



**Etude des effets biologiques de  
l'exposition à l'uranium chez le  
poisson zèbre (*D. rerio*).  
*Impact sur les stades de vie***

**Stéphanie BOURRACHOT**

Mai 2009

N° ISRN/IRSN-2009/119

Laboratoire de Radioécologie et d'Écotoxicologie



**Thèse**

*Présentée à*

**L'UNIVERSITE AIX-MARSEILLE I – UNIVERSITE DE PROVENCE**

*Ecole doctorale*

**ED 251 SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT**

*Pour l'obtention du titre de*

**Docteur de l'Université de Provence Mention Sciences,**

*Spécialité*

**Environnement et santé**

*Par*

**Stéphanie BOURRACHOT**

---

**Etude des effets biologiques de l'exposition à l'uranium chez le poisson  
zèbre (*D. rerio*)**

**- Impact sur les stades de vie -**

---

*Thèse dirigée par* Rémi Chappaz

*Soutenance prévue le* 28 Mai 2009

Devant le jury d'examen composé de :

Pr. Jérôme Cachot	Professeur à l'université de Bordeaux I	Rapporteur
Dr. Xavier Cousin	Chercheur, IFREMER	Rapporteur
Dr. François Brion	Chercheur, INERIS	Examineur
Pr. Catherine Aliaume	Professeur à l'université de Montpellier	Examineur
Pr. Catherine Massiani	Professeur à l'université de Provence	Examineur
Pr. Rémi Chappaz	Professeur à l'université de Provence	Directeur de thèse
Dr. Christelle Adam-Guillermin	Chercheur, IRSN	Tuteur de thèse
Dr. Rodolphe Gilbin	Chercheur, IRSN	Tuteur de thèse







## Remerciements

Cette thèse a été effectuée au Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie (LRE) du Service d'Étude du Comportement des Radionucléides dans les Écosystèmes (SECRE) à l'IRSN, Cadarache. Je remercie Rodolphe Gilbin, Jacqueline Garnier-Laplace et Jean-Christophe Gariel de m'avoir accueillie dans leur équipe et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour effectuer ce travail de thèse.

Je tiens à adresser mes très sincères remerciements à tous les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail et à l'ensemble des personnes qui ont contribué à l'élaboration de cette thèse.

J'adresse toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Rémi Chappaz qui par ses suggestions, m'a apporté le recul nécessaire pour faire les bons choix au bon moment.

Je tiens également à remercier très chaleureusement, Christelle Adam-Guillermin, et Rodolphe Gilbin, pour leur aide particulièrement précieuse pour la rédaction de ce manuscrit, ainsi que pour leurs encouragements et accompagnement durant cette thèse.

Cette thèse fut aussi l'occasion d'une collaboration fructueuse avec l'Unité d'Evaluation des Risques Ecotoxicologiques, de l'INERIS. J'adresse ainsi mes sincères remerciements à Jean Marc Porcher et son équipe dont François Brion, Olivier Palluel, Nathalie Hinfray. Je tiens à les remercier de leur accueil chaleureux à chacune de mes visites dans cette région fraîche et humide...

Je tiens ensuite à remercier tous ceux avec qui j'ai travaillé lors de mes quatre années au Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie et à leur exprimer toute mon amitié : Claire Della Vedova, pour ton aide précieuse pour toutes ces analyses statistiques, et surtout ta patience à m'expliquer les lignes de codes sous R ; Frédéric Alonzo, pour ton initiation à la modélisation, ta rigueur et ton amitié depuis le DEA ; Karine Beaugelin, pour ton aide à la compréhension des calculs de débits de dose ; Sandrine Frelon, merci pour ton implication à passer des heures à chercher les pièges dans les fichiers excel de ddd et de ta grande

gentillesse ; Marcel Morello, pour les nombreux dosages en scintillation liquide ; Virginie Camilleri, pour son efficacité à doser des « tonnes » d'échantillons en ICP AES et MS ; Isabelle Cavalié, pour son aide à la réalisation des expérimentations ; Sylvie Pierrisnard, pour les dosages ILC et tout les petits plaisirs que tu amènes au café ; Magali Floriani, pour avoir incluse, coupé, observé, recoupé...merci beaucoup de ton implication et ta gentillesse ; la « bande des géochimistes » ou « quand j'ai failli mal tourner c'est-à-dire faire de la chimie », Laureline Février, Arnaud Martin-Garin, pour les relectures de publiés et les rhum, , merci de toutes les compétences que vous avez partagées avec moi, et surtout de toutes ces conversations enrichissantes qui m'ont permis de prendre toujours plus de recul avec une mention spéciale pour Fred Coppin, merci pour ton aide précieuse en chimie et calculs en tout genre... tout au long de ces mois, merci à tous les 3 de votre soutien moral ; Lionel Aubergat avec qui j'ai partagé des moments parfois « critiques » mais qui font aussi les bons souvenirs, Véronique Mary qui m'a bien aidé pour les heures de dissection ; la « thésards team », Florence, Victor et Olivia, ma collègue, puis voisine et surtout grande amie, pour tous les agréables moments partagés à refaire le monde et le labo ; sans oublier Nico et Sandrine, la relève, bonne suite à vous 2 ; Laurette, pour nous les cornes de gazelle de Tatawin n'ont plus de secret ; Hervé Spor, pour ta pluri, multi fonctionnalité, et toute ton aide ; Nadine Cauvin, pour toutes tes commandes et surtout pour les heures passées à la salle de sport à papoter et parfois transpirer ; Super Claudine pour ta gentillesse, ta disponibilité et toutes tes petites attention au quotidien.

Cette thèse a également été l'occasion de rencontrer de nombreuses personnes et d'avoir des conversions au détour de couloir toujours plus intéressantes, merci à : Béatrice Gagnaire, Cathie Pradines, Jean- Marc Bonzomme, Chantal Madoz Escande (pour les discussions cuisine et tricot aussi !!), Pierre Hurtevent, Julie Misson-Pons, Jérôme Michon, et toutes les rencontres à l'INERIS et tout ceux que j'oublierais...

Enfin je tiens à remercier mes proches de m'avoir toujours soutenu, encouragé et surtout supporté !!!







## Résumé

Ce travail s'intègre dans le cadre général du programme ENVIRHOM lancé à l'IRSN en 2000 et vise à évaluer les effets biologiques de l'uranium sur le cycle de vie du poisson zèbre, poisson d'eau douce employé couramment pour les tests standards en écotoxicologie. Il s'agissait d'identifier les stades les plus sensibles du cycle de vie en y associant les critères d'effets les plus pertinents (des biomarqueurs aux traits d'histoire de vie) et de caractériser les effets liés à la chimiotoxicité et à la radiotoxicité de l'uranium. Des expériences ont été menées avec des œufs, des larves et des adultes matures exposés à l'uranium à des concentrations proches de celles détectées à proximité d'anciens sites miniers français (gamme de 20 à 500 µg/L) afin d'étudier la survie, l'éclosion des œufs, la croissance des larves et la reproduction des géniteurs. Parallèlement, des biomarqueurs de l'exposition (bioaccumulation d'uranium dans les œufs, gonades) et biomarqueurs d'effets au niveau moléculaire (génotoxicité, reprotoxicité) ont été également mesurés. Les résultats obtenus ont montré l'intérêt d'étudier les différents stades de vie ; en effet les stades de vie précoces sont apparus comme étant les plus sensibles à l'uranium (dès 20 µg/L), que ce soit suite à une exposition directe des œufs, ou à une exposition indirecte, via un transfert parental. Ces résultats soulignent la pertinence d'inclure les étapes pro-larvaires dans des tests de toxicité pour l'évaluation du risque environnemental. De surcroît, l'étude de différentes étapes du cycle de vie permet, à l'aide de modèle de simulation du recrutement des populations, d'extrapoler les données obtenues à des niveaux d'organisation biologiques supérieurs. A ce titre, les effets drastiques de l'uranium sur le succès reproducteur et les dommages d'ADN dans les cellules germinales indiquent la probabilité d'un fort impact sur la population pour des concentrations très faibles (20 µg/L). Il apparaît, à travers l'étude comparative des effets radiologiques induits, soit par un autre isotope de l'uranium de plus forte activité spécifique ( $^{233}\text{U}$ ) soit par une irradiation externe ( $^{137}\text{Cs}$ ), que les effets de l'uranium sont globalement dus à sa chimiotoxicité.

Mots clefs : uranium, poisson zèbre, traits d'histoire de vie, sensibilité, biomarqueurs d'effets.



## Table des matières

Listes des figures et tableaux .....	1
Liste des abréviations .....	5
<b>Introduction</b> .....	<b>9</b>

### ***Partie 1*** **15**

---

<b>Chapitre 1. Etude bibliographique</b> .....	<b>19</b>
1. L'uranium dans l'environnement .....	21
2. Contamination à l'uranium .....	30
3. Toxicité de l'uranium .....	35
4. Synthèse de l'étude bibliographique .....	51
<b>Chapitre 2. Démarche expérimentale</b> .....	<b>55</b>
1. Rappels des objectifs .....	59
2. Le modèle biologique de notre étude .....	61
3. Choix des expositions .....	67
4. Les paramètres biologiques de l'études .....	68

### ***Partie 2*** **73**

---

<b>Chapitre 1. Matériels et méthodes</b> .....	<b>77</b>
1. Matériel biologique .....	83
2. Etude des effets de l'uranium .....	85
3. Etude des effets de l'irradiation $\gamma$ externe .....	105
4. Critères d'effets étudiés lors des différentes expositions .....	106
5. Traitements statistiques des résultats .....	119
6. Modélisation du recrutement des générations de poisson zèbre .....	120
<b>Chapitre 2. Résultats et discussion</b> .....	<b>125</b>
1. Effets des radionucléides sur les principaux traits d'histoire de vie .....	133
2. Histopathologie .....	171
3. Effets moléculaires .....	183

### ***Partie 3*** **195**

---

<b>Chapitre. Synthèse et perspectives</b> .....	<b>199</b>
1. Sensibilité des stades de vie précoces à une exposition directe à l'uranium .....	201
2. Reprotoxicité de l'uranium chez les géniteurs .....	207
<b>Conclusion</b> .....	<b>211</b>

<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>217</b>
Annexe : Article : Bourrachot et al. (2008). Effet de l'uranium sur l'éclosion, le développement et la survie des stades de vie précoces du poisson zèbre (D. rerio). <i>Aquatic Tox.</i> 90, 29-36 .....	231



## Listes des figures et tableaux

<b>Figure 1</b> : Chaînes de décroissance de $^{238}\text{U}$ et $^{235}\text{U}$ (Morello et al., 2001).....	24
<b>Figure 2</b> : Effets biologiques moléculaires induits par une exposition aux radionucléides (d'après Ercal et al., 2001). .....	34
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique des principales lésions à l'ADN produites par les radionucléides.....	34
<b>Figure 4</b> : Récapitulatif des données bibliographiques relatives à des organismes aquatiques lors d'exposition à l'uranium. ....	52
<b>Figure 5</b> : Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale de l'étude. ....	58
<b>Figure 6</b> : <i>Danio rerio</i> . ....	60
<b>Figure 7</b> : Mâle et femelle de poisson zèbre <i>Danio rerio</i> .....	62
<b>Figure 8</b> : Cycle de vie de <i>Danio rerio</i> (temps pour atteindre le stade). ....	62
<b>Figure 9</b> : Etapes du développement embryonnaire de <i>Danio rerio</i> . ....	64
<b>Figure 10</b> : Dispositif de reproduction de <i>Danio rerio</i> au laboratoire.....	82
<b>Figure 11</b> : Exemples d'œufs non viables âgés de 5 hpf : à gauche avec des divisions cellulaires anormales ; à droite coagulé. ....	84
<b>Figure 12</b> : Graphique de spéciation de l'uranium dans l'eau artificielle obtenu avec le logiciel J-Chess (pH= 2 à 12 ; [U] = 100 $\mu\text{M}$ ; pCO <sub>2</sub> atm) (à pH 6,5 il y a 0.95 % d'uranium sous forme d'ion libre UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup> ).....	86
<b>Figure 13</b> : Test embryon : boîte de pétri pour l'exposition à l'uranium du stade œuf ; exposition à l'incubateur. ....	88
<b>Figure 14</b> : Test embryon/larve : bouteille de 500 ml pour l'exposition ; nourrice pour le renouvellement du milieu.....	88
<b>Figure 15</b> : Test adulte : schéma du dispositif expérimental global pour l'exposition l'uranium appauvri en système ouvert.....	90
<b>Figure 16</b> : Photographie du dispositif expérimental de contamination des poissons adultes à l'uranium appauvri.....	90
<b>Figure 17</b> : Dispositif pour le suivi de pontes issus des adultes préalablement exposés à l'uranium appauvri....	92
<b>Figure 18</b> : Principe du dosage de la radioactivité par scintillation liquide (d'après Morello et al., 2001).....	98
<b>Figure 19</b> : Schéma du dispositif d'irradiation contenu dans un incubateur. ....	104
<b>Figure 20</b> : Photographie des dispositifs d'irradiation gamme externe.....	104
<b>Figure 21</b> : Photographie d'une pro larve âgée de 5 jours de <i>Danio rerio</i> et de la mesure réalisée. ....	108
<b>Figure 22</b> : Photographie à microscopie en épifluorescence de nucléoïdes de cellules embryonnaires X 400. (a) ADN intact ; (b) ADN endommagé.....	112
<b>Figure 23</b> : Schéma simplifié d'un test ELISA compétitif (Ag = Antigène ; AcI = anticorps primaire ; AcII = anticorps secondaire couplé à une peroxydase –Horseradish peroxidase ; S = substrat).....	116
<b>Figure 24</b> : Effet de l'uranium appauvri sur l'évolution du pourcentage de mortalité des œufs exposés pendant 120h. (Moyenne $\pm$ ES ; n = 2). ....	132
<b>Figure 25</b> : Effet de l'uranium appauvri sur le pourcentage d'éclosion des œufs exposés pendant 120 h. (Moyenne $\pm$ ES ; n = 2). Test de Chi <sup>2</sup> , (***) Différence significative par rapport au témoin pour p<0,001. ....	132
<b>Figure 26</b> : Effet de l'uranium appauvri sur le temps d'éclosion moyen HT <sub>50</sub> (IC 95%). (*) Différence significative par rapport au témoin base sur le non recouvrement des intervalles de confiance. ....	132
<b>Figure 27</b> : Effet de l'irradiation $\gamma$ externe sur l'évolution du pourcentage de mortalité des œufs exposés pendant 96 h. (Moyenne $\pm$ ES ; n = 5). ....	134
<b>Figure 28</b> : Photographie de larves écloses (75 hpf) témoin à gauche et condition 1000 mGy/j à droite. ....	134
<b>Figure 29</b> : Effet de l'irradiation $\gamma$ externe sur le pourcentage de larve présentant un œdème de la cavité péricardique (Moyenne $\pm$ ES, n= 5). ANOVA (*) différence significative par rapport au témoin p<0,05. ....	134
<b>Figure 30</b> : Effet de l'irradiation $\gamma$ externe sur le pourcentage d'éclosion des œufs exposés pendant 96h. (Moyenne $\pm$ ES ; n = 5). Test de Chi <sup>2</sup> , (**) Différence significative par rapport au témoin pour p< 0,01. ....	136
<b>Figure 31</b> : Effet de l'irradiation $\gamma$ externe sur le temps d'éclosion moyen HT <sub>50</sub> (IC 95%). (*) Différence significative par rapport au témoin base sur le non recouvrement des intervalles de confiance. ....	136
<b>Figure 32</b> : Effet de l'uranium appauvri et de l'uranium 233 sur la mortalité des œufs et des larves pendant 15 jours. (Moyenne $\pm$ ES ; n = 3). ....	138
<b>Figure 33</b> : Photographie du développement de la queue des embryons de 24h lors de l'exposition à l'uranium appauvri et 233 associées au pourcentage d'œufs avec la queue détachée. Echelle: 1 mm.....	140

<b>Figure 34</b> : Effet de l'uranium appauvri et de l'uranium 233 sur les pourcentages d'éclosion. Moyenne $\pm$ ES ; n = 3. Les HT <sub>50</sub> (IC 95 %) sont notés dans la légende pour chaque condition. Test de Chi, avec (**) (***) Différence significative par rapport au témoin avec respectivement p < 0,01 et p < 0,001. ....	140
<b>Figure 35</b> : Effets de l'uranium appauvri sur le poids sec à 2 jours (embryons déchorionés), 9 et 15 jours (larves). Moyenne $\pm$ ES ; n = 30 à 2 et 9 jours et à 15 jours : témoin : n = 30, 20 $\mu$ g/L : n = 8. ANOVA (*) différence statistique par rapport au témoin pour p < 0,05 et (a) par rapport à la concentration 250 $\mu$ g/L pour p < 0,05. ....	142
<b>Figure 36</b> : Concentration d'uranium mesurée ( $\mu$ g U/g poids sec) au niveau de l'embryon et du chorion après 2 jours d'exposition. Moyenne $\pm$ ES ; n = 30. ANOVA Kruskal Wallis, (*) (**) différence significative par rapport au témoin avec p < 0,05 et p < 0,01 et (a) différence significative avec 20 $\mu$ g/L avec p < 0,05. ....	144
<b>Figure 37</b> : Concentration d'uranium mesurée chez les larves à 9 et 15 jours. Moyenne $\pm$ ES ; n = 30 à 9j et à 15j : témoin : n = 30, 20 $\mu$ g/L : n = 6). ANOVA Kruskal Wallis, (**) différence significative par rapport au témoin avec p < 0,01 et (a) différence significative avec 20 $\mu$ g/L avec p < 0,05. ....	144
<b>Figure 38</b> : Effet de l'irradiation $\gamma$ externe sur la mortalité des œufs et larves exposés pendant 15 jours. (Moyenne $\pm$ ES ; n = 5). ....	146
<b>Figure 39</b> : Effet de l'irradiation $\gamma$ externe sur les pourcentages d'éclosion. Moyenne $\pm$ ES ; n = 5. Les HT50 (IC 95 %) sont notés dans la légende pour chaque condition. Test de Chi2, (**) différence significative par rapport au témoin pour p < 0,01. ....	148
<b>Figure 40</b> : Effets de l'irradiation $\gamma$ externe sur le poids sec à 2 jours (embryons déchorionés), 9 jours (larves). Moyenne $\pm$ ES ; n = 12. ....	150
<b>Figure 41</b> : Nombre d'œufs moyen et d'évènements moyen par femelle sur 14 jours des tests de reproduction pour chaque concentration. Moyenne $\pm$ ES. n = 7, 8 et 7 pour respectivement les témoins, exposés à 20 $\mu$ g/L et 250 $\mu$ g/L. ANOVA (***) (**) différence significative par rapport au témoin p < 0,001 et p < 0,01; (a) différence significative par rapport à la concentration 20 $\mu$ g/L pour p < 0,05. ....	156
<b>Figure 42</b> : Relation entre le nombre d'œufs pondus et le nombre d'évènements de ponte pour chaque réplicat de chaque condition. ....	158
<b>Figure 43</b> : Effets de l'uranium appauvri sur (A) la fécondité (nombre moyen d'œufs pondus par femelle par jour) pendant les 14 jours de reproduction en eau claire consécutifs à l'exposition à l'uranium pendant 20 jours (moyenne $\pm$ ES) et (B) le nombre d'évènements de ponte par jour. n = 7, 8 et 7 pour respectivement les témoins, exposés à 20 $\mu$ g/L et 250 $\mu$ g/L. ....	158
<b>Figure 44</b> : Effet de l'uranium appauvri sur le pourcentage de mortalité des générations F1 issues de parents exposés à 0 et 20 $\mu$ g/L pour chaque jour de ponte et plusieurs temps clefs du développement (24, 48, 72, 96 et 216 hpf). ....	160
<b>Figure 45</b> : Concentration d'U mesurées dans le corps entier de poisson adulte (mâle et femelle) après 20 jours d'exposition et 35 jours (20 jours d'exposition + 15 jours de reproduction en eau non contaminée). Moyenne $\pm$ ES. ANOVA, (*) (**) (***) différence significative par rapport au témoin respectivement avec p < 0,05 p < 0,01 et p < 0,001 et (b) différence significative avec 20 $\mu$ g/L avec p < 0,001. ....	162
<b>Figure 46</b> : Concentration d'U mesurées dans les gonades mâle et femelle après 20 jours d'exposition et 35 jours (20 jours d'exposition + 15 jours de reproduction en eau non contaminée). Moyenne $\pm$ ES; n = 9. ANOVA, (**) (***) différence significative par rapport au témoin respectivement avec p < 0,01 et p < 0,001 et (b) différence significative avec 20 $\mu$ g/L avec p < 0,01. ....	162
<b>Figure 47</b> : Concentrations d'uranium appauvri mesurées dans les œufs de la génération F1 issus de la reproduction des adultes exposés à l'uranium appauvri, de la 1 <sup>ère</sup> ponte du test et de la dernière ponte du test. Moyenne $\pm$ ES ; (n=3). ANOVA, (**) (***) différence significative par rapport au témoin respectivement avec p < 0,01 et p < 0,001. ....	164
<b>Figure 48</b> : Concentrations et répartitions de l'uranium appauvri mesuré dans les œufs à la 1 <sup>ère</sup> ponte issue des adultes exposés. Moyenne $\pm$ ES, n=3 sauf à 250 $\mu$ g/L n= 1. ....	164
<b>Figure 49</b> : Effets de l'exposition parentale ou parentale +directe à l'uranium appauvri sur le recrutement de poissons zèbre pendant 15 jours. ....	170
<b>Figure 50</b> : Rapport entre la surface d'occupation des spermatozoïdes et la surface de la coupe observée (%). Moyenne $\pm$ ES, témoin n = 10, 20 $\mu$ g/L n= 15 et 250 $\mu$ g/L n = 10. ....	170
<b>Figure 51</b> : Observations en microscopie optique de gonades mâles. (A et (D) Témoin, (B) et (E) exposés à 20 $\mu$ g/L et (C) et (F) exposés à 250 $\mu$ g/L Spg = spermatogonies ; Spc = spermatocytes ; Spd = spermatides ; Spz, spermatozoïdes ; T, tubules. ....	172
<b>Figure 52</b> : Observations en microscopie optique de gonades femelle. (A) Témoin, (B) exposés à 20 $\mu$ g/L et (C) exposés à 250 $\mu$ g/L (épaisseur 0,5 $\mu$ m). OpV = Ovocyte prévitellogénique ; OV = Ovocyte en cours de vitellogénèse ; Oa = Ovocyte atrétique. ....	174
<b>Figure 53</b> : Observations en microscopie électronique à transmission de gonades mâles. (A) (B) (C) Témoin, (D) (E) (F) exposés à 250 $\mu$ g/L. Sp = Spermatogonies et spermatides ; Spz = spermatozoïdes ; T = tubules ; Fg = flagelle ; Vc = vacuole. ....	176



