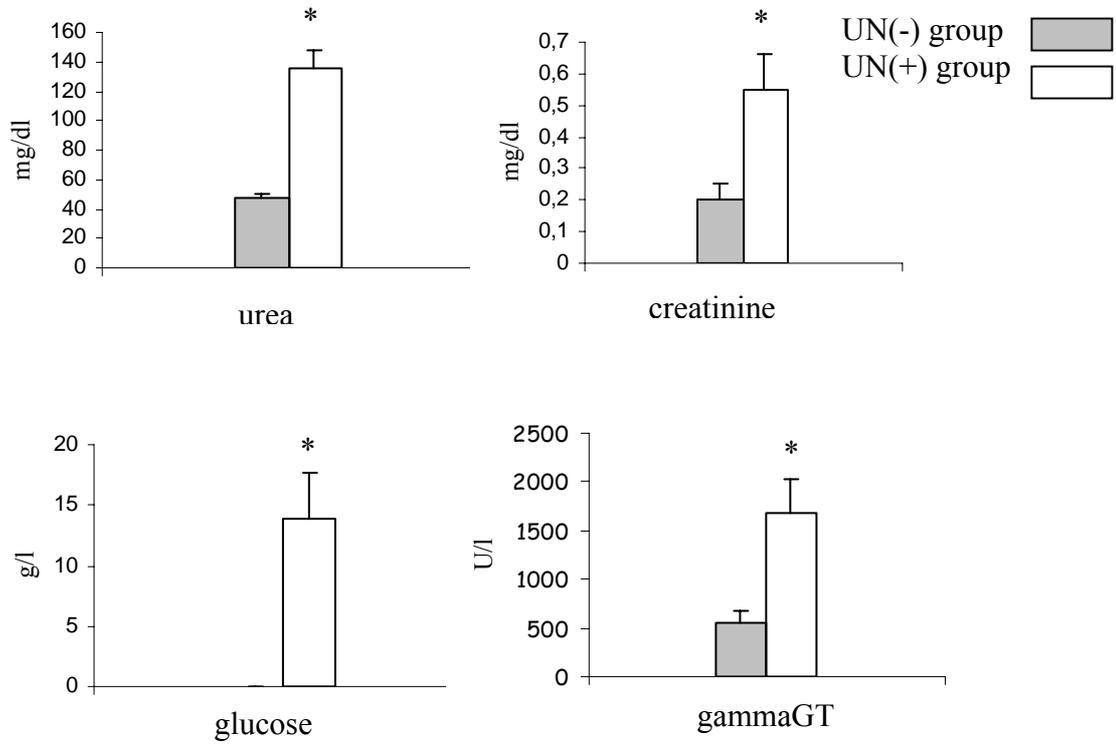
Figure 2: Summary of the SAGE data. The ratio of the number of occurrences for each given unique tag in both libraries (UN (-) and UN (+)) has been calculated. Tags have been grouped according to their expression ratio (X-Axis). The frequency (Y-Axis) plot of this ratio has showing a Gaussian distribution.

Figure 3: Confirmation of SAGE data. (A). Real-time RT-PCR analysis. The y-axis represents the arbitrary units of the amplification of the expression. PCR analyses were performed on cDNA from UN(-) or UN(+) tissues. All values represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs control. (B). Western blot analysis of ODC and Gal-3 proteins in UN(-) and UN(+) tissues. Forty micrograms of total cell protein was loaded per lane on a 10% SDS-polyacrylamide gel, and ODC and Gal-3 were detected by immunoblotting with antibodies against the respective proteins. Representative blots are shown (n=4).

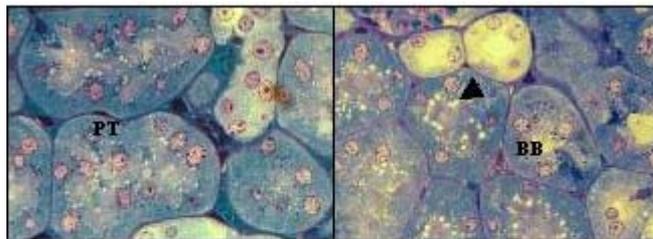
Figure 4: **Hydrogen peroxide release from kidney tissue**. H₂O₂ was produced by UN. Data shown represent means \pm SEM of three independent experiments (n=4).

Figure 1

A.



B.



C.

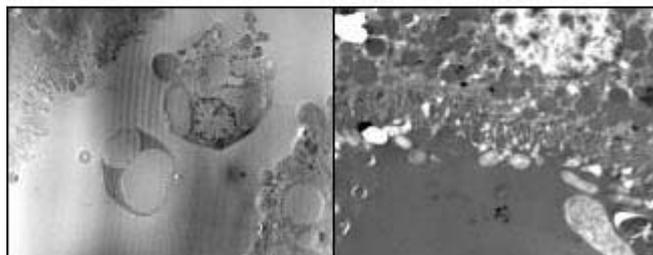


Figure 2

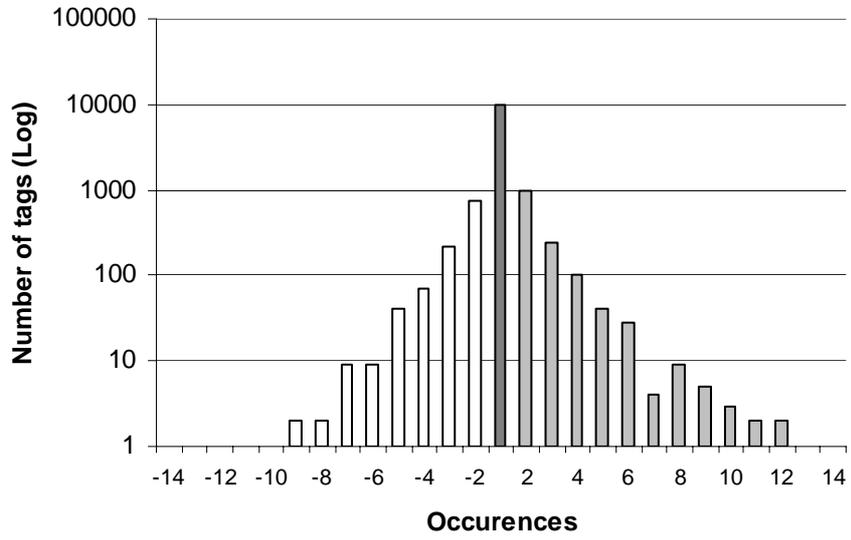
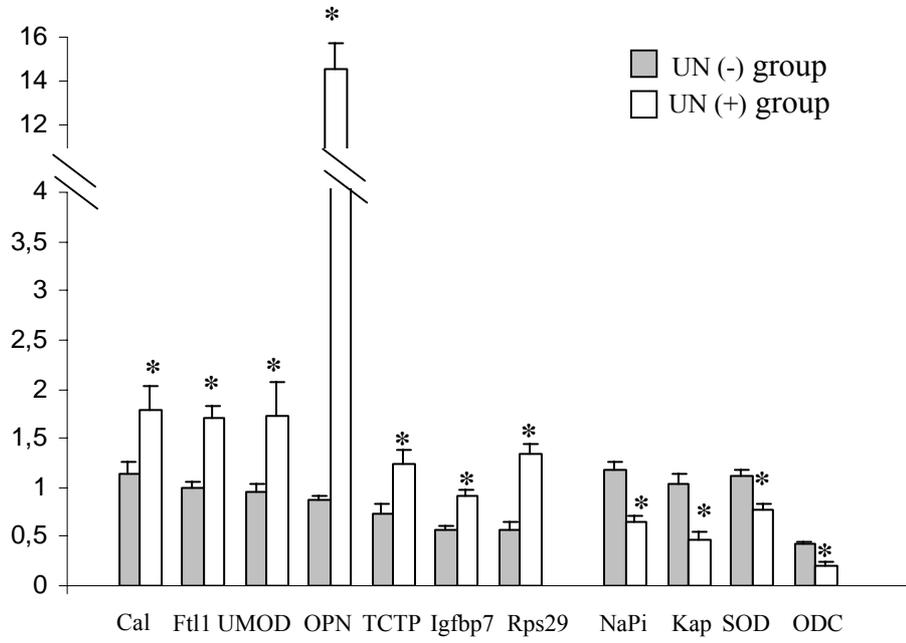


Figure 3

A.



B.

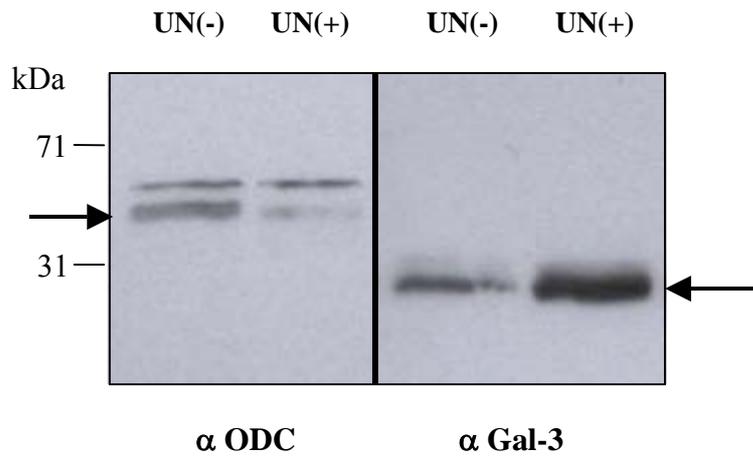
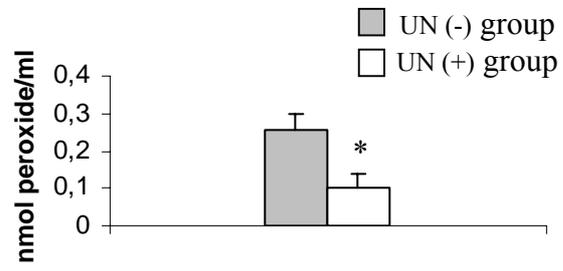


Figure 4



Comme décrit dans l'article, nous avons étudié les réponses toxicogénomiques résultantes d'une injection IP de 5mg/kg de NU *via* l'analyse du transcriptome murin. Nous avons observé des modifications du profil d'expression de nombreux gènes impliqués dans différentes voies cellulaires comme l'inflammation, le stress oxydant, le métabolisme et le catabolisme cellulaire, la transduction du signal, les transporteurs membranaires.... Cependant, il serait intéressant de réaliser d'autres transcriptomes pour évaluer les conséquences moléculaires d'une injection d'U à des temps différents (temps 0, 1, 2, 4, 7 et 9 jours) après l'intoxication. L'étude de ces transcriptomes permettrait de définir quels sont les gènes qui sont impliqués dans les phases d'initiation des altérations induites par le toxique, de progression des lésions et de réparation tissulaire. Une telle approche a déjà été décrite dans le cas de l'insuffisance rénale induite par le cisplatine ou l'ischémie (189-194). En ce qui concerne l'IRA induite par l'U, aucune donnée n'est, à ce jour, disponible. Seules des données sur la fonction rénale et des observations histologiques sont disponibles et montrent que les premières altérations apparaissent dès le deuxième jour et que le pic des lésions se situe entre le quatrième et le septième jour après l'injection d'U (93,115). Afin d'évaluer les conséquences moléculaires d'une contamination aiguë par l'U, au cours du temps, nous avons récemment vérifié par *RT-PCR* quantitative l'expression de certains gènes 9 jours après l'intoxication. Ces études montrent que les variations dans les profils d'expression génique des transcrits codant pour l'ostéopontine (OPN), l'ornithine décarboxylase (ODC) et la protéine ribosomale S29 (Rps29), persistent 9 jours après la contamination. Par contre, l'expression du transcrit *Translationally Controlled Tumor Protein* (TCTP) retourne au niveau basal 9 jours après la contamination (Figure 10).

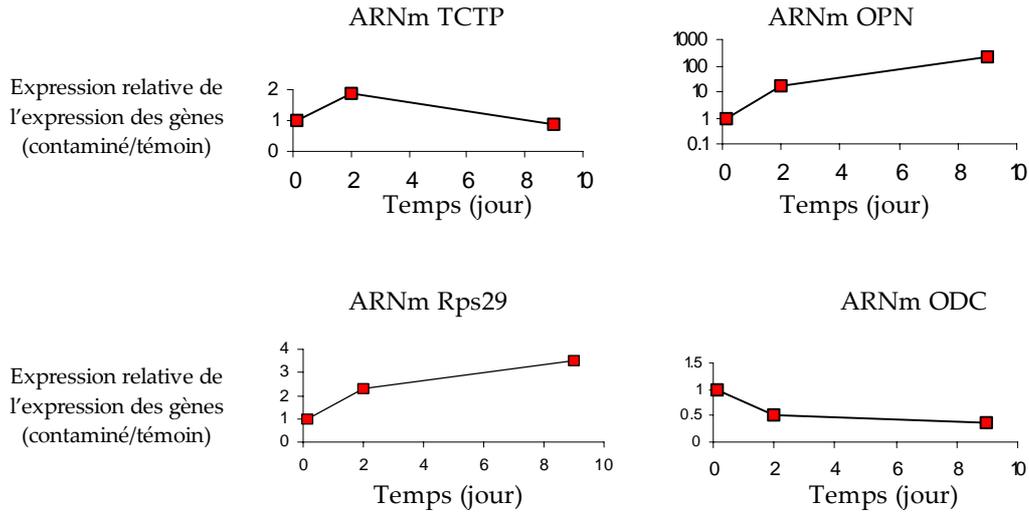


Figure 10 : Variation de l'expression des gènes TCTP, OPN, Rps 29 et ODC, en fonction du temps après l'injection d'uranium, par PCR en temps réel.

Dans le cas de OPN, ce phénomène a déjà été décrit (195). En effet, ce gène code pour une protéine qui participe à l'induction de l'altération de la fonction rénale de part son aspect de médiateur de l'inflammation, et participe également à la réparation des lésions rénales induites par le néphrotoxique (195). Il est parfaitement connu que cette protéine est multifonctionnelle, avec des fonctions qui diffèrent dans le temps et dans l'espace (Figure 11).

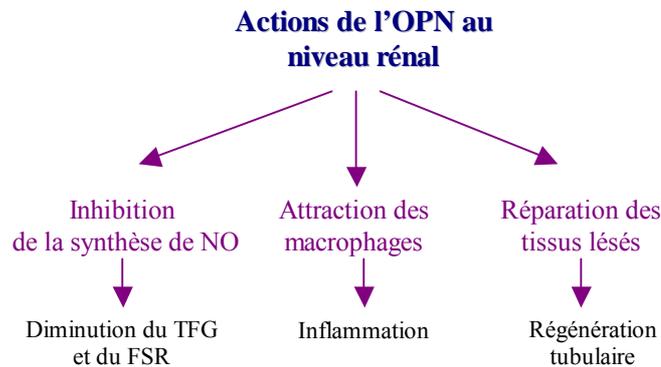


Figure 11 : Rôles connus de l'OPN au niveau rénal, mettant en évidence l'action multifonctionnelle de cette protéine. TGF : Taux de Filtration Glomérulaire, FSR : Flux Sanguin Rénal.

La présence de cette protéine dans le tissu osseux, nous a conduit à l'hypothèse suivante, à savoir que l'ostéopontine pourrait probablement avoir un rôle dans la fixation de l'U dans les os au niveau de l'hydroxyapatite. Une autre hypothèse que nous pourrions faire est que l'inactivation de cette protéine, pourrait permettre de diminuer l'inflammation induite par le toxique au niveau rénal et donc une réparation plus rapide des tissus lésés.

Afin de vérifier plus précisément l'implication de certaines protéines comme la galectine-3 et la TCTP, connues pour être des médiateurs de l'inflammation, nous pourrions réaliser des expériences d'interférence de l'ARN (RNAi) pour inhiber l'expression des gènes étudiés.

II. Conséquences moléculaires d'une contamination chronique à l'uranium.

La toxicité de l'U présent dans l'environnement est une préoccupation grandissante de notre société. Ce risque peut concerner la population. Les eaux, les sols, ainsi que les différents éléments de la chaîne alimentaire peuvent être contaminés par ce métal. Le Canada, et la Finlande se sont tout particulièrement intéressés à ce problème (159,160) et ont mis en évidence des effets modestes mais significatifs, à savoir des altérations de la fonction tubulaire sans conséquences cliniques. Les travaux conduits dans le cadre d'une contamination chronique à l'U, administrée par voie orale, chez des animaux, semblent mettre en évidence des altérations morphologiques plus importantes au niveau rénal (*cf chapitre I-3. L'uranium et le rein, p44*). Cependant, les concentrations utilisées sont largement supérieures à celles qui sont observées dans l'environnement.

Pour évaluer les conséquences moléculaires d'une contamination chronique par l'U, nous avons réalisé le profil d'expression des gènes après exposition chronique à l'U durant quatre mois *via* l'eau de boisson. Pour cela nous avons utilisé une approche de génomique fonctionnelle, la technique *SAGE* qui nous a permis de visualiser les modifications moléculaires en réponse au toxique, au niveau du rein. L'évaluation des paramètres classiques permettant de déterminer les altérations potentielles de la fonction rénale a également été réalisée.

Article

***Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate
insult in mice***

*Magali Taulan, François Paquet, Christophe Maubert, Olivia Delissen,
Jacques Demaille and Marie-Catherine Romey*

Soumis à Environmental Health Perspectives

Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice

Magali Taulan ^{‡¶}, François Paquet [‡], Christophe Maubert [‡], Olivia Delissen [‡], Jacques
Demaille [¶] and Marie-Catherine Romey ^{¶*}

[‡]Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

DRPH / SRBE / LRTOX

Laboratoire de radiotoxicologie expérimentale

Site du Tricastin - BP 166 - 26702 Pierrelatte Cedex, France.

[¶]Institut de Génétique Humaine

Laboratoire de Génétique Moléculaire et Chromosomique.

CNRS UPR 1142

141, Route de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex 05, France.

***Corresponding author:**

Marie-Catherine Romey

Laboratoire de Génétique Moléculaire et Chromosomique.

Institut de Génétique Humaine

141, Route de la Cardonille

34396 Montpellier Cedex 05

phone: (33) 4 67 41 53 64

Fax: (33) 4 67 41 53 65

E-mail: Marie-Catherine.Romey@igh.cnrs.fr

Running title: Genomics fingerprints in response to UN

Key words: **drinking water, mice, long-term exposure, gene expression profiles, SAGE, toxicogenomics, uranyl nitrate.**

Acknowledgements: **The authors would like to thank Marie Claraz-Donnadieu, Fabrice Petitot and Sandrine Frelon for helpful discussions.**

Abbreviations:

γ GT: Gamma Glutamyl Transpeptidase

GPx3: Glutathion Peroxidase 3

KAP: Kidney Androgen regulated Protein

KPA: Kinetic Phosphorescence Analyzer

NaPi-II: Solute carrier family 34 (sodium phosphate member 1)

ODC: Ornithine Decarboxylase

ROS: Reactive Oxygen Species

Rps26: Ribosomal protein S26

SAGE: Serial Analysis of Gene Expression

SOD: Superoxide Dismutase

TCTP: Translationally Controlled Tumor Protein

THP: Tamm-Horsfall Protein

U: Uranium

UMOD: Uromodulin

UN: Uranyl Nitrate

Outline of manuscript section headers:

Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice

Introduction

Materials and methods

- ✓ *Animals*
- ✓ *Assessment of renal function parameters*
 - ✓ *RNA isolation*
 - ✓ *Analysis of gene expression*
 - ✓ *Real-time RT-PCR*
 - ✓ *Peroxides level assessment*

Results

- ✓ *General observation*
- ✓ *Genes responding to toxic UN exposure*
- ✓ *Real-time quantitative PCR analyses*
- ✓ *Peroxides level measurement*

Discussion

- ✓ *Oxidative stress response*
- ✓ *Involvement of gene encoding ion transporters*
- ✓ *Involvement of protein biosynthesis-related genes*
- ✓ *Others genes of interest*

References

Abstract

While the nephrotoxicity of uranium has been established through numerous animals studies, relatively little is known about the effects of long-term environmental uranium exposure. Using a combination of conventional biochemical studies and serial analysis of gene expression, we examined the renal responses to uranyl nitrate chronic exposure. Renal uranium levels were significantly increased four months after ingestion of uranium in drinking water. Creatinine levels in serum were slightly but significantly increased compared to controls. Although, no further significant differences in other parameters were noted, substantial molecular changes were observed in toxicogenomic profiles. UN induced dramatic alterations in expression level of more than 200 genes, mainly up-regulated, including oxidative response related genes, genes encoding for cellular metabolism, ribosomal protein, signal transduction and solute transporters. Seven differentially expressed transcripts were confirmed by real-time quantitative PCR. In addition, significantly increased peroxides levels support the implication of oxidative stress in UN toxicant response. This report highlights the potential of SAGE for the discovery of novel toxicant-induced gene expression alterations. Here, we present, for the first time, a comprehensive view on renal molecular events following uranium long-term exposure.