<b>Figure 54</b> : Observations en microscopie électronique à transmission de membrane d'ovocyte sur les coupes gonades femelles (A) et (B)Témoin, (C) et (D) exposé à 250 µg/L. Zr = zona radiata ; Gr = granulosa ; Th = thèque ; C= canaux ; Vx = vaisseaux sanguins ; H = hématie .....	178
<b>Figure 55</b> : Effet du peroxyde d'hydrogène (exposition <i>in vivo</i> ) sur le pourcentage de dommages à l'ADN dans les cellules d'embryons âgés de 24 hpf exposés 1h. Moyenne ± ES, n =3. ANOVA, (***) différence significative par rapport au témoin respectivement avec p<0,001et (b) différence significative avec 1mM avec p<0,01. ....	182
<b>Figure 56</b> : Effet de l'uranium appauvri et l'uranium 233 (exposition <i>in vivo</i> ) sur le pourcentage de dommages à l'ADN dans la queue des comètes de cellules d'embryons âgés de 24 et 48 hpf après respectivement 20 h et 44 heures d'exposition. Moyenne± ES, n = 3. ANOVA, (*) (**) (***) différence significative par rapport au témoin respectivement avec p< 0,05, p<0,01 et p<0,001 et (\$) différence significative entre les temps 24 et 48h pour la concentration donnée avec p<0,05 et (a) différence significative avec la concentration 20 µg/L pour p < 0,01. ....	182
<b>Figure 57</b> : Effet de l'irradiation $\gamma$ externe (exposition <i>in vivo</i> ) sur le pourcentage de dommages à l'ADN dans la queue des comètes de cellules d'embryon âgés de 24 et 48 hpf après respectivement 20 h et 44 heures d'exposition. Moyenne ± ES, n = 3. ANOVA, (*) différence significative par rapport au témoin avec p< 0,05.....	184
<b>Figure 58</b> : Effet du peroxyde d'hydrogène (exposition <i>in vitro</i> ) sur le pourcentage de dommages à l'ADN dans les cellules germinales femelles et mâles. Moyenne ± ES, n=3. ANOVA, (*) (**) (***) différence significative par rapport au témoin respectivement avec p<0,05 p<0,01 et p<0,001 et (a) différence significative avec la concentration 10 µM pour p < 0,05. ....	184
<b>Figure 59</b> : Effet de l'uranium appauvri (exposition <i>in vivo</i> ) sur le pourcentage de dommages à l'ADN dans les cellules germinales femelles et mâles de poissons exposés pendant 20 jours. Moyenne ± ES, n=3. ANOVA, (*) (**) différence significative par rapport au témoin respectivement avec p<0,05et p<0,01. ....	186
<b>Figure 60</b> : Effet de l'uranium appauvri (exposition <i>in vivo</i> ) sur le pourcentage de dommages à l'ADN dans les cellules d'embryons âgés de 24 et 48 hpf, issus de la 1 <sup>ère</sup> pontes des adultes exposés pendant 20 jours. Moyenne ± ES, n=3 excepté à 250 µg/L n =1. ....	186
<b>Figure 61</b> : Effet de l'uranium appauvri sur la concentration de vitellogénine dans les homogénats de corps entier de poisson femelle (A) et mâle (B) après exposition à l'Uranium appauvri pendant 20 jours et après la phase de 15 jours de reproduction. Moyenne ± IC 95%, n= 10. ANOVA Kruskal Wallis, (*) différence significative par rapport au témoin avec p<0,05. ....	188
<b>Figure 62</b> : Résumé graphique de l'intensité des effets (% relatif au témoin) pour chaque critère étudié aux deux stades de vie précoces : œuf et larve et aux deux concentrations d'expositions : 20 et 250 µg/L. ....	200
<b>Figure 63</b> : Représentation graphique des résultats de (A) HT50 (% moyen relatif au témoin de chaque expérience (IC95%) en fonction du débit de dose et en fonction de la concentration massique ; (B) pourcentage d'ADN dans la queue des comètes de cellules embryonnaires de 48h (% moyen relatif au témoin de chaque expérience ± ES) en fonction du débit de dose et en fonction de la concentration massique. Le débit de dose calculé (moyenne ± ES) intègre le bruit de fond mesuré et les données des critères d'effets sont issus des expériences embryon/larves. ....	202
<b>Figure 64</b> : Schéma résumé des effets et mécanismes de toxicité envisagés lors d'une contamination à l'uranium appauvri des géniteurs. ....	206
<b>Tableau 1</b> : Caractéristiques nucléaires de isotopes de l'uranium naturel (Madic et Genet, 2001) .....	22
<b>Tableau 2</b> : Composition isotopique en masse et activité spécifique de l'uranium naturel et uranium appauvri. (Madic et Genet, 2001 ; WHO, 2001). ....	22
<b>Tableau 3</b> : Caractéristiques nucléaires des isotopes 233 et 236 de l'uranium (Madic et Genet, 2001). ....	22
<b>Tableau 4</b> : Synthèses d'organismes nationaux ou internationaux ayant conduit à la détermination de critères de protection des milieux d'eau douce. ....	26
<b>Tableau 5</b> : Principaux effets génotoxiques (lésions primaires et conséquences cytogénétiques) de l'uranium <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> et sur mammifère et espèces aquatiques .....	38
<b>Tableau 6</b> : Effets génotoxiques (lésions primaires et conséquences cytogénétiques chez des espèces aquatiques exposés à différents radionucléides, principalement l'irradiation $\gamma$ externe. ....	40
<b>Tableau 7</b> : Phylogénie de <i>Danio rerio</i> .....	60
<b>Tableau 8</b> : Résumé des expositions testées pour chaque stade de vie de <i>D. rerio</i> .....	80
<b>Tableau 9</b> : Résumé des critères étudiés pour chaque stade de vie dans chaque expérience. ....	80
<b>Tableau 10</b> : Composition ionique de l'eau artificielle utilisée pour les expériences. ....	86
<b>Tableau 11</b> : Liste des isotopes d'uranium utilisés, ainsi que leurs descendants respectifs qui ont été sélectionnés en fonction des différentes hypothèses d'exposition. Ce tableau présente également les DCCs (dose par	

unités de concentration en Gy/j par Bq/g) pour l'organisme (dose interne) et le milieu (dose externe) cumulés pour tous les types de rayonnements ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), obtenus grâce à EDEN ainsi que les facteurs de transferts utilisés qui sont issus de la littérature (**Beaugelin-Sellier et Garnier-Laplace, 2007**). ..... 102

**Tableau 12** : Résumé des taux de fécondité pour chaque condition d'exposition utilisés pour la simulation du recrutement (n = 10 femelles pour chaque condition). ..... 122

**Tableau 13** : Résumé des taux de mortalité (Naturel, Direct et Maternel) utilisés pour la simulation du recrutement..... 122

**Tableau 14** : Effets de l'uranium appauvri et 233 sur la taille totale des larves à 9 et 15 jours post fertilisation. ANOVA Kruskal Wallis (\*\*\*) différence significative par rapport au témoin pour  $p < 0,001$ ; (a) différence significative par rapport à la concentration 20  $\mu\text{g/L}$  pour  $p < 0,05$ . ..... 142

**Tableau 15** : Débits de dose (mGy/j) associés aux valeurs de bioaccumulation pour les œufs de 48 hpf exposés à l'uranium appauvri et l' $^{233}\text{U}$  lors du test embryon/larve..... 146

**Tableau 16** : Effets de l'irradiation  $\gamma$  externe sur la taille totale des larves à 9 jours post fertilisation. .... 150

**Tableau 17** : Effet de l'uranium appauvri sur la longueur, le poids, l'indice de condition K, l'Indice Gonado-Somatique sur les adultes après l'exposition pendant 20 jours et après la phase de reproduction en eau non contaminée pendant 15 jours. (Moyenne  $\pm$  ES, n = 10). ..... 156

## Liste des abréviations

**ADN** Acide désoxyribonucléique  
**AIEA** Agence internationale de l'énergie atomique  
**BCF** Facteur de bioconcentration  
**Biotic ligand model**  
**CDB** Cassure double brin  
**CHESS** Chemical equilibrium of species and surfaces  
**CL<sub>50</sub>** Concentration qui entraîne 50 % de létalité chez les organismes exposés  
**Cs** Césium  
**CSB** Cassure simple brin  
**DB** Dommages de base  
**DCC** Dose conversion coefficient  
**ddd<sub>ext</sub>** Débit de dose externe  
**ddd<sub>int</sub>** Débit de dose interne  
**DMSO** Diméthyl sulfoxyde  
**EDEN** Elementary dose evaluation for natural environment  
**EDTA** Acide éthylène diamine tétra acétique  
**ELISA** Enzyme linked immunosorbent assay  
**EROs** Espèces réactives de l'oxygène  
**FIAM** Free ion activity model  
**GH** Hormone de croissance  
**GVBD** Germinal vesicle break down  
**Gy** Gray  
**HDR<sub>5</sub>** Hazardous dose rate for 5 % of species  
**Hpf** Heure post fertilisation  
**HT<sub>50</sub>** Temps auquel 50 % des œufs observés ont éclos  
**HTR** High temperature reactor  
**IC** Intervalle de confiance  
**ICP- MS** Spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif  
**ICP-AES** Spectrométrie d'émission atomique à source plasma à couplage inductif  
**IGS** Indice gonado somatique  
**IRMM** Institute for reference materials and measurements  
**ISO** International organization of standardization  
**K** Indice de condition  
**LH** Hormone lutéinisante  
**MET** Microscope électronique à transmission  
**NQEp** Norme de qualité environnementale provisoire  
**OCDE** Organization for economic cooperation and development  
**p.s.** Poids sec  
**PBS** Phosphate buffer saline  
**PEC** Predicted environmental concentration  
**PNEC** Predicted no effect concentration  
**PNEDR** Predicted no effect dose rate  
**PrI** Prolactine  
**RBE** Relative biological effectiveness  
**TGD** Technical guidance document  
**TLD** Thermo luminescent dosimeter  
**TMB** Tetramethyl benzidine

**U** Uranium

**Uapp** Uranium appauvri

**UNSCEAR** United nations scientific committee on the effects of atomic radiation

**Vtg** Vitellogénine

**WHO** World health organization





# *Introduction*





---

## **1. Contexte général**

La préoccupation de l'Homme pour la protection de l'environnement est grandissante. Avec l'accroissement des activités anthropiques génératrices de pollutions (accidentelles ou chroniques), cette question environnementale devient essentielle pour une bonne conservation ou une remise en l'état rapide des milieux naturels. Les processus naturels de transport des matières (érosion et lessivage des sols par les eaux de pluies) accentuent les phénomènes de pollution. Ainsi, à terme une grande partie des polluants se retrouve concentrée dans des milieux aquatiques divers (nappes phréatiques, rivières, étangs...).

Dans ce contexte général, l'écotoxicologie s'est développée au cours des dernières décennies et a permis d'améliorer la compréhension du risque environnemental lié aux substances pouvant séjourner dans l'environnement.

Les éléments radioactifs (isotopes instables) font partie de ces substances pouvant induire des risques pour les écosystèmes et l'Homme en raison de leur présence de façon chronique dans l'environnement. Parmi ceux-ci, l'uranium, de la famille des actinides, est utilisé dans des secteurs d'activités très diversifiés. Il se retrouve en effet au cours des différentes étapes du cycle du combustible nucléaire (e.g. sites d'extraction miniers, combustible nucléaire, et sites de stockages de déchets nucléaires), dans l'agriculture (engrais phosphatés), en milieu médical et laboratoires de recherche, ainsi que le domaine militaire.

La présence de ces substances radioactives au sein des écosystèmes aquatiques constitue alors un risque potentiel pour la biocénose et sa préservation. L'acquisition de données concernant les réponses biologiques induites lors de l'accumulation des radionucléides dans les organismes vivants, devient incontournable et plus particulièrement pour le contexte des expositions chroniques à faibles concentrations. Cette préoccupation croissante a mené au lancement du programme ENVIRHOM (Radioprotection de l'ENVironnement à l'HOMme), à l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire en 2001 (**Garnier-Laplace et Paquet, 2001**) qui vise à étudier les processus d'accumulation des substances radioactives et les effets biologiques induits en situation d'exposition chronique au sein des écosystèmes naturels jusqu'à l'homme. Le développement de méthodes d'évaluation du risque environnemental, associé aux rejets ou à la présence de radionucléides dans l'environnement, a également fait l'objet de deux programmes de recherches européens (**ERICA et FASSET, 5 et 6<sup>ème</sup> PCRD**). Ces programmes ont mis en évidence des lacunes de connaissances concernant les expositions chroniques à faibles doses. Cela concerne également l'uranium, pour lequel les effets

biologiques induits chez les organismes non humains ont été peu étudiés, tandis que la majorité des connaissances et données acquises concernent plutôt les effets toxiques dits aigus (exposition à de fortes concentrations pendant une durée d'exposition courte) dans un contexte d'irradiation externe. Le manque de données concernant l'exposition interne conduit à aborder la question de l'extrapolation des effets obtenus par l'irradiation externe vers ceux obtenus par voie interne. Cette extrapolation est réalisée à partir du traitement statistique des valeurs trouvées dans la littérature qui prend en compte le type de rayonnement mais aussi le type d'effet pour un groupe taxonomique donné. Par ailleurs, d'autres extrapolations sont nécessaires (effet de l'individu à la population par la modélisation de la dynamique des populations, effets intergénérationnels). Enfin, la majorité des études a porté sur la compréhension des réponses biologiques chez des organismes adultes, les traits majeurs d'histoire de vie des organismes gouvernant un bon déroulement de leur cycle de vie n'étant généralement pas pris en compte.

## **2. Objectifs de recherche**

Dans ce cadre général, ce travail de thèse vise à apporter de nouvelles connaissances relatives aux effets biologiques de l'uranium sur les écosystèmes aquatiques et plus particulièrement sur le poisson zèbre *Danio rerio*, représentatif des vertébrés du milieu aquatique continental. Le travail s'est articulé en deux axes :

(1) L'axe majeur de ces travaux a consisté à étudier les effets de l'uranium sur les différents stades de vie du poisson. En effet il est aujourd'hui admis que la sensibilité des organismes peut différer d'un stade à l'autre. De plus il apparaît essentiel de considérer tous les traits d'histoire de vie d'un organisme pour apprécier un effet à l'échelle de la population et appréhender l'impact plus global à l'échelle de l'écosystème.

Ainsi il s'agit de tester quels sont les stades de vie et les étapes les plus sensibles du cycle de vie. Un ensemble d'expérimentations a ainsi été conduit afin : (i) d'évaluer les effets de l'uranium appauvri sur la survie, la croissance et la reproduction de *D. rerio* sur 3 stades de vie identifiés et de mettre en évidence les critères d'effets les plus pertinents pour chaque stade et (ii) d'identifier les mécanismes sous jacents à l'aide de marqueurs histologiques, biochimiques et de génotoxicité.

---

(2) Le second axe d'étude a porté sur l'évaluation de la radiotoxicité et de la chimiotoxicité de l'uranium. En effet l'uranium présente une double toxicité : radiologique (émetteur alpha à faible activité radiologique) et comme de nombreux métaux, une toxicité chimique. Afin de mettre en évidence la part respective de ces toxicités, l'isotope 233 de l'uranium (émetteur alpha à haute activité radiologique) a été utilisé. Les effets obtenus suite à cette exposition à l'uranium 233 et à l'uranium appauvri ont été comparés aux effets radiologiques observés lors d'une exposition à un émetteur gamma (césium 137) en irradiation externe à faible dose.

### **3. Articulation du manuscrit**

La première partie est composée d'un chapitre destiné à l'étude bibliographique de l'uranium et de ses effets sur la composante biologique. A la suite de cette synthèse, un chapitre est dédié à la démarche scientifique et expérimentale mise en place pour répondre aux objectifs.

La seconde partie est consacrée à l'étude expérimentale avec le déroulement dans un premier chapitre, du matériel et méthodes employés, suivi d'un second chapitre de résultats accompagnés de premiers points de discussion.

La troisième partie synthétisera les principaux résultats de ces recherches en faisant le lien entre tous les résultats obtenus et sera complété par les nouvelles perspectives liés à ces travaux.