Introduction

Uranium, the heaviest of the naturally occurring elements, is widely present in the environment as a result of leaching from natural deposits, release in mill tailings, emissions from the nuclear industry, the combustion of coal and other fuels, and the use of phosphate fertilizers and weapons that contain uranium. Thus, uranium is found in various chemical forms and different levels in all soils, rocks, sea and bedrocks (Moss MA et al. 1983; Bosshard E et al. 1992; Kurttio et al. 2002). It is also found in both food and drinking water. The wide range of levels of uranium in drinking water, together with the observation of consistently higher levels in certain community water supplies, has raised concerns regarding the potential hazard of such sources of uranium to human health.

Many isolated studies, conducted on the mechanisms for the toxic effects of uranium at moderate to high acute doses on experimental animals, have shown that the major health effects of uranium is chemical kidney toxicity rather than a radiation hazard (Lin et al. 1993; Miller et al. 1998, 2002). In addition, only a few studies have attempted to characterize the effects of chronic exposure to uranium through drinking water (McDonald-Taylor et al. 1997; Gilman et al. 1998a, 1998b, 1998c; Zamora et al. 1998; Kurttio et al. 2002) . While chronic uranium exposure in humans has been clearly associated with increasing urinary glucose, alkaline phosphatase and β 2-microglobulin supporting proximal tubule alterations, the urinary albumin levels, indicators of glomerular function are conflicting (Kurttio et al. 2002; Zamora et al. 1998). Although both functional and histological damage to the proximal tubules resulting from acute uranium exposure has been clearly demonstrated (Sun et al. 2002; Schramm et al. 2002), little is known about the effect of long-term environmental uranium exposure in both humans and animals (Mao et al. 1995; McDonald-Taylor et al. 1997; Zamora et al. 1998; Kurttio et al. 2002; Gilman et al. 1998a, 1998b, 1998c).

Toxicogenomics is presently used to evaluate risk assessment of environmental toxicants through the identification of gene expression networks, as well as to use toxicant-induced gene expression as a biomarker to assess human exposure. Several scientists are currently combining the identification of gene expression patterns representative of adverse outcomes with traditional biochemical parameters measures to categorize and classify toxic responses through direct comparison in exposed and control samples. The use of oligonucleotide-based or cDNA microarrays for understanding the biochemical processes associated with environmental chemical exposures has proven successful in recent experiments on human health risk assessment for several toxicants (Bartosiewicz et al. 2001; Andrew et al. 2003).

Because the risk assessment and establishment of exposure limits for uranium in drinking water is of considerable importance in various areas including Finland, we used for the first time the SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) approach to identify gene expression profiles associated with this hazard exposure. Toxicogenomics providing increased confidence in extrapolation of hazards observed in animals studies to hazard that are likely to appear in humans, we examined renal molecular effects of chronic exposure to uranium in mice.

Materials and methods

Animals.

Experiments were performed with 16 male C57BL/6J mice, weighing 25-30 g (Harlan, France) at the beginning of the study. The mice were randomly divided into three groups; one control group (group 0) and two uranyl nitrate-treated mice (group 1 and 2). Exposed group 1 and 2 received UN mineral water at concentrations of 80 or 160 mg UN.L⁻¹ of water, respectively. U in water, given to control mice, was determined to be less than 0.002 mg U.L⁻¹. Body weights were measured weekly. Food intake and fluid consumption data were recorded. After 4 months of treatment, all animals were euthanized by exsanguination using cardiac puncture. Urine and blood were collected for each group. The kidneys were either embedded in epon for morphological examination or snap-frozen in liquid nitrogen and then stored at -70°C until further study.

Assessment of renal function parameters. Uranium contents were determined in samples of kidney using kinetic phosphorescence analyzer (KPA) (Ejnik JW et al. 2000). Serum creatinine and urea level and urinary concentrations of glucose, gamma-glutamyltranspeptidase (γ GT) were measured by routine methods.

RNA isolation. Total RNAs, extracted from renal tissue using the RNA isolation mini kit (Qiagen, France) were pooled. The amount of total RNA was determined using a fluorescent nucleic acid stain (RiboGreen RNA Quantitation kit, Molecular Probes).

Analysis of gene expression.

Production of kidney library. Kidney libraries were generated from 50 μ g of total RNA using I-SAGE kit (Invitrogen, France) following the manufacturer's instructions (http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/sage_man.pdf), adapted from initial description ((Velculescu et al. 1995), <http://www.sagenet.org>). Because of budgetary

restriction, SAGE was only performed for both control (UN(-)) and UN-treated mice (UN(+)) (80 mg UN.L⁻¹), *i.e* group 0 and group 1, respectively.

Tag quantification. Concatemer sequences were analyzed by using SAGE software v4.0 (provided by Invitrogen, France) which automatically detects and counts tags from sequence files. SAGE software excludes replicate ditags from the tag sequence catalogue, because the probability of any two tag being coupled in the same ditag is small, even for abundant transcripts. For tag identification, the tag list of each library was matched against a mouse tag database extracted by SAGE software from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Usually, SAGE tag sequences matched more than one transcript. The average p value computed by the SAGE software, based on a Monte Carlo analysis (Zhang et al. 1997), serves as ranking parameter to produce a list of differentially expressed genes. SAGE data for the libraries, described here, are available at GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) (accession nos. GSM24256 and GSM24257). In *Results section*, tags occurrence were arbitrarily noted as follow: tags occurrence in UN(-)/tags occurrence in UN(+).

Real-time RT-PCR. Total RNAs (1µg) from each UN(-) and UN(+) renal tissue (extracted as described above *RNA isolation*) were used to generate cDNA using M-MLV-RT (Invitrogen) according the manufacturer's conditions. Primers and probes specifically designed for selected cDNA using PRIMER EXPRESS software version 2.0 (PE, Applied Biosystems), are listed in table 1. The ABI PRISM 7000 sequence detection system was used for detected real-time RT-PCR products with the SYBR Green I assay according to recommendations of the manufacturer (PE, Applied Biosystems). For two cases, in which we encountered difficulties with the SYBR Green I assay, we used TaqMan probe assays (table 1). Each PCR reaction was optimized to ensure that a single band of the appropriate size was amplified and that no bands corresponding to genomic DNA amplification or primer-dimer pairs were present. The PCR cycling conditions were performed for all samples as follows: 50°C, 2min for AmpErase

UNG incubation, 95°C, 10min for AmpliTaq Gold activation, and 40 cycles for the melting (95°C, 15s) and annealing/extension (60°C for 1min) steps. PCR reactions for each template were done in triplicate in 96-well plates. The comparative Ct method (PE, Applied Biosystems) was used to determine relative quantitation of gene expression for each gene compared to the HPRT control (listed in table 1).

Peroxides level assessment. To determine the impact of UN on the oxidative balance status, we measured peroxides levels by using enzymatic treatment, on the group 0, 1 and 2. Kidney samples were homogenized on ice using a potter in the phosphate buffer (10mM KH₂PO₄, 40mM Na₂HPO₄, 0.01mM EDTA, pH 7.5). The homogenates were centrifuged at 15,000g for 15 min at 4°C to discard any cell debris. The supernatants were immediately used for protein estimation according to the method of Bradford (Bradford et al. 1976). 300 µg of total protein were used for each assay. Spectrometric analyses were used to measure the production of peroxides. All experiments were carried out in triplicates using a Beckman DU 7500 UV/Vis Spectrophotometer.

Results

General observation.

To examine the general parameters, gross endpoints analysis such as body and organ weight changes and histological observations, as well as the dosage of uranium content in renal tissue and biochemical markers, were performed.

No significant dose related effects were observed on body weight gain, food intake, or water consumption. Since the concentrations of UN in the drinking water remained constant through the study, it is natural to assume that the measurement of UN per kilogram body weight decreased with age.

Gross pathological examination was performed in all animals, and the histopathological analysis did not identify any significant differences between control and exposed group.

We observed a significant increase in renal uranium tissue levels in groups 1 and 2 compared to control mice, using a KPA (0.35 ± 0.02 and 1.05 ± 0.210 vs. 0.16 ± 0.04 , respectively).

Compared to controls, there are no significant differences in kidney weights, in any dose group (table 2).

Serum creatinine levels appeared to increase with uranyl nitrate treatment, and group 1 and 2 showed creatinine levels significant higher than controls (0.23 ± 0.02 and 0.25 ± 0.02 vs. 0.12 ± 0.02 , respectively).

Genes responding to toxic UN exposure.

We investigated the transcriptomic response which underlies the induction of the metal-elicited molecular modification in C57/Bl6J mice. The SAGE was used to determine the global genes expression profile in UN toxicity. This approach allows an analysis of genes expression by sequencing of $\approx 21,000$ transcripts from kidney libraries of the groups 0 and 1, which represent 5,252 and 4,069 unique tags, respectively.

We validated both libraries quality by comparison both with previous data on the kidney (Virlon et al. 1999; El-Meanawy et al. 2000; Chabardes-Garonne et al. 2003). For example, known markers for proximal tubules (KAP), thick ascending limbs (UMOD) were evidenced in both libraries. As expected, a large fraction of the most abundant tags matches with widely expressed mitochondrial genes or ribosomal proteins such as ribosomal protein P1 and S26. Because the kidney mass consists predominantly of proximal tubules, a significant fraction of tags mapped to genes known to be expressed in proximal tubular

epithelial cells. In particular, the most abundant transcripts in normal kidney were kidney androgen regulated protein (KAP) and glutathione peroxidase3 (GPx3), in agreement with previous data (El-Meanawy et al. 2000).

Tags which are significantly up- or down-regulated in the UN RNA library are listed in table 3, with their frequency and their relevant accession number. We considered only the transcripts with a significant expression change (p-values <0.05). Considering the large number of sequenced tags, the number of genes expressed in kidney was evaluated by excluding tags matching mitochondrial sequences, tags with multiple matches and non-reliable matches. Tags were arbitrarily separated in categories according to gene function. As illustrated in table 3, most of these changes involved up-regulation. SAGE analysis revealed the expression changes of genes related to lipid metabolism (crystalline, zeta, 9/18; phosphatidic acid phosphatase type 2c, 4/10), carbohydrate metabolism (isocitrate dehydrogenase 2(NADP+), mitochondrial, 12/26; phosphoglycerate kinase 1, 17/31; sorbitol dehydrogenase 1, 25/41) and amino acid metabolism (glutamate dehydrogenase, 1/6; fumarylacetoacetate hydrolase, 4/12; ornithine decarboxylase, 40/24; phenylalanine hydroxylase, 1/8). The UN-induced transcripts mainly consist of gene encoding proteins associated with protein biosynthesis (ribosomal protein S25, 11/28; ribosomal protein S26, 18/29; ribosomal protein, large, P1, 48/68; ribosomal protein L19, 47/66), protein folding (heat shock protein 10 kDa, 4/14) and proteolysis (kallikrein5, 33/41; protein C, 3/10; ubiquitin B, 22/43). Many genes involved in signaling were up-regulated such as hormonal receptors (growth hormone receptor, 7/16; estrogen related receptor, alpha, 4/14; cholecystokinin A receptor, 4/14). Chronic exposure to UN also increased the expression of a number of genes related to oxidative process and detoxification. Among these, cytochrome P450 (Cyp4b1, 14/20) which catalyses the oxidation of a wide variety of substrates, including endogenous lipids and xenobiotics (Heng et al. 1997). Other relevant enzymes under- or

overexpressed, include thioredoxin, mitochondrial (7/0), SOD1 (7/18), thioether S-methyltransferase (20/8). We also mainly observed up-regulation of genes related with ion transporters including solute carrier family 34 (sodium phosphate), member1 (48/91), with electron transporters such as ATPase inhibitor (20/35), ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial Fo complex (subunit c, isoform1, 12/24; subunit f, isoform2 6/16), cytochrome c oxidase (subunit IVa, 33/45; subunit VIIIa, 53/74). Finally, expression level of several genes, in the category related to stress/apoptosis (Bcl2-associated athanogene 1, 11/4; nerve growth factor receptor associated protein 1, 0/6; programmed cell death 6, 3/8), and immunity (Ia-associated invariant chain, 4/12; translationally regulated transcripts, 151/174; uromodulin, 43/26), were changed.

Real-time quantitative PCR analyses.

To validate our SAGE data, we conducted real-time quantitative PCR analyses to verify the differential expression of seven selected genes (Figure 1). Kidney androgen regulated protein (KAP) was chosen because of its high abundance level in the normal and contaminated kidney. Solute carrier family 34 (sodium phosphate, NaPi) member1 (slc34a1, NaPi-II), Superoxide dismutase 1 soluble (SOD1), Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus ubiquitously expressed (Fau) and Translationally regulated transcript (Trt or TCTP) were chosen as they were increased in our data. Uromodulin (UMOD) and ornithine decarboxylase structural (ODC) were chosen because its expression level were decreased in the present study as well as in ischemic ARF or UN-induced chronic renal failure; respectively (Fleck et al. 2003). Using real-time PCR analyses, KAP, NaPi-II, SOD, Fau and TCTP were confirmed to be significantly increased whereas ODC were decreased in chronic exposure to UN. In summary, PCR analysis confirmed the accuracy of the differences in expression level observed in our SAGE analysis.

Peroxides level measurement.

To evaluate whether the variations in both SOD and GPx transcripts, may reflect a potential oxidative stress, we examined the production of H₂O₂. The concentration of H₂O₂ in the kidney was measured and found to be significantly higher in the groups 1 and 2 compared to the control group (4.06±0.06 and 4.39±0.11 vs. 3.3±0.02) (Figure 2). Long-term UN exposure clearly caused the production of H₂O₂ levels in UN groups 1 and 2, in dose dependant fashion.

Discussion

Human exposures to metals such as uranium in both occupational and environmental setting are common occurrences. Uranium exposures are a growing concern in our society. Classically, toxicologists assess potential chronic adverse health outcomes resulting from chemical exposure by using gross endpoints such as body or organ weight changes and histopathological observations. However, the analysis of histological or biochemical markers often does not provide information about the mechanisms involved in toxicant response. The study of molecular mechanisms of toxicant action might provide interesting information to understand their potential adverse effects on human health. Recent technologies such as SAGE, facilitate studies that glean insight into the cellular response to chemical exposure. In environmental monitoring, SAGE could provide not only a method to quickly categorize chemicals and assign a mode of toxic action but also allow more sensitive end points to address specifically gene expression pattern.

Results reported here identify more than 200 genes, out of ≈ 21,000 tags sequenced, for which the expression in kidney changed significantly after UN-long term exposure. The vast majority of these tags represent distinct transcripts, however, some tags, especially those detected only once, may result from PCR or sequencing errors (Velculescu et al. 1997; Zhang et al. 1997). Using classical endpoints examination including histological observation, clinical

and biochemical parameters evaluation, we have only noted a slight alteration in serum creatinine levels. However, at the molecular level, we observed that UN induced changes in expression profiles for oxidative response related genes, genes encoding for ribosomal protein, cellular metabolism, signal transduction and solute transporters. Altered expression of these genes is likely reflect an altered protein product (not determined in the present study).

Oxidative stress response. Reactive oxygen species (ROS) are produced by the metabolism of O₂ in all aerobic cells and are essential for normal cellular signaling functions. However, oxidative stress can occur as a result of either increased ROS generation or depressed antioxidant system or both. Of them, SOD, CAT and GPx constitute the main components of the antioxidant defense system. These antioxidants protect the cell against cytotoxic ROS such as superoxide anions, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. The measurement of peroxides in biological systems is one of the factor allowing to determine the degree of certain free radical present in specific tissues. Recently, Jung *et al.* suggested that H₂O₂ produced by arsenite might activate growth factor receptor by increasing its tyrosine phosphorylation (Jung et al 2003). These data indicated that H₂O₂ might be a pivotal mediator of the tumor-promoting activity of arsenite (Jung 2003). In the present study, we observed that UN induces dose-dependent manner production of H₂O₂. We also observed an increase in Cu, Zn-SOD mRNA level in the kidney. SOD is an enzyme responsible for dismutation of highly reactive superoxide radicals to H₂O₂. Moreover, GPx, which scavenges H₂O₂ and lipid peroxides, had its gene expression level increased, maybe induced by the high concentrations of H₂O₂. Induction of oxidative balance perturbation has been previously described in UN-induced ARF (Schramm et al. 2002). Taken together, these data suggest that UN induces oxidative stress. Exploring this point seems of interest in risks of UN long-term exposure.

Involvement of gene encoding ion transporters. The proximal tubule (especially the S3 segment) and the outer medullary thick ascending limb have been demonstrated to suffer

the most severe injury after toxic and ischemic insult (Sun DF et al. 2000; Kwon et al. 2000). The proximal tubule is the site of reabsorption of approximately two-thirds of the NaCl that enters the tubular fluid by glomerular filtration. Basolateral transport of sodium among the entire nephron and collecting ducts occurs *via* the active Na-K-ATPase pump. The active absorption is mediated by the Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporters (NaPi). NaPi type II are expressed at the apical brush border membranes of the proximal tubules. After acute contamination to UN, we have noted that the abundance of renal NaPi-II transcripts was severely reduced, in agreement with the observed brush border alterations. Surprisingly, after long-term exposure, we found an increase of NaPi mRNA level. Studying a model of hypophosphatemia, Moz *et al* (Moz et al. 1999) also observed that phosphate regulates gene expression with an increase in NaPi-II mRNA level. On the other hand, Na-K-ATPase expression level is down-regulated after UN long-term ingestion. The decreased transcription of Na-K-ATPase mRNA, after ischemic injury, indicates that its expression may be dysregulated and thus play a role in the impaired proximal tubular sodium reabsorption in postischemic kidneys (Kwon et al. 2000). However, the role of these proteins in response to UN exposure remains unclear and warrants additional investigation.

Involvement of protein biosynthesis-related genes. Interestingly, many ribosomal subunits and other factors involved in protein synthesis (elongation factor) were induced upon UN treatment. Ribosomal proteins are major component of ribosomes that catalyze protein biosynthesis in the cytoplasm of cells. Under normal growth conditions, ribosomal proteins are synthesized stoichiometrically, in relation with ribosomal RNA, to produce equimolar supply of ribosomal components. However, regulation of the transcriptional activity of the genes encoding for ribosomal protein in differentiated human tissues appears to be less concertedly regulated than previously reported (Bortoluzzi et al. 2001). Recent progress in ribosome research provides growing evidence that ribosomal proteins can also have a function

during various cellular processes such as replication, transcription, RNA processing, DNA repair, and even inflammation; all these functions being independent of their own involvement in the protein biosynthesis (Wool 1996; Yamamoto 2000). In the present work, up-regulation of transcripts for several ribosomal proteins such as Rpl13a, Rpl19, Rpl30, Rplp1, Rps24 and Rps26 has been observed. This latter has been described as a marker to differentiate either ozone or UV-B radiation environmental stresses in plants (Brosché and Strid 1999). Whereas Rps4, Rpl19 and Rps18 have been involved in regulation of the development (Wool 1996), Rpl13a, Rps18 and Rps24 has been associated in the maturation of mucosal epithelia (Kasai et al. 2003). Moreover, these latter was markedly decreased in colorectal cancer (Kasai et al. 2003). Taken together, these observations offer a new putative way of investigation for the study of chronically UN exposure.

Others genes of interest. ODC, described as the rate-limiting enzyme of polyamine biosynthesis and a marker of G1 phase, is down-regulated in long-term UN exposure. Recently, Fleck *et al*, also observed a decrease in ODC expression level 10 weeks after a single injection of UN (Fleck et al. 2003). Kramer *et al* have showed that a depletion of polyamine pool, through inhibition of ODC, causes p21-mediated G1 cell cycle arrest, followed by development of a senescence-like phenotype and loss of cellular proliferative capacity (Kramer et al. 2001). Therefore, the decrease in ODC mRNA level might be related to an arrest of cell cycle following UN treatment. Of particular interest, uromodulin (Tamm-Horsfall protein) was decreased in the present study. This protein, is one of the most abundant in the renal tubule (Bachmann et al. 1990). Moreover, expression level of UMOD has been previously reported to decrease in ischemic-induced ARF (Yoshida et al. 2002). Unexpectedly, in previous work performed in our laboratory, we showed that its expression level was increased in UN-induced ARF. In addition, an up-regulation of UMOD has been observed in the progression of nephrolithiasis (Katsuma et al. 2002). However, the role of this

protein remains unclear and requires additional investigation. Finally, and perhaps more interestingly, TCTP, a cytoplasmic protein usually found in both normal and tumor cell lines, is overexpressed after UN long-term ingestion. It was identified as an antiapoptotic protein (Li et al. 2001). TCTP is associated with components of the translational machinery, the elongation factors implicated in tumor formation (Cans et al. 2003). The implication of this protein in potentially adverse health effects remains to be elucidated.