## *Partie 1*



*Cette partie regroupe un premier chapitre consacré à l'étude bibliographique avec une synthèse des données majeures, suivi d'un second chapitre exposant la démarche expérimentale mise en œuvre pour traiter le programme de recherche.*





# Chapitre 1. Etude bibliographique

## Plan détaillé

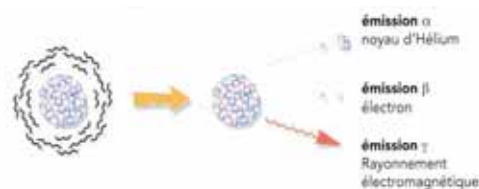
1. L'uranium dans l'environnement
  - 1.1 Sources et concentrations environnementales
  - 1.2 Propriétés de l'élément U
    - 1.2.1 Propriétés chimiques et biochimiques
    - 1.2.2 Propriétés nucléaires
      - 1.2.2.1 *L'uranium naturel*
      - 1.2.2.2 *L'uranium appauvri*
      - 1.2.2.3 *Cas de l'uranium 233*
  - 1.3 Valeurs guides sans effet pour l'environnement
2. Contamination à l'uranium
  - 2.1 Biodisponibilité de l'uranium
  - 2.2 Bioaccumulation de l'uranium
3. Toxicité de l'uranium
  - 3.1 Mécanismes de toxicité
    - 3.1.1 Toxicité radiologique
    - 3.1.2 Toxicité chimique
  - 3.2 Effets biologiques de l'uranium à l'échelle subcellulaire et cellulaire
    - 3.2.1 Génotoxicité de l'uranium et conséquences
    - 3.2.2 Cancérogénicité et mort cellulaire
    - 3.2.3 Conséquences sur la balance antioxydante
  - 3.3 Effets biologiques de l'uranium sur les tissus et organes
    - 3.2.1 Les branchies
    - 3.2.2 Le foie
    - 3.2.3 Les reins
    - 3.2.4 Les muscles
    - 3.2.5 L'appareil reproducteur
  - 3.4 Effets de l'uranium sur l'individu
    - 3.4.1 Toxicité aiguë vs toxicité chronique
    - 3.4.2 Effets sur les traits d'histoire de vie
      - 3.4.2.1 *Survie et croissance des stades de vie précoces*
      - 3.4.2.2 *Reproduction des stades adultes matures*
  - 3.5 Effets à l'échelle de la population
4. Synthèse de l'étude bibliographique

## Fiche: Les radionucléides

### Définition

Un radionucléide est un élément possédant un **noyau instable** dit radioactif, capable de se désintégrer et **d'émettre alors un rayonnement pour libérer son surplus d'énergie** pour tendre vers la stabilité. La radioactivité se caractérise par « l'**activité** » de l'élément qui est en fait **le nombre de désintégrations émises par unité de temps**. Pour cela l'unité utilisée est le becquerel (Bq) qui équivaut à une désintégration par seconde.

On distingue 3 principaux types de rayonnements :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Selon les particules émises, les rayonnements seront de nature différente.



Les rayonnements sont également définis par leur énergie (exprimée en eV) et leur pourcentage d'émission par désintégration. Les rayonnements déposent une fraction ou la totalité de cette énergie dans la matière qu'ils pénètrent, provoquant ionisation et excitation des molécules composant cette matière. La quantité d'énergie cédée (en Joules (J)) par unité de masse (en kg) de la matière est appelée dose absorbée et s'exprime en gray (Gy) ou  $J.kg^{-1}$ .

### Les rayonnements $\alpha$

Les rayonnements alpha sont de nature particulaire (émission de noyaux d'hélium). Ces rayonnements sont dits directement ionisants dans la mesure où ils ont la faculté d'interagir directement avec les molécules de la matière traversée, ils ont donc un fort pouvoir ionisant. Du fait qu'ils vont perdre rapidement leur énergie en traversant la matière, on considère qu'ils possèdent un faible pouvoir de pénétration. En effet on retiendra que ces rayonnements peuvent être arrêtés par une simple feuille de papier.

### Les rayonnements $\gamma$

Ces rayonnements gamma de nature électromagnétique (émission de photons par le noyau) sont, à l'inverse des rayonnements alphas, indirectement ionisants, puisqu'ils produisent des ionisations des atomes de la matière par l'intermédiaire des particules chargées qu'ils mettent en mouvement. Les photons émis étant très énergétiques, ce rayonnement possède un fort pouvoir de pénétration. On retiendra dans ce cas que plusieurs centimètres de matière dense comme du plomb sont nécessaires pour les arrêter.

### Les rayonnements $\beta$

La radioactivité bêta ou émission bêta (symbole  $\beta$ ) est un type de désintégration dans laquelle une particule bêta (un électron ou un positron) est émise. On parle de désintégration bêta moins ( $\beta^-$ ) (basse énergie) ou bêta plus ( $\beta^+$ ) (haute énergie) respectivement pour les émissions d'électrons (particules chargées négativement) ou de positrons (particules chargées positivement).

### Les modes d'exposition

- ▶ **Exposition externe** : la source émettant le rayonnement est à l'extérieur de l'organisme (ex  $^{137}Cs$  ou  $^{60}Co$ ).
- ▶ **Contamination ou exposition interne** : l'élément radioactif pénètre à l'intérieur de l'organisme soit par inhalation soit par ingestion. Les éléments émettant des rayonnements  $\alpha$  comme l'uranium sont généralement plus nocifs par cette voie de contamination.

### Dosimétrie

Le coefficient de conversion de dose (Dose Conversion Coefficient) appliqué à la concentration de la source d'exposition (soit 1 Bq/unité de masse ou de volume) permet d'évaluer le débit de dose ou la dose reçue par un organisme particulier, irradié par contamination interne et/ou par exposition externe, par un radionucléide donné, pour chaque le type de rayonnement, alpha, bêta ou gamma.

Concernant le domaine de la radioprotection humaine (en particulier le domaine des travailleurs), l'évaluation du risque des rayonnements ionisants prend, de plus, en compte des facteurs de pondérations comme la nature du rayonnement et la sensibilité des tissus ou organes irradiés, pour déterminer « la dose équivalente » ou « la dose efficace à l'organisme entier », exprimée cette fois en sievert, Sv. Cette notion de dose équivalente n'existe pas pour les organismes non humains et les effets sont reportés par rapport à la dose absorbée (Gy).

(Guide pratique Radionucléides et Radioprotection, Delacroix D., Guerre J. et Leblanc P., CEA, 2004).

## 1. L'uranium dans l'environnement

### 1.1 Propriétés de l'élément U

#### 1.1.1 Propriétés chimiques et biochimiques

L'uranium est un radioélément (Fiche radionucléide ci-contre) (symbole U, numéro atomique  $Z = 92$ ) et fait partie de la famille des actinides. Il n'existe pas à l'état de métal en tant que tel (chimiquement pur ou en alliage) dans l'environnement. En effet, de par sa forte électropositivité, l'uranium a une forte affinité pour l'oxygène, et de ce fait, il ne se rencontre à l'état naturel que dans des composés oxygénés (**Madic et Genet, 2001**).

Cet élément se positionne dans la classe A de la classification des éléments définie par **Nieböer et Richardson (1980)**, qui regroupe les éléments métalliques ayant une forte affinité pour l'oxygène et ayant tendance à former des complexes stables. L'uranium peut adopter quatre états de valence associés aux formes ioniques suivantes :  $U^{3+}$  (+III),  $U^{4+}$  (+IV),  $UO^{2+}$  (+V) et  $UO_2^{2+}$  (+VI) (**Ribera et al., 1996**). Les formes prépondérantes dans l'environnement sont celles caractérisées par les degrés d'oxydation (+IV) et (+VI).

En solution aqueuse, l'état d'oxydation de l'uranium va dépendre des conditions oxydo-réductrices du milieu, ainsi que du pH. L'uranium est très peu soluble sous la forme U(IV) en conditions réductrices et beaucoup plus en conditions oxydantes dans lesquelles il est présent à la valence VI sous la forme de l'ion uranyle et de ses complexes. La répartition des espèces chimiques formées de l'uranium dépend du pH de la solution, de la concentration des ligands présents, et de la concentration en uranium total. L'ion uranyle est l'espèce prédominante dans les eaux de surface en milieu oxydant, jusqu'à pH 6 (**Sheppard, 2005**). Au-delà apparaissent les formes hydroxylées ( $UO_2(OH)_2$ ) puis, pour des pH supérieurs à 8, les formes carbonatées ( $UO_2(CO_3)_3^{4-}$ ). L'ion uranyle se complexe facilement avec les carbonates, les phosphates et les ions sulfates (**Colle et al., 2001 ; Denison, 2004**). Il peut aussi former en conditions oxydantes des complexes organiques avec des ligands organiques de faible poids moléculaire et avec les substances humiques et fulviques (**Lenhart et al., 2000**).

Isotope	Abondance naturelle (% massique)	Période radioactive (années)	Activité spécifique (Bq/g)	Energie des principaux rayonnements émis (keV)	
				$\alpha$ (% émission)	$\beta, X$ (% émission)
$^{234}\text{U}$	$0,005 \pm 0,001$	$2,45 \cdot 10^5$	$2,30 \cdot 10^8$	4777 (72)	53 (0.7)
				4723 (23)	120 (0.2)
$^{235}\text{U}$	$0,720 \pm 0,001$	$7,03 \cdot 10^8$	$8,00 \cdot 10^4$	4397 (57)	186 (57)
				4367 (18)	143 (11)
$^{238}\text{U}$	$99,275 \pm 0,002$	$4,47 \cdot 10^9$	$1,24 \cdot 10^4$	4196 (77)	15 (9)
				4149 (23)	

**Tableau 1 :** Caractéristiques nucléaires des isotopes de l'uranium naturel (Madic et Genet, 2001)

	Masse (%)			Activité spécifique (Bq/g)
	$^{238}\text{U}$	$^{235}\text{U}$	$^{234}\text{U}$	
<b>U naturel</b>	99,27	0,72	0,005	$2,53 \cdot 10^4$
<b>U appauvri</b>	99,80	0,20	0,0006	$1,48 \cdot 10^4$

**Tableau 2 :** Composition isotopique en masse et activité spécifique de l'uranium naturel et uranium appauvri. (Madic et Genet, 2001 ; WHO, 2001).

Isotope	Activité spécifique (Bq/g)	Mode de désintégration	Période radioactive (années)	Energie (keV) et % des principaux rayonnements émis
$^{233}\text{U}$	$3,56 \cdot 10^8$	$\alpha$	$1,59 \cdot 10^5$	4824 (82%)
				4783 (14%)
$^{236}\text{U}$	$2,40 \cdot 10^6$	$\alpha$	$2,342 \cdot 10^7$	4494 (74%)
				4455 (14%)

**Tableau 3 :** Caractéristiques nucléaires des isotopes 233 et 236 de l'uranium (Madic et Genet, 2001).

---

## 1.1.2 Propriétés nucléaires

L'uranium est un radioélément, c'est-à-dire que c'est un élément dont tous les isotopes sont radioactifs (17 isotopes).

### 1.1.2.1 L'uranium naturel

L'uranium naturel se présente dans l'environnement sous forme d'un mélange de 3 isotopes :  $^{234}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  et  $^{238}\text{U}$  (tableau 1), se désintégrant principalement par émission de rayonnements  $\alpha$  (noyau d'hélium). Le tableau 1 présente les périodes radioactives relatives à ce mode de désintégrations pour chaque isotope, ainsi que les caractéristiques principales des rayonnements émis lors des désintégrations. L'abondance et l'activité spécifique de ces isotopes engendrent une activité spécifique globale de l'uranium appauvri de  $2,53 \cdot 10^4$  Bq/g (tableau 2).

De ces trois isotopes, seuls  $^{235}\text{U}$  et  $^{238}\text{U}$  sont des isotopes primordiaux, c'est-à-dire qu'ils existent depuis l'origine de la Terre ( $4,5 \cdot 10^9$  ans) ;  $^{234}\text{U}$  est issu de la décroissance de  $^{238}\text{U}$ . Par ailleurs, la majorité de ces isotopes (la moitié de  $^{238}\text{U}$  et la majorité de  $^{235}\text{U}$ ) a aujourd'hui disparu et s'est transformée en isotopes de plomb.

La Figure 1 présente les chaînes de désintégrations de  $^{235}\text{U}$  et  $^{238}\text{U}$  qui conduisent à des noyaux de plomb stable.

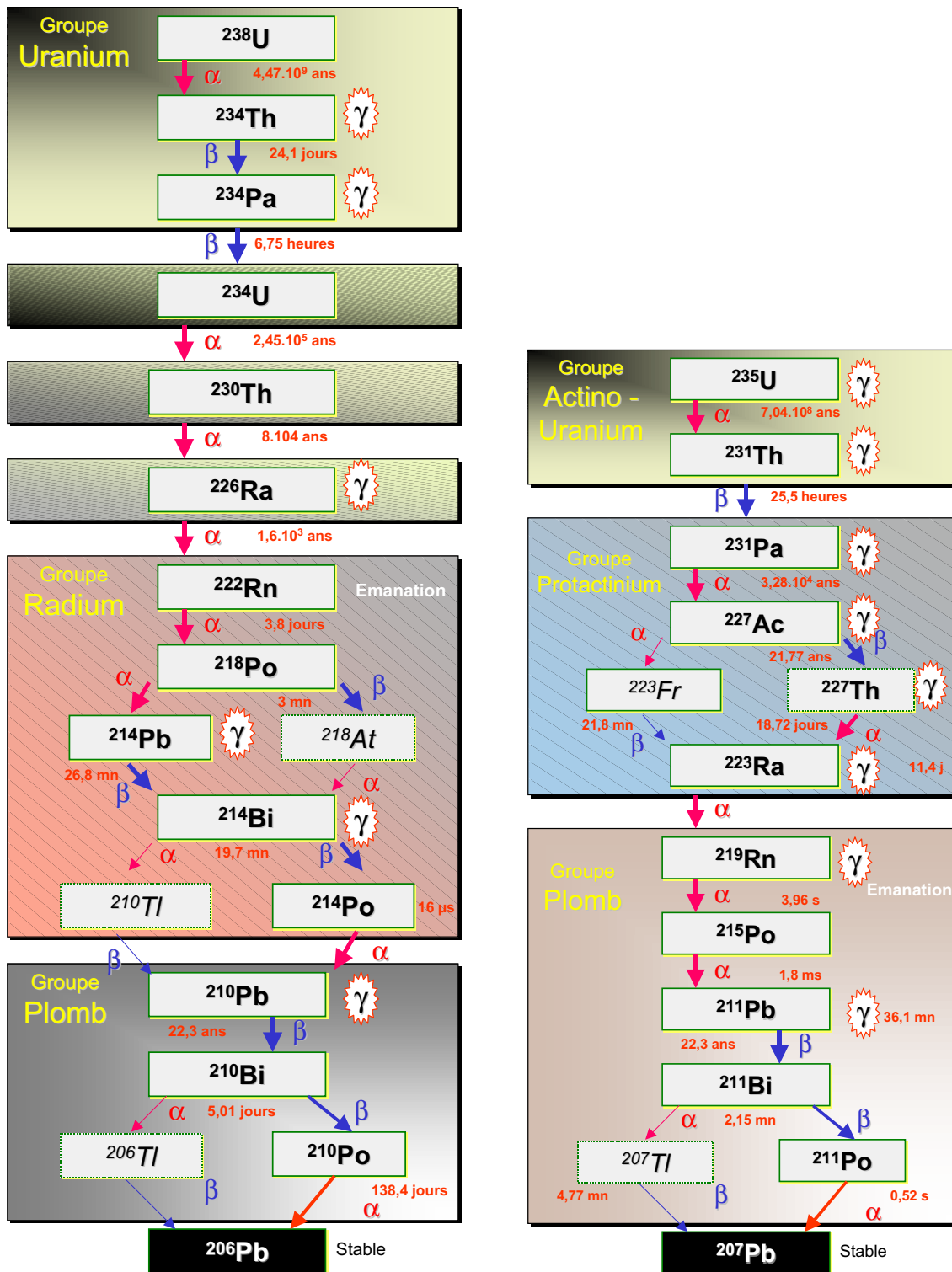


Figure 1 : Chaînes de décroissance de  $^{238}\text{U}$  et  $^{235}\text{U}$  (Morello *et al.*, 2001).

### 1.1.2.2 L'uranium appauvri

L'uranium appauvri est un sous-produit des industries nucléaires. Son origine principale est l'enrichissement de l'uranium naturel en  $^{235}\text{U}$  pour fabriquer le combustible pour les réacteurs nucléaires. Il se différencie par sa composition isotopique qui devient plus riche en isotope  $^{238}\text{U}$  et moins riche en  $^{234}\text{U}$  et  $^{235}\text{U}$  (Tableau 2). La composition isotopique typiquement employée, est  $^{234}\text{U}$  (0,0006 %),  $^{235}\text{U}$  (0,2 %),  $^{238}\text{U}$  (99,8 %). L'uranium appauvri peut également résulter du retraitement du combustible usé des réacteurs et dans ces conditions, il peut comporter d'autres isotopes comme l'  $^{236}\text{U}$ , radioisotope artificiel (**WHO, 2001**). L'activité spécifique de cet uranium appauvri ( $1,48.10^4$  Bq/g) est donc globalement diminuée de 60% par rapport à celle de l'uranium naturel ( $2,53. 10^4$  Bq/g). Cette diminution d'activité est surtout due au changement de proportion de l'isotope  $^{234}\text{U}$  qui a la plus forte activité spécifique (**WHO, 2001**).

Du fait de sa densité et dureté, son utilisation se retrouve dans divers domaines, aussi bien à des fins de contre poids ou ballast dans des avions, que comme bouclier anti-radiations dans l'équipement médical, ou dans les applications militaires (blindage de véhicules, munitions) et le domaine de la recherche scientifique. Ces secteurs d'activités sont susceptibles de rejeter de l'uranium dans l'environnement, en particulier dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce, de manière incidente (e.g. fuite, déversement comme l'usine de Socatri sur le site du Tricastin en 2008), et/ou résiduelle (e.g. terrils des mines uranifères, résidus d'explosion de bombes et missiles).

### 1.1.2.3 Cas de l'uranium 233

L'uranium 233 est un isotope artificiel produit par l'irradiation du thorium 232. Il est fissile et utilisable comme matière nucléaire dans les armements et les réacteurs. L'uranium 233 ne se trouve aujourd'hui qu'en très faibles quantités dans les têtes nucléaires, parce qu'il est plus difficile et plus coûteux à produire que l'uranium 235 et le plutonium 239. A des fins commerciales, l'uranium 233 a également été utilisé dans des réacteurs à haute température (HTR). Comme l'uranium 235 et 238, c'est un émetteur alpha. Ses caractéristiques sont présentées dans le Tableau 3. Il possède une activité spécifique supérieure aux autres isotopes de l'uranium ( $3,56.10^8$  Bq/g). Il possède une activité spécifique supérieure aux autres isotopes de l'uranium ( $3,56.10^8$  Bq/g).

<i>Programme</i>	<i>Objectifs des valeurs proposées</i>	<i>Concentration en µg U/L</i>	<i>Référence</i>
Quebec regional water quality objective	Valeur guide pour la protection de la vie aquatique	14 (20-100mg/L CaCO <sub>3</sub> ) 100 (100-210mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Boudreau et Guay, 2002
Saskatchewan Surface water Quality Objectives for the Protection of Aquatic life	Valeur guide pour la protection de la vie aquatique	15	Saskatchewan, Environment 2006
Ontario Interim Provincial Water Quality Objective	Valeur à employer en cas d'urgence, avec précaution	5	MOEE, 1994
Environment Canada	Canadian Water Quality guidelines for the Protection of Aquatic life- exposition à long terme	19	Environnement Canada, 2008
Environment Canada Et Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME)	Valeurs estimées sans effet observé (VESEO) Canadian Water Quality guidelines for the Protection of Aquatic life	Poissons : 280 <i>Daphnia pulex</i> : 22 <i>Ceriodaphnia dubia</i> : 3	Environnement Canada, 2003
Australian and New Zealand Environment and Conservation Council (ANZECC) et Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand (ARMCANZ)	Valeurs guide pour la qualité de l'eau ou WQG	0,5 (valeur provisoire)	ANZECC Et ARMCANZ, 2001

**Tableau 4 :** Synthèses d'organismes nationaux ou internationaux ayant conduit à la détermination de critères de protection des milieux d'eau douce.



## 1.2 Sources et concentrations environnementales

L'uranium est un élément présent naturellement dans la croûte terrestre (**Bonin et Blanc, 2001**) à une concentration de 2 à 4 g/t en moyenne (**Ribera et al., 1996 ; Bleise et al., 2003**). Sous l'action des processus naturels tels que l'érosion et le lessivage des sols par les eaux de pluies, l'uranium est redistribué dans toutes les composantes de l'environnement, aboutissant à terme dans les milieux aquatiques (**Colle et al., 2001**). Sa concentration dans les eaux naturelles est extrêmement variable, allant de quelques ng/L à plus de 2 mg/L (**WHO, 2001**).