In summary, by using SAGE, we elegantly demonstrated that UN chronic exposure induces changes in expression profiles. The present report provide the first evidence that UN alter the expression of numerous genes including those encoding for oxidative stress-related proteins, ribosomal protein, solute transporter and genes involved in cellular metabolism or signal transduction (Figure 3). Although, these molecular changes, resulting from a subclinical toxicity, do not systematically lead to kidney failure or overt illness, our results might constitute a determining step in the identification of sensitive biomarkers to prevent the development of a UN-induced renal injury. Moreover, although human biology is ideally, studies are neither feasible nor ethical. Thus, the vast majority of current biomedical research is conducted using mice and rats. However, we must keep in mind that extrapolation to human might have some bias, because of the fact that human can be exposed to many compounds simultaneously, often on a chronic or intermittent basis. Then, the use of throughput genomic approaches after long-term exposure to mixtures of toxicants, might enlighten on the assessment of interactions such as additivity, synergism, or antagonism. The comparison of gene expression profiles could help to identify putative new sensitive biomarkers of chronic nephrotoxicity and then evaluate the impact of environmental toxic contaminants on human health.

References

- Andrew AS, Warren AJ, Barchowsky A, Temple KA, Klei L, Soucy NV et al. 2003. Genomic and Proteomic Profiling of Responses to Toxic Metals in Human Lung Cells. *Environ Health Perspect* 111:825-838.
- Bachmann S, Metzger R, Bunnemann B. Tamm-Horsfall protein-mRNA synthesis is localized to the thick ascending limb of Henle's loop in rat kidney. 1990. *Histochemistry*. 94(5):517-23.
- Bartosiewicz MJ, Jenkins D, Penn S, Emery J, Buckpitt A. 2001. Unique gene expression patterns in liver and kidney associated with exposure to chemical toxicants. *J Pharmacol Exp Ther* 297:895-905.
- Bortoluzzi S, Alessi F, Romualdi C, Danieli GA. 2001. Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues. *Bioinformatics* 17:1152-57.
- Bosshard E, Zimmerli B, Schalatter C. 1992. Uranium in diet: risk assessment of its nephro- and radiotoxicity. *Chemosphere* 24(3):309-321.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Brosché M and Strid A. 1999. The mRNA-binding ribosomal protein S26 as a molecular marker in plants: molecular cloning, sequencing and differential gene expression during environmental stress. *Biochim Biophys Acta*. 1445(3):342-4.
- Cans C, Passer BJ, Shalak V, Nancy-Portebois V, Crible V, Amzallag N et al. 2003. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation

inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(24):13892-7.

Chabardes-Garonne D, Mejean A, Aude JC, Cheval L, Di Stefano A, Gaillard MC et al. 2003. A panoramic view of gene expression in the human kidney. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(23):13710-5.

Ejnik JW, Hamilton MM, Adams PR, Carmichael AJ. 2000. Optimal sample preparation conditions for the determination of uranium in biological samples by kinetic phosphorescence analysis (KPA). J Pharm Biomed Anal. 24(2):227-35.

El-Meanawy MA, Schelling JR, Pozuelo F, Churpek MM, Ficker EK, Iyengar S et al. 2000. Use of serial analysis of gene expression to generate kidney expression libraries. Am J Physiol Renal Physiol. 279(2):F383-92.

Fleck C, Sutter L, Appenroth D, Koch B, Meinhold T, Pitack M et al. 2003. Use of gene chip technology for the characterisation of the regulation of renal transport processes and of nephrotoxicity in rats. Exp Toxicol Pathol. 54(5-6):401-10.

Gilman AP, Villeneuve DC, Secours VE, Yagminas AP, Tracy BL, Quinn JM et al. 1998a. Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. Toxicol Sci. 41(1):117-28.

Gilman AP, Villeneuve DC, Secours VE, Yagminas AP, Tracy BL, Quinn JM et al. 1998b. Uranyl nitrate: 91-day toxicity studies in the New Zealand white rabbit. Toxicol Sci. 41(1):129-37.

- Gilman AP, Moss MA, Villeneuve DC, Secours VE, Yagminas AP, Tracy BL et al. 1998c. Uranyl nitrate: 91-day exposure and recovery studies in the male New Zealand white rabbit. *Toxicol Sci.* 41(1):138-51.
- Heng YM, Kuo CS, Jones PS, Savory R, Schulz RM, Tomlinson SR et al. 1997. A novel murine P-450 gene, Cyp4a14, is part of a cluster of Cyp4a and Cyp4b, but not of CYP4F, genes in mouse and humans. *Biochem J.* 325 (Pt 3):741-9.
- Jung DK, Bae GU, Kim YK, Han SH, Choi WS, Kang H et al. 2003. Hydrogen peroxide mediates arsenite activation of p70(s6k) and extracellular signal-regulated kinase. *Exp Cell Res.* 290(1):144-54.
- Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, Takagaki K, Kaminishi Y, Koba M et al. 2002. Global analysis of differentially expressed genes during progression of calcium oxalate nephrolithiasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 296(3):544-52.
- Kramer DL, Chang BD, Chen Y, Diegelman P, Alm K, Black AR et al. 2001. Polyamine depletion in human melanoma cells leads to G1 arrest associated with induction of p21WAF1/CIP1/SDI1, changes in the expression of p21-regulated genes, and a senescence-like phenotype. *Cancer Res.* 61(21):7754-62.
- Kurttio P, Auvinen A, Salonen L, Saha H, Pekkanen J, Makelainen I et al. 2002. Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 110(4):337-42.
- Kwon TH, Froklaer J, Huan JS, Knepper MA. 2000. Decreased abundance of major Na⁺ transporters in kidneys of rats with ischemia-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 278:F925-39.

- Li F, Zhang D, Fujise K. 2001. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem.* 276(50):47542-9.
- Lin RH, Wu LJ, Lee CH, Lin-Shiau SY. 1993. Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res.* 319(3):197-203.
- Mao Y, Desmeules M, Schaubel D, Berude D, Dyck R, Brule D et al. 1995. Inorganic components of drinking water and microalbuminuria. *Environ Res* 71(2):135-40.
- McDonald-Taylor CK, Singh A, Gilman A. 1997. Uranyl nitrate-induced proximal tubule alterations in rabbits: a quantitative analysis. *Toxicol.Pathol.* 25(4):381-9.
- Miller AC, Fuciarelli AF, Jackson WE, Ejniak EJ, Emond C, Strocko S et al. 1998. Urinary and serum mutagenicity studies with rats implanted with depleted uranium or tantalum pellets. *Mutagenesis.* 13(6):643-8.
- Miller AC, Stewart M, Brooks K, Shi L, Page N. 2002. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *J Inorg Biochem.* 91(1):246-52.
- Moss MA, McCurdy RF, Dooley KC, Givner ML, Dymond LC, Slayter JM et al. 1983. Uranium in drinking water-report on clinical studies in Nova Scotia. Dans : *Chemical toxicology and clinical chemistry of metals.* S.S. Brown et J. Savory (eds.). Academic Press, London. 149-152.
- Moz Y, Silver J, Naveh-Many T. 1999. Protein-RNA interactions determine the stability of the renal NaPi-2 cotransporter mRNA and its translation in hypophosphatemic rats. *J Biol Chem.* 274(36):25266-72.

- Schramm L, La M, Heidbreder E, Hecker M, Beckman JS, Lopau K et al. 2002. L-arginine deficiency and supplementation in experimental acute renal failure and in human kidney transplantation. *Kidney Int.* 61(4):1423-32.
- Sun DF, Fujigaki Y, Fujimoto T, Yonemura K, Hishida A. 2000. Possible involvement of myofibroblasts in cellular recovery of uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. *Am J Pathol.* 157(4):1321-34.
- Sun DF, Fujigaki Y, Fujimoto T, Goto T, Yonemura K, Hishida A. 2002. Relation of distal nephron changes to proximal tubular damage in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. *Am J Nephrol.* 22(5-6):405-16.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science.* 270(5235):484-7.
- Velculescu VE, Zhang L, Zhou W, Vogelstein J, Basrai MA, Bassett DE Jr et al. 1997. Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 88:243-51.
- Virlon B, Cheval L, Buhler JM, Billon E, Doucet A, Elalouf JM. 1999. Serial microanalysis of renal transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(26):15286-91.
- Wool IG. 1996. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *TIBS* :164-65.
- Yamamoto T. 2000. Molecular mechanism of monocyte predominant infiltration in chronic inflammation: mediation by a novel monocyte chemotactic factor, S19 ribosomal protein dimer. *Pathol Int* 50(11):863-71.
- Yoshida T, Kurella M, Beato F, Min H, Ingelfinger JR, Stears RL et al. 2002. Monitoring changes in gene expression in renal ischemia-reperfusion in the rat. *Kidney Int.* 61(5):1646-54.

Zamora ML, Tracy BL, Zielinski JM, Meyerhof DP, Moss MA. 1998. Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol Sci.* 43(1):68-77.

Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR et al. 1997. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science.* 276(5316):1268-72.

Table 1. SYBR Green (a) and Taq Man primers (b) sequences used for RT PCR reactions.

GeneSymbol	Accession No.	Primer 5' -> 3' sequence	Amplicon size (bp)
<i>a. Primers using SYBR Green detection</i>			
HPRT	NM_013556	Forward 5'-TTGCTGACCTGCTGGATTAC-3' Reverse 5'-CCCGTTGACTGATCATTACA-3'	112
SOD1	XM_128337	Forward 5'-TGGTGGTCCATGAGAAACAA-3' Reverse 5'-TCCCAGCATTCCAGTCTTT-3'	75
ODC	NM_013614	Forward 5'-TGCCACTGATGATTCCAAA-3' Reverse 5'-CATGGAAGCTCACACCAATG-3'	129
Fau	NM_007990	Forward 5'-GCTGGGAGGTAAAGTTCACG-3' Reverse 5'-TGTA CTGCATTGCGCTCTTG-3'	125
TCTP	NM_009429	Forward 5'-CCGGGAGATCGCGGAC-3' Reverse 5'-TTCCACCGATGAGCGAGTC-3'	92
<i>b. Primers using Taq Man technology</i>			
		<i>Assay ID (Applied Biosystems)</i>	
HPRT	NM_013556	Mm00446968m1	
KAP	NM_010594	Mm00495104m1	
NaPi-II	NM_011392	Mm00441450m1	
UMOD	NM_009470	Mm00447649m1	

Table 2. Physiological parameters in serum, urine and uranium amount in control (group 0) and contaminated (groups 1 and 2) groups, following four-months of daily contamination.

Group number	0	1	2
Exposure (mg UN.L ⁻¹)	0	80	160
Kidney			
Weight (g)	0.47±0.01	0.46±0.01	0.47±0.02
Uranium amount(µg.g ⁻¹)	0.16±0.04	0.35±0.02*	1.05±0.21*
Serum			
Urea (mg.dl ⁻¹)	59±5	57±5	54±7
Creatinine (mg.dl ⁻¹)	0.12±0.02	0.23±0.02*	0.25±0.02*
Urine			
Glucose (g.L ⁻¹)	0.08±0.03	0.08±0.03	0.04±0.01
GammaGT (U.L ⁻¹)	86±44	94±42	119±66

All values represent the mean ± SEM. *p<0.05 vs control. n=4.

Table 3. List of tags with significant variation in expression level induced by UN long-term ingestion ($p < 0.05$). The table includes their frequency and their relevant accession number.

Tag sequence	Count	Gene name	Accession no.	Regulation (Up: +/down: -)	Gene symbol	
Apoptosis						
GCTGCCAGGG	11	4	Bcl2-associated athanogene 1	NM_009736	-	Bag1
GAAAGCAATG	0	6	nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1	NM_009750	+	Ngfrap1
TGCCTTACTT	3	8	programmed cell death 6	NM_011051	+	Pdcd6
Amino acid metabolism						
CGTATCTGTA	4	10	D-amino acid oxidase	NM_010018	+	Dao1
CAGTTACAAA	1	6	glutamate dehydrogenase	NM_008133	+	Glud
TTTTACCTGC	0	8	glycine amidinotransferase			
			(L-arginine:glycine amidinotransferase)	NM_025961	+	Gatn
CTACCACTGC	4	12	fumarylacetoacetate hydrolase	NM_010176	+	Fah
ATACTAACGT	40	24	Ornithine decarboxylase, strcutral	NM_013614	-	Odc
AACAGAAAGT	1	8	phenylalanine hydroxylase	NM_008777	+	Pah
Carbohydrate metabolism						
GCAAACAAGA	11	18	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	NM_173011	+	Idh2
GTGCCATATT	12	26	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	NM_173011	+	Idh2
CCAAATAAAA	17	31	lactate dehydrogenase 1, A chain	NM_010699	+	Ldh1
TGATATGAGC	33	12	lactate dehydrogenase 2, B chain	NM_008492	-	Ldh2
TTGITAGTGC	70	89	malate dehydrogenase, soluble	NM_008492	+	Mor2
GCAATCTGAT	17	31	phosphoglycerate kinase 1	NM_008828	+	Pgk1
GCCCAGACCT	25	41	sorbitol dehydrogenase 1	NM_146126	+	Sdh1
GCTTGTGACG	1	8	transaldolase 1	NM_011528	+	Taldo1
Cell adhesion						
CTCTGACTTA	3	8	basigin	NM_009768	+	Bsg
GAGACTAGCA	4	10	transmembrane 4 superfamily member 8	NM_019793	+	Tob1
Immunity and defense						
Immunity						
GTCAAGTGA	4	12	Ia-associated invariant chain	NM_010545	+	Ii
TATCTGAAT	14	2	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	NM_010738	-	Ly6a
TTTTATGTTT	12	20	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	NM_009395	+	Tnfaip1
TATACATCCA	43	26	uromodulin	NM_009470	-	Umod
TGGGTTGCT	151	174	Translationally regulated transcript (21 kDa)	NM_009429	+	Trt,Tpt1,Tctp
Antioxidant and free radical removal						
CTATCCTCTC	297	341	glutathione peroxidase 3	NM_008161	+	Gpx3
CAGCTTCGAA	12	2	glutathione S-transferase, theta 2	NM_010361	-	Gstt2
AGAAACAAGA	7	18	superoxide dismutase 1, soluble	XM_128337	+	Sod1
TGCTTCTAT	20	8	Thioether S-methyltransferase	NM_009349	-	Temt
CATCAGCCTC	7	0	thioredoxin, mitochondrial	NM_019913	-	Txn2
Lipid fatty acid and steroid metabolism						
TCTCCTTAGC	0	10	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	NM_008991	+	Abcd3
TTAAGACCTG	9	18	crystallin, zeta	NM_009968	+	CryZ
TATAATAAAC	0	8	cytochrome P450, 2d9	NM_080006	+	Cyp2d9
TGTGTGGAAT	14	20	cytochrome P450, subfamily IV B, polypeptide 1	NM_007823	+	Cyp4b1
GGAGGGTGTG	4	10	phosphatidic acid phosphatase type 2c	NM_015817	+	Ppap2c
Protein metabolism and modification						
Protein folding						
CCTCCITTTT	4	14	heat shock 10 kDa protein 1 (chaperonin 10)	NM_008303	+	Hspe1
Protein biosynthesis						
GATGTGGCTG	7	22	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	NM_018796	+	Esf1b2
TCACCCAATA	36	49	eukaryotic translation elongation factor 2	NM_007907	+	Eef2
CTAATAAAGC	18	43	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived)	NM_007990	+	Fau
TGTCATCTAG	7	14	laminin receptor 1 (67kD, ribosomal protein SA)	NM_011029	+	Lamr1
TGCTGGGATG	6	16	mitochondrial ribosomal protein S12	NM_011885	+	Mrps12
AGGTCGGGTG	7	14	ribosomal protein L13a		+	Rpl13a
TGGATCAGTC	47	66	ribosomal protein L19	NM_009078	+	Rpl19
CCAGAACAGA	7	20	ribosomal protein L30	NM_009078	+	Rpl30
GGCTTCGGTC	48	68	ribosomal protein, large, P1	NM_018853	+	Rplp1
GTGAAACTAA	36	45	ribosomal protein S4, X-linked	NM_009094	+	Rps4x
CTGGGCGTGT	3	8	ribosomal protein S15	NM_009091	+	Rps15
GTGGGCGTGT	0	6	ribosomal protein S15		+	Rps15
CAGAACCCAC	0	6	ribosomal protein S18	NM_138946	+	Rps18
GCCTTTATGA	4	10	ribosomal protein S24	NM_011297	+	Rps24
AACAGGTTC	11	18	ribosomal protein S25	NM_024266	+	Rps25
TAAAGAGGCC	18	29	ribosomal protein S26	NM_013765	+	Rps26
Proteolysis						
GGTTAAATGT	1	8	cathepsin L	NM_009984	+	Ctsl

CAGCAAAAA	33	41	kallikrein 5	NM_008456	+	Klk5
GAGAGTGTGA	6	14	kidney-derived aspartic protease-like protein	NM_008437	+	Kdap
CAGAATGGAA	14	29	peptidase 4	NM_008820	+	Pep4
AGGCGGGATC	3	8	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 7	NM_011969	+	Psma7
CAACAAACAT	3	10	protein C	NM_008934	+	Proc
GTAAGCAAAA	22	43	ubiquitin B	NM_011664	+	Ubb
Signal transduction system, receptor						
TGGGACTCAC	4	14	cholecystokinin A receptor	NM_009827	+	Cckar
AGAAAAAAA	7	14	ciliary neurotrophic factor receptor	NM_016673	+	Cntfr
TGATTTTGT	1	10	disabled homolog 2 (Drosophila)	NM_023118	+	Dab2
GGGCAAGCCA	4	14	estrogen related receptor, alpha	NM_007953	+	Esrra
CATACGCATA	7	16	growth hormone receptor	NM_010284	+	Ghr
TTAAGAGGGA	12	0	transducer of ErbB-2.1	NM_009427	-	
Transport						
Electron transport						
GCTTTGAATG	20	35	ATPase inhibitor	NM_007512	+	Atpi
CCAGTCCTGG	12	24	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 1	NM_007506	+	Atp5g1
GTTCTTTCGT	3	8	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 2	NM_026468	+	Atp5g2
GCCGAGCATA	6	16	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit f, isoform 2	NM_020582	+	Atp5j2
GATAGATAAT	3	8	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1	NM_007505	+	Atp5a1
CTAATAAAAG	33	45	cytochrome c oxidase, subunit IVa	NM_009941	+	Cox4a
TATTGGCTCT	53	74	cytochrome c oxidase, subunit VIIIa	NM_007750	+	Cox8a
AGGGCACTGG	3	8	cytochrome c oxidase, subunit XVII assembly protein homolog		+	
CAGAATGTGC	3	8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 2	NM_010885	+	Ndufa2
TTATGAAATG	15	24	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1	NM_019443	+	Ndufa1
ACTGCTTTTC	1	10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 7	NM_023202	+	Ndufa7
Ion transport						
TTCTAGCATA	28	10	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	NM_009721	-	Atp1b1
CTAGTACTCG	48	91	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 1	NM_011392	+	Slc34a1
ACAAATTATG	1	8	voltage-dependent anion channel 2	NM_011695	+	Vdac2
Lipid fatty acid transport						
GCTCTGATAC	0	8	sterol carrier protein 2, liver	NM_138508	+	Sep2
Others						
TGCTTTTACG	7	20	6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1)	NM_025273	+	Pebd
ATTACGGTGG	7	18	aldo-keto reductase family 1, member A4 (aldehyde reductase)	NM_021473	+	Akr1a4
AAGACCTATG	12	2	diazepam binding inhibitor	NM_007830	-	Dbi
CTCCTGCAGC	15	29	esterase 10	NM_016903	+	Es10
ATCTGACTCC	3	10	hemoglobin Y, beta-like embryonic chain	NM_008221	+	Hbb
TAAAGCAAAA	20	43	H2B histone family, member S	NM_023422	+	Hist1h2bc
GACTTCACGC	155	182	kidney androgen regulated protein	NM_010594	+	Kap
GCACGAGCGT	7	0	low density lipoprotein receptor-related protein 2	XM_130363	-	Lrp2
TGCTGTGACC	9	16	membrane-associated protein 17 pending	NM_026018	+	Map17-
TGTGCTTCCC	4	12	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 8	NM_008683	+	Nedd8
TGAGCGCTGC	15	24	PDZ domain containing 1	NM_021517	+	Pdzk1
GGGGAGGGGG	7	0	pre B-cell leukemia transcription factor 2	NM_017463	-	Pbx2
GGCTGGGGGC	3	10	profilin 1	NM_011072	+	Pfn1
AAGTAAAGCG	6	12	SEC61, gamma subunit (S. cerevisiae)	NM_011343	+	Sec61g
CAGCCTGAGC	4	10	selenoprotein R	NM_013759	+	Sepr
TTTCCAGGTG	1	8	selenoprotein W, muscle 1	NM_009156	+	Sepw1

Figure 1: Confirmation of SAGE data by Real-time RT-PCR analysis. The variation of the amplification of the expression in both groups (UN(-)/UN(+)) are plotted. PCR analyses were performed on cDNA from UN(-) or UN(+) tissues.