L'utilisation de l'uranium au cours des différentes étapes du cycle du combustible nucléaire (sites d'extraction miniers, sites de stockages de déchets), en milieu médical, dans les laboratoires de recherche, ainsi que dans le domaine militaire, peut engendrer des concentrations localement plus importantes. Ainsi, à proximité de certains sites miniers aux Etats-Unis, des concentrations allant de 10 mg/L à pH 7 jusqu'à 20 mg/L pour des pH faibles ont été mesurées (**Ragnarsdottir et Charlet, 2000**).

## 1.3 Valeurs guides sans effet pour l'environnement

Il n'existe à ce jour aucune valeur réglementaire pour la protection des écosystèmes adaptée au cas de l'uranium, que ce soit aux niveaux français ou européen. En effet, jusqu'à récemment, la protection de l'environnement vis-à-vis des radionucléides au sens large n'était abordée qu'à travers le débit de dose limite de 10 mGy/j préconisé par l'AIEA (**AIEA 1992**). Cependant, cette valeur seuil, ayant fait l'objet de consensus d'experts au moment de sa publication, a été définie sur la base de travaux dont l'objectif initial n'était pas nécessairement la mise en place d'un système de radioprotection de l'environnement alors qu'elle est souvent utilisée dans ce but.

Dans ce cadre général et dans le contexte actuel de la réglementation européenne sur la gestion des milieux aquatiques, ne désignant pas un type particulier de polluant mais préconisant des résultats en termes de bonne santé des écosystèmes, il apparaît important de développer un système de radioprotection de l'environnement cohérent avec les méthodes existantes pour les substances chimiques.

Pour la toxicité radiologique, la détermination de la valeur du débit de dose sans effet est basée sur l'analyse des données d'effet des rayonnements ionisants (résultats d'exposition externe à des émetteurs gamma) par l'application de modèles statistiques d'extrapolation établis sous l'hypothèse que la variabilité de sensibilité des espèces testées est un échantillon représentatif de la sensibilité de toutes les espèces au sein d'un écosystème (**Garnier-Laplace et al., 2006**). Cette méthode a permis d'estimer le débit de dose en deçà duquel 95 % des espèces d'un écosystème donné sont considérées comme protégées (HDR<sub>5</sub>, Hazardous Dose Rate for 5% of species). Pour l'écosystème aquatique continental, le HDR<sub>5</sub> est de 98 µGy/h (intervalle de confiance à 95 % : [23 ; 497]). Après application d'un facteur de sécurité de 10 prenant en compte un RBE (Relative Biological Effectiveness : facteur de pondération caractéristique du rayonnement qui donne une mesure de l'efficacité relative des différents types de rayonnements à produire un même effet biologique pour une même dose absorbée) de 4,7 relatif à l'exposition interne au rayonnement alpha et l'incertitude due au traitement de données d'exposition gamma externe (i.e. majorité des données disponibles) et en arrondissant à la première dizaine inférieure, un PNEDR (Predicted No Effect Dose Rate) de 10 µGy/h a finalement été retenu.

Ces valeurs doivent être comparées aux valeurs représentatives des débits de dose relatifs au bruit de fond naturel. Ce débit de dose varie de 0,01 à 6 µGy/h selon les écosystèmes et les espèces exposées (**Gómez-Ros et al., 2004**).

En parallèle de cette évaluation du risque écologique associé aux propriétés radiologiques des radionucléides, il est nécessaire d'examiner le risque d'écotoxicité chronique lié à la chimiotoxicité de radioéléments comme l'uranium.

Une telle démarche d'évaluation du risque écologique a été appliquée récemment au cas des sites miniers de Haute-Vienne (**Beaugelin-Seiller et Garnier-Laplace, 2007**), en prenant en compte non seulement la radiotoxicité de l'uranium mais également sa toxicité chimique.

La méthode d'évaluation du risque chimiotoxique pour l'uranium est celle préconisée dans le Technical Guidance Document (TGD), selon une démarche similaire à celle utilisée pour le risque radiologique. L'application d'analyse statistique de la sensibilité des espèces regroupées en trois niveaux trophiques (producteurs primaires, invertébrés et vertébrés) a permis d'estimer la concentration protégeant 95 % des espèces constituant un écosystème d'eau douce dans un contexte d'exposition chronique (dite HC5) à la valeur de 3,2 µg/L, IC 95 % [0,57-23 µg/L]. Les données étant nombreuses, un facteur d'extrapolation de 1 est appliqué pour obtenir la PNEC (Predicted No Effect Concentration). Cette valeur est à

---

comparer dans le ratio PEC (Predicted Environmental Concentration)/PNEC à la concentration ajoutée par les pratiques anthropiques et non à la concentration totale, i.e. incluant le bruit de fond naturel. A titre d'exemple, la gamme de variation des concentrations d'uranium mesurées par l'IRSN au cours des deux dernières années dans les cours d'eau français s'établit de 0,06 à 0,9 µg U/L.

Cette valeur de PNEC est supérieure à la NQEp (Norme de Qualité Environnementale provisoire) de 0,3 µg/L déterminée pour l'uranium dans la circulaire du ministère de l'écologie et du développement durable (DCE/23 2007). La NQEp préconisée dans ce cas est égale à la somme de la PNEC de 0,3 µg/L et de la concentration de bruit de fond géochimique.

D'autres organismes internationaux (**MOEE, 1994; ANZECC et ARMCANZ, 2001; Environnement Canada, 2003,2008 ; Saskatchewan Environment, 2006**) ont émis des critères de protection des milieux d'eaux douces pour l'uranium, basés principalement sur des critères de toxicité chimique (Tableau 4). Ces valeurs varient de 0,5 à 280 µg/L, mettant en évidence la nécessité d'une homogénéisation des valeurs seuils au niveau international.

## 2. Contamination à l'uranium

### 2.1 Biodisponibilité de l'uranium

Pour la voie de contamination directe (par le milieu environnant), de nombreux travaux ont montré que la toxicité d'un élément métallique n'était pas liée à sa concentration totale dans le milieu mais à la fraction de cet élément métallique biodisponible pour l'organisme. En effet les proportions des différentes formes chimiques du métal dépendent des caractéristiques physico-chimiques du milieu, et seules certaines formes du métal sont assimilables (e.g. la forme de l'ion libre  $M^{z+}$ ). Cette fraction biodisponible de la quantité totale de métal pourra de plus être assimilée de différentes façons d'un organisme à l'autre (influence de l'âge, taille, type de nutrition...). Des modèles basés sur les équilibres thermodynamiques sont couramment utilisés afin de prédire la spéciation de métaux dans l'environnement et de tenter d'établir une relation entre cette spéciation, la biodisponibilité et les effets envers les organismes. Deux modèles sont le plus souvent utilisés pour évaluer la toxicité des métaux :

Le modèle de l'ion libre ou FIAM, Free-Ion Activity Model (**Morel, 1983**), est le plus populaire en écotoxicologie et repose sur l'hypothèse d'une liaison réversible du métal sous la forme de l'ion libre  $M^{z+}$  avec un site de surface chargé négativement, le transport du métal à travers la membrane plasmique étant l'étape limitante de l'internalisation métallique.

Le modèle BLM, Biotic Ligand Model (**Paquin, 2002**) est un modèle dérivé de l'ion libre, qui intègre la spéciation chimique de l'élément en solution, la formation de complexe(s) métal/ligand biotique déterminant la réponse toxique induite, et la prise en compte de la compétition avec d'autres ions ( $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$ ...) pour la complexation sur le ligand biotique. Selon ces modèles, les différentes substances présentes dans le milieu peuvent interagir avec la biodisponibilité du métal en formant des complexes métalliques (i.e. réduisant l'activité de l'ion libre) ou via une compétition pour le site de liaison surfacique.

Concernant l'uranium, l'application de ces modèles semble plus complexe dans la mesure où les études sont partagées quant à la corrélation entre la concentration de l'ion libre, la biodisponibilité et la toxicité. En effet certaines études montrent une relation proportionnelle entre l'activité de l'ion libre ( $UO_2^{2+}$ ) et sa bioaccumulation chez l'algue *C. reinhardtii* et le bivalve *C. fluminea* (**Fortin et al., 2004 ; Tran et al., 2004**) ou entre celle-ci et sa toxicité

chez le bivalve *V. angasi* (Markish, 1996). A l'opposé, il apparaît que l'effet du pH ne peut pas être simplement pris en compte *via* la compétition proton-uranyle telle qu'elle est décrite dans le modèle BLM (Fortin *et al.*, 2007) et que d'autres espèces que l'ion uranyle sont probablement co-accumulées comme l'espèce neutre  $\text{UO}_2\text{CO}_3^\circ$  et les complexes hydroxylés  $\text{UO}_2\text{OH}^+$  ou  $\text{UO}_2(\text{OH})_2^\circ$  (Markish *et al.*, 2000 ; Denison, 2004).

L'ensemble de ces travaux montre que la corrélation entre la spéciation chimique de l'uranium, sa biodisponibilité et sa toxicité est plus complexe que celle mise en évidence par les modèles classiques pour d'autres métaux comme le cadmium ou le cuivre.

## 2.2 Bioaccumulation de l'uranium

L'entrée de l'uranium par contamination interne chez les organismes aquatiques et en particulier chez le poisson, peut se faire par la voie directe par le milieu au contact de l'eau avec les branchies (voie de respiration et d'osmorégulation) ou au contact du sédiment, mais aussi par la voie trophique (l'ingestion de nourriture) ou encore par transfert parental. La contribution respective des deux voies est encore mal connue mais les données existantes montrent que le transfert de l'uranium dans les chaînes alimentaires est considéré comme faible et diminue quand le niveau trophique augmente (Poston, 1982 ; Swanson, 1982 ; Ribera, 1996). Parallèlement à cette diminution du facteur de concentration, une diminution du facteur trophique (facteur défini comme le ratio des concentrations de radionucléide dans le prédateur et dans la proie) est également observé (Colle *et al.*, 2001). Ceci est corroboré par le très faible taux d'assimilation de l'uranium lors de l'ingestion (1 à 13%) (Environnement Canada, 2003 ; Simon *et al.*, 2004, 2005).

Par ailleurs, le sédiment étant un des compartiments du système aquatique qui peut comporter de très fortes concentrations en uranium (Hart *et al.*, 1986 ; Lottermoser *et al.*, 2005), cette source de contamination pourra se révéler plus importante pour des espèces benthiques, qui soit ingèrent du sédiment pour trouver leur nourriture, soit vivent au contact direct de ce sédiment (Swanson, 1983 et 1985 ; Ribera *et al.*, 1996).

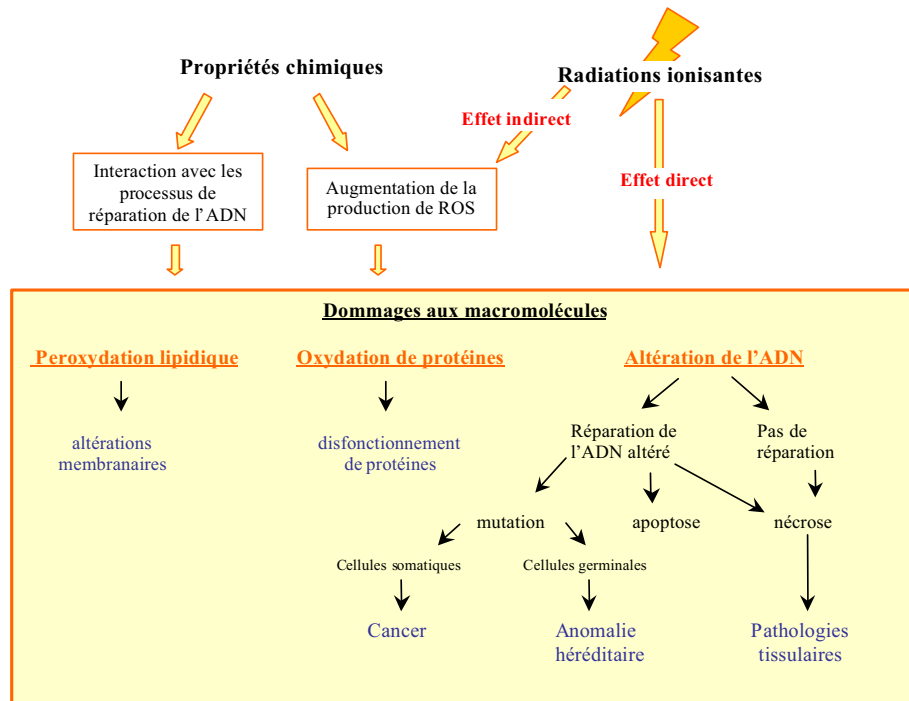
Les informations sur la bioaccumulation de l'uranium par les poissons d'eau douce sont rares. Cependant des études sur des poissons sauvages ont révélé des sites d'accumulation majeurs de l'uranium dans certains organes des poissons comme les os, les reins, le tractus gastro-intestinal et le foie (Poston, 1982 ; Swanson, 1985 ; Waite *et al.*, 1988, 1990 ; Clulow *et al.*, 1998). En effet la distribution de l'U dans les tissus semblerait conditionnée par

sa solubilité puisque quelle que soit sa voie d'entrée et sa forme chimique initiale, il est finalement solubilisé et pénètre le flux sanguin (**Hengé-Napoli et al., 2001**). Certains auteurs ont pu, plus récemment, relier des concentrations mesurées dans les organes aux concentrations d'exposition, notamment dans le cas des écailles de corégone (*Coregonus clupeaformis*) exposés par de la nourriture contaminée à 100 µg U/g de nourriture (**Cooley et Klaverklamp, 2000**). Les tissus minéralisés comme le squelette ou les écailles représentent des sites de fixation majeurs de l'uranium qui a un rayon ionique proche de celui du calcium et peut donc s'échanger avec l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  à la surface des os dans les cristaux d'hydroxyapatite (**Hamilton, 1971**) et des écailles (**Kovalsky et al., 1967**). **Cooley et Klaverklamp (2000)** ont retrouvé dans leur étude en laboratoire les mêmes organes d'accumulation majeure que les études en milieu naturel. De plus **Cooley et Klaverklamp (2000)** ont montré qu'à la forte concentration d'exposition (10 mg U/g de nourriture), que la gonade était aussi un organe majeur d'accumulation et plus particulièrement les gonades mâles ( $194 \pm 50$  µg/g poids frais pour les gonades mâles vs  $17,8 \pm 3,4$  µg/g poids frais pour les gonades femelles). Chez les mammifères il a aussi été suggéré que l'uranium pouvait traverser la barrière hémato testiculaire (**Calmet et al., 2003**). **Cooley et Klaverklamp (2000)** émettent l'hypothèse qu'un effet de dilution tissulaire spécifique aux gonades femelles pourrait expliquer la différence entre les deux sexes, le volume des gonades femelles étant plus important que celui des mâles alors que les charges tissulaires totales sont équivalentes. On note cependant que l'accumulation dans les gonades femelles est plus forte quand les gonades ont une maturation très avancée.

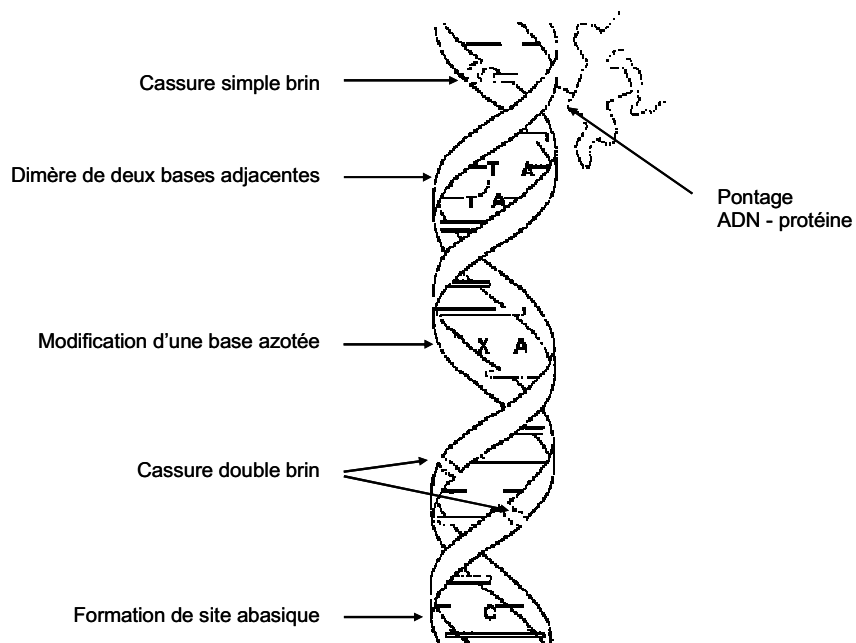
Plus récemment, des travaux de laboratoire menés sur le *Danio rerio* (**Barillet, 2007**) ont également montré que l'uranium s'accumulait préférentiellement dans les branchies et le foie et qu'il pouvait atteindre l'ensemble des tissus (squelette, cerveau et gonade mâle) à de faibles concentrations d'exposition directe (20 et 100 µg U/L). La cinétique d'accumulation et la distribution biologique de l'uranium sont affectées lorsque différentes compositions isotopiques de l'uranium sont utilisées (uranium appauvri seul ou en mélange avec de l' $^{233}\text{U}$ ) (**Barillet et al., 2006**), avec notamment une augmentation de l'accumulation de l'uranium dans les gonades en présence de  $^{233}\text{U}$ . D'autres travaux menés au laboratoire sur poisson zèbre (**Lerebours et al., 2008**) ont également montré une faible accumulation de l'uranium dans le cerveau et le muscle après 21 jours d'exposition par voie directe à 100 µg/L (comparativement aux organes cibles que sont le foie et les branchies). En revanche, ces organes sont caractérisés par une dépurabilité beaucoup plus faible après 8 jours en eau claire.

---

Il existe une variabilité importante des facteurs de bioconcentration mesurés. Ainsi on retrouve des valeurs variant de 1,9 à 6,7 selon le temps d'exposition des organismes (35 j à 60 j), la concentration d'exposition (150 µg/L à 4 mg/L) et l'espèce (Salmonidés et Cyprinidés) (**Poston, 1982 ; Parkurst *et al.*, 1984 ; Labrot *et al.*, 1999**). Les travaux de **Barillet (2007)** montrent également une forte variation du facteur de bioconcentration de l'uranium mesuré chez *D. rerio*, en fonction de la concentration d'exposition notamment (BCF de 1400 à 20 µg U/L vs 100 à 500 µg U/L). L'ensemble de ces travaux montre que la bioaccumulation de l'uranium chez des vertébrés aquatiques comme les poissons dépend de nombreux facteurs (milieu, voie, concentration et durée d'exposition, espèce...).



**Figure 2 :** Effets biologiques moléculaires induits par une exposition aux radionucléides (d'après Ercal et al., 2001).



**Figure 3 :** Représentation schématique des principales lésions à l'ADN produites par les radionucléides.



---

### **3. Toxicité de l'uranium**

#### 3.1 Mécanismes de toxicité

L'uranium fait partie des radionucléides à faible activité spécifique pour lesquels il est nécessaire de prendre en compte à la fois les propriétés chimiques et radiologiques de l'élément pour comprendre les effets biologiques (Figure 2).

##### 3.1.1 Toxicité radiologique

Les propriétés radiologiques de l'uranium sont susceptibles de créer des interactions avec les molécules de façon directe ou indirecte. Dans le cas du processus direct, il s'agit d'un dépôt d'énergie (excitation) et de l'arrachement consécutif d'un électron (ionisation) sur la molécule. Le processus indirect met en jeu la radiolyse de l'eau intracellulaire entraînant la production du radical hydroxyle, hautement toxique et la surproduction des autres EROs (Espèces Réactives de l'Oxygène), et de façon consécutive, l'accroissement du stress oxydant.