Figure 2: Hydrogen peroxide release from kidney tissue. H₂O₂ was produced by UN in a dose-dependent manner. Data shown represent means ± SEM of three independent experiments (n=4).

Figure 3: Cellular pathways triggered in response to UN long-term exposure. Some genes or molecules, which present an altered expression level following uranium ingestion, emphasize the implication of these cellular processes in UN long-term exposure (bracket).

Figure 1

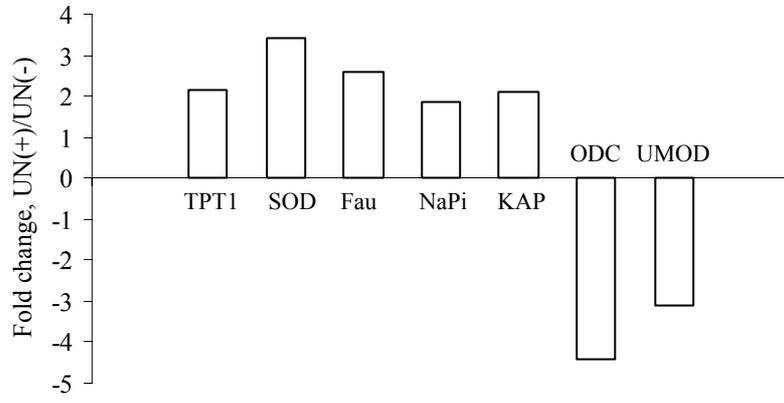


Figure 2

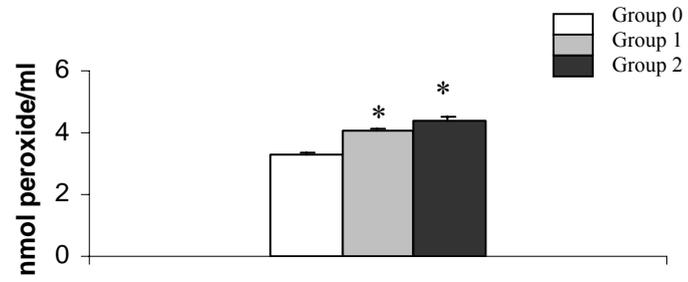
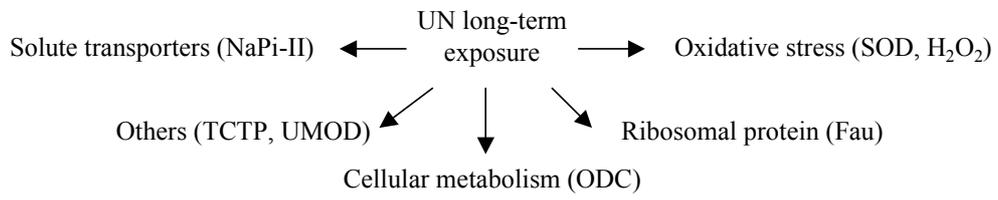


Figure 3



A ce jour, très peu de données sont disponibles sur les conséquences d'une exposition chronique à l'U *via* l'eau de boisson. Bien que la fonction rénale ne semble pas atteinte, l'utilisation d'outils, plus sensible que les dosages de marqueurs physiologiques et les analyses histologiques, comme les techniques de toxicogénomique, nous a permis de montrer que l'U, administré quotidiennement, induit des modifications moléculaires significatives. En effet, l'analyse des données *SAGE* montre une modification du profil d'expression de nombreux gènes qui codent pour des protéines impliquées dans de nombreuses voies cellulaires telles que le métabolisme et le catabolisme cellulaire, la transduction du signal, les transporteurs cellulaires et le processus oxydant. Bien que les modifications transcriptionnelles observées ne semblent pas refléter une pathologie rénale, il est vraisemblable que ces altérations moléculaires pourraient induire à long terme des dysfonctionnements rénaux ou une sensibilité des reins pour le développement d'une pathologie donnée. En effet, une perturbation prolongée de la balance oxydative, peut être associée à de nombreuses pathologies comme la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'Huntington, la maladie d'Alzheimer ainsi que des désordres dégénératifs de la rétine (196-198).

Afin de compléter cette étude, il devrait être réalisé le même type de travail avec des animaux exposés plus longtemps à ce toxique. Une partie du travail a déjà été réalisé puisque des souris ayant subi une contamination d'une année, ont été suivies selon des paramètres généraux tels que la prise de poids, l'ingestion de nourriture et d'eau, mais aussi les dosages des concentrations de la fonction rénale. Ces différents paramètres, comme dans le cas des animaux contaminés pendant quatre mois, n'ont pas montré de différences significatives, après comparaison avec les animaux témoins. La réalisation du transcriptome rénal de ces animaux, devrait permettre de confirmer et/ou compléter le catalogue répertoriant

les gènes dont l'expression est altérée. En effet, les gènes codant pour des protéines anti-oxydantes ont montré une modification transcriptionnelle après 4 mois d'exposition. Ces modifications peuvent être le signe d'une perturbation de la balance oxydative, laquelle pourrait être vérifiée en examinant les concentrations enzymatiques caractéristiques du stress oxydant (exemple de la SOD, catalase, GPx, marqueur de la peroxydation lipidique comme la malondialdéhyde).

De plus, l'altération de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans certains métabolismes cellulaires (exemple des métabolismes des acides aminés et protéiques) peuvent être des pistes intéressantes pour des explorations futures. Nous avons observé une diminution de l'expression de l'ornithine décarboxylase, enzyme clé de la synthèse des polyamines. L'analyse de l'activité de cette enzyme après exposition à l'U devra être réalisée pour confirmer son implication. La diminution d'expression de ce transcrit a également été noté dans l'étude de Fleck *et al* (178). La diminution de l'activité de cette enzyme ayant été décrite comme associée à l'arrêt du cycle cellulaire, des études de prolifération cellulaires permettraient de connaître l'état de prolifération dans lequel se trouvent les cellules rénales. En effet, d'autres transcrits tels que ceux codant pour des protéines ribosomales pourraient, au contraire, être une indication d'une prolifération anormale des cellules rénales.

L'étude du transcriptome rénal, après exposition chronique à l'U, a permis d'établir un catalogue du profil d'expression des gènes, qui constitue un outil précieux pour mieux définir la gravité potentielle des conséquences d'une contamination chronique à l'U et mieux prévenir ce type de contamination.

III. Analyse globale des données obtenues par la technique SAGE.

Ce chapitre est destiné d'une part, à présenter les difficultés que nous avons rencontrées pour l'interprétation des données *SAGE* et la validation des banques obtenues et d'autre part, à proposer une discussion plus détaillée des différentes voies cellulaires impliquées dans la réponse à la toxicité de l'U.

III-1. Analyse bio-informatique des données SAGE :

III-1-1. Extraction et traitement des informations.

Le séquençage des concatémères contenant les étiquettes *SAGE* par la société Genome Express, nous a permis de réaliser une première analyse séquentielle en fournissant une série de fichiers bruts. Chaque fichier donne la séquence d'un concatémère (alignement des étiquettes) de longueur variable, et les séquences adjacentes du plasmide. Nous avons extrait la séquence des concatémères par rapport à celle des plasmides, une par une, et vérifié chaque électrophorégramme. La vérification de la qualité des séquences nous a permis d'éliminer les caractères "N", insérés par le logiciel d'analyse du séquenceur, lorsqu'il y avait une ambiguïté au niveau de la reconnaissance du nucléotide. A partir de ces séquences vérifiées, nous avons réalisé une analyse des données grâce à l'utilisation d'un logiciel proposé par la société Invitrogen (http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/sage_man.pdf). Le logiciel permet d'extraire les étiquettes alignées dans les concatémères, délimitées par le site CATG (*NlaIII*), en considérant seulement les doubles étiquettes dont la taille est proche de 24 pb, en éliminant les séquences trop longues ou trop courtes.

L'enzyme BsmfI coupe entre 10 et 12 pb après le site CATG et génère des doubles étiquettes ("*ditags*") d'au moins 20 pb ; cependant il arrive que l'enzyme puisse former des

étiquettes de 9 bases. Afin d'extraire les informations contenues dans chaque "ditag", le programme extrait d'abord, après chaque site CATG, les 10 bases suivantes (étant donné l'imprécision du site de coupure par l'enzyme *BsmfI*, on n'est pas sûr en effet que la base suivante appartienne à l'étiquette recherchée). Pour lire la deuxième étiquette (du même "ditag"), on doit considérer les 10 bases qui précèdent le site CATG suivant, mais il faut lire la séquence complémentaire, inverse. Cette étape se répète pour chaque "ditag". Le programme compte par la suite les étiquettes et crée un rapport d'édition, en incorporant des données dans une base de données de type *ACCESS*. Le logiciel dénombre également la quantité de "ditags" qui sont répétés et donne ainsi un indice de qualité de la banque *SAGE*.

III-1-2. Identification des étiquettes.

Si le clivage par *NlaIII* s'est déroulé correctement, seule l'étiquette la plus proche de la queue polyA sera extraite de la séquence. Bien que cette information soit essentielle pour connaître la pertinence d'une étiquette, nous n'avons pas pu définir ce critère pour toutes les étiquettes obtenues vu le grand nombre de données, mais simplement pour les transcrits qui ont été sélectionnés pour valider les données *SAGE* par *PCR* (Figure 12).

Figure 12 : Séquence de l'ARNm codant pour la protéine ribosomale S29.

>gi|6677802|ref|NM_009093.1| Mus musculus ribosomal protein S29 (Rps29), mRNA

TCTGAAGGCAAGATGGGTCACCAGCAGCTCTACTGGAGTCACCCACGGAA
GTTTCGGCCAGGGTTCCCGCTCTTGCCGCGTCTGCTCCAACCGCCACGGTCTGATCC
GCAAATACGGGCTGAA**CATG**TGCCGCCAGTGCTTCCGGCAGTACGCGAAGGACA
TAGGCTTCATTAAGTTGGACTAAGCGACCTTGAATGGATTCGACTGACTACTACC
AAGTGAACCGAT**CATG****CTAGTCTTG**TACACAAAGA**AATAAA**AATGTGAAGAAC
TT

Dans cet exemple, la séquence encadrée correspond à la première étiquette *SAGE* obtenue qui suit le site CATG le plus proche de la queue poly A. En bleu, nous avons noté un signal de polyadénylation (AATAAA) mais la séquence poly A n'est pas présente dans cette séquence.

Il est vrai que lorsque une séquence ne possède ni queue poly A, ni séquence de polyadénylation, il est difficile de savoir si le message a été intégralement séquencé en 3' et si son orientation est correcte. C'est pour cela que les données *SAGE* n'apportent qu'un catalogue de départ et que les informations qu'il comporte, ne peuvent être considérées comme des données bien établies. Il faut également garder à l'esprit que l'état d'avancée des connaissances au niveau du génome murin n'est pas aussi poussé que pour l'homme (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/UGOrg.cgi?TAXID=10090>).

Dans certains cas, l'ARN peut au contraire porter différents sites de polyadénylation, qui peuvent générer plusieurs étiquettes pour le même ARN. Cette redondance d'étiquettes peut également être due à un épissage alternatif de la séquence correspondante. C'est le cas des transcrits codant pour la NaPi-II et l'uromoduline.

Le traitement informatique, nous a permis également d'entrevoir d'autres problèmes comme l'ambiguïté d'identification de certaines étiquettes car il identifie, par exemple, plusieurs messages non répertoriés et/ou ESTs. L'origine de ce recouvrement de l'information est due en partie aux répétitions dispersées à travers le génome (plus de 50% de séquences répétées pour le génome humain (199)). Les plus importantes sont les LTR (*long terminal repeat*), les LINE (*long interspersed repeat sequences*), les SINE (*short interspersed repeat sequences*) et les transposons. Il existe trois classes importantes de rétrotransposons mammaliens. Les rétrovirus endogènes et les rétrotransposons non viraux, sont capables d'une transposition indépendante, ainsi que les pseudogènes qui ne possèdent pas la transcriptase

inverse. Parmi cette dernière classe, on distingue les pseudogènes modifiés, avec un faible nombre de copies transcrits par l'ARN polymérase II et les séquences *SINE* avec un grand nombre de copies, comme les familles de gènes qui contiennent de nombreuses séquences répétées, *Alu* chez l'homme (3 à 6 % du génome humain) et B1 chez la souris (199). Ces éléments peuvent générer des variations dans l'expression d'un gène, en se trouvant transposé au niveau de celui-ci, soit au niveau de sa région régulatrice, ou dans la région où se trouve l'étiquette extraite. Les pseudogènes étant des gènes non fonctionnels (parfois transcrits mais jamais traduits) posent également un problème pour l'identification des étiquettes.

Bien que la comparaison de deux banques permette une étude différentielle, la validation statistique des variations observées reste un problème important. Une variation de l'expression d'un gène observée de 1 à 5 étiquettes, est-elle significative et peut-elle être comparée à une variation de 10 à 50 étiquettes ? Le modèle de simulation statistique proposé par le logiciel fourni par Invitrogen, simulation Monte Carlo, permet de calculer si une variation de l'expression d'un gène est la résultante d'une régulation de la fonction biologique. Le calcul est basé sur la probabilité que deux tirages réalisés sur chaque banque, diffèrent d'une valeur donnée. Cette probabilité mathématique sera d'autant plus faible que l'écart observé est grand. En des termes plus simples, plus la probabilité mathématique sera faible, plus la signification biologique sera élevée. Par exemple, lorsque $p=0,05$, il est considéré, qu'il y a 5 % de chance que le nombre d'étiquettes soit différent entre les deux conditions testées.

III-1-3. Qualité des banques.

Différentes étapes de la technique *SAGE* sont critiques pour l'obtention d'une banque de transcrits, de bonne qualité. Les étapes de vérification sur gel d'agarose sont indispensables pour vérifier les biais potentiels de la manipulation et de l'utilisation des outils biologiques

comme les enzymes de restriction. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'efficacité de coupure de l'enzyme de restriction *NlaIII*, n'est pas forcément de 100% ; de ce fait, l'étiquette qui sera séquencé ne sera pas nécessairement celle correspondant à l'extrémité 3' de l'ARNm. Sur le même principe, la coupure avec l'enzyme d'étiquetage *BsmFI* peut créer un déséquilibre si l'efficacité n'est pas correcte. En effet, cette étape de digestion enzymatique est précédée par la séparation du pool d'ADNc en deux (se référer à la description de la technique *SAGE*, p53), et si à la fin de ces étapes, il y a un déséquilibre entre les deux pools de molécules, cela faussera la formation des doubles étiquettes. Ce problème étant survenu lors de la préparation des banques aiguës, nous avons dû recommencer la constitution de notre librairie pour éviter les difficultés dans les autres étapes du *SAGE*, comme la *PCR* qui entraînerait une représentation biaisée des transcrits du fait d'une potentielle amplification préférentielle. De plus, au cours du clonage, nous avons pu observer que si l'efficacité de la transformation bactérienne n'est pas de 100 %, le même clone peut être présent de manière redondante, en raison du trop faible nombre de concatémères transfectés. Ces différents problèmes pouvant conduire à une mauvaise représentation de la population initiale des ARNm, le logiciel, mis à disposition avec le kit pour l'exploitation des données *SAGE*, indique le nombre de "*ditags*" pour chaque banque réalisée, et donne une information sur les étapes d'amplification et de clonage bactérien. Bien que nous ayons observé un nombre non négligeable de "*ditags*" (8 %), nous avons considéré nos banques *SAGE* comme correctes.

Lorsque les banques ont été obtenues, différents contrôles peuvent être réalisés comme par exemple, l'estimation de la taille et le pourcentage des inserts présents dans les banques *SAGE*. En ce qui concerne la taille des inserts, il est recommandé qu'au moins 75 % des clones contiennent un insert d'une taille minimale de 400 pb. Le nombre d'étiquettes présentes dans une banque peut également être calculé pour estimer la bonne qualité d'une banque

(Invitrogen préconise que la banque doit produire au moins 100.000 étiquettes) ; ce nombre peut être estimé par la formule suivante :

$$\text{Nombre total de tags par librairie} = \left(\text{Nombre total de tags par clone} \times \frac{\text{Nombre total de tags}}{\text{Quantité du mélange réactionnel de ligation utilisée } (\mu\text{l})} \right) \times \frac{\text{Nombre total de } \mu\text{l du mélange réactionnel de ligation}}$$

Un autre paramètre qui permet de définir la qualité d'une banque *SAGE* est le nombre d'étiquettes séquencées. D'après certaines études, 4.500 ARNm peuvent être identifiés à partir de 10.000 étiquettes séquencées, et 11.500 ARNm pour 40.000 étiquettes (200,201). Les ARNm exprimés très faiblement (moins d'une copie par cellule) nécessitent le séquençage et l'exploitation d'un grand nombre d'étiquettes, jusqu'à 650.000 (163). La lecture massive de ces 650.000 étiquettes d'une lignée cellulaire humaine colorectale, a mis en évidence que 10 % des étiquettes représentent à elles seules, 77 % de la masse totale des messagers exprimés. Les 90 % des transcrits présentent donc un niveau d'expression très faible. L'évaluation de ce paramètre dépend évidemment du but recherché.

Pour l'étude présente, nous voulions établir un catalogue représentatif des transcrits dont l'expression est modifiée par une exposition à l'U. Pour cela, nous avons essayé de définir au mieux le nombre de *tags* qui devaient être séquencés pour que les données soient suffisamment représentatives et significatives et que le coût du séquençage soit correct. Dans le cas de l'exposition aiguë, nous avons analysé plus de 43000 étiquettes avec 20127 et 23437 étiquettes contenues dans les librairies témoins et contaminées, respectivement. Après la contamination chronique, seulement 22000 étiquettes ont été séquencées avec 12713 et 9654 séquences qui constituent les librairies témoins et contaminées, respectivement. Pour avoir une représentation correcte du contenu cellulaire en transcrits, il est admis qu'il est nécessaire

de séquencer entre 20000 et 30000 étiquettes. Dans le cadre de l'exposition chronique, nous n'avons pas pu satisfaire cette demande à cause d'une restriction budgétaire, le coût du séquençage étant un paramètre fortement limitant pour la réalisation du SAGE.

Un dernier point important pour valider la qualité de la banque est la présence et la représentation de certaines étiquettes caractéristiques d'un organe ou d'un état donné. Pour cela nous nous sommes basés sur les études antérieures réalisées sur le transcriptome rénal (table 6).

Table 6 : liste des études réalisées sur le rein *via* des analyses globales du génome.

Etudes	Méthodologie	Condition	Espèces
Chabardés-Garonne <i>et al.</i> (2003)	<i>SAGE*</i>	normale	homme
Yano <i>et al.</i> (2002)	puce à ADN	normale	homme
El-Meanawy <i>et al.</i> (2000)	<i>SAGE</i>	normale	souris
Virlon <i>et al.</i> (1999)	<i>SAGE*</i>	normale	souris

**SAGE Adaptation for Downsized Extracts*

Comme décrit dans les articles présentés dans le chapitre "*Résultats, article : Detection of putative indicators in predicting renal response to acute toxicant insult: TCTP, IGFBP7 and Rps29*", la présence de certaines étiquettes caractéristiques du rein et voire de certaines parties du rein (exemple de la GPx (2 %) ou de KAP (1,4 %) pour les tubules), nous a permis de valider les banques que nous avons réalisées. Nous avons également observé dans toutes les banques réalisées, un nombre important de transcrits correspondants à l'uromoduline (0.1 %) (ou Tamm-Horsfall), une protéine exclusivement synthétisée dans l'anse large ascendante de Henle et abondamment sécrétée dans l'urine. Parmi les étiquettes abondantes et spécifiques des reins, on peut distinguer le transcrit correspondant au récepteur

de l'hormone parathyroïdienne (0,1 %) et la rénal cytochrome P450 (0,08 %), et parmi les transcrits abondants qui ne sont pas exclusivement exprimés dans le rein, on peut noter le cotransporteur NaPi-II (0,2 %) et la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (0,2 %). De plus, d'après les tables ci-dessous (table 7), nous pouvons noter que les étiquettes les plus abondants correspondent à des transcrits mitochondriaux. La présence de nombreux transcrits du génome mitochondrial reflète probablement un métabolisme énergétique très élevé des cellules épithéliales rénales.