##### 3.1.2 Toxicité chimique

Par ses propriétés chimiques, la présence d'uranium peut entraîner la surproduction d'EROs pouvant être à l'origine d'un stress oxydant cellulaire induisant des réactions d'oxydation, d'hydroxylation, de réduction, de rupture de chaînes carbonatées, etc... ayant pour cibles principales les macromolécules telles que les protéines, les phospholipides membranaires et les acides nucléiques (**Ribera *et al.*, 1996**).

#### 3.2 Effets biologiques de l'uranium à l'échelle subcellulaire et cellulaire

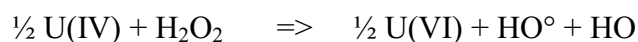
##### 3.2.1 Génotoxicité de l'uranium et conséquences

Quelle que soit l'origine du stress, chimique ou radiologique, l'ADN constitue la molécule cible des effets biologiques induits. Différentes altérations radio-induites de l'ADN peuvent être retrouvées, appartenant aux grands types de dégradation suivants (Figure 3): les coupures

du brin d'ADN (simple ou double), la création de site abasique, la dégradation de base (la guanine étant la base la plus sensible), le pontage ADN-protéine, et l'addition des produits de la peroxydation des lipides comme le malondialdéhyde.

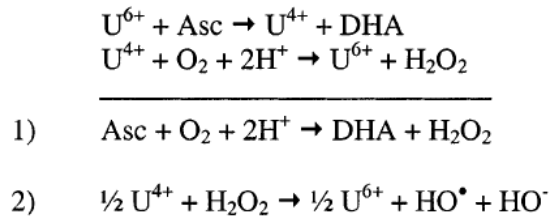
Ces lésions de l'ADN induisent un arrêt du cycle cellulaire permettant aux processus de réparation de se mettre en place. La perturbation de ces processus est donc une autre voie de génération de dommages à l'ADN. Les dommages de base (DB), qui sont les dommages à l'ADN le plus fréquemment induits par les rayonnements ionisants, sont généralement réparés en une dizaine de minutes après l'irradiation et convertis en cassures d'ADN via un processus d'excision-resynthèse (**Frankenberg-Schwager, 1989 ; Jackson, 2002**). Les cassures simple brin (CSB) sont également rapidement réparées (en moins d'une heure) et à ce titre elles ont peu d'impact en matière de létalité cellulaire. Enfin, les cassures double brin (CDB), correspondant à une rupture des deux chaînes en des sites proches l'un de l'autre constituent une catégorie de lésions parmi les plus délétères. Si leur taux de formation est assez faible, leur réparation est relativement longue et de ce fait, elles sont considérées comme une catégorie de lésions très critique. Elles sont notamment impliquées dans la formation d'aberrations chromosomiques et dans la mutagenèse radio-induite (**Phillips et Morgan, 1993**).

Dans le cas de l'uranium, diverses altérations de l'ADN ont été observées: modifications de bases (hydroxylation, dimérisation), altérations des sucres, formation de ponts covalents entre la double chaîne d'ADN et cassures de chaîne (**Ribera et al., 1996**). Il a été montré que l'uranium pouvait créer un déséquilibre de la balance oxydative en entraînant une surproduction d'EROs selon un schéma réactionnel basé sur un mécanisme d'oxydoréduction de type Fenton :



Ce mécanisme a été démontré en présence de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dans un milieu inorganique à  $\text{pH} < 4$  (**Hamilton et al., 1997**) et en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et d'ascorbate sur de l'ADN de thymus de veau, entraînant des dommages oxydatifs (thymine glycol et 8-hydroxydeoxyguanosine) (**Miller et al., 2002a**). Par ailleurs, l'ion uranyle peut également provoquer des cassures d'ADN de plasmides en présence d'ascorbate mais sans  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Yazzie et al., 2003**).

Ces auteurs proposent un mécanisme de toxicité selon lequel l'ascorbate et le dioxygène catalyseraient le cycle d'oxydo-réduction entre U(VI) et U(IV), en libérant du peroxyde d'hydrogène. Celui-ci réagirait ensuite avec l'U(IV) pour générer le radical hydroxyle :



Une interaction directe entre l'ion uranyle et l'ADN est également suggérée, avec une fixation du complexe uranyle-ascorbate sur le groupement phosphate de l'ADN (Yazzie *et al.*, 2003).

Type d'étude	Espèces étudiées	Mode d'exposition	Effets mis en évidence	Référence
<i>In vitro</i>	Hamster Chinois (cellules d'ovaires)	Uranium appauvri (nitrate d'uranyle)	Micronoyaux, aberrations chromosomiques, échanges chromatides sœurs	Lin <i>et al.</i> , 1993
	Hamster Chinois (cellules d'ovaires)	Uranium appauvri (acétate d'uranyle)	Lésions primaires de l'ADN (essai des comètes), formation d'adduits, induction de mutations	Stearns <i>et al.</i> , 2005
	Rats (cellules rénales)	Uranium appauvri (nitrate d'uranyle)	Lésions primaires de l'ADN (essai des comètes)	Thiébaud <i>et al.</i> , 2007
	Cellules HOS	Uranium appauvri (chlorure d'uranyle)	Echange de chromatides sœurs, micronoyaux Instabilité génomique (cassures chromosomiques), mutagénèse (mutations HPRT), pouvoir transformant	Miller <i>et al.</i> , 2002a et b
<i>In vivo</i>	Souris mâle (cellules germinales)	Uranium enrichi injecté dans les testicules	Aberrations chromosomiques	Hu et Zhu, 1990a, b
	Rats (cellules broncho alvéolaires)	Uranium appauvri par inhalation	Lésions primaires de l'ADN (essai des comètes)	Monleau <i>et al.</i> , 2006
	Rats	Uranium appauvri par implantation sous cutanée	Présence de facteur mutagène dans l'urine (test d'Ames)	Miller <i>et al.</i> , 1998a
	Hommes (lymphocytes)	Uranium appauvri (in situ)	Inhibition des capacités de réparation	Au <i>et al.</i> , 1998
	Poisson zèbre adulte mâles - érythrocytes -cellules germinales	Uranium appauvri (nitrate d'uranyle) vs <sup>233</sup> U (nitrate d'uranyle)	Lésions primaires de l'ADN (essai des comètes)	Barillet <i>et al.</i> , 2005 Barillet, 2007

**Tableau 5 :** Principaux effets génotoxiques (lésions primaires et conséquences cytogénétiques) de l'uranium *in vitro*, *in vivo* et sur mammifère  et espèces aquatiques .

La majorité des travaux concernant les effets génotoxiques de l'uranium sont résumés dans le tableau 5. On notera que de nombreux travaux ont été réalisés *in vitro* sur cellules de mammifères afin d'éclairer les mécanismes d'effets et que différents types cellulaires ont été testés et présentent des lésions primaires de l'ADN, comme les cellules germinales ou rénales (Lin *et al.*, 1993 ; Stearns *et al.*, 2005 ; Thiébault *et al.*, 2007).

Parmi ces lésions, des cassures du brin d'ADN ont été observées lors de l'exposition à l'uranium. Elles seraient dues à la rupture de la liaison phosphate-sucre consécutive soit à l'arrachement direct d'électrons de la molécule d'ADN par un radical hydroxyle (Yazzie *et al.*, 2003 ; Calmet *et al.*, 2003 ) soit à la fixation de l'uranium sur les groupements phosphate de l'ADN (Lin *et al.*, 1993 ; Stearns *et al.*, 2005). Des cassures d'ADN, mesurées par le test des comètes, ont également été mises en évidence dans des cellules d'ovaires de hamster chinois après exposition à l'uranium appauvri (Stearns *et al.*, 2005). Ces auteurs indiquent la capacité de l'uranium à former des cassures à l'ADN et induire des mutations. Ces cassures de brin peuvent être également générées par l'organisme lors des processus de réparation de bases ou nucléotides altérées (Wirgin et Theodorakis, 2002). Dans le cas de cassures double brin, elles ont un taux de formation moins important que les cassures simple brin, mais elles sont difficilement réparables et donc considérées comme des lésions critiques. L'uranium pourrait également être génotoxique *via* une altération de la réparation de l'ADN, comme suggéré par Au *et al.* (1998), qui ont observé une diminution des capacités de réparation de l'ADN chez des individus vivant à proximité de mines d'uranium. Des altérations de base ont également été identifiées. L'attaque de radicaux hydroxyles peut provoquer une altération de la base. En effet il a été montré qu'une altération de l'ADN par la formation de thymine glycol et de 8-hydroxy-deoxyguanosine peut être induite en présence d'uranium appauvri, de peroxyde d'hydrogène et d'ascorbate (Miller *et al.*, 2002a).

Des conséquences cytogénétiques (nombre de micronoyaux, aberrations chromosomiques, échanges de chromatides sœurs) ont été observées sur des cellules exposées *in vitro* à de l'uranium appauvri : cellules d'ovaires de hamster chinois (Lin *et al.*, 1993) et lignée d'ostéoblastes humains (Miller *et al.*, 2002b, 2003). Sur ces cellules HOS, l'augmentation de la fréquence de chromosomes dicentriques est dépendante de la dose radiologique (exposition à  $^{238}\text{U}$ , uranium appauvri et  $^{235}\text{U}$ ), ce qui indique un rôle des radiations dans l'effet génotoxique de l'uranium.

Type d'étude	Espèces étudiées	Type de stresseurs radioactifs	Effets mis en évidence	Référence
<i>In vitro</i>	Poisson zèbre ( <i>D. rerio</i> ) (hépatocytes et cellules germinales mâles)	Irradiation $\gamma$ externe par $^{137}\text{Cs}$	Lésions primaires de l'ADN (essai des comètes)	Adam <i>et al.</i> , 2007
<i>In vivo</i>	Moules ( <i>M. edulis</i> ) (Hémocytes)	Tritium ( 12 $\mu\text{Gy/h}$ à 485 $\mu\text{Gy/h}$ ) pendant 96 h	Domages à l'ADN (essai des comètes et micronoyaux) dès la dose plus faible	Jha <i>et al.</i> , 2005 ; 2006
	Moules ( <i>M. edulis</i> )	Tritium	Aberrations chromosomiques dès 0,03 mGy/j et Mutations (RAPD)	Hagger <i>et al.</i> , 2005
	Plies adulte ( <i>P. platesa</i> ) (érythrocytes)	Irradiation $\gamma$ externe par $^{137}\text{Cs}$ (0,25 à 12 mGy/h)	Absence d'effet génotoxique (micronoyaux) après 197 j d'exposition	Knowles <i>et al.</i> , 1999
	Larves de poisson zèbre ( <i>D. rerio</i> )	Irradiation $\gamma$ externe par $^{137}\text{Cs}$ (400 à 7400 $\mu\text{Gy/h}$ )	Domages à l'ADN (essai des comètes) à partir de 1200 $\mu\text{Gy/h}$	Jarvis et Knowles, 2003
	Medaka ( <i>O. latipes</i> ) (cellules germinales mâles et cellules embryonnaires)	Irradiation $\gamma$ externe par $^{137}\text{Cs}$ (0,03 à 95 cGy/min)	Augmentation des fréquences de mutations (microsatellites)	Shimada <i>et al.</i> , 2005
	Medaka ( <i>O. latipes</i> ) (cellules germinales)	Irradiation $\gamma$ externe par $^{137}\text{Cs}$ (68 mGy/d)	Augmentation des fréquences de mutation (microsatellites)	Tsyuko <i>et al.</i> , 2007
<i>In situ</i>	Amphibiens ( <i>R. perezii</i> ) (érythrocytes)	Site minier d'uranium Portugal (complexe de métaux)	Micronoyaux	Marques <i>et al.</i> , 2008
	Gambusies	Lac White Oak avec mélange d'élément actif ( $^{235}\text{U}$ , $^{239,240}\text{Pu}$ , $^{137}\text{Cs}$ , $^{60}\text{Co}$ , $^{90}\text{Sr}$ ) et stable	Différents types de cassures de l'ADN (électrophorèse sur gel d'agarose) selon les tissus et les saisons	Theodorakis <i>et al.</i> , 1997, 1999 ; Theodorakis et Shugart, 1998
	Achigan à grande bouche ( <i>M. salmoides</i> ) adultes (érythrocytes)	Site Savannah river, $^{134,137}\text{Cs}$ + $^{89,90}\text{Sr}$ + Hg	Lésions de l'ADN (cytométrie de flux)	Lingenfelter <i>et al.</i> , 1997a
	Carassin ( <i>C. carassius</i> ) (érythrocytes)	Site Tchernobyl, $^{137}\text{Cs}$	Lésions de l'ADN (cytométrie de flux)	Lingenfelter <i>et al.</i> , 1997b

**Tableau 6 :** Effets génotoxiques (lésions primaires ■ et conséquences cytogénétiques ■ chez des espèces aquatiques exposés à différents radionucléides, principalement l'irradiation  $\gamma$  externe.

Des conséquences cytogénétiques et la présence de facteurs mutagènes ont également été observées lors d'expérimentations *in vivo* sur des rongeurs (rats et souris) après exposition par injection ou inhalation d'uranium appauvri (Hu et Zhu, 1990 ; Miller *et al.*, 1998a ; Monleau *et al.*, 2006).

Concernant les organismes aquatiques, il n'existe, à notre connaissance, que quelques études sur les effets génotoxiques de l'uranium chez le poisson zèbre. Celles-ci ont montré un effet significatif de l'uranium sur l'ADN érythrocytaire lors d'une exposition à de faibles concentrations d'uranium appauvri (100 µg/L et 500 µg/L pendant 20 jours) (Barillet *et al.*, 2005) et sur l'ADN des cellules germinales lors d'une exposition à différents enrichissements d'uranium (Barillet, 2007).

D'une façon plus générale au domaine du nucléaire, la majorité des travaux relatifs aux espèces aquatiques d'eau douce ou marine, concerne des expositions à d'autres radionucléides, notamment aux rayonnements  $\gamma$  et au tritium. Le tableau 6 regroupe les expérimentations ayant été réalisées avec des gammes de débit de dose réalistes. Dans ces travaux, des lésions primaires du type cassures de brins d'ADN ont également pu être mesurées, *in vivo* et *in vitro* dans différents types cellulaires. Adam *et al.* (2007) ont ainsi montré des altérations de l'ADN dans des hépatocytes et des cellules germinales mâles après exposition *in vitro* à une gamme d'irradiation  $\gamma$  externe pendant 24h. Ces résultats ont mis en évidence une sensibilité accrue des gamètes par rapport aux hépatocytes, avec une augmentation des dommages à l'ADN à partir de 42 µGy/h (vs 31 mGy/h pour les hépatocytes). Les spermatozoïdes, dépourvus de systèmes de réparation efficaces, maintiennent difficilement l'intégrité de leur ADN et sont, par conséquent, plus sensibles que les hépatocytes à la présence d'agents génotoxiques dans le milieu. Cette vulnérabilité a toutefois pu être accentuée par l'absence du milieu physiologique naturel dans lequel les gamètes mâles évoluent *in vivo*, jouant un rôle majeur dans la préservation de l'intégrité de leur ADN (Ciereszko *et al.*, 2005 ; Dietrich *et al.*, 2005). La sensibilité des cellules germinales a par ailleurs déjà été démontrée *in vivo* à des débits de dose similaires (175m Gy/j) chez une autre espèce de poisson (*Ameioba splendens*) (Rackham et Woodhead, 1984). Des effets génotoxiques ont aussi été observés chez des larves de poissons zèbre (*D. rerio*) lors d'une irradiation  $\gamma$  externe ( $^{137}\text{Cs}$ , 400 à 7400 µGy/h) (Jarvis et Knowles, 2003). Les effets mesurés ainsi par le test des comètes ont montré une augmentation du pourcentage

d'ADN dans la queue des comètes à partir de 1200  $\mu\text{Gy/h}$  ainsi qu'une absence de relation intensité des dommages/temps d'exposition, indiquant des réparations possibles de l'ADN.

Des dommages cytogénétiques ont également été observés, caractérisés par une altération du nombre (aneuploïdie, i.e. un ou plusieurs chromosomes manquants) (études *in situ* **Lingenfelter et al., 1997ab**) ou de la structure des chromosomes (cassures, translocations, inversions, fragments acentriques)(tritium, **Hagger et al., 2005**), ainsi que par la formation de micronoyaux (**Knowles et al., 1999 ; Marques et al., 2008**). L'effet des radiations ionisantes apparaît très dépendante du type de rayonnement, puisque des effets génotoxiques sont observés dès la dose de 12  $\mu\text{Gy/h}$  chez des moules exposées au tritium, tandis que chez des larves de poissons exposés à des rayonnements gamma, les premiers effets sont observés à partir de 1200  $\mu\text{Gy/h}$ .

Bien que les rayonnements alpha soient considérés comme les plus dangereux, la seule étude existante à notre connaissance concerne les effets de l'uranium enrichi *in vivo* sur les organismes aquatiques est celle de Barillet (**2007**) (tableau 5).

Parmi les différents types cellulaires étudiés, les cellules germinales présentent un intérêt particulier dans l'évaluation de la génotoxicité d'agents ionisants et chimiques. En effet, l'altération du matériel génétique des gamètes peut compromettre la capacité des organismes à engendrer une descendance viable, modifier la constitution génétique des générations suivantes par introduction de mutations plus ou moins délétères et ainsi avoir de graves répercussions à l'échelle des populations (**Anderson et Wild, 1994**). Dans ce cadre général, l'étude de la génotoxicité à l'échelle de l'individu se développe et s'étend vers une compréhension des effets toxicologiques génétiques au niveau des écosystèmes par l'étude des populations (**Belfiore et Anderson, 2001; Theodorakis, 2001**). Les changements du matériel génétique induits par des polluants, conceptualisés sous le terme d'écotoxicologie génétique (**Theodorakis et Shugart, 1998**), peuvent notamment engendrer une réduction de la diversité génétique et alors impacter la structure et la dynamique des populations.

Les conséquences des lésions de l'ADN à d'autres niveaux d'organisation biologique, avec des répercussions pouvant aller jusqu'au niveau de la population ont notamment été mis en évidence dans les travaux de **Theodorakis et al., (1997, 1999)** et de **Theodorakis & Shugart (1998)**. Ces auteurs ont montré que la quantité de dommages à l'ADN chez les organismes aquatiques était inversement reliée à leur capacité reproductrice et ont, de plus, observé une corrélation entre le nombre de cassures de l'ADN érythrocytaire chez les



femelles, une baisse de la fécondité et le nombre de malformations embryonnaires. Cette corrélation était plus forte dans le cas des cassures double brin et de plus, un effet seuil a pu être mis en évidence entre l'occurrence des malformations embryonnaires et la présence de cassures double brin chez la mère. Les risques génétiques trans-générationnels ont également été étudiés sur des medakas (*O. latipes*) exposés au  $^{137}\text{Cs}$  : une relation dose effet concernant des fréquences spécifiques de mutations chez des cellules germinales a été observé par les auteurs (**Shimada *et al.*, 2005 ; Tsyuko *et al.*, 2007**).

**Kurelec (1993)** a montré chez les invertébrés que la génotoxicité était corrélée à un syndrome général associant une altération du fonctionnement de certaines enzymes, du turn-over protéique et du métabolisme cellulaire, une diminution des défenses immunitaires, de la croissance et de la fécondité, ainsi qu'un vieillissement accéléré.

### 3.2.2 Cancérogénicité et mort cellulaire

Les travaux de **Miller *et al.* (2002b)** ont montré que des souris ayant subi une implantation de lignées cellulaires d'ostéoblastes exposés à de l'uranium pouvaient développer des tumeurs. Les cellules transformées étaient caractérisées notamment par l'induction de l'expression d'oncogène et la réduction de l'expression d'antioncogène (**Miller *et al.*, 1998b**). Des résultats similaires d'activation d'oncogène à l'origine de sarcomes, notamment dans le rein et le muscle, ont été montrés chez les rats ayant reçu des implants d'uranium appauvri (**Hahn *et al.*, 2002**).

Lorsque « la machinerie cellulaire » est dépassée, un mécanisme de mort cellulaire peut alors se mettre en place. Comme décrit ci après (§ 3.4) des nécroses hépatiques et rénales ont pu être constatées chez les poissons (**Cooley *et al.*, 2000**). Ces nécroses peuvent être les conséquences de différents mécanismes comme la rupture des lysosomes (l'accumulation d'uranium dans les lysosomes a été montrée chez les mollusques par **Chassard-Bauchaud, 1983**), une hypoxie tissulaire ou une peroxydation des lipides membranaires (**Kehrer, 1993**).

### 3.2.3 Conséquences sur la balance antioxydante

La capacité de l'uranium à induire un stress oxydatif a déjà été déterminée chez plusieurs espèces de poissons et pour différents types d'exposition. Ainsi une perturbation précoce mais transitoire de l'activité d'enzymes intervenant dans la défense cellulaire antioxydante

(superoxyde dismutase et catalase) a été montrée chez la truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*) après exposition trophique à l'U (Buét *et al.*, 2005). Chez le poisson zèbre, d'autres études, *in vitro* ou *in vivo* ont montré l'instauration d'un stress oxydatif suite à l'exposition à l'uranium dans différents organes d'intérêt comme le cerveau ou le foie (Labrot *et al.*, 1996 ; Barillet *et al.*, 2005, 2007). Les expériences menées par Labrot *et al.* (1996), ont montré que chez le poisson zèbre l'activité de l'acétylcholinestérase (biomarqueur de neurotoxicité) mais aussi que le niveau de malondialdéhyde (produit de dégradation des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène générés par des contaminants) diminuaient avec l'exposition à l'uranium. Alors que de légères variations dans l'activité de la catalase et de la glutathion peroxydase (deux biomarqueurs de stress oxydant) ont été observées. Cependant ces travaux ont été réalisés sur des périodes de contaminations de 4 et 11 jours avec des concentrations en uranium bien supérieures à celles rencontrées dans les écosystèmes naturels. Mais les travaux menés à des concentrations plus faibles par Barillet *et al.*, (2007) ont montré également de légères perturbations de la balance antioxydante, notamment dans le foie pour la SOD Superoxyde Dismutase et les mêmes enzymes que Labrot *et al.* (1996). D'autres études réalisées sur l'espèce *Coregonus clupeaformis* (corégone, poisson d'eau douce) exposée par ingestion de nourriture contaminée en uranium pendant 100 jours ont montré des dommages membranaires au niveau cellulaire et sub-cellulaire dans le foie et les reins postérieurs (Cooley *et al.*, 2000).

Les effets toxiques sublétaux de l'uranium chez les poissons se manifestent donc par un stress oxydant, avec le déclenchement de mécanismes de peroxydation lipidique membranaire et l'inhibition de l'activité catalytique de diverses enzymes intervenant dans la défense antioxydante (Labrot *et al.*, 1996; Ribera *et al.*, 1996; Cooley *et al.*, 2000 ; Barillet *et al.*, 2007).

### 3.3 Effets biologiques de l'uranium sur les tissus et organes

#### 3.3.1 Les branchies

L'atteinte branchiale des poissons exposés à des métaux par voie directe est fréquemment rapportée dans la littérature. Des travaux récents chez le poisson zèbre exposé pendant 20 jours par voie directe à 100 µg/L d'uranium, ont montré de nombreuses altérations au niveau des branchies au niveau des lamelles primaires et secondaires : œdèmes (gonflement de

l'épithélium) et augmentation des cellules ainsi que des vaisseaux sanguins (**Adam, 2008**). La microscopie électronique couplée à une sonde EDAX a pu de plus mettre en évidence une micro localisation de précipité d'uranium dans les noyaux de cellules piliers.

### 3.3.2 Le foie

Plusieurs études ont montré que le foie était un organe cible de la toxicité de l'uranium chez les poissons comme chez le mammifère (**Maynard et al., 1953 ; Souidi et al., 2005 ; Barillet et al., 2007**). Cet organe a en effet un rôle clef dans la détoxification lors de contamination métallique des organismes. Ainsi, **Cooley et al. (2000)** ont pu observer des lésions hépatiques comme des nécroses chez le corégone *Coregonus clupeaformis* après exposition à l'uranium. La fréquence et la sévérité des lésions étaient directement corrélées à la concentration d'uranium dans la nourriture et la durée de l'exposition. De plus ils ont noté une réduction de l'index hépato-somatique chez les poissons les plus exposés, laissant penser à une toxicité hépatique chronique.

### 3.3.3 Les reins

Chez les mammifères, les reins constituent l'organe principal d'excrétion de l'uranium (**Hengé-Napoli et al., 2001**) et deviennent de part sa fixation dans cet organe, l'organe cible de la toxicité de l'uranium (**Hodge et al., 1973 ; Diamond et al., 1989 ; Kurttio et al., 2002**). Il semble que cet organe constitue une cible pour l'uranium chez le poisson au vu de la diversité des effets observés chez le corégone exposé *via* la nourriture : nécroses tubulaires, inflammations, hémorragies, lésions glomérulaires, altération des tubes proximaux (**Cooley et al., 2000**). De plus dans les tubules proximaux, ces effets sont apparus dépendants de la dose et du temps d'exposition.

### 3.3.4 Les muscles

Plusieurs études menées chez le poisson zèbre exposé à l'uranium pendant 20 jours à 100 µg/L ont montré des altérations des tissus musculaires (**Barillet, 2007 ; Lerebours et al., 2008**) : une augmentation de l'espace entre les myofibrilles, des enchevêtrements filamenteux, ainsi qu'une dilatation du réticulum endoplasmique.

### 3.3.5 L'appareil reproducteur

Ce paragraphe concerne les effets sur la reproduction en termes de fertilité (capacité à engendrer une descendance) et fait donc état des effets de l'uranium sur la formation des cellules sexuelles notamment et de l'histologie des gonades.

La majorité des travaux sur les effets de l'uranium a été réalisée chez les mammifères (rongeurs) *in vitro* et *in vivo* (**Domingo, 2001 ; Arfsten et al., 2001**) et plus particulièrement chez les organismes mâles. En effet, des altérations histologiques comme l'apparition de vacuolisation chez les cellules de Leydig (cellules de soutien dans les testicules responsables de la production d'hormones stéroïdes) ont été rapportées chez des souris mâles contaminées à l'uranium par l'eau de boisson à 0,42 mg U/ml (**Lloblet et al., 1991**). La production de cellules de Leydig altérées, peut alors engendrer une perturbation de la production d'hormones stéroïdes et se traduirait par un sperme de mauvaise qualité. De tels effets ont été constatés chez des rats mâles exposés à l'uranium par le biais d'implants sous-cutanés : effets sur la concentration ou la mobilité des spermatozoïdes (**Maynard et al., 1953**). Cependant des études plus récentes ne retrouvent pas ces effets et émettent l'hypothèse de différences de résultats liés aux doses d'exposition et mode d'exposition (**Arfsten et al., 2006**).

Les rares travaux sur les effets de l'uranium sur la reproduction chez les individus femelles on montré une forte toxicité (**Bosque et al., 1993**). Chez des femelles souris, il a été montré lors d'expositions à l'uranium par l'eau de boisson que l'ovulation en tant que telle n'était pas perturbée mais qu'en revanche il y avait une diminution de la qualité des ovocytes lors de l'ovogénèse, avec l'apparition d'altérations de l'espace péri-vitellin et la disparition du premier globule polaire (**Feugier et al., 2008**). D'autres travaux *in vitro* (**Arnault et al., 2008**) ont montré que l'uranium ralentissait significativement le processus de GVBD (germinal vesicle break down: rupture de la vésicule germinative qui correspond chez le mammifère à la première étape de reprise de méiose de l'ovocyte sous l'influence du pic pré-ovulatoire de l'hormone hypophysaire LH), et que l'uranium ralentissait aussi l'évolution vers la phase de métaphase II de la méiose. Ces auteurs évoquent les possibilités soit d'effets directs de l'uranium sur les organes soit indirects *via* des perturbations hormonales.

L'uranium a donc un fort effet reprotoxique chez les mammifères et se manifeste par un effet délétère sur les organes de la reproduction et une perturbation indirecte des activités hormonales, notamment l'activité oestrogéniques (**Raymond Whish et al., 2007**).

Chez les vertébrés aquatiques comme le poisson zèbre, les mâles exposés à l'uranium ont montré des altérations des cellules germinales (apparition de vacuoles dans les noyaux dans la tête des spermatozoïdes, irrégularité dans la forme des têtes spermatiques et apparition de cellules plus petites) (Adam *et al.*, 2008). De plus, l'étude des effets de différentes compositions isotopiques de l'uranium (uranium appauvri et  $^{233}\text{U}$ ) a permis d'observer, pour les cellules germinales mâles, des effets spécifiques en fonction de la radiotoxicité de l'uranium (i.e. pour les conditions avec une forte radiotoxicité, il y a une augmentation des dommages de type vacuoles dans les têtes spermatiques) (Adam *et al.*, 2008).

Cette radiosensibilité des cellules germinales a déjà été démontrée de nombreuses fois *in vivo* lors de l'exposition à divers radionucléides de différentes espèces de poisson (Egami et Hama-Furukawa, 1981 ; Hyodo-Taguchi *et al.*, 1982 ; Etoh et Hyodo-Taguchi, 1983 ; Rackham et Woodhead, 1984 ; Hyodo-Taguchi et Etoh, 1986 ; Tsyuko *et al.*, 2007), cette sensibilité pouvant conduire à une diminution des capacités de reproduction. Contrairement aux travaux sur l'uranium et les mammifères, ces derniers ont été pour la plupart réalisés sur des gonades en développement chez des poissons juvéniles pour étudier les effets sur la reproduction des futurs poissons adultes. Parmi ces travaux il a notamment été observé que les spermatogonies primaires étaient plus sensibles que les secondaires mais aussi que les cellules germinales femelles seraient moins sensibles que celles des mâles.

### 3.4 Effets de l'uranium sur l'individu

#### 3.4.1 Toxicité aiguë vs toxicité chronique

La majorité des travaux sur les effets de l'uranium chez les vertébrés aquatiques comme les poissons concernent des données acquises dans le cadre d'expositions aiguës à forte concentration en uranium et visant à déterminer des  $\text{CL}_{50}$  (concentration d'exposition qui entraîne 50 % de mortalité chez les organismes observés) (Tarzwell et Henderson, 1960 ; Davies, 1980 ; Parkhurst *et al.*, 1984 ; Bywater *et al.*, 1991 ; Holdway, 1992 ; Hamilton, 1995 ; Labrot *et al.*, 1996 ; Sheppard *et al.*, 2005). La  $\text{CL}_{50}$  à 96h varie de 0,7 mg U/L (Bywater *et al.*, 1991) à 135 mg U/L (Tarzwell et Henderson, 1960) en fonction des facteurs biotiques (espèces, stade de vie) et abiotiques (température, dureté, pH). L'influence de la dureté de l'eau d'exposition sur l'écotoxicité aiguë de l'uranium chez les poissons a notamment été résumée dans l'article de Sheppard *et al.* (2005).

La plupart de ces travaux se sont concentrés sur le stade adulte, mais quelques données montrent que les stades de vie plus précoces comme les œufs ou les larves pourraient montrer une sensibilité différente. En effet **Bywater et al. (1991)** ont montré que des juvéniles de gougeons mouchetés (*Morgunda morgunda*) âgés de 90 jours et exposés à l'uranium (sulfate d'uranyle) présentaient une  $CL_{50}$  plus élevées que des larves de gougeons âgées de 7 jours (respectivement  $CL_{50} = 1,46 [1,12 - 1,90]$  et  $1,11 [0,83 - 1,45]$  mg U/L). La gamme de concentration testée (0,5 à 8 mg/L), était cependant relativement élevée. Les travaux de **Holdway (1992)** montrent également que des larves plus âgées sont significativement deux fois plus tolérantes à une exposition à l'uranium que des larves fraîchement écloses. L'étude d'**Hamilton (1995)** n'a pas montré de différence de  $CL_{50}$  à 96 h entre trois espèces de poisson (*Ptychocheilus lucius*, *Xyrochen texanus* et *Gila elegans*) et pour trois stades de vie différents (larves fraîchement écloses, et deux stades juvéniles).

### 3.4.2 Effets sur les traits d'histoire de vie

En dehors des études rapportant les domaines de concentrations létales dans le cas d'expositions aiguës à l'uranium, peu de travaux concernent les effets de l'exposition d'organismes aquatiques à l'uranium dans des conditions sublétales (faible concentration d'exposition) pour mettre en évidence des effets concernant l'individu et ses traits d'histoire de vie majeurs.

Or l'étude des traits d'histoire de vie d'un individu, et des potentielles perturbations des phases critiques de son cycle du vie paraissent essentielles pour comprendre et analyser la perturbation à l'échelle de la population (**Barnthouse et al., 1990; Woodhead, 2003**).

#### 3.4.2.1 Survie et croissance des stades de vie précoces

Pour les effets d'exposition directe des stades de vie précoces, les seuls travaux à notre connaissance visant l'étude des critères d'effets sublétaux chez des poissons exposés à l'uranium sont ceux de **Pyle et al. (2002) et Holdway (1992)**. **Pyle et al. (2002)** ont étudié la croissance des larves ou l'éclosion des œufs de tête de boule *Pimephales promelas* exposés à un cocktail d'éléments comprenant de l'uranium, issu de sites proches d'une mine uranifère. Ces auteurs n'ont pas pu mettre en évidence une relation entre l'exposition et les effets. En revanche les travaux de **Holdway (1992)** ont montré que des larves plus âgées sont

significativement deux fois plus tolérantes à une exposition à l'uranium que des larves fraîchement écloses.

Il a été suggéré dans le cas des œufs de poissons, la concentration en radionucléides dans l'œuf ou à sa surface peut entraîner pour l'embryon en cours de développement, l'exposition à une dose plus forte que celle provenant du milieu uniquement. De plus, de nombreuses études ont montré la sensibilité des stades de vie précoces lors d'expositions à des métaux, notamment le cadmium (**Eaton et al., 1978 ; Shazili et Pascoe, 1986 ; Fraysse et al., 2006**).

Chez les mammifères, il a été montré que l'uranium pouvait affecter le développement des embryons (**Pellmar et al., 1999**). Un retard dans le développement embryonnaire de souris a été observé lors de cultures en présence d'uranium avant implantation (**Kundt et al., 2000**).

#### 3.4.2.2 Reproduction des stades adultes matures

A l'échelle de l'individu adulte, la reproduction qui peut être affectée en termes de fécondité ou fertilité est l'ensemble des processus par lesquels l'espèce va se perpétuer, en formant de nouveaux individus. C'est une des étapes fondamentales du cycle de vie de l'espèce pour son bon fonctionnement.

Les effets de l'uranium sur la fertilité des organismes ont été étudiés dans les paragraphes précédents (§ 3.3.5), le paragraphe suivant traitera plus particulièrement des effets sur la fécondité. La fécondité fait généralement référence à la descendance engendrée par les organismes, leur développement et leur survie. Les effets de l'uranium sur la fécondité n'ont été étudiés que récemment et à notre connaissance seulement sur des mammifères lors d'expositions *in vivo* ou *in vitro* (**Domingo, 2001 ; Arfsten et al., 2001, 2006 ; Zhu et al., ; Paternain et al., 1989 ; Hindin et al., 2005**) et *in vivo* sur des micro-crustacés comme la daphnie (**Poston et al., 1984 ; Semaan et al., 2001 ; Antunes et al., 2007 ; Zeman et al., 2008**). Aucune étude n'a été faite sur des vertébrés aquatiques comme les poissons.

Ainsi les effets sur la descendance d'animaux exposés à l'uranium appauvri ont été étudiés sur des femelles rats gestantes dans lesquelles des fragments d'uranium avaient été implantés. Pour une exposition durant tout le temps de la gestation, il a été montré que l'uranium pouvait franchir la barrière placentaire (**Pellmar et al., 1999**). Des effets tératogènes ont été observés chez la descendance de rates contaminées par ingestion pendant la durée de la gestation (**Domingo et al., 1989a**).

---

Pour la plus forte dose testée, une mortalité embryonnaire a été observée. En dessous de cette dose, la toxicité fœtale s'est traduite par une diminution du poids et de la taille du fœtus associée à des malformations et des perturbations dans les différents stades de développement. Ces mêmes auteurs ont pu également observer lors de gavage des femelles gestantes que la taille des portées diminuait ainsi que leur viabilité (**Domingo et al., 1989b**). **Paternain et al.(1989)** ont pu évaluer les effets sur la survie postnatale chez la souris après une contamination chronique via l'eau de boisson jusqu'au sevrage des portées. Ils ont montré que pour les doses élevées, le nombre de fœtus vivants, la croissance et le développement des nouveau-nés et leur survie avaient été considérablement affectés.

D'autres travaux plus récents montrent de plus des anomalies du squelette chez les fœtus de rats issus de la reproduction d'adultes mâles exposés à de l'uranium enrichi par des injections dans les testicules (**Zhu et al., 1994**).

### 3.5 Effets à l'échelle de la population

La plupart des travaux de recherche concernant les effets des rayonnements ionisants sur les écosystèmes aquatiques se sont focalisés sur l'impact au niveau des individus (en raison principalement de la plus grande simplicité de l'approche expérimentale). Il n'existe donc pas d'approche, à notre connaissance, concernant les niveaux d'organisation supérieure comme la population chez les poissons (**AIEA, 1992 ; UNSCEAR, 2000**). Afin de relier le niveau de l'individu et de la population, l'approche la plus utilisée consiste à intégrer les données sur les effets de survie, reproduction et croissance dans des modèles de dynamiques de population.



#### **4. Synthèse de l'étude bibliographique**

Nous avons pu voir que l'uranium est naturellement présent dans l'environnement mais que sa distribution dans les différents compartiments environnementaux peut être influencée par les activités anthropiques. De ce fait certaines zones géographiques (site d'exploitation minier notamment) peuvent présenter des concentrations très élevées allant jusqu'à quelques mg /L dans les systèmes aquatiques.

L'étude des effets biologiques de l'uranium révèle qu'il a une toxicité pouvant s'exprimer à différents niveaux d'organisation biologique : depuis les interactions moléculaires, et les altérations histologiques, jusqu'aux effets sur certaines grandes fonctions physiologiques comme la reproduction. De ce fait l'uranium constitue un risque pour la biocénose aquatique. Cependant la majorité des données présentées est relative à des travaux menés sur mammifères notamment les rongeurs. En effet les effets biologiques de l'uranium sur les organismes aquatiques comme les poissons pourtant souvent représentatifs de la qualité du milieu ont été beaucoup moins abordés.


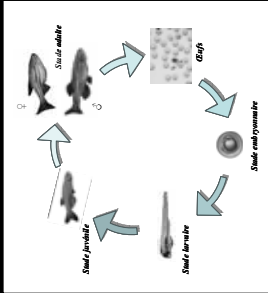

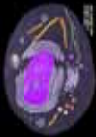
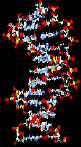
Niveau de complexité		Les effets	Références citées dans l'étude bibliographique	Nombre
Population				0
Individu		Trait d'histoire de vie Effets tératogènes Effets reprotoxiques	Pyle et al. (2002); Bywater et al., 1991	2
		Effets létaux	Tarzwel et Henderson, 1960 ; Davies, 1980 ; Parkhurst et al., 1984 ; Bywater et al., 1991 ; Holdway, 1992 ; Hamilton, 1995 ; Labrot et al., 1996 ; Sheppard et al., 2005	8
Tissu, organe		Bioaccumulation Histopathologie	Swanson, 1983; Poston, 1982; Ribera, 1996; Waite et al., 1988,1990 ; Clulow et al., 1998; Cooley et Klaverklamp, 2000 ; Kovalsky et al., 1967 ; Barillet et al., 2007; Lerebours et al., 2008; Parkurst et al., 1984 ; Labrot et al., 1999	11
Cellule		Stress oxydant Neurotoxicité	Lerebours et al., 2008; Barillet et al., 2005; Buet et al., 2005; Cooley et al., 2000; Ribera et al., 1996	5
Molécule		Protéotoxicité Génotoxicité	Barillet et al., 2005 Theodorakis et al., 1997, 1999 ; Theodorakis et Shugart, 1998; Buet et al., 2005 Labrot et al., 1996	6

Figure 4 : Récapitulatif des données bibliographiques relatives à des organismes aquatiques lors d'exposition à l'uranium.