Table 7 : Transcrits les plus abondamment exprimés dans la librairie "aiguë" obtenue à partir des animaux témoins.

Séquence <i>SAGE</i>	Occurrence	UniGene	Description
ATAATACATA	681	mito	Tag matches mitochondrial sequence
ATACTGACAT	565	mito	Tag matches mitochondrial sequence
CTATCCTCTC	419	7156	glutathione peroxidase 3
GTGACCACGG	414	ribo	Tag matches ribosomal RNA sequence
GACTTCACGC	283	13052	kidney androgen regulated protein
CAAACCTCCA	169	mito	Tag matches mitochondrial sequence
TGGGTTGTCT	149	254	translationally regulated transcript (21 kDa)
GCCGTTCTTA	111	ribo	Tag matches ribosomal RNA sequence
TGGATCAGTC	77	30806	ribosomal protein L19
TAATACTCAA	73	29722	upregulated during skeletal muscle growth 5
TCACCCAATA	64	27818	eukaryotic translation elongation factor 2
GGCTTCGGTC	55	3158	ribosomal protein, large, P1
ATACTAACGT	53	34102	ornithine decarboxylase, structural

Il est vrai que nous aurions pu réaliser ces banques à partir des sections spécialisées du rein comme le néphron, où l'U est connu pour induire des lésions (enrichissement en segment S3), mais le but de ce travail était d'évaluer les conséquences moléculaires d'une intoxication par l'U sur le rein dans son ensemble. En revanche, nous avons éliminé la partie correspondant au bassinet par crainte de perte du signal.

Les librairies ont été déposées sur le site GEO où elles peuvent être consultées, sous les numéros d'accès GSM21251 et GSM21255 pour les banques aiguës, et GSM21256 et GSM21257 pour les banques chroniques, correspondant aux banques témoins et contaminées, respectivement.

III-2. Les atteintes biologiques observées consécutives à une exposition à l'uranium :

Bien que certaines protéines impliquées dans différentes voies métaboliques aient déjà été rapportées dans les articles issus de notre travail et inclus dans ce manuscrit (p61 et p65), l'ensemble des gènes dont l'expression est modifiée, n'a pas été discuté en détail. Le but de la section n'est pas de décrire toutes les modifications transcriptionnelles induites par l'U, mais de comparer les variations géniques induites par ce toxique pour proposer un modèle permettant de mieux comprendre la néphrotoxicité résultante d'une contamination par l'U.

III-2-1. L'inflammation :

Nous n'avons observé l'activation de ce processus que dans le cadre de l'exposition aiguë, liée à une IRA. Cette observation met en évidence le rôle de l'inflammation, associé à la genèse de l'IRA. Il est suggéré que l'activation de la réponse immunitaire, en réponse à un toxique, ou une IRA induite par une IR, peut induire la mort cellulaire. De manière surprenante, il n'a été observé aucune modification de l'expression de gènes codant pour des anti-inflammatoires.

Sans vouloir reprendre en détail les données de la littérature concernant les marqueurs de l'inflammation (*cf chapitre Résultats. article : Comprehensive analysis of the toxicogenomic renal response to acute uranyl nitrate exposure*), il est intéressant de noter que l'activité multifonctionnelle de l'OPN souligne les difficultés d'assigner des modifications

transcriptionnelles à un seul processus biologique. Bien que nous ayons établi une corrélation certaine entre l'activation du processus inflammatoire dans le cas de la contamination aiguë par injection IP de 5 mg/kg de NU, les données antérieures (92) et les observations faites au niveau histologique et biochimique, aucune modification importante des transcrits potentiellement impliqués dans ce processus n'a pu être mise en évidence après une exposition chronique à l'U.

De manière intéressante, l'expression de TCTP a été modifiée par l'U que ce soit après une exposition aiguë à forte dose, ou après une exposition à long terme par une faible quantité d'U. L'expression de ce gène a déjà été montrée pour être modifiée par d'autres toxiques (202). De plus, la sur-expression de la protéine TCTP a été associée à la tumorigénèse (203,204). Comme l'ostéopontine, TCTP est une protéine multifonctionnelle (Figure 13) (205). Le véritable rôle de cette protéine dans les phénomènes de toxicité induits par l'U devrait donc apporter une meilleure connaissance des mécanismes à l'origine de cette toxicité.

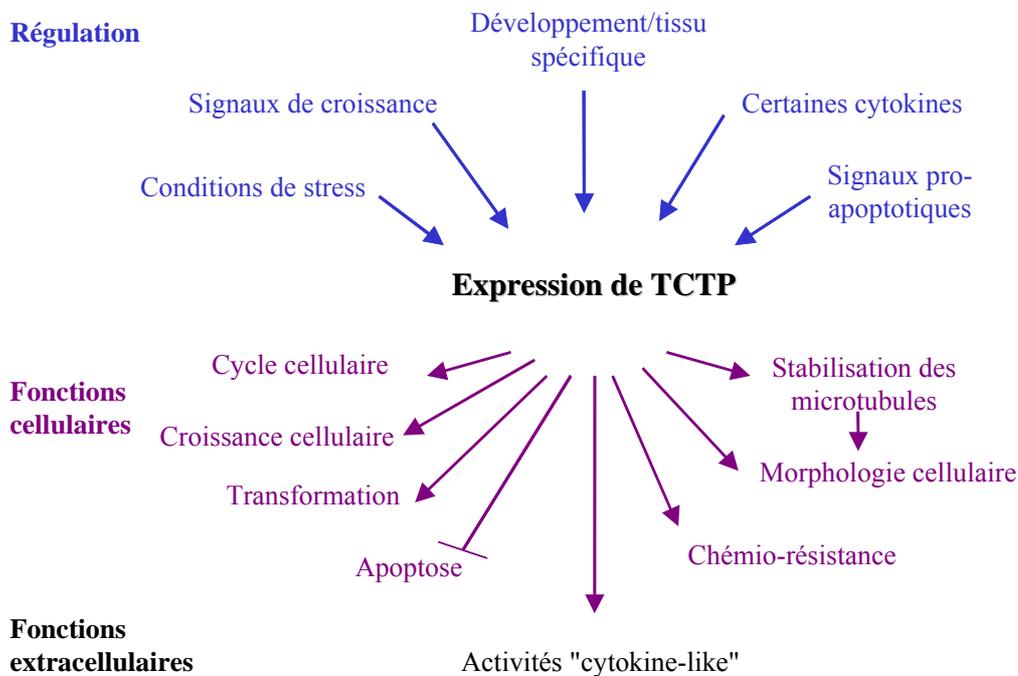


Figure 13 : Régulation et fonctions de TCTP.

III-2-2. Voie du stress oxydant : maintien de la balance par les antioxydants.

Bien que le métabolisme de l'oxygène soit essentiel pour la vie cellulaire, il inflige une menace potentielle de part la formation d'espèces oxygénées activées (EOA). La réduction d'un électron sur un oxygène produit des superoxydes (O_2°) alors qu'une réduction de deux électrons produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Par conséquent, le flux électronique de l'oxygène, utilisant certains processus comme la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, les flavoprotéines, les cytochrome P450 et les oxydases, est finement régulé pour éviter une réduction partielle de l'oxygène.

Les défenses anti-oxydantes se définissent selon deux catégories, les anti-oxydants enzymatiques et ceux, non enzymatiques.

- Les superoxydes dismutases sont des métalloprotéines qui dismutent les radicaux superoxydes (O_2°) en H_2O_2 et en molécules oxygénées (Figure 6). Trois types de superoxydes dismutases existent chez les cellules eucaryotes. La superoxyde dismutase Cu/Zn, est principalement localisée dans les fractions cytosoliques, la superoxyde dismutase Mn dans les mitochondries, et la superoxyde dismutase EC est présente dans l'espace extracellulaire. La catalase, une protéine à "hème" principalement localisée dans les peroxisomes et au niveau de la membrane interne mitochondriale, catalyse la conversion de H_2O_2 en H_2O . Dans les cellules de mammifères, cette conversion est aussi accomplie par les glutathiones peroxydases *via* la catalyse du glutathione.

- Les défenses non enzymatiques *via* des petites molécules telles que l' α -tocophérole associé aux membranes, l'ascorbate et le glutathione.

L'homéostasie cellulaire normale est une balance fragile qui oscille entre le taux, la fréquence de la formation d'oxydants et le taux de leur dégradation. Le stress oxydant peut donc être défini comme une conséquence de la sur-production de molécules oxydantes qui bouleversent la capacité anti-oxydante de la cellule. Il est vrai que dans le cadre de notre étude

nous avons observé des modifications de l'expression des transcrits codant pour la SOD, la GPx et d'autres enzymes impliquées dans le maintien de la balance oxydative. En revanche, nous n'avons pas observé de variation de l'expression de la catalase. Pour vérifier l'importance de ces variations d'expression de ces molécules dans les mécanismes de toxicité induits par l'U, il serait intéressant de contrôler les niveaux d'activité de ces différentes enzymes.

De manière générale, il a été montré qu'un stress oxydant pouvait occasionner la déplétion de l'ATP intracellulaire aboutissant à une augmentation de la concentration du calcium cytoplasmique (206,207). Depuis, plusieurs études visant à étudier la toxicité de l'U montrent que ce toxique induit une déplétion de l'ATP (58,145). La mitochondrie est le siège de la production d'énergie nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. La phosphorylation oxydative, à l'origine de cette production d'énergie, s'effectue par des processus d'oxydation complète des glucides, des acides gras et des acides aminés. L'énergie produite est stockée sous forme d'ATP, qui peut être utilisée par la cellule. L'altération des mitochondries est un processus qui est classiquement retrouvé après contamination par différents toxiques (135,146-148). Dans le cas d'une intoxication par l'U, aucune étude n'a mis en évidence l'altération de cet organite ; cependant de nombreuses données semblent abonder dans ce sens. En effet, Brady *et al.* (145) ont noté que l'uranium induit une inhibition progressive de certains processus enzymatiques impliqués dans la respiration cellulaire. Plus récemment, une autre équipe a observé une vacuolisation de l'espace intramitochondriale (152). Le stress oxydant étant connu pour induire une déplétion de l'ATP intracellulaire, menant à une augmentation de la concentration du calcium cytoplasmique (206,207) et les mitochondries pouvant être la cible d'un stress oxydant (208), il serait intéressant de vérifier l'intégrité des fonctions physiologiques de cet organite.

III-2-3. La mort cellulaire : apoptose ou nécrose ?.

Les deux voies précédemment citées (inflammation et modification de la balance oxydative) peuvent être une des causes de l'induction du processus de mort cellulaire.

Il est admis à ce jour, que la toxicité de l'uranium est principalement associée à une mort cellulaire par nécrose (Figure 7). Cependant, des études suggèrent aussi l'implication de l'apoptose dans le processus de toxicité de l'uranium (116,117,134). De plus, lors d'une contamination par inhalation, il a été décrit que l'entrée de l'UA dans les macrophages initie des événements qui conduisent à la mort cellulaire apoptotique de ces cellules. Les macrophages présents dans un grand nombre de tissus comme les poumons, le foie, les nodules lymphatiques, le cerveau, les reins, la peau et la rate (209), constituent le premier type cellulaire où sont phagocytés les débris et la destruction des micro-organismes. Par ailleurs, il est bien connu que les macrophages sont importants pour la transition de l'inflammation du tissu lésé vers la sécrétion de facteurs variés comme le PDGF, $TNF\alpha$ et $TGF\beta$ (210). Les macrophages participent aussi à l'élimination des débris des particules des métaux des tissus (211,212), ainsi qu'à la détoxification des métaux (136).

La nécrose et l'apoptose semblent être deux processus étroitement impliqués dans la mort cellulaire après intoxication à l'uranium. Ceci a déjà été décrit pour d'autres métaux (213,214). Bien que le processus apoptotique, passant par l'activation des caspases, semble être bien établi pour de nombreux métaux comme le cadmium, le chromium, le nickel et l'arsenic (215), et que des études ont montré que l'U induit la mort cellulaire, l'analyse des données *SAGE* ne nous a permis de mettre en évidence des variations des profils d'expression des caspases. Cela ne signifie par pour autant que le processus apoptotique n'est pas impliqué après une intoxication à l'uranium, surtout que certains transcrits observés dans le cas de l'exposition aiguë, ont été décrit pour avoir une activité anti- ou pro-apoptotique (galectin-3,

TCTP, mac25 et Rps29, respectivement) (203). Des études plus approfondies sur les différentes voies pouvant être impliquées dans le processus apoptotique, permettraient de mieux comprendre ces résultats.

III-2-4. Transporteurs d'électrolytes.

Nous avons observé dans les deux types de contamination une modification du niveau d'expression du gène codant pour le NaPi. Il est généralement admis que la régulation de ce transporteur membranaire est post-traductionnelle, *via* l'endocytose et sous le contrôle, entre autre, de l'hormone parathyroïdienne (216). Cependant, certains travaux ont suggéré la possibilité d'une régulation au niveau transcriptionnel (217). Après une injection IP de NU, nous avons observé une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour la NaPi. Cette variation semble être en accord avec des observations précédentes (118) mettant en évidence une diminution du transport de sodium. Cependant nous ne savons pas si cette réduction d'expression est due à une régulation transcriptionnelle ou à une perte du nombre de cellules exprimant cette protéine, ou bien aux deux phénomènes. A la suite, des travaux récents réalisés dans le laboratoire, sur des cultures cellulaires, ayant montré que la NaPi serait en partie responsable de l'internalisation de l'uranium dans la cellule (134), il serait intéressant de réaliser des expériences d'immunohistochimie pour valider la pertinence des modifications observées au niveau des ARNm après contamination. De manière surprenante, après une ingestion quotidienne d'uranium, nous avons observé une augmentation du niveau transcriptionnel du gène codant pour cette protéine. Cependant, il semble exister un rétro-contrôle positif du transport de cette protéine. En effet, après une première période d'adaptation des cellules tubulaires proximales à de fortes concentrations de Pi, caractérisée par une diminution de l'expression membranaire en NaPi, il a été montré une augmentation de la densité membranaire en NaPi (218).

III-2-5. L'homéostasie cellulaire.

La calmoduline (CaM) est une protéine ubiquitaire, qui fixe le Ca^{2+} , et qui est impliquée dans différents processus cellulaires. De nombreuses enzymes sont directement régulées par l'interaction avec CaM et *via* la fixation du calcium. L'expression de CaM, une protéine essentielle pour la progression mitotique (219), est particulièrement élevée dans les cancers du poumon (220). Dans le cas d'une contamination par le nickel, il a été suggéré qu'une sur-expression de l'expression du gène codant pour la CaM pouvait être une réponse directe à l'intoxication par le nickel(II) (221). De ce fait, l'augmentation de l'expression du transcrite codant pour la CaM pourrait être un indicateur de l'augmentation de calcium cellulaire, ce qui pourrait expliquer et induire l'activation de la mort cellulaire.

La ferritine est la protéine intracellulaire la plus importante du stockage de l'ion ferreux. Elle joue un rôle majeur dans le contrôle de la distribution intracellulaire de cet ion et dans la gestion à long terme de son stockage. Dans notre modèle cellulaire d'IRA, l'expression du taux de messager est significativement augmenté, FTL (32/62), en accord avec une précédente étude (222).

Cependant, la variation de ces transcrits, impliqués dans l'homéostasie cellulaire, n'est retrouvée que dans le cas de l'exposition aiguë.

II-6. Le métabolisme Cellulaire.

Synthèse des protéines : le ribosome.

Les protéines ribosomales sont le constituant majeur des ribosomes qui catalysent la biosynthèse protéique dans le cytoplasme des cellules. Sous des conditions de croissance normale, les protéines ribosomales sont synthétisées de manière stœchiométrique, en accord avec les RNA ribosomaux, pour produire un stock équimolaire de constituants ribosomaux (223). Cependant, la régulation de l'activité transcriptionnelle des gènes des protéines ribosomales, dans des tissus humains différenciés, apparaît être moins bien concertée que précédemment rapporté, à savoir que l'expression tissu-spécifique des transcrits codant pour des protéines ribosomales est démontrée dans des tissus humain normaux variés, tels que le cerveau, le foie et la rétine (224). De plus, certains travaux mettent en évidence que les protéines ribosomales peuvent aussi agir lors de nombreux processus cellulaires tels que la réplication, la transcription, la maturation de l'ARN, la réparation de l'ADN et même l'inflammation, et que ces fonctions sont indépendantes de leur propre implication dans la biosynthèse protéique (225,226). Une différence d'expression de gènes codant pour des protéines ribosomales, a été rapportée pour plusieurs conditions pathologiques (227,228). En particulier, la sur-régulation des transcrits codant pour plusieurs protéines ribosomales a été mise en évidence dans plusieurs cellules malignes, incluant des carcinomes colorectales, de la prostate et de l'œsophage (229,230). Au contraire, d'autres études ont montré un profil d'expression, de certains protéines ribosomales, diminué (231).

Ceci conforte nos données puisque nous avons noté une variation dans l'expression de nombreux transcrits codant pour des protéines ribosomales, que ce soit dans le cadre de l'intoxication aiguë ou chronique à l'uranium.

Après une injection unique de NU, nous avons observé une forte augmentation du transcrit codant pour la protéine ribosomale S29. Cette protéine a été décrite comme un pro-apoptotique (232).

Dans le cadre de la contamination chronique, nous avons noté une augmentation des transcrits codant pour les protéines ribosomales S24, S26 impliquées dans divers processus cellulaires comme le développement et la maturation. RpS26 a également été décrit comme un marqueur permettant de différencier le stress induit par l'ozone de celui induit par l'UV-B (233). La RpS4, codé par un gène sur les chromosome X, est rendue responsable du syndrome de Turner. Ce syndrome se traduit par une faible viabilité de l'embryon dans l'utérus et si la grossesse arrive à son terme, par des anomalies anatomiques spécifiques.

Il apparaît que l'expression des protéines ribosomales peut être régulée positivement ou négativement. Il est généralement admis que les protéines ribosomales sont abondamment transcrites dans des cellules présentant une prolifération activée, telles que les cellules cancéreuses. Cependant de récentes études ont clairement montré que certaines protéines ribosomales sont sous-exprimées dans les cellules qui ont une prolifération active (231,234). De ce fait, l'implication de ces protéines ribosomales dans la toxicité de l'U ouvre un nouvel axe de recherche.

Autres métabolismes :

De nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, celui des carbohydrates ou encore celui des acides aminés voient leur un niveau d'expression modifié après contamination par l'U.

Dans le cadre de l'intoxication aiguë par l'U, nous avons pu observer majoritairement une sous-expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans ces processus. Nous

pouvons supposer que ces réductions sont associées à l'arrêt de la croissance cellulaire induite par les altérations rénales induites par le NU. La réduction de l'expression de l'ornithine decarboxylase, un marqueur de l'arrêt du cycle cellulaire en G1, semble confirmer cette hypothèse.

La régulation des gènes impliqués dans les mécanismes de conversion d'énergie semble être en accord avec les observations faites précédemment. L'ATP est la principale source d'énergie utilisée par la cellule pour assurer ses fonctions fondamentales telles que la respiration, la prolifération, la différenciation ou encore l'apoptose. Dans les banques que nous avons réalisées, des transcrits relatifs à cette chaîne respiratoire présentent un taux d'expression diminué comme la NADH déshydrogénase (NDUFB9) et l'ATP synthase (ATP5B) qui catalyse la formation d'ATP. Ces données sont en accord avec la déplétion de l'ATP, après une contamination par l'U, observée dans de précédentes études (58,145).

Le cycle de l'acide citrique exerce aussi bien des fonctions cataboliques qu'anaboliques. Il utilise le pyruvate et l'acetyl CoA (produits intermédiaires du catabolisme) et fournit des précurseurs importants pour des voies anaboliques, alimentant par exemple la voie de biosynthèse du glucose (gluconéogenèse, précurseurs : oxalo-acétate et malate), celle des porphyrines (précurseur : succinyl CoA) ou celle des principaux acides aminés (précurseur : 2-céto-glutamate-oxloacétate) (235). Il a été montré que le profil d'excrétion de plusieurs intermédiaires du cycle de Krebs comme le succinate, la 2-OG et le citrate est altéré après l'intoxication de NU. De plus, Anthony *et al.* (92) ont décrit que NU entraîne une augmentation de la concentration des lactates dans les urines et une forte excrétion du glucose. De manière similaire, le cadmium produit une réduction dramatique du citrate, 2-OG et une excrétion de succinate (236). Des effets qui subsistent 2 à 3 jours après l'intoxication de ce toxique. Ces effets sont en accord avec l'acidose du tubule rénale causé par l'inhibition de l'activité de l'anhydrase carbonique rénale, résultant en une augmentation de l'utilisation

des intermédiaires du cycle de Krebs par les mitochondries tubulaires (236). L'expression du gène codant pour l'anhydrase carbonique α , en effet, été montrée pour être inhibée dans notre modèle d'insuffisance rénale aiguë induite par le NU.

Considérées dans leur ensemble, les variations observées suggèrent une altération du métabolisme des acides gras, une redistribution des composants de la voie des pentoses et de la voie de la glycolyse, ainsi qu'une modification du métabolisme énergétique lors d'une contamination aiguë par l'U.

Par contre, après une exposition chronique, l'U induit principalement une sur-expression des transcrits impliqués dans ces différents processus métaboliques, c'est le cas des transcrits qui codent pour les constituants de la chaîne respiratoire (NADH déshydrogénase, Cytochrome c oxydase, et ATP synthase). Ces variations pourraient être liées à un métabolisme activé, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux appréhender l'implication que peuvent avoir ces altérations au niveau cellulaire, après une contamination chronique par de l'U.

II-7. Autres processus cellulaires.

La détoxification cellulaire est un processus qui semble ubiquitaire pour la plupart des toxiques. La métallothionéine II, décrite comme étant un des médiateurs du mécanisme de défense cellulaire, est une protéine possédant une haute affinité pour les métaux comme le cadmium (215) ou le mercure (237). La susceptibilité de l'apoptose, induite par le cadmium, est dépendante des niveaux basal et induit de la métallothionéine, qui lie le cadmium pour prévenir les dommages toxiques (238,239). Dans notre modèle de contamination aiguë à l'U, nous avons observé une sur-expression du gène codant pour cette protéine. Le rôle protecteur de la métallothionéine peut expliquer que son expression n'augmente que dans ce type de contamination, une hypothèse confortée par la forte concentration du métal dans le tissu rénal. Ceci semble suggérer que l'intoxication aiguë par l'uranium met en jeu de nombreux processus permettant *in fine* la détoxification des cellules atteintes.

BILAN ET PERSPECTIVES



La compilation des informations concernant la répartition tissulaire de l'U, ses caractéristiques cytotoxiques et cinétiques, ainsi que la toxicité induite par d'autres métaux, nous a permis de mieux comprendre le comportement chimiotoxique de cet élément. Ainsi, à partir des résultats que nous avons obtenus *via* l'utilisation du *SAGE* et les données de la littérature, nous proposons un modèle possible de la toxicité de l'U au niveau cellulaire (Figure 14).

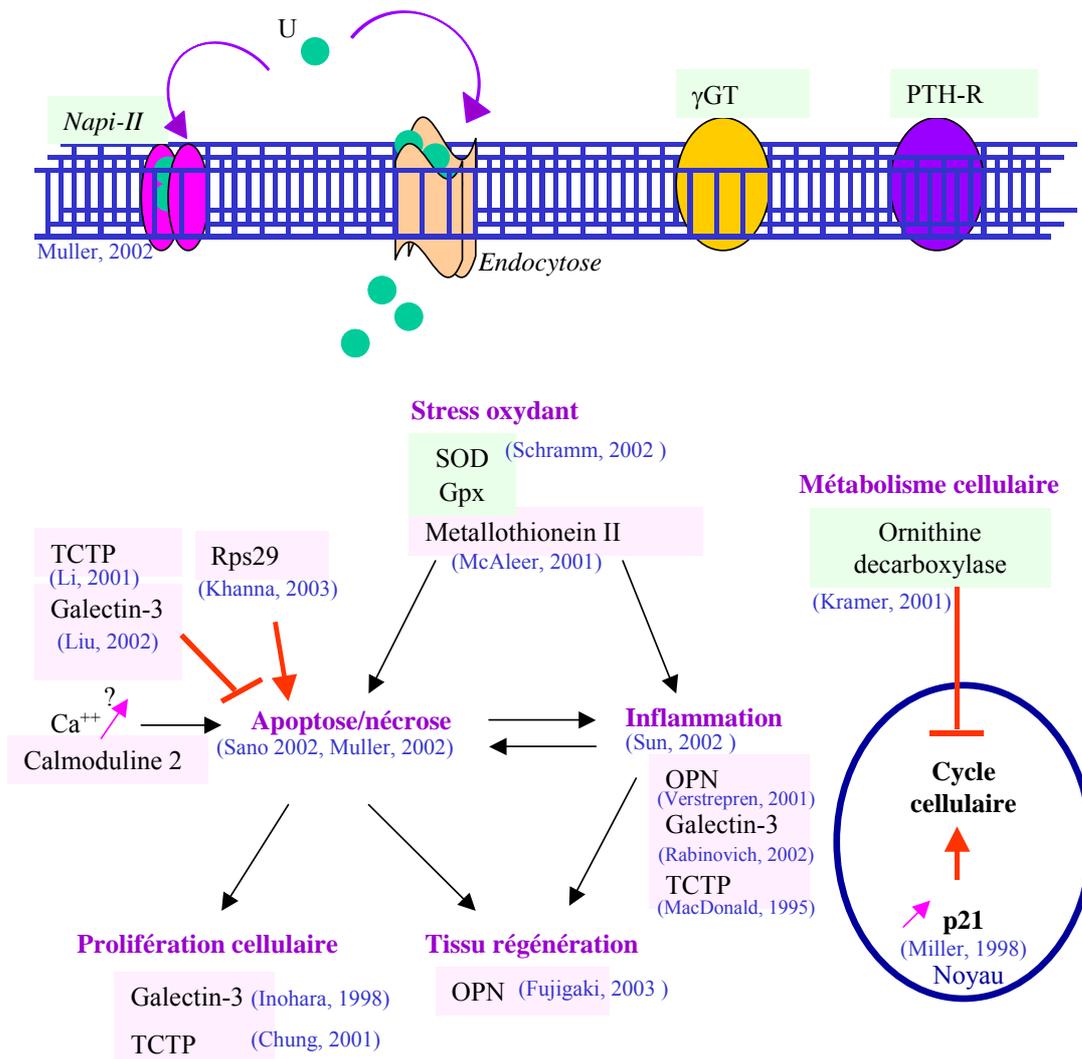


Figure 14 : Modèle putatif sur la toxicité de l'uranium (schéma adapté de (189)) (82, 93,117,134,186,194,223,239-247).

La compilation des données *SAGE* et des travaux réalisés par différentes équipes nous ont permis de réaliser l'ébauche d'un modèle de la toxicité de l'U. Les transcrits sous-exprimés sont représentés avec un fond vert et ceux sur-exprimés avec un fond saumon.

D'après ce modèle, l'U serait réabsorbé au niveau tubulaire proximal *via* un processus d'endocytose et un co-transporteur Na-Pi de type IIa (134). Ce dernier serait responsable de la translocation d'une fraction soluble de l'actinide dans le compartiment intracytoplasmique, induisant ainsi la perturbation du métabolisme cellulaire. Après l'exposition aiguë à l'U, nous avons observé une diminution de ces co-transporteurs NaPi. Cependant, la question qui consiste à savoir si l'inhibition des transporteurs de la bordure en brosse est due à une interaction des ions métalliques M^{2+} avec les transporteurs, ou simplement si cette inhibition est due à la perte de l'intégrité membranaire de la bordure en brosse ou bien les deux, reste sans réponse.

Le lien commun entre les différents métaux comme le cadmium, le mercure et l'U est qu'ils se présentent dans les systèmes biologiques sous formes M^{2+} , *i.e.* UO_2^{2+} (51,54,54,247-249). La présence de ces cations dans les tissus pourraient rentrer en compétition avec des éléments essentiels pour l'organisme tels que Mg^{2+} et Ca^{2+} . On peut concevoir que si les métaux prennent la place du calcium par exemple, cela peut perturber les processus dans lequel il est indispensable (transduction du signal, activation de certaines kinases, fixation avec des protéines telles que la calmoduline, activation transcription gène pro-inflammatoire comme NF-KB, réponse hormonale et réponse à certains stress). En effet, nous avons observé que la calmoduline, une "sensor" protéine a été augmentée après l'exposition à l'U, ce qui peut éventuellement corrélérer avec notre hypothèse. De plus, si les métaux lourds comme l'uranium, prennent la place du calcium, ce dernier reste disponible dans la cellule. Or une augmentation intracellulaire du calcium peut être associée à certaines perturbations (croissance cellulaire, différenciation, stress oxydant) et même à l'apoptose (250,251). Même si une telle augmentation n'a pas été montrée dans le cas d'une intoxication par l'U, il est admis que pour d'autres métaux tels que le cadmium ou le nickel, une augmentation intracellulaire du calcium est induite par le toxique (252,253). Afin de vérifier cette

hypothèse, il suffirait de regarder si l'intoxication par l'U peut être associée à une augmentation intracellulaire de calcium et par conséquent d'évaluer si une perturbation de l'homéostasie calcique peut contribuer à la toxicité de l'U.

Les changements observés de l'état oxydant, de l'homéostasie du calcium et du cycle cellulaire après intoxication à l'U peuvent être des événements qui précèdent ceux de la mort cellulaire, ce qui a déjà été suggéré pour le cisplatine (189). Par contre, les processus inflammatoire et de régénération tissulaire sont des événements qui se déroulent après la mort cellulaire par nécrose (93,195). L'analyse des conséquences moléculaires relatives à la toxicité de l'U, à différents temps, permettrait de mieux comprendre les cinétiques qui régissent les différents processus impliqués dans la genèse de l'IRA induite par une incorporation d'U, mais aussi dans la progression des lésions induites par ce métal, ainsi que les mécanismes de réparation mis en œuvre par le tissu lésé. Dans la figure 15, nous présentons les événements morphologiques que l'on peut observer lors de l'induction d'une IRA (254). Ces changements sont en accord avec les données de la littérature pour les différentes phases observées dans le cas d'une intoxication par l'U (58,116,117,195,255).

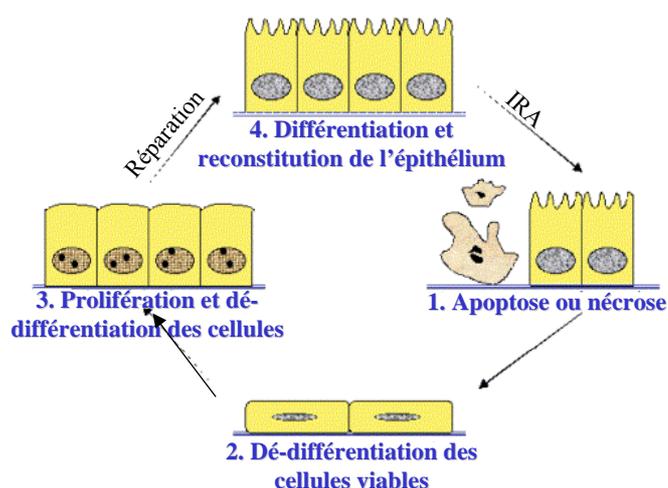


Figure 15 : Les événements morphologiques consécutifs à l'induction d'une IRA {Devarajan P, Mishra J, et al. 2003 1429 /id}. Après l'induction d'une IRA, quatre phases peuvent être observées. La première consiste en l'induction des dommages et de la mort cellulaire. La seconde est caractérisée par un quantité importante de cellules dé-différenciées avec des cellules aplaties et une bordure en brosse faiblement différenciée. La troisième est marquée par un nombre important de cellules en prolifération. Enfin, la dernière est une phase de reconstitution de l'épithélium tubulaire.

La compréhension des mécanismes impliqués dans la toxicité relative à l'incorporation d'U, permettra d'une part, de proposer des bio-marqueurs potentiels pour établir un diagnostic précoce de la physiopathologie, associée à l'IRA et induite par l'U, et d'autre part, de déterminer de nouveaux outils thérapeutiques pour palier à cette pathologie, notamment pour les travailleurs de l'industrie du nucléaire, qui sont susceptibles d'être contaminés par des concentrations importantes d'U.

Dans le cadre de l'exposition chronique, il n'a pas été facile de proposer un modèle étant donné le peu d'information bibliographique. Cependant, ce travail nous a permis d'établir une cartographie préliminaire des modifications transcriptionnelles en réponse à l'incorporation chronique d'U. Cependant, la modification de la balance oxydative cellulaire peut nous alerter quant aux conséquences sur la santé humaine. En effet, le stress oxydant a déjà été associé à la pathogenèse de maladies très différentes telles que la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'Huntington et la maladie d'Alzheimer (196,198). Par conséquent, bien que nous nous sommes principalement intéressés aux conséquences de l'U au niveau rénal, ce toxique pourrait à long terme induire des effets néfastes sur l'organisme entier.

Le but de ce travail était d'évaluer l'impact d'une intoxication par l'U sur la santé humaine. Il est vrai qu'il faut garder à l'esprit que l'extrapolation faite des données obtenues à partir de l'animal vers l'homme peut être trompeuse. Cependant, vu qu'il est très difficile, voire quasi impossible de travailler sur le modèle humain, il faut bien se contenter de ces extrapolations. Il ne faut donc pas oublier qu'il existe des différences inter-espèces (en plus de celles inter-individuelles) et que les individus exposés à des métaux tels que l'UN et l'UA peuvent également être exposés à d'autres polluants (cadmium, plomb, arsenic..) pouvant

compliquer l'interprétation des signes d'intoxication. Cette notion de multipollution peut donc compliquer l'interprétation des données épidémiologiques. On peut imaginer que l'U en simple contaminant peut induire des perturbations au niveau du système urinaire, sans pour autant aboutir à une pathologie rénale. Cependant, les reins ainsi fragilisés peuvent être plus sensibles à d'autres métaux. C'est donc pour cela qu'il est important de connaître les mécanismes de toxicité de chaque élément mais aussi de tenir compte des mécanismes relatifs à la toxicité d'un ensemble de métaux toxiques d'un site donné pour estimer les risques que peuvent encourir la population présente sur ce site. Il serait peut être intéressant de réaliser des multiples expositions, comme par exemple une contamination chronique à certains métaux comme l'U et l'administration de certains médicaments connus pour fragiliser le rein (cisplatine, métal utilisé pour le traitement de certains cancers, déjà connu pour être néphrotoxique et induire des IRA (189)). Dans le même sens, il serait intéressant de connaître l'impact d'une intoxication à l'uranium chez des individus qui présentent des susceptibilités rénales comme des personnes atteintes de diabète.

La toxicogéomique suppose que la toxicité est toujours associée à des changements d'expression des gènes ; de ce fait, la nature et l'étendue de la toxicité peut être déduite par l'étude de l'expression génique. Malgré les informations extrêmement précieuses que peuvent générer l'utilisation de techniques de génomique fonctionnelle, l'information sur les taux d'ARNm n'est pas suffisante pour étudier et analyser la régulation d'un gène dans la cellule. Les données sur l'expression des protéines (protéome) ou des métabolismes associés (métabolome) sont souvent plus informatives. Il est vrai que l'évaluation de l'activité des protéines dans une cellule reste une étape incontournable pour étudier la réponse d'une cellule à un stress ou à un stimulus quelconque entraînant le développement, la prolifération ou la division cellulaire. Cependant, les méthodes actuelles d'analyse des protéines n'ont pas tout à

fait la même capacité de haut débit (bien que la différence s'amenuise), la reproductibilité et l'automatisation nécessaires, qui sont attribués aux études de génomique ; elles ne permettent donc pas à l'heure actuelle de réaliser des études à grande échelle comme le permettent les techniques d'analyse du génome.

Cependant, l'utilisation combinée de ces approches, représentée sous la forme d'un réseau parfaitement défini (Figure 16), devrait permettre d'une part de diminuer l'investigation animale et d'autre part d'examiner plus rapidement les conséquences d'une multi-intoxication par les différents métaux ou autres toxiques présents dans l'environnement. Il existe à l'heure actuelle un consortium (*Toxicogenomics Research Consortium, NCT*), qui tente de recueillir toutes les informations disponibles sur la toxicité des métaux de l'environnement (métal, concentration, temps de contamination, espèce utilisée...).

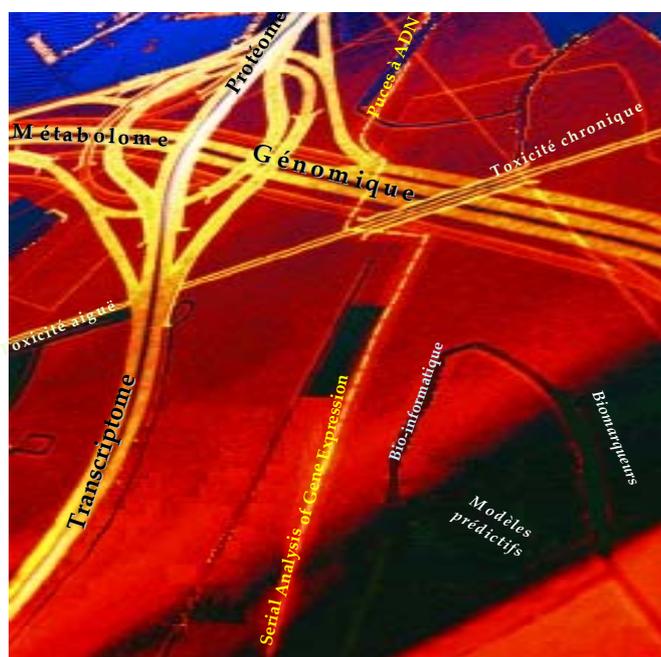


Figure 16 : La toxicogénomique et les différentes approches pouvant permettre de mieux comprendre les mécanismes relatifs à une intoxication par un métal présent dans l'environnement (schéma adapté de Wakefield *et al* (257)).

Ainsi, l'évaluation de cartographies relatant les évènements moléculaires consécutifs à l'intoxication par différents métaux devrait permettre d'établir un diagnostic précoce des contaminations potentielles et de prévenir la potentialisation de susceptibilités particulières qui pourraient être aggravé par la présence de métaux dans l'environnement proche.

Liste des figures :

<u>Figure 1</u> : Les caractéristiques générales de l'uranium.	17
<u>Figure 2</u> : Les voies d'entrées de l'uranium et ses organes cibles.	19
<u>Figure 3</u> : Autoradiographie d'une coupe longitudinale de rein de rat contaminé à l'uranium-233 (80).	25
<u>Figure 4</u> : Anatomie du rein et du néphron.	32
<u>Figure 5</u> : Conséquences cellulaires d'une intoxication à l'uranium, d'après les données de la littérature (58,92,113,152,256).	37
<u>Figure 6</u> : Accumulation des espèces oxygénées activées au sein des mitochondries.	40
<u>Figure 7</u> : Représentation schématique des deux modes de la mort cellulaire : La nécrose et l'apoptose.	41
<u>Figure 8</u> : Principe des puces à ADN.	51
<u>Figure 9</u> : Principe de la méthode <i>SAGE</i> (<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>).	56
<u>Figure 10</u> : Variation de l'expression des gènes TCTP, OPN, Rps 29 et ODC, en fonction du temps après l'injection d'uranium, par PCR en temps réel.	68
<u>Figure 11</u> : Rôles connus de l'OPN au niveau rénal, mettant en évidence l'action multifonctionnelle de cette protéine.	68
<u>Figure 12</u> : Séquence de l'ARNm codant pour la protéine ribosomale S29.	76
<u>Figure 13</u> : Régulation et fonctions de TCTP.	84
<u>Figure 14</u> : Modèle putatif sur la toxicité de l'uranium (schéma adapté de Huang <i>et al</i> (189)).	96
<u>Figure 15</u> : Les évènements morphologiques consécutifs à l'induction d'une IRA (254).	98
<u>Figure 16</u> : La toxicogénomique et les différentes approches pouvant permettre de mieux comprendre les mécanismes relatifs à une intoxication par un métal présent dans l'environnement (schéma adapté de Wakefield <i>et al</i> (257)).	101

Glossaire :

- Activité spécifique : C'est le nombre de désintégration par unité de temps, par mole d'un composé marqué donné. Elle s'exprime en Becquerel (Bq).
- Concatémère : Polymère d'ADN correspondant à une série d'étiquettes.
- Génome : ensemble des gènes d'un organisme donné.
- Génomique : C'est l'étude des gènes et de leur fonction. Elle diffère de la génétique par le fait que cette dernière se focalise principalement sur l'étude de gènes uniques, alors que la génomique s'intéresse à l'étude d'un ensemble de gènes.
- Métabolomique : C'est l'étude du métabolome, qui correspond à l'ensemble des métabolismes qui régissent les cellules d'un organisme.
- Protéomique : C'est l'étude de l'ensemble des protéines (le protéome) codées par le génome d'une cellule ou d'un tissu dans un état donné.
- Transcriptome : Il correspond à l'ensemble des ARNm d'une cellule ou d'un tissu dans un état donné.
- Toxicogénomique : Etude des réponses des génomes à des stress ou toxiques environnementaux.