De plus, concernant les poissons, tous les niveaux d'intégration biologique ne sont pas traités avec la même ampleur (Figure 4). Alors que la majorité des travaux s'intéresse à des échelles moléculaires, cellulaires et parfois tissulaires, très peu sont réalisés sur les principaux traits d'histoire de vie des organismes.

Le lien semble également difficile à établir entre les effets subcellulaires, cellulaires, et tissulaires et les conséquences sur les traits d'histoire de vie et les processus clefs pour le maintien des populations, comme la reproduction. Cette synthèse bibliographique montre donc l'intérêt de l'étude en parallèle de critères d'effets à différents niveaux d'intégration biologique afin de mieux appréhender les effets éventuels sur la population mais aussi de prendre en compte la sensibilité des différents stades de vie des organismes. Il s'agit donc de cibler des effets ayant un lien à chaque niveau d'organisation biologique : l'ADN pour la transmission du patrimoine génétique aux descendants, des biomarqueurs protéiques impliqués dans les mécanismes de la reproduction comme la vitellogénine, l'histopathologie des tissus d'intérêt majeurs à la reproduction, notamment les gonades et enfin les effets macroscopiques comme la reproduction, la survie et le développement de nouvelles générations.

D'autre part, il est apparu tout au long de cette partie bibliographique que les effets liés à la chimiotoxicité et/ou à la radiotoxicité de l'uranium avaient très peu été étudiés.

---

## **Chapitre 2. Démarche expérimentale**

### ***Plan détaillé***

1. Rappel des objectifs
2. Le modèle biologique de notre étude
  - 2.1 Choix du modèle biologique
  - 2.2 Descriptif
    - 2.2.1 Phylogénie
    - 2.2.2 Origine
    - 2.2.3 Biotope
    - 2.2.4 Anatomie et biologie
    - 2.2.5 Cycle de vie et reproduction
  - 2.3 Les tests normalisés
3. Choix des expositions
4. Les paramètres biologiques de l'étude
  - 4.1 Stades et traits d'histoire de vie étudiés
  - 4.2 Mesures de concentrations interne et dosimétrie
  - 4.3 Critères d'effets à une échelle subcellulaire et tissulaire
    - 4.3.1 Mesure de génotoxicité
    - 4.3.2 Histopathologie
    - 4.3.3 Biomarqueur de la reproduction



*Pour l'évaluation des effets des polluants dans l'environnement aquatique, les poissons sont des organismes très utilisés compte-tenu de leur position élevée dans la chaîne trophique, ce qui en fait de bons intégrateurs de la qualité de leur environnement.*

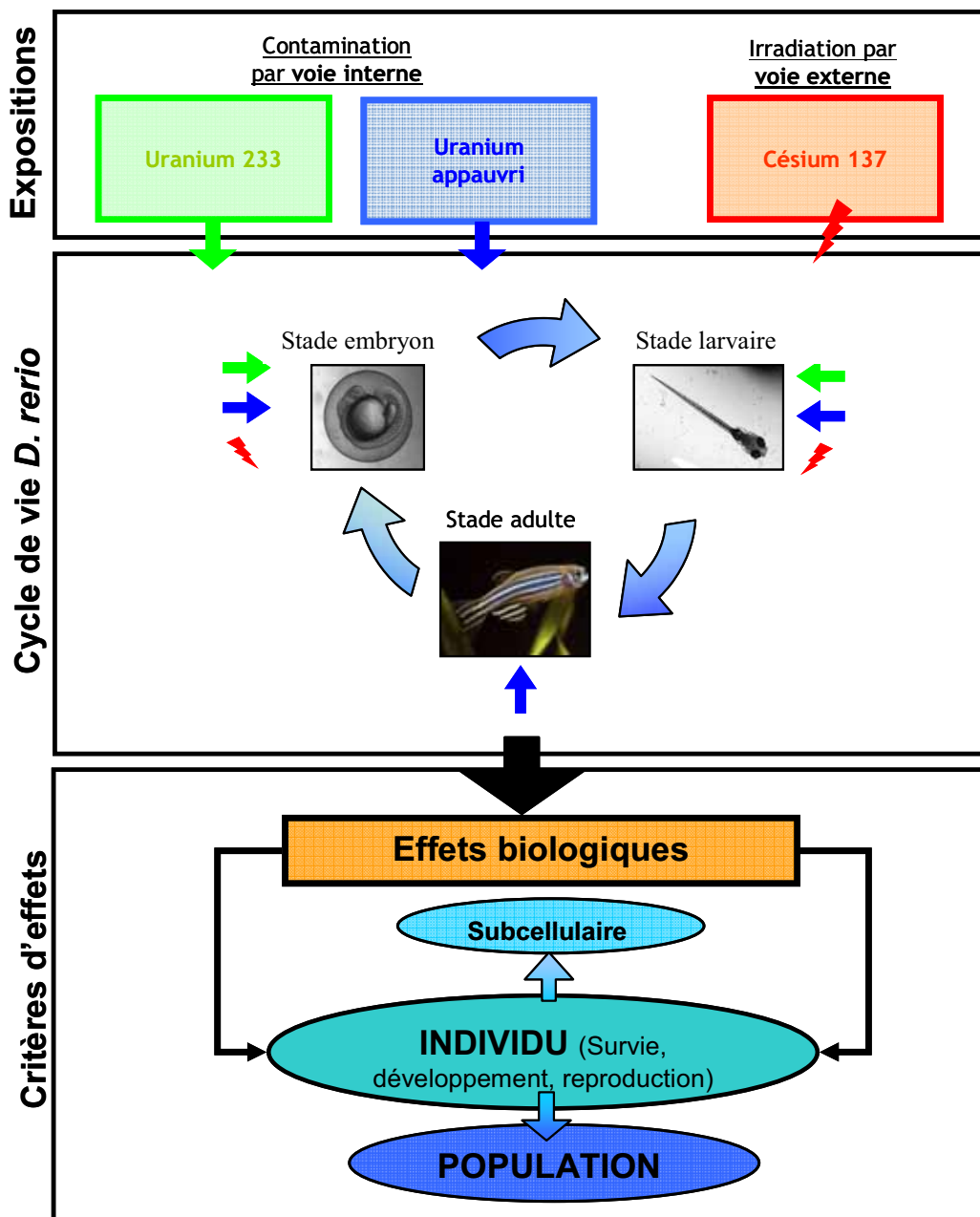


Figure 5 : Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale de l'étude.



## **1. Rappel des objectifs**

Dans le cadre de ce travail de thèse, l'objectif général est de mieux comprendre les effets de l'uranium sur le cycle de vie d'une espèce de vertébré représentative de la colonne d'eau douce.

Dans un premier temps, l'accent a été porté sur l'étude des différences de sensibilité entre les stades de vie majeurs du cycle.

Dans un second temps ces effets à l'échelle de l'individu ont été reliés à des effets observés à une échelle subcellulaire ciblés afin d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de toxicité de l'uranium en lien avec la reproduction.

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés aux effets liés à la chimio et à la radiotoxicité de l'uranium en utilisant d'autres éléments radioactifs (uranium 233 et césium 137).

La figure 5 résume la démarche expérimentale de la thèse.



**Figure 6 :** *Danio rerio*.

<i>Phylum</i>	Poissons ou chordés
<i>Super Classe</i>	Osseux ou Ostéichthyens
<i>Classe</i>	Actynoptérygiens
<i>Super ordre</i>	Téléostéens
<i>Ordre</i>	Cypriniformes
<i>Famille</i>	Cyprinidés
<i>Genre</i>	Danio
<i>Espèce</i>	rerio

**Tableau 7 :** Phylogénie de *Danio rerio*

## 2. Le modèle biologique de notre étude

### 2.1 Choix du modèle biologique

Le poisson zèbre *Danio rerio* (figure 6) a été choisi comme organisme représentatif des vertébrés de la colonne d'eau douce. C'est un modèle biologique de référence, recommandé par de nombreuses normes internationales (ISO, 1996 a,b,c ,1998, 2003 ; OCDEa,b,c,d,e, 2004 ; U.S. EPA, 2002, 2003) pour l'évaluation de potentiels effets toxiques des substances chimiques. En effet, ce poisson s'élève facilement en laboratoire (Laale, 1977 ; Lawrence, 2007) et de surcroît possède de nombreuses caractéristiques favorisant son utilisation expérimentale : cycle de vie court, petite taille, croissance rapide, précocité de maturité sexuelle, développement externe des œufs (espèce ovipare) et enveloppe des œufs transparente (Westerfield, 1995). Ces critères sont essentiels pour étudier les réponses biologiques de différents stades de vie de l'organisme et font de ce modèle le plus pertinent pour notre étude. Il est également utilisé dans divers domaines de recherche comme la génétique et le développement (le génome est entièrement séquencé), la connaissance du système nerveux, la lutte contre le cancer, ainsi qu'en écotoxicologie aquatique (Amatruda *et al.*, 2002 ; Keller and Murtha 2004).

### 2.2 Descriptif

#### 2.2.1 Phylogénie

*Danio rerio* fait partie de la famille des Cyprinidés. La taxinomie détaillée dans le tableau 7 a été proposée par Buchanan-Hamilton (1822) et plus récemment par Gilles *et al.* (2001).

#### 2.2.2 Origine

*Danio rerio*, également appelé poisson zèbre (zebrafish) est originaire de l'Inde de l'Est et de la péninsule Malaise. Il a été importé au début des années 1900 et fait maintenant partie intégrante des espèces qu'on retrouve le plus souvent en aquariophilie et élevage pour la recherche (Laale 1977, Spence, 2008).



Figure 7 : Mâle et femelle de poisson zèbre *Danio rerio*.

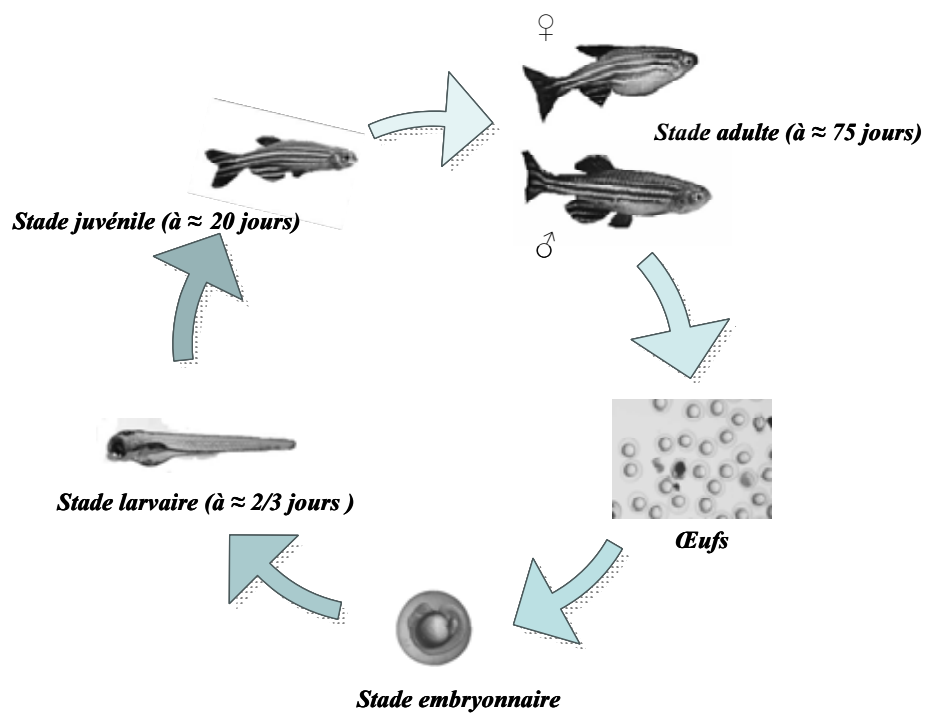


Figure 8 : Cycle de vie de *Danio rerio* (temps pour atteindre le stade).

### 2.2.3 Biotope

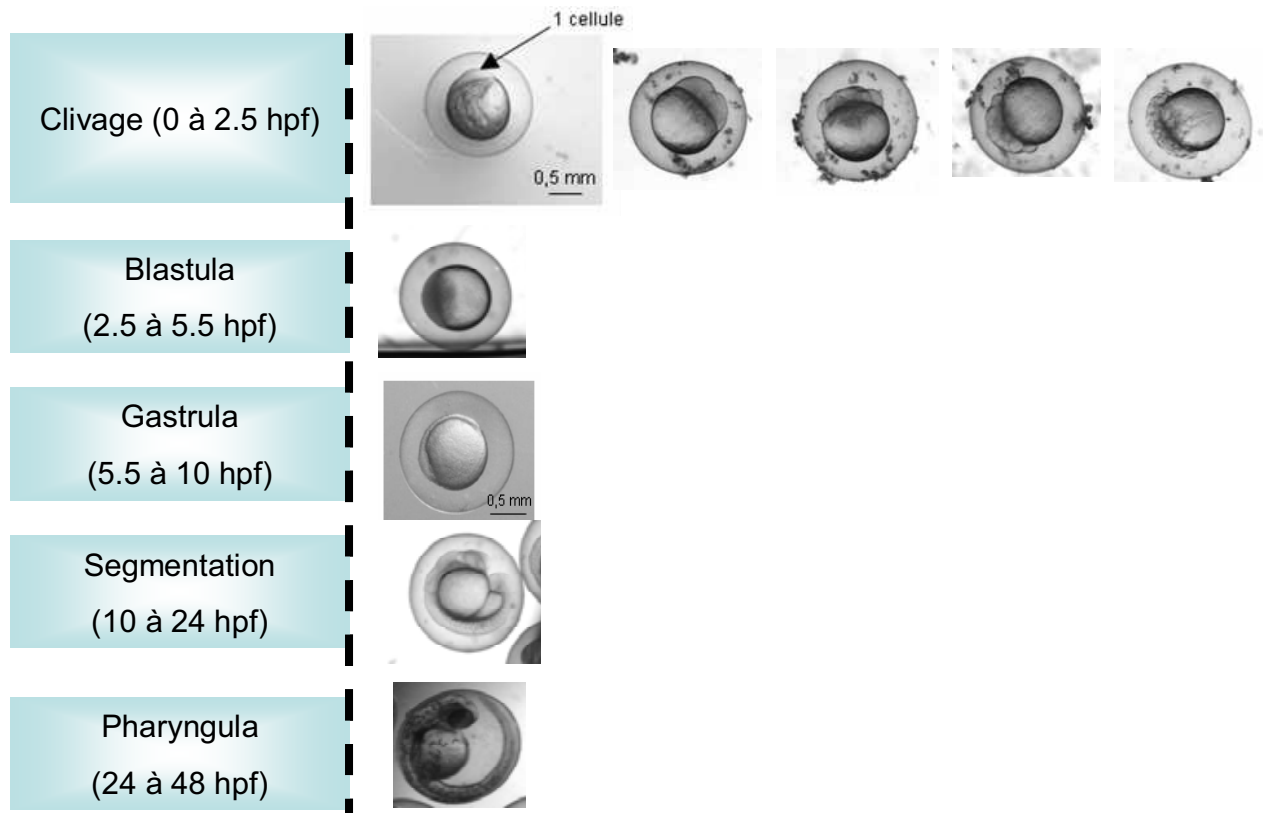
Il peuple généralement les cours d'eau rapides et peu profonds, parfois les rivières à courant lent et les étangs. Son adaptation thermique est importante puisqu'il peut supporter des températures allant de 10 à 40°C. Les eaux dans lesquelles il vit sont généralement dures et pauvres en matière organique (**Spence et al., 2006**). Il peut également supporter de larges gammes de pH (6,5 à 8) et de dureté de l'eau (jusqu'à 300 mg de carbonates de calcium/L). Récemment des travaux sur le comportement ont montré que c'est un poisson qui vit en petit banc.

### 2.2.4 Anatomie et biologie

Le poisson zèbre dépasse rarement 40 mm de longueur standard. Son corps est fusiforme et latéralement comprimé avec une bouche oblique dirigée vers le haut du fait de sa mâchoire inférieure proéminente. Du fait de cette caractéristique biologique, son alimentation naturelle est constituée de proies en surface de l'eau (insectes). En laboratoire, toute nourriture sèche en surface est acceptée ainsi que la distribution de proies vivantes dans la colonne d'eau comme *Daphnia magna*. Il possède plusieurs paires de barbillons (organes tactiles). Le corps est jaune et possède cinq à sept bandes longitudinales bleu foncé. La nageoire anale est pareillement rayée, alors que la dorsale a le bord supérieur bleu-foncé, bordé de blanc. Les opercules sont bleutés avec des tâches dorées. Les mâles et les femelles (Figure 7) ont des couleurs relativement semblables bien que les mâles aient une nageoire anale légèrement plus grande et de couleur jaune. Ils sont différenciables par la présence chez la femelle d'une papille urogénitale entre les nageoires pelviennes et la nageoire anale. La femelle peut également présenter un abdomen plus bombé ((**Laale, 1977 ; Barman, 1991 ; Spence et al., 2008**)).

### 2.2.5 Cycle de vie et reproduction

*Danio rerio* est une espèce ovipare. Son cycle de vie est très court (Figure 8). La maturité sexuelle est atteinte approximativement à 75 jours (**Eaton et Farley, 1974**) en conditions de laboratoire.



**Figure 9** : Etapes du développement embryonnaire de *Danio rerio* (hpf heure post fertilisation).

Les mécanismes génétiques à l'origine de la différenciation sexuelle chez le *Danio rerio* sont inconnus. Les gonades sont à l'origine des ovaires chez tous les individus et chez les futurs mâles la différenciation en testicules débute entre 5 et 7 semaines (Spence *et al.*, 2008).

Une fois la maturité sexuelle atteinte, une femelle peut pondre de 1 à 700 œufs en une ponte, mais le nombre quotidien d'œufs est de  $103 \pm 140$  d'après les travaux de Spence et Smith (2006) lors d'un suivi de douze jours de tests de reproduction en laboratoire. L'intervalle de ponte varie de 1 à 6 jours et est en moyenne de 1,5 jour, cet intervalle augmentant avec l'âge. En conditions naturelles, le poisson zèbre a une reproduction saisonnière dépendant des pluies et des apports en ressources alimentaires dans le milieu. Sa reproduction ou fraie en laboratoire, peut être déclenchée par différents facteurs comme la lumière, une augmentation de température, ou encore un choc osmotique ou pH (Westerfield, 1995). L'ovulation dépend ensuite de l'exposition des femelles aux phéromones mâles et de la même façon l'exposition des mâles aux phéromones femelles lors de l'ovulation déclenche le comportement de fraie (Van den Hurk and Lambert, 1983).

Après fertilisation des œufs, le développement embryonnaire est très rapide et se définit en plusieurs phases (Figure 9) :

- Après la fertilisation de l'œuf, les mouvements cellulaires sont activés et le cytoplasme migre vers le pôle animal. Trois quarts d'heure après la fertilisation, la période de division commence. Seul le dôme du blastoderme entre en division. L'œuf passe de 2 à 64 cellules par des divisions rapides et synchrones. C'est la période de clivage cellulaire.
- La période de blastula commence à 2,5 hpf (Heure Post Fertilisation), l'embryon est alors constitué de 128 cellules. Le dôme de cellules de blastoderme occupe la moitié de la hauteur du sac vitellin. La division du blastoderme continue, jusqu'à former plus de 1000 cellules. La blastula change ensuite de forme. Dans un premier temps, elle s'allonge, puis l'axe pôle animal-pôle végétal se raccourcit, elle retrouve alors une forme sphérique. A ce stade, des cellules du sac vitellin (I-YSL) s'enfoncent dans le blastoderme en direction du pôle animal et forment un dôme. A la fin de la période de la blastula, le blastoderme recouvre la cellule vitelline sur 30% de son diamètre.