Références.

1. Cummings BS and Schnellmann RG. Pathophysiology of nephrotoxic cell injury, in Schrier RW, ed: Diseases of the kidney and urinary tract. Philadelphia, lippincott Williams & Wilkins. 2001;1071-1091.
2. Ghorbe F *et al.* Effect of chronic lead exposure on kidney function in male and female rats: determination of a lead exposure biomarker. Arch Physiol Biochem 2001;109(5):457-63.
3. Van Vleet TR and Schnellmann RG. Toxic nephropathy: environmental chemicals. Semin Nephrol 2003;23(5):500-8.
4. O'Dell BL, Kilburn KH, McKenzie WN, Thurston RJ. The lung of the copper-deficient rat. A model for developmental pulmonary emphysema. Am J Pathol 1978;91(3):413-32.
5. Zietz BP *et al.* Epidemiological investigation on chronic copper toxicity to children exposed via the public drinking water supply. Sci Total Environ 2003;302(1-3):127-44.
6. Halliwell B and Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys 1990;280(1):1-8.
7. Tamai KT, Gralla EB, Ellerby LM, Valentine JS, Thiele DJ. Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90(17):8013-7.
8. Dieguez-Acuna FJ, Ellis ME, Kushleika J, Woods JS. Mercuric ion attenuates nuclear factor-kappaB activation and DNA binding in normal rat kidney epithelial cells: implications for mercury-induced nephrotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol 2001;173(3):176-87.
9. Tchounwou PB, Ayensu WK, Ninashvili N, Sutton D. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. Environ Toxicol 2003;18(3):149-75.
10. Johnson FM. The genetic effects of environmental lead. Mutat Res 1998;410(2):123-40.
11. Bornschein R, Pearson D, Reiter L. Behavioral effects of moderate lead exposure in children and animal models: part 2, animal studies. Crit Rev Toxicol 1980;8(2):101-52.
12. Fewtrell LJ, Pruss-Ustun A, Landrigan P, Ayuso-Mateos JL. Estimating the global burden of disease of mild mental retardation and cardiovascular diseases from environmental lead exposure. Environ Res 2004;94(2):120-33.

13. Correa M, Roig-Navarro AF, Aragon CM. Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice. *Life Sci* 2004;74(16):2009-21.
14. Falk H. International environmental health for the pediatrician: case study of lead poisoning. *Pediatrics* 2003;112(1 Pt 2):259-64.
15. International agency for research on cancer monographs, beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass industry. 1993;58, IARC, Lyon:119-238.
16. National toxicology program, tenth report on carcinogens, department of health and human services, research triangle park, NC. 2000;III-42-44.
17. Mueller PW, Price RG, Finn WF. New approaches for detecting thresholds of human nephrotoxicity using cadmium as an example. *Environ Health Perspect* 1998;106(5):227-30.
18. Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis in review. *J Inorg Biochem* 2000;79(1-4):241-4.
19. Morselt AF *et al.* Differences in immunological susceptibility to cadmium toxicity between two rat strains as demonstrated with cell biological methods. Effect of cadmium on DNA synthesis of thymus lymphocytes. *Toxicology* 1998;48(2):127-39.
20. Waalkes MP and Misra RR. Cadmium carcinogenicity and genotoxicity. in: L Chang (Ed), *Toxicology of Metals*, CRC Press, Boca Raton, FL 1996;231-244.
21. Schwartz GG and Reis IM. Is cadmium a cause of human pancreatic cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9(2):139-45.
22. Tseng WP *et al.* Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *J Natl Cancer Inst* 1968;40(3):453-63.
23. Bettley FR and O'Shea JA. The absorption of arsenic and its relation to carcinoma. *Br J Dermatol* 1975;92(5):563-8.
24. Cuzick J, Evans S, Gillman M, Price Evans DA. Medicinal arsenic and internal malignancies. *Br J Cancer* 1982;45(6):904-11.
25. Engel RR and Smith AH. Arsenic in drinking water and mortality from vascular disease: an ecologic analysis in 30 counties in the United States. *Arch Environ Health* 1994;49(5):418-27.
26. Germolec DR *et al.* Arsenic induces overexpression of growth factors in human keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;141(1):308-18.
27. Rahman M *et al.* Hypertension and arsenic exposure in Bangladesh. *Hypertension* 1999;33(1):74-8.
28. Tseng CH *et al.* Long-term arsenic exposure and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a cohort study in arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. *E* 2000;108(9):847-51.

29. Gurr JR *et al.* Nitric oxide production by arsenite. *Mutat Res* 2003;533(1-2):173-82.
30. Jung DK *et al.* Hydrogen peroxide mediates arsenite activation of p70(s6k) and extracellular signal-regulated kinase. *Exp Cell Res* 2003;290(1):144-54.
31. Doll R, Morgan LG, Speizer FE. Cancers of the lung and nasal sinuses in nickel workers. *Br J Cancer* 1970;24(4):623-32.
32. Shen HM and Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 1:275-82.
33. Nielsen GD, Rohold AE, Andersen KE. Nickel contact sensitivity in the guinea pig. An efficient open application test method. *Acta Derm Venereol* 1992;72(1):45-8.
34. Liden C. Legislative and preventive measures related to contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 2001;44(2):65-9.
35. Meding B, Liden C, Berglind N. Self-diagnosed dermatitis in adults. Results from a population survey in Stockholm. *Contact Dermatitis* 2001;45(6):341-5.
36. Nagashima K. A review of experimental methylmercury toxicity in rats: neuropathology and evidence for apoptosis. *Toxicol Pathol* 1997;25(6):624-31.
37. Huan SY, Yang CH, Chen YC. Arsenic trioxide therapy for relapsed acute promyelocytic leukemia: an useful salvage therapy. *Leuk Lymphoma* 2000;38(3-4):283-93.
38. Rotilio G, Carri MT, Rossi L, Ciriolo MR. Copper-dependent oxidative stress and neurodegeneration. *IUBMB Life* 2000;50(4-5):309-14.
39. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull* 2003;68:167-82.
40. Hyun Park W *et al.* Arsenic trioxide inhibits the growth of A498 renal cell carcinoma cells via cell cycle arrest or apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(1):230-5.
41. Thevenod F. Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol* 2003;93(4):p87-93.
42. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* 2003;533(1-2):201-9.
43. Haq F, Mahoney M, Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res* 2003;533(1-2):211-26.
44. Bosshard E, Zimmerli B, Schalatter C. Uranium in diet: risk assessment of its nephro- and radiotoxicity. *Chemosphere* 1992;24(3):309-321.
45. Moss MA *et al.* Uranium in drinking water-report on clinical studies in Nova Scotia. Dans : *Chemical toxicology and clinical chemistry of metals*. S.S. Brown et J. Savory (eds.). Academic Press, London. 1983;149-152.

46. Betcher RN, Gascoyne M, Brown D. Uranium in groundwater of southeastern Manitoba, Canada. *Canada J Can Sci Terre* 1988;25:2089-2103.
47. Juntunen R. Uranium and radon in wells drilled into bedrock in Southern Finland. Report of Investigation, Geological Survey of Finland 1991;98
48. Fisenne IM and Welford GA. Natural U concentration in soft tissues and bone of New York City residents. *Health Phys* 1986;50(6):746-739.
49. Singh NP, Burleigh DP, Ruth HM, Wrenn ME. Daily U intake in Utah residents from food and drinking water. *Health Phys* 1990;59(3):333-337.
50. 2nde édition of the Guidelines for drinking water quality Who. 1993.
51. Aigueperse J *et al.* Etat des connaissances sur les risques potentiels associés a l'uranium appauvri utilisé dans les armes. Raport DPHD/IPSN 2001;
52. Bem H, Wiczorkowski P, Budzanowski M. Evaluation of technologically enhanced natural radiation near the coal-fired power plants in the Lodz region of Poland. *J Environ Radioact* 2002;61(2):191-201.
53. Galle P. Métabolisme et toxicité de l'uranium. Deuxième édition, Toxiques nucléaires, Editions Masson, Paris. 1997;184-205.
54. Métivier H, Ansoborlo E, Chazel V, Gérosimo P. L'Uranium dans l'environnement à l'homme : Biocinétique et dosimétrie des expositions à l'uranium. EDP Sciences 2001;Chap. 7:213-238.
55. CIPR.Publication 66. Human respiratory tract: model for radiological protection: Part 3, ingestion doses coefficients. Pergamon Press, Oxford 1994;Vol 24 n°1-3.
56. Petitot F, Moreels AM, Paquet F. In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig. *Can J Physiol Pharmacol* 2004;82(2):133-9.
57. Wrenn ME *et al.* Metabolism of Ingested U and Ra. *Health Phys* 1985;601-633.
58. Leggett RW. The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys* 1989;57:365-83.
59. Karpas Z *et al.* Uptake of ingested uranium after low "acute intake". *Health Phys* 1998;74(3):337-45.
60. Chevari S and Likhner D. Complex formation of natural uranium in blood. *Med Radiol (Mosk)* 1968;13:53-57.
61. Dounce AL, Roberts E, Wills JM. Catalasuria as a sensitive test for uranium poisoning. In Voegtlin C, Hodge HC, eds *Pharmacology and toxicology of uranium compounds* vol I Mc Graw-Hill, New York 1949;889-950.

62. Durbin PW and Wrenn ME. Metabolism and effects of uranium in animals. In: Conference on occupational health: experience with uranium Arlington, V A , 28-30 April: ERDA 1975;93:67-129.
63. Stevens W, Bruenger FW, Atherton DR, Smith JM , Taylor GN. The Distribution and Retention of Hexavalent ²³³U in the Beagle. *Radiat Res* 1980;83:109-126.
64. Cooper JR, Stradling GN, Smith H, Ham SE. The Behaviour of Uranium-233 Oxide and Uranyl-233 Nitrate in Rats. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1982;41:421-33.
65. Wrenn ME *et al.* A comprehensive metabolic model for uranium metabolism and dosimetry based on human and animal data. *Radiat Prot Dosim* 1994;53:255-258.
66. Tannenbaum A, Silverstone H, Koziol J. Tracer studies of the distribution and excretion of uranium in mice, rats and dogs. In: Toxicology of uranium, National Nuclear Energy, Series Div IV, McGraw Mill Book Co, New York 1951;23:128-181.
67. Domingo JL. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. *Reprod Toxicol* 2001;15(6):603-9.
68. Pellmar TC *et al.* Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci* 1999;49(1):29-39.
69. McDiarmid MA *et al.* Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans. *Environ Res* 2000;82:168-80.
70. Novikov IuV and Iudina TV. [Data on the biological action of small amounts of natural uranium in water]. *Gig Sanit* 1970;35(1):54-61.
71. Berlin M and Rudell B. Uranium. In: Friberg L. eds. Handbook on the toxicology of metals. Elsevier/North Molland biochemical Press 1979;647-58.
72. Priest ND, Howells GR, Green D, Haines JW. Uranium in Bone: Metabolic and Autoradiographic Studies in the Rat. *Hum Toxicol* 1982;2:479-496.
73. Harley NH and Fisenne IM. Distribution and alpha radiation dose from naturally occurring U, Th, and Ra in the human skeleton. *Health Phys* 1990;58(4):515-8.
74. Hursh JB, Neuman WR, Toribara T, Wilson H, Waterhouse C. Oral ingestion of uranium by man. *Health Phys* 1969;17(4):619-21.
75. Menard O, Scheid P, Anthoine D, Martinet Y. [Radon and primary bronchial cancer]. *Rev Mal Respir* 1994;11(6):531-45.
76. Kreuzer M *et al.* Characteristics of the German uranium miners cohort study. *Health Phys* 2002;83(1):26-34.
77. Pasanen M, Lang S, Kojo A, Kosma VM. Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environ Res* 1995;70(2):126-33.

78. Gilman AP *et al.* Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci* 1998;41(1):117-28.
79. Moon YJ *et al.* Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats. *Drug Metab Dispos* 2003;31(6):776-84.
80. Paquet F, Frelon S, Cote G, Madic C. Spéciation et dosimétrie interne : des espèces chimiques aux modèles dosimétriques. *Radioprotection EDP Sciences* 2004;39(3)
81. Hodge HC. A history of uranium poisoning (1824-1842). In: Hodge HC, Stannard JN, Hursh JB. eds *Uranium, plutonium, transplutanic elements: Handbook of experimental pharmacology* Heidelberg: Springer-Verlag 1973;36:1-68.
82. Miller AC *et al.* Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride. *Environ Health Perspect* 1998;106(8):465-71.
83. McClain DE *et al.* Health effects of embedded depleted uranium. *Mil Med* 2002;167(2 Suppl):117-9.
84. Miller AC, Brooks K, Smith J, Page N. Effect of the militarily-relevant heavy metals, depleted uranium and heavy metal tungsten-alloy on gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). *Mol Cell Biochem* 2004;255(1-2):247-56.
85. Miller AC *et al.* Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation. *J Environ Radioact* 2003;64(2-3):247-59.
86. Miller AC *et al.* Neoplastic transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by heavy metal-tungsten alloy particles: induction of genotoxic effects. *Carcinogenesis* 2001;22(1):115-25.
87. Miller AC, Stewart M, Brooks K, Shi L, Page N. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *J Inorg Biochem* 2002;91(1):246-52.
88. Chen WZ and Xie YY. [Studies on uranium mobilization agents. IV. Synthesis of N, N'-bis-[N-carboxymethyl-(2,3-dihydroxy-5-carbomethoxy) benzylaminoacetyl]-alpha, omega-diamines]. *Yao Xue Xue Bao* 1990;25(10):790-4.
89. Filippova LG, Nifatov AP, Liubchanskii ER. [Late sequelae of administering enriched uranium to rats]. *Radiobiologiia* 1978;18(3):400-5.
90. Haley DP, Bulger RE, Dobyas DC. The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1982;41(1-2):181-92.
91. Diamond GL, Morrow PE, Panner BJ, Gelein RM, Baggs RB. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam Appl Toxicol* 1989;13(1):65-78.

92. Anthony ML, Gartland KP, Beddell CR, Lindon JC, Nicholson JK. Studies of the biochemical toxicology of uranyl nitrate in the rat. *Arch Toxicol* 1994;68(1):43-53.
93. Sun DF, Fujigaki Y, Fujimoto T, Yonemura K, Hishida A. Possible involvement of myofibroblasts in cellular recovery of uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. *Am J Pathol* 2000;157(4):1321-34.
94. Voegtlin C and Hodge HC. eds. Pharmacology and toxicology of uranium compounds. National nuclear Energy Series. Div IV, Parts I and II. New York: Mc Graw-Hill. 1949.
95. Yuile PG, Tait SM, Hayes JM. Donor renin activity and function of cadaveric renal allografts. *Lancet* 1973;2(7820):75-6.
96. Lin RH, Wu LJ, Lee CH, Lin-Shiau SY. Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 1993;319(3):197-203.
97. Lopez R, Diaz Sylvester PL, Ubios AM, Cabrini RL. Percutaneous toxicity of uranyl nitrate: its effect in terms of exposure area and time. *Health Phys* 2000;78(4):434-7.
98. Abou-Donia MB *et al.* Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;72(4):881-90.
99. Pellmar TC, Keyser DO, Emery C, Hogan JB. Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments. *Neurotoxicology* 1999;20(5):785-92.
100. Domingo JL, Ortega A, Paternain JL, Corbella J. Evaluation of the perinatal and postnatal effects of uranium in mice upon oral administration. *Arch Environ Health* 1989;44(6):395-8.
101. Domingo JL, Paternain JL, Llobet JM, Corbella J. The developmental toxicity of uranium in mice. *Toxicology* 1989;55(1-2):143-52.
102. Paternain JL, Domingo JL, Ortega A, Llobet JM. The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicol Environ Saf* 1989;17(3):291-6.
103. Llobet JM, Sirvent JJ, Ortega A, Domingo JL. Influence of chronic exposure to uranium on male reproduction in mice. *Fundam Appl Toxicol* 1991;16(4):821-9.
104. Hu QY and Zhu SP. Induction of chromosomal aberrations in male mouse germ cells by uranyl fluoride containing enriched uranium. *Mutat Res* 1990;244(3):209-14.
105. Miller AC *et al.* Urinary and serum mutagenicity studies with rats implanted with depleted uranium or tantalum pellets. *Mutagenesis* 1998;13(6):643-8.
106. Huang X, Zhuang Z, Frenkel K, Klein CB, Costa M. The role of nickel and nickel-mediated reactive oxygen species in the mechanism of nickel carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 3:281-4.

107. Miller AC *et al.* Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints. *Radiat Prot Dosimetry* 2002;99(1-4):275-8.
108. Miller AC, Xu J, Stewart M, McClain D. Suppression of depleted uranium-induced neoplastic transformation of human cells by the phenyl fatty acid, phenyl acetate: chemoprevention by targeting the p21RAS protein pathway. *Radiat Res* 2001;155(1 Pt 2):163-170.
109. Yazzie M, Gamble SL, Civitello ER, Stearns DM. Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chem Res Toxicol* 2003;16(4):524-30.
110. Sibernagl S and Despopoulos A. *Physiologie*. Deuxième édition Médecine-Sciences Flammarion Paris 1996;120-153.
111. Morrow P *et al.* Inhalation and intravenous studies of UF₆/UO₂F₂ in dogs. *Health Phys* 1982;43:859-873.
112. Moss MA. Study on the effects of uranium on kidney functions. Atomic Energy Control Board, CP 1046, OTTAWA, Canada. 1989.
113. Haley DP. Morphologic changes in uranyl nitrate-induced acute renal failure in saline- and water-drinking rats. *Lab Investigation* 1982;46:196-208.
114. McDonald-Taylor CK, Singh A, Gilman A. Uranyl nitrate-induced proximal tubule alterations in rabbits: a quantitative analysis. *Toxicol Pathol* 1997;25(4):381-9.
115. Sun DF *et al.* Relation of distal nephron changes to proximal tubular damage in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. *Am J Nephrol* 2002;22(5-6):405-16.
116. Sano K *et al.* The roles of apoptosis in uranyl acetate-induced acute renal failure. *Ren Fail* 1998;20(5):697-701.
117. Sano K *et al.* Role of apoptosis in uranyl acetate-induced acute renal failure and acquired resistance to uranyl acetate. *Kidney Int* 2000;57(4):1560-70.
118. Flamenbaum W *et al.* The initiation phase of experimental acute renal failure: an evaluation of uranyl nitrate-induced acute renal failure in the rat. *Kidney Int* 1976;Suppl. 6:S115-S122.
119. Avasthi PS, Evan AP, Hay D. glomerular endothelial cells in uranyl nitrate-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest* 1980;65:121-27.
120. Nizet A. Influence of uranyl nitrate upon tubular reabsorption and glomerular filtration in blood perfused isolated dog kidneys. *Pflugers Arch* 1981;391(4):296-300.
121. McDonald-Taylor CK, Bhatnagar MK, Gilman A, Yagminas A, Singh A. Uranyl nitrate-induced glomerular basement membrane alterations in rabbits: a quantitative analysis. *Bull Environ Contam Toxicol* 1992;48(3):367-73.

122. Kato A, Hishida A, Kobayashi S, Honda N. Glomerular alterations in experimental oliguric and nonoliguric acute renal failure. *Ren Fail* 1993;15(2):215-24.
123. Mirto H *et al.* Influence of uranium(VI) speciation for the evaluation of in vitro uranium cytotoxicity on LLC-PK1 cells. *Hum Exp Toxicol* 1999;18(3):180-7.
124. Kleinman JG, McNeil JS, Schwartz JH, Hamburger RJ, Flamenbaum W. Effect of dithiothreitol on mercuric chloride- and uranyl nitrate-induced acute renal failure in the rat. *Kidney Int* 1977; 12(2):115-21.
125. Mendelsohn FA and Smith EA. Intrarenal renin, angiotensin II, and plasma renin in rats with uranyl nitrate-induced and glycerol-induced acute renal failure. *Kidney Int* 1980;17(4):465-72.
126. Ikuma K, Honda N, Hishida A, Nagase M. Loss of glomerular responses to vasoconstrictor agents in rabbits recovering from ARF. *Kidney Int* 1986;30(6):836-41.
127. Mirto H *et al.* Intracellular behaviour of uranium(VI) on renal epithelial cell in culture (LLC-PK1): influence of uranium speciation. *Toxicol Lett* 1999;104(3):249-56.
128. Blantz RC. The mechanism of acute renal failure after uranyl nitrate. *J Clin Invest* 1975;55:621-35.
129. Hori R, Takano M, Okano T, Inui K. Transport of P-aminohippurate, Tetraethylammonium and D-glucose in renal brush border membranes from rats with acute renal failure. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;233:776-81.
130. Zalups RK, Gelein RM, Morrow PE, Diamond GL. Nephrotoxicity of uranyl fluoride in uninephrectomized and sham-operated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988;94(1):11-22.
131. Pedraza-Chaverri J *et al.* Angiotensin I converting enzyme activity in uranyl nitrate induced acute renal failure in rats. *Ren Fail* 1995;17(4):377-88.
132. Braun JP, Siest G, Rico AG. Uses of gamma-glutamyltransferase in experimental toxicology. *Adv Vet Sci Comp Med* 1987;31:151-72.
133. Sudo M, Honda N, Hishida A, Nagase M. Renal hemodynamics in uranyl acetate-induced acute renal failure of rabbits. *Kidney Int* 1977;11(1):35-43.
134. Muller D. Etude in vitro de la reabsorption tubulaire proximale de l'uranium - Consèquences fonctionnelles. Thèse IRSN-Bordeaux II 2002.
135. Galle P. Rôle des lysosomes et des mitochondries dans les phénomènes de concentration et d'élimination d'éléments minéraux (uranium et or) par le rein. *J Microscopie* 1974;19:17-24.
136. Berry JP, Hourdry J, Galle P, Lagrue G. Chromium concentration by proximal renal tubule cells: an ultrastructural, microanalytical and cytochemical study. *J Histochem Cytochem* 1978;26:651-57.

137. Ghadially FN, Lalonde JM, Yong NK. Uraniosomes produced in the Synovial membrane by uranyl acetate. *Pathology* 1982;14:121-27.
138. Floren C *et al.* Analytical microscopy observations of rat enterocytes after oral administration of soluble salts of lanthanides, actinides and elements of group III-A of the periodic chart. *Cell Mol Biol* 2001;47(3):419-25.
139. Goodford PJ and Wolowyk MW. Localization of cation interactions in the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *J Physiol* 1972;224(3):521-35.
140. Simmons CF Jr, Rennke HG, Humes HD. Acute renal failure induced by diethylaminoethyl dextran: importance of cationic charge. *Kidney Int* 1981;19(3):424-30.
141. Kirschbaum BB. Interactions between renal brush border membranes and polyamines. *J Pharmacol Exp Ther* 1984;229(2):409-16.
142. Lin-Shiau SY, Fu WM, Lee CY. Effects of uranyl ions on neuromuscular transmission of chick biventer cervicis muscle. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1979;241(2):332-43.
143. Boileau LJR, Nieboer E, Richardson DHS. Uranium accumulation in the lichen *cladonia rangiferina*. Part II. Toxic effects of cationic, neutral, and anionic forms of the uranyl ion. *Can J Bot* 1985;63:390-397.
144. Kato A, Hishida A, Nakajima T. Effects of oxygen free radical scavengers on uranium-induced acute renal failure in rats. *Free Radic Biol Med* 1994;16:855-59.
145. Brady HR, Kone BC, Brenner RM, Gullans SR. Early effects of uranyl nitrate on respiration and K⁺ transport in rabbit proximal tubule. *Kidney Int* 1989;36:27-34.
146. Choie DD, del Campo AA, Guarino AM. Subcellular localization of cis-dichlorodiammineplatinum(II) in rat kidney and liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980;55(2):245-52.
147. Bull RJ. Lead and energy metabolism. In: Singhal RL, Thomas JA, eds *Lead toxicity* Baltimore : Urban and Schwarzeberg 1980;119-68.
148. Weinberg JM. The cellular basis of nephrotoxicity. In: Schrider RW, Gottschalk CW, eds. *Disease of the kidney*. Boston: Little, Brown, and Co. 1988;1137-95.
149. Pavlovic D, Vlahovic P, Cvetkovic T, Savic V , Kocic G. Is oxidative stress the biochemical basis of uranyl nitrate-induced acute renal failure? *Ren Fail* 1998;20(3):539-42.
150. Schramm L *et al.* L-arginine deficiency and supplementation in experimental acute renal failure and in human kidney transplantation. *Kidney Int* 2002;61(4):1423-32.
151. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001;495(1-2):12-5.
152. McDonald-Taylor CK, Singh A, Gilman A. Uranyl nitrate-induced proximal tubule alterations in rabbits: a quantitative analysis. *Toxicol Pathol* 1997;25:381-9.

153. Gilman AP *et al.* Uranyl nitrate: 91-day exposure and recovery studies in the male New Zealand white rabbit. *Toxicol Sci* 1998;41(1):138-51.
154. Furuya R, Kumagai H, Hishida A. Acquired resistance to rechallenge injury with uranyl acetate in LLC-PK1 cells. *J Lab Clin Med* 1997;129:347-55.
155. Komatsuda A *et al.* Overexpression of the human 72 kDa heat shock protein in renal tubular cells confers resistance against oxidative injury and cisplatin toxicity. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14(6):1385-90.
156. Mizuno S *et al.* Association of HSP73 with the acquired resistance to uranyl acetate-induced acute renal failure. *Toxicology* 1997;117(2-3):183-91.
157. Gilman AP *et al.* Uranyl nitrate: 91-day toxicity studies in the New Zealand white rabbit. *Toxicol Sci* 1998;41(1):129-37.
158. Mao Y *et al.* Inorganic components of drinking water and microalbuminuria. *Environ Res* 1995;71(2):135-40.
159. Zamora ML, Tracy BL, Zielinski JM, Meyerhof DP, Moss MA. Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol Sci* 1998;43(1):68-77.
160. Kurttio P *et al.* Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 2002;110(4):337-42.
161. Maskos U and Southern EM. Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ. *Nucleic Acids Res* 1992;20(7):1679-84.
162. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995;270(5235):484-7.
163. Velculescu VE *et al.* Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 1999;23(4):387-8.
164. Chen J *et al.* Identifying novel transcripts and novel genes in the human genome by using novel SAGE tags. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(19):12257-62.
165. Velculescu VE *et al.* Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 1997;88:243-51.
166. Lee JY and Lee DH. Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in Arabidopsis pollen undergoing cold stress. *Plant Physiol* 2003;132(2):517-29.
167. Ekman DR, Lorenz WW, Przybyla AE, Wolfe NL, Dean JF. SAGE analysis of transcriptome responses in Arabidopsis roots exposed to 2,4,6-trinitrotoluene. *Plant Physiol* 2003;133(3):1397-406.
168. Divina P and Forejt J. The Mouse SAGE Site: database of public mouse SAGE libraries. *Nucleic Acids Res* 2004;32:D482-3.

169. Zhang L *et al.* Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 1997;276(5316):1268-72.
170. Untergasser G, Koch HB, Menssen A, Hermeking H. Characterization of epithelial senescence by serial analysis of gene expression: identification of genes potentially involved in prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62(21):6255-62.
171. Kal AJ *et al.* Dynamics of gene expression revealed by comparison of serial analysis of gene expression transcript profiles from yeast grown on two different carbon sources. *Mol Biol Cell* 1999;10(6):1859-72.
172. Hashimoto S *et al.* Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 1999;94(3):845-52.
173. Hashimoto S, Suzuki T, Dong HY, Yamazaki N, Matsushima K. Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages. *Blood* 1999;94(3):837-44.
174. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997;389(6648):300-5.
175. Madden SL, Galella EA, Zhu J, Bertelsen AH, Beaudry GA. SAGE transcript profiles for p53-dependent growth regulation. *Oncogene* 1997;15(9):1079-85.
176. Aldaz CM *et al.* Serial analysis of gene expression in normal p53 null mammary epithelium. *Oncogene* 2002;21(41):6366-76.
177. Van Den Berg A, Van Der Leij J, Poppema S. Serial analysis of gene expression: rapid RT-PCR analysis of unknown SAGE tag. *Nucleic Acids Res* 1999;27(17):e17.
178. Chen JJ, Rowley JD, Wing SM. Generation of longer cDNA fragments from serial analysis of gene expression tags for gene identification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(1):349-253.
179. Ye SQ, Zhang LQ, Zheng F, Virgil D, Kwitrovich PO. MiniSAGE: Gene Expression Profiling Using Serial Analysis of Gene Expression from 1 µg Total RNA. *Anal Biochem* 2000;287:144-152.
180. Saha S *et al.* Using the transcriptome to annotate the genome. *Nature biotechnology* 2002;20:508-512.
181. Powell J. Enhanced concatemer cloning-a modification to the SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) technique. *Nucleic Acids Res* 1998;26(14):3445-3446.
182. Wang SM and Rowley JD. A strategy for genome-wide gene analysis: integrated procedure for gene identification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(20):11909-14.
183. Datson NA, Van Der Perk-de Jong J, Van Der Berg MP, de Kloet ER, Vreugdenhil E. MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. *Nucleic Acids Res* 1999;27(5):1300-7.
184. Peters DG *et al.* Comprehensive transcript analysis in small quantities of mRNA by SAGE-Lite. *Nucleic Acids Res* 1999;27(24):e39.

185. Virlon B *et al.* Serial microanalysis of renal transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(26):15286-91.
186. Ryo A *et al.* A modified serial analysis of gene expression that generates longer sequence tags by nonpalindromic cohesive linker ligation. *Anal Biochem* 2000;277(1):160-2.
187. Fleck C *et al.* Use of gene chip technology for the characterisation of the regulation of renal transport processes and of nephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2003;54(5-6):401-10.
188. Kobayashi S, Nagase M, Honda N, Hishida A. Glomerular alterations in uranyl acetate-induced acute renal failure in rabbits. *Kidney Int* 1984;26:808-15.
189. Huang Q *et al.* Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology. *Toxicol Sci* 2001;63(2):196-207.
190. Yoshida T *et al.* Monitoring changes in gene expression in renal ischemia-reperfusion in the rat. *Kidney Int* 2002;61(5):1646-54.
191. Yoshida T *et al.* Global analysis of gene expression in renal ischemia-reperfusion in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291(4):787-94.
192. Kieran NE *et al.* Modification of the transcriptomic response to renal ischemic/reperfusion injury by lipoxin analog. *Kidney Int* 2003;64:480-92.
193. Mishra J *et al.* Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(10):2534-43.
194. Supavekin S *et al.* Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 2003;63(5):1714-24.
195. Fujigaki Y, Sun DF, Goto T, Hishida A. Temporary changes in macrophages and MHC class-II molecule-expressing cells in the tubulointerstitium in response to uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. *Virchows Arch* 2003;443(2):206-16.
196. Stokes AH *et al.* Dopamine toxicity in neuroblastoma cells: role of glutathione depletion by L-BSO and apoptosis. *Brain Res* 2000;858(1):1-8.
197. Zhang Y and Herman B. Ageing and apoptosis. *Mech Ageing Dev* 2002;123(4):245-60.
198. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Essential cellular regulatory elements of oxidative stress in early and late phases of apoptosis in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal* 2004;6(2):277-87.
199. Passarge E. Génétique. Deuxième édition Médecine-Sciences Flammarion Paris 2002;76-77.
200. Welle S, Bhatt K, Thornton CA. Inventory of high-abundance mRNAs in skeletal muscle of normal men. *Genome Res* 1999;9(5):506-13.

201. Chen H, Centola M, Altschul SF, Metzger H. Characterization of gene expression in resting and activated mast cells. *J Exp Med* 1998;188(9):1657-68.
202. Sturzenbaum SR, Kille P, Morgan AJ. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Biochim Biophys Acta* 1998;1398(3):294-304.
203. Li F, Zhang D, Fujise K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem* 2001;276(50):47542-9.
204. Tuynder M *et al.* Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(23):14976-81.
205. Bommer UA and Thiele BJ. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(3):379-85.
206. Snowdowne KW, Freudenrich CC, Borle AB. The effects of anoxia on cytosolic free calcium, calcium fluxes, and cellular ATP levels in cultured kidney cells. *J Biol Chem* 1985;260(21):11619-26.
207. Kribben A *et al.* Evidence for role of cytosolic free calcium in hypoxia-induced proximal tubule injury. *J Clin Invest* 1994;93(5):1922-9.
208. Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* 2002;265:49-72.
209. Kalinich JF, Ramakrishnan N, Villa V, McClain DE. Depleted uranium-uranyl chloride induces apoptosis in mouse J774 macrophages. *Toxicology* 2002;179(1-2):105-14.
210. Mutsaers SE *et al.* Cytokine regulation of mesothelial cell proliferation in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 1997;72(1):24-9.
211. Haynes DR, Rogers SD, Howie DW, Percy MJ, Vernon-Roberts B. Drug inhibition of the macrophage response to metal wear particles in vitro. *Clin Orthop* 1996;(323):316-26.
212. Chen FS, Scher DM, Clancy RM, Vera-Yu A, Di Cesare PE. In vitro and in vivo activation of polymorphonuclear leukocytes in response to particulate debris. *J Biomed Mater Res* 1999;48(6):904-12.
213. Nosseri C, Coppola S, Ghibelli L. Possible involvement of poly(ADP-ribosyl) polymerase in triggering stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 1994;212(2):367-73.
214. Vayssier M and Polla BS. Heat shock proteins chaperoning life and death. *Cell Stress Chaperones* 1998;3(4):221-7.
215. Pulido MD and Parrish AR. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res* 2003;533(1-2):227-41.

216. Kwon TH, Froklaer J, Huan JS, Knepper MA. Decreased abundance of major Na⁺ transporters in kidneys of rats with ischemia-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:F925-39.
217. Jehle AW *et al.* Type II Na-Pi cotransport is regulated transcriptionally by ambient bicarbonate/carbon dioxide tension in OK cells. *Am J Physiol* 1999;276(1 Pt 2):F46-53.
218. Moz Y, Silver J, Naveh-Many T. Protein-RNA interactions determine the stability of the renal NaPi-2 cotransporter mRNA and its translation in hypophosphatemic rats. *J Biol Chem* 1999;274(36):25266-72.
219. Torok K, Wilding M, Groigno L, Patel R, Whitaker M. Imaging the spatial dynamics of calmodulin activation during mitosis. *Curr Biol* 1998;8(12):692-9.
220. Liu GX, Sheng HF, Wu S. A study on the levels of calmodulin and DNA in human lung cancer cells. *Br J Cancer* 1996;73(7):899-901.
221. Cheng RY *et al.* Gene expression dose-response changes in microarrays after exposure of human peripheral lung epithelial cells to nickel(II). *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;191(1):22-39.
222. Mavromatidis K, Fytil C, Kynigopoulou P, Fragia T, Sombolos K. Serum ferritin levels are increased in patients with acute renal failure. *Clin Nephrol* 1998;49(5):296-8.
223. Mager WH. Control of ribosomal protein gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1998;949(1):1-15.
224. Bortoluzzi S, Alessi F, Romualdi C, Danieli GA. Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues. *Bioinformatics* 2001;17:1152-57.
225. Wool IG. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *TIBS* 1996;164-65.
226. Yamamoto T. Molecular mechanism of monocyte predominant infiltration in chronic inflammation: mediation by a novel monocyte chemotactic factor, S19 ribosomal protein dimer. *Pathol Int* 2000;50(11):863-71.
227. Go H and Taniguchi S. Augmentation in the expression of a ribosomal protein associated with transformation. *Biochem Mol Biol Int* 1998;46(3):629-38.
228. Bevort M and Leffers H. Down regulation of ribosomal protein mRNAs during neuronal differentiation of human NTERA2 cells. *Differentiation* 2000;66(2-3):81-92.
229. Pogue-Geile K *et al.* Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein. *Mol Cell Biol* 1991;11(8):3842-9.
230. Wang Q *et al.* Cloning and characterization of full-length human ribosomal protein L15 cDNA which was overexpressed in esophageal cancer. *Gene* 2001;263(1-2).

231. Kasai H *et al.* Differential Expression of Ribosomal Proteins in Human Normal and Neoplastic Colorectum. *The Journal of Histochemistry* 2003;51(5):567-73.
232. Khanna N, Sen S, Sharma H, Singh N. S29 ribosomal protein induces apoptosis in H520 cells and sensitizes them to chemotherapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304(1):26-35.
233. Brosché. The mRNA-binding ribosomal protein S26 as a molecular marker in plants: molecular cloning, sequencing and differential gene expression during environmental stress. *Biochim Biophys Acta* 1999;1445(3):342-4.
234. Welsh JB *et al.* Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;98:1176-1181.
235. Koolman J and Rohm KH. *Biochimie. Médecine-Sciences- Eds Flammarion* 2001;Deuxième édition:130-132.
236. Nicholson JK, Higham DP, Timbrell JA, Sadler PJ. Quantitative high resolution ¹H NMR urinalysis studies on the biochemical effects of cadmium in the rat. *Mol Pharmacol* 1989;36(3):398-404.
237. Satoh M *et al.* Enhanced renal toxicity by inorganic mercury in metallothionein-null mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283(3):1529-33.
238. Shimoda R, Nagamine T, Takagi H, Mori M, Waalkes MP. Induction of apoptosis in cells by cadmium: quantitative negative correlation between basal or induced metallothionein concentration and apoptotic rate. *Toxicol Sci* 2001;64(2):208-15.
239. McAleer MF and Tuan RS. Metallothionein protects against severe oxidative stress-induced apoptosis of human trophoblastic cells. *In Vitro Mol Toxicol* 2001;14(3):219-31.
240. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572:263-273.
241. Kramer DL *et al.* Polyamine depletion in human melanoma cells leads to G1 arrest associated with induction of p21^{WAF1/CIP1/SDI1}, changes in the expression of p21-regulated genes, and a senescence-like phenotype. *Cancer Res* 2001;61(21):7754-62.
242. Verstrepen WA, Persy VP, Verhulst A, Dauwe S, De Broe ME. Renal osteopontin protein and mRNA upregulation during acute nephrotoxicity in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(4):712-24.
243. Rabinovich GA *et al.* Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol* 2002;23(6):313-20.
244. MacDonald SM, Rafnar T, Langdon J, Lichtenstein LM. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* 1995;269(5224):688-90.
245. Inohara H, Akahani S, Raz A. Galectin-3 stimulates cell proliferation. *Exp Cell Res* 1998;245(2):294-302.

246. Chung S, Kim M, Choi W, Chung J, Lee K. Expression of translationally controlled tumor protein mRNA in human colon cancer. *Cancer Lett* 2000;156(2):185-190.
247. Endo T. Transport of cadmium across the apical membrane of epithelial cell lines. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002;131(3):223-9.
248. Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003;192(2-3):95-117.
249. Zalups RK. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev* 2000;52(1):113-43.
250. Meneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med* 1997;23(5):783-92.
251. Oakes SA, Opferman JT, Pozzan T, Korsmeyer SJ, Scorrano L. Regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ dynamics by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Pharmacol* 2003;66(8):1335-40.
252. Beyersmann D and Hechtenberg S. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;144(2):247-61.
253. Denkhaus E and Salnikow K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;42(1):35-56.
254. Devarajan P, Mishra J, Supavekin S, Patterson LT, Steven Potter S. Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. *Mol Genet Metab* 2003;80(4):365-76.
255. Hodge HC. A history of uranium poisoning (1824-1942). In: Hodge HC, Stannard JN, Hursh JB. eds *Uranium, plutonium, transplutanic elements: Handbook of experimental pharmacology* New York: Springer-Verlag 1953;36:5-68.
256. Ribera D, Labrot F, Tisnerat G, Narbonne JF. Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects. *Rev Environ Contam Toxicol* 1996;146:53-89.
257. Wakefield J. Toxicogenomics: roadblocks and new directions. *Environ Health Perspect* 2003;111(6):A334.