- Lorsqu'il la recouvre à 50%, à 5,5 hpf, il s'agit de la période de la gastrula. Cette période est marquée par le début des mouvements morphogénétiques d'involution, d'extension, et par le développement de l'orientation de l'axe dorso-ventral. On peut distinguer, du pôle animal, un anneau de blastoderme d'épaisseur uniforme. Puis le bouclier embryonnaire apparaît. Les cellules du pôle animal donnant les structures de la tête, on peut alors déterminer les axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Les rudiments de la queue, du tube neural et du cerveau sont visibles en fin du stade.
  
- La période de la segmentation a lieu à partir 10 hpf. Les somites, les arcs pharyngés primordiaux et les neuromères se développent. Les premiers mouvements apparaissent. La queue se détache au fur et à mesure et croît.
  
- La période de la pharyngula à partir de 24 hpf est marquée par le début de la pigmentation de la rétine et de la peau. La circulation du sang se met en place : le coeur commence à battre et on peut voir des cellules sanguines en mouvement. Des contractions musculaires brusques sont très fréquentes. Les nageoires pectorales commencent à se développer.

La période de l'éclosion commence à 48 hpf. Elle est constituée de trois stades : “ long pec ” (48 hpf), “ pec fin ” (60 hpf), et “ protruding mouth ” (72 hpf). Pendant cette période, la fin de la morphogénèse des organes primaires a lieu. Les cartilages de la tête et des nageoires pectorales se développent. La nageoire pectorale s'allonge postérieurement et commence à recouvrir le sac vitellin. La pigmentation est très importante, les bandes dorsales et ventrales se rencontrent au niveau de la queue. Les mouvements spontanés disparaissent. La bouche est grande ouverte mais pas béante. Elle se situe en dessous de la limite antérieure des yeux. Le coeur bat très fort et est plein de sang circulant. Trois jours après l'éclosion, la larve a pratiquement achevé sa morphogénèse et elle continue à grandir grâce à sa réserve vitelline. Il y a un accroissement de la vessie natatoire et la bouche sort de plus en plus vers l'avant dans l'axe antéro-dorsal. Certaines bandes de pigments s'assombrissent pendant que d'autres s'éclaircissent. La larve commence à nager activement et bouge ses mâchoires, ses nageoires pectorales et ses yeux. Ces développements permettent des réponses rapides à des stimuli par la fuite, et annoncent la respiration, la recherche de proies et l'alimentation ( $\approx$  5 jours).



### 2.3 Les tests de toxicité normalisés

Des approches expérimentales spécifiques ont été mises en place afin d'évaluer la potentielle toxicité des polluants sur les différents stades de vie du cycle du poisson zèbre.

Le test « embryon », (**ISO 12890, 2003 ; OCDEd, 2004**) basé sur le développement embryonnaire, s'appuie sur des descriptifs du développement très précis et largement validé aujourd'hui (**Kimmel *et al.*, 1995; Kimmel *et al.*, 2001; Nagel, 2002; Spitsenbergen et Kent 2003 ; Hill *et al.*, 2005**). Le test « stade de vie précoce » basé sur l'expérimentation des stades embryonnaire, pro-larvaire, larvaire et juvénile (**OCDEe, 2004**). La durée de ces tests diffère selon les normes (48h à 32 jours) et est de plus en plus réduite au stade embryon (48h) dans les normes les plus récentes (**DIN 38415-T6, 2002**).

Les tests sur le stade adulte le plus souvent utilisés sont ceux qui permettent d'évaluer la toxicité aiguë des substances (**ISO 7346-1,2,3, 1996**). Cependant il existe des tests qui permettent d'étudier des effets sublétaux de la fertilisation des œufs de la génération F0, suivie de leur maturité sexuelle, puis l'investigation de la reproduction de la génération F0 et du développement de la génération F1, depuis la fertilisation des œufs jusqu'aux juvéniles (durée totale du test 4 à 5 mois) (**Nagel, 1994**).

### 3. Choix des expositions

Pour l'exposition à l'uranium, la voie retenue a été la voie de contamination directe (par la colonne d'eau). En effet, bien que pour de nombreux métaux la voie trophique semble être la voie majeure de contamination, on a pu voir dans l'étude bibliographique que dans le cas de l'uranium, le facteur de transfert trophique était relativement faible. Cette voie de contamination n'a donc pas été choisie. La voie d'exposition directe a été retenue afin de se placer dans les conditions les plus favorables à la biodisponibilité de l'uranium afin d'augmenter la probabilité d'apparition d'effets.

La gamme de concentrations testée varie de 20 à 500 µg/L pour le stade embryonnaire et a été restreinte à deux concentrations pour les stades de vie suivants. Cette gamme de concentrations a été choisie d'une part pour être représentative de concentrations

environnementales simulant une exposition chronique faible dose et d'autre part sur la base des données obtenues lors de travaux précédents réalisés au laboratoire. La concentration maximale testée de 500 µg/L a été fixée par la limite de solubilité de l'uranium dans notre eau d'exposition.

Dans l'objectif de mettre en évidence la part des effets liés à la chimiotoxicité et radiotoxicité de l'uranium, des expositions similaires ont été conduites avec l'isotope 233 de l'uranium. En effet, on a pu le voir dans le chapitre précédent, l'uranium 233 est un isotope ayant une activité radiologique 14 000 fois plus forte que l'uranium appauvri. Sachant que les isotopes de l'uranium ont le même comportement de bioaccumulation dans l'organisme, les éventuelles différences d'effets observés entre les deux types d'expositions à l'uranium peuvent être ainsi attribuées à la part de radiotoxicité s'ils n'apparaissent que dans les expériences avec l'uranium 233.

Toujours dans le même objectif d'identifier des effets spécifiques de la radiotoxicité de l'uranium, des expositions à une irradiation  $\gamma$  externe ont été mises en place. En effet, on a pu voir dans la bibliographie que la majorité des données d'effets biologiques des rayonnements ionisants chez les poissons était relative à des expositions à une irradiation externe. Ainsi les effets résultants de cette exposition pourront être considérés comme témoin positif des effets radiologiques. La gamme de débit de dose utilisée a été fixée de manière à encadrer la valeur limite guide de 10 mGy/j de l'AIEA (valeur qui aujourd'hui tend plutôt vers 10 µGy/h).

## **4. Les paramètres biologiques de l'étude**

### **4.1 Stades et traits d'histoire de vie étudiés**

Pour l'évaluation des effets des radionucléides sur le cycle de vie du poisson, ces travaux impliquent de posséder les connaissances adéquates et de maîtriser les outils concernant chaque stade de vie du poisson zèbre. Ainsi, il a été nécessaire de développer au laboratoire un élevage, où la maîtrise de la reproduction permettait d'obtenir des organismes au stade de vie souhaité pour les expérimentations. Même si la maîtrise du cycle de vie complet n'est pas aisée, les expérimentations ont pu être menées sur 3 stades de vie du poisson zèbre. Le stade juvénile n'a pas été expérimenté dans cette thèse pour une question de temps d'expérience

long (3 mois pour atteindre l'âge adulte) et de difficultés à maintenir les juvéniles dans les conditions d'élevage.

Chacun des 3 stades suivants ont donc été choisis comme représentant un trait d'histoire de vie essentiel pour le bon déroulement du cycle de vie du poisson :

- Stade embryonnaire (0-48/72h) : pour l'évaluation des effets sur la survie des œufs (critères du développement embryonnaire, battement cardiaque, éclosion),
- Stade pro larvaire (72h à 15 jours) : pour l'évaluation des effets sur la croissance et survie,
- Stade adulte mature : pour l'évaluation des effets sur la reproduction (succès reproducteur et suivi des générations F1).

Ces trois stades ont donc été exposés à l'uranium appauvri. Pour les expositions à une irradiation  $\gamma$  externe, l'exposition d'adulte n'a pu être réalisée car à l'heure actuelle le dispositif expérimental ne permet pas l'utilisation d'unités expérimentales de grande taille dans les irradiateurs. L'exposition à l'uranium 233 a aussi été réalisée uniquement sur les stades de vie précoces pour des raisons de quantité maximale d'isotope autorisée en zone surveillée lors des expérimentations, limitant l'utilisation de volumes d'eau importants, comme cela peut être le cas pour des organismes adultes.

#### 4.2 Mesures de concentrations interne et dosimétrie

Des mesures de concentration en uranium permettent de rendre compte de l'entrée effective de l'uranium dans l'organisme : à l'état d'embryon dans l'œuf, de larve, et d'adulte, ainsi que d'un potentiel transfert de l'uranium entre les stades de vie (transfert parental) mais également de caractériser l'intensité des effets de l'exposition des poissons. Ces résultats de bioaccumulation sont dans un second temps indispensable pour calculer le débit de dose radiologique (Gy/j) et permettre la comparaison des différentes expositions (uranium appauvri, uranium 233 et irradiation  $\gamma$  externe).

### 4.3 Critères d'effets à une échelle subcellulaire et tissulaire

Afin d'étudier les effets sur ces différents stades de vie, de pouvoir apprécier leur sensibilité et relier les différents effets pour éventuellement discuter de l'impact sur les populations, des critères d'effets à une échelle subcellulaire ont été choisis.

#### 4.3.1 Mesure de génotoxicité

L'étude de la génotoxicité intéresse de plus en plus la communauté scientifique travaillant dans le domaine de l'écotoxicologie. Ce paramètre a été étudié dans le cadre de cette thèse dans le but d'identifier des indicateurs précoces des effets sur la reproduction et le développement.

Parmi les tests de génotoxicité les plus utilisés, on retrouve :

- le test des comètes : test permettant la caractérisation des lésions primaires de l'ADN (cassures simple et double brin, ainsi que sites alcali-labiles) par une technique d'électrophorèse sur gel (**Singh *et al.*, 1988**).

- le test d'Ames : test de mutagenicité se basant sur l'utilisation de différentes souches bactériennes de *Salmonella typhimurium* portant des mutations dans les gènes nécessaires à la synthèse de d'histidine, qui permet d'évaluer la capacité que possède une substance à induire une réversion de cette mutation.

- le test micronoyaux : test de cytogénicité basé sur le dénombrement de fragments chromatidiques exclus du noyau (**Fernandez *et al.*, 1993**).

- la cytométrie de flux : cette technique, basée sur la mesure de la fluorescence émise par un fluorochrome se complexant avec l'ADN, permet de détecter les changements de la quantité d'ADN nucléaire (**Lingenfelser *et al.*, 1997ab**).

- la méthode des microsatellites : les séquences d'ADN répétées en tandem (microsatellites, minisatellites et ESTRs) sont des régions du génome connues pour être

instables et majoritairement non-codantes. Leur taux de mutations élevé en a fait un outil de choix pour l'étude des événements mutagènes (**Tsyusko et al., 2007**).

La réalisation du test des comètes est relativement simple, ne requiert pas un investissement financier important, et utilise peu de matériel biologique. Ce test très sensible s'applique à n'importe quel type de cellules isolées: cellules en culture, cellules provenant de tissus dissociés, prélèvements sanguins, etc. De plus parmi les techniques citées ci-dessus, l'essai des comètes est celle qui permet le plus facilement d'estimer la génotoxicité dans des cellules germinales. A ce titre, **Jha (2008)** montre l'intérêt d'utiliser les tests de génotoxicité pour mettre en évidence des conséquences potentielles sur du court ou long terme pour la survie des espèces.

L'ensemble des résultats obtenus avec la méthode des tests des comètes indique que c'est une méthode sensible pour l'étude de la génotoxicité des radionucléides dans un contexte d'exposition chronique faible dose (**Adam et al., 2007**).

► Dans le cadre de cette thèse, il est apparu essentiel de mesurer l'éventuelle génotoxicité dans les cellules germinales femelles et mâles des poissons après exposition à l'uranium appauvri. Ces mesures ont alors été réalisées à l'aide du test des comètes déjà mis en place au laboratoire. Le test des comètes a également été réalisé sur des embryons exposés après dissociation cellulaire (technique mise en place au laboratoire lors du stage de Master II de **Massarin, 2006**).

#### 4.3.2 Histopathologie

Les gonades font partie des organes d'intérêt pour la reproduction et les travaux précédents ont de plus montré qu'elles pouvaient accumuler de l'uranium. Chez les mammifères, il a même été suggéré que les tissus étaient endommagés. L'histologie faisant partie des outils adéquats pour évaluer une reprotoxicité (**Van der Ven et al., 2003**), ces tissus ont été ciblés pour une étude histologique en microscopie optique et électronique.

#### 4.3.3 Biomarqueur de la reproduction

Les biomarqueurs de la reproduction ont principalement été développés dans les travaux visant à étudier les effets de perturbations endocriniennes chez les poissons. Parmi ces

biomarqueurs, l'induction de la protéine vitellogénine (Vtg) (glycolipophosphoprotéine homodimérique) semble être caractéristique chez les poissons mâles d'une exposition à un œstrogène-mimétiques ou xéno-œstrogènes.

L'expression du gène de la Vtg est sous contrôle hormonal. L'hormone de croissance (GH), la prolactine (Prl) et des hormones thyroïdiennes ont un effet stimulateur, mais le contrôle dominant est réalisé par les oestrogènes, en particulier par le 17- $\beta$  oestradiol (**Arukwe *et al.*, 2003**).

Cette protéine est normalement synthétisée dans le foie des femelles durant la phase de vitellogénèse et est transportée par les voies sanguines jusqu'aux ovaires pour y être incorporée dans les ovocytes en croissance. Chez la femelle mature en phase d'ovogenèse, la concentration de Vtg plasmatique augmente alors de manière très importante, jusqu'à plusieurs centaines de milligrammes par litre de plasma. Elle constitue le précurseur majeur des réserves nutritives incorporées dans l'œuf pour le développement du futur embryon. La Vtg contient de fortes proportions de lipides (environ 20 %), de phosphore (0,6%) et de calcium (0,6%).

Chez les mâles et les juvéniles, les concentrations d'oestrogènes ne sont, normalement, pas assez importantes pour induire une synthèse de Vtg significative.

Le dosage de la Vtg, chez mâles et femelles permet de donner des informations sur le stade de maturité sexuelle des femelles d'une part mais aussi sur la potentielle reprotoxicité de l'uranium comme cela a été vu chez les rats (**Raymond-Which *et al.*, 2007**).

## *Partie 2*





*Cette partie sera consacrée à l'étude expérimentale, incluant dans un premier chapitre le matériel et méthodes suivies d'un chapitre comprenant les principaux résultats agrémentés de premiers points de discussion.*



# Chapitre 1. Matériels et méthodes

## Plan détaillé

### Introduction

1. Matériel biologique
  - 1.1 Origine et maintien des organismes adultes au laboratoire
  - 1.2 Obtention des œufs de *Danio rerio*
2. Etude des effets de l'uranium
  - 2.1 Exposition à l'uranium
    - 2.1.1 Solutions stock et concentrations testées
    - 2.1.2 Composition de l'eau artificielle
  - 2.2 Tests de toxicité
    - 2.2.1 Test embryon
    - 2.2.2 Test embryon /larve
    - 2.2.3 Test adulte
      - 2.2.3.1 Phase de contamination
      - 2.2.3.2 Phase de reproduction
  - 2.3 Suivis des conditions d'exposition
    - 2.3.1 Gestion de l'exposition aux radionucléides en laboratoire
    - 2.3.2 Prélèvements pour le suivi des milieux d'exposition
      - 2.3.2.1 Ions majeurs
      - 2.3.2.2 Uranium
      - 2.3.2.3 pH
  - 2.4 Prélèvements pour la bioaccumulation
    - 2.4.1 Embryons, chorions et larves
    - 2.4.2 Adultes : gonades et F1
  - 2.5 Préparation des échantillons et dosages
    - 2.5.1 Préparation des échantillons d'eau
    - 2.5.2 Préparation des échantillons biologiques
    - 2.5.3 Techniques de dosage
      - 2.5.3.1 ICP AES
      - 2.5.3.2 ICP MS
      - 2.5.3.3 Scintillation liquide alpha
      - 2.5.3.4 La chromatographie ionique
  - 2.6 Calculs de dose
    - 2.6.1 Définitions et outils
    - 2.6.2 Hypothèses de calculs
      - 2.6.2.1 Géométrie et distribution
      - 2.6.2.2 Prise en compte des descendants
3. Etude des effets de l'irradiation  $\gamma$  externe
  - 3.1 Source et gamme de dose testée
  - 3.2 Test embryon et embryon/larve



4. Critères d'effets étudiés lors des différentes expositions
  - 4.1 Critères d'effets biologiques à l'échelle de l'individu
    - 4.1.1 Survie des organismes
    - 4.1.2 Au stade de vie précoce œuf
      - 4.3.2.1 *Développement embryonnaire*
      - 4.3.2.2 *Eclosion*
    - 4.3.3 Au stade de vie précoce larves
    - 4.3.4 Au stade adulte
      - 4.3.4.1 *Indice gonado somatique (IGS) et Indice de condition (K)*
      - 4.3.4.2 *Reproduction*
  - 4.2 Critères d'effets à l'échelle tissulaire
    - 4.2.1 Observations histologiques en microscopie optique
      - 4.2.1.1 *Préparation des échantillons*
      - 4.2.1.2 *Observations*
    - 4.2.2 Microscopie Electronique à Transmission couplée à une sonde EDX
      - 4.2.2.1 *Principe*
      - 4.2.2.2 *Préparation des échantillons*
      - 4.2.2.3 *Observations*
  - 4.3 Critères d'effets à l'échelle moléculaire
    - 4.3.1 Génotoxicité
      - 4.3.1.1 *Principe de l'essai des comètes*
      - 4.3.1.2 *Application du test des comètes version alcaline aux œufs*
      - 4.3.1.3 *Application aux organes de la reproduction*
    - 4.3.2 Dosage de la vitellogénine (Vtg)
      - 4.3.2.1 *Principe du dosage*
      - 4.3.2.2 *Application sur mâle et femelle exposés à l'uranium appauvri*
5. Traitements statistiques des résultats
6. Modélisation du recrutement des générations de poisson zèbre

Stade de vie Scénarios	Embryon	Larve	Adulte
Contamination interne à l' U <sub>app</sub>	0, 20, 50, 100, 150, 250 et 500 µg/L	0, 20, 250 µg/L	0, 20, 250 µg/L
Contamination interne à l' <sup>233</sup> U	0, 20, 100 µg/L	0, 20, 100 µg/L	
Irradiation γ externe	0, 1, 10, 100, 1000 mGy/j	0, 1, 10, 100, 1000 mGy/j	

Tableau 8 : Résumé des expositions testées pour chaque stade de vie de *D. rerio*.

Stade de vie Scénarios	Embryon (hpf)	Larve (j)	Adulte mature (j)
Durée de l'expérience Temps de mesure			
Contamination interne à l' U <sub>app</sub>	Gén. Gén. BioA Ms  Morta., Eclo., Dév. Emb.	BioA BioA Ms/Lg Ms/Lg  Morta., Dév.	Gén. Vtg Vtg BioA BioA GSI / K GSI / K Histo Morta., Repro., Dév. de F1
Contamination interne à l' <sup>233</sup> U	Gén. Gén. BioA Ms  Morta., Eclo., Dév. Emb.	BioA BioA Ms/Lg Ms/Lg  Morta., Dév.	X
Irradiation ? externe	Gén. Gén.  Morta., Eclo., Dév. Emb.	Ms/Lg Ms/Lg  Morta., Dév.	X

Tableau 9 : Résumé des critères étudiés pour chaque stade de vie dans chaque expérience.

**Critères d'effets macroscopiques :** mortalité, éclosion, développement embryonnaires, reproduction ; Masse/longueur ; GSI et indice K. **Critères d'effets moléculaires :** génotoxicité, Vtg. **Critères d'exposition :** bioaccumulation.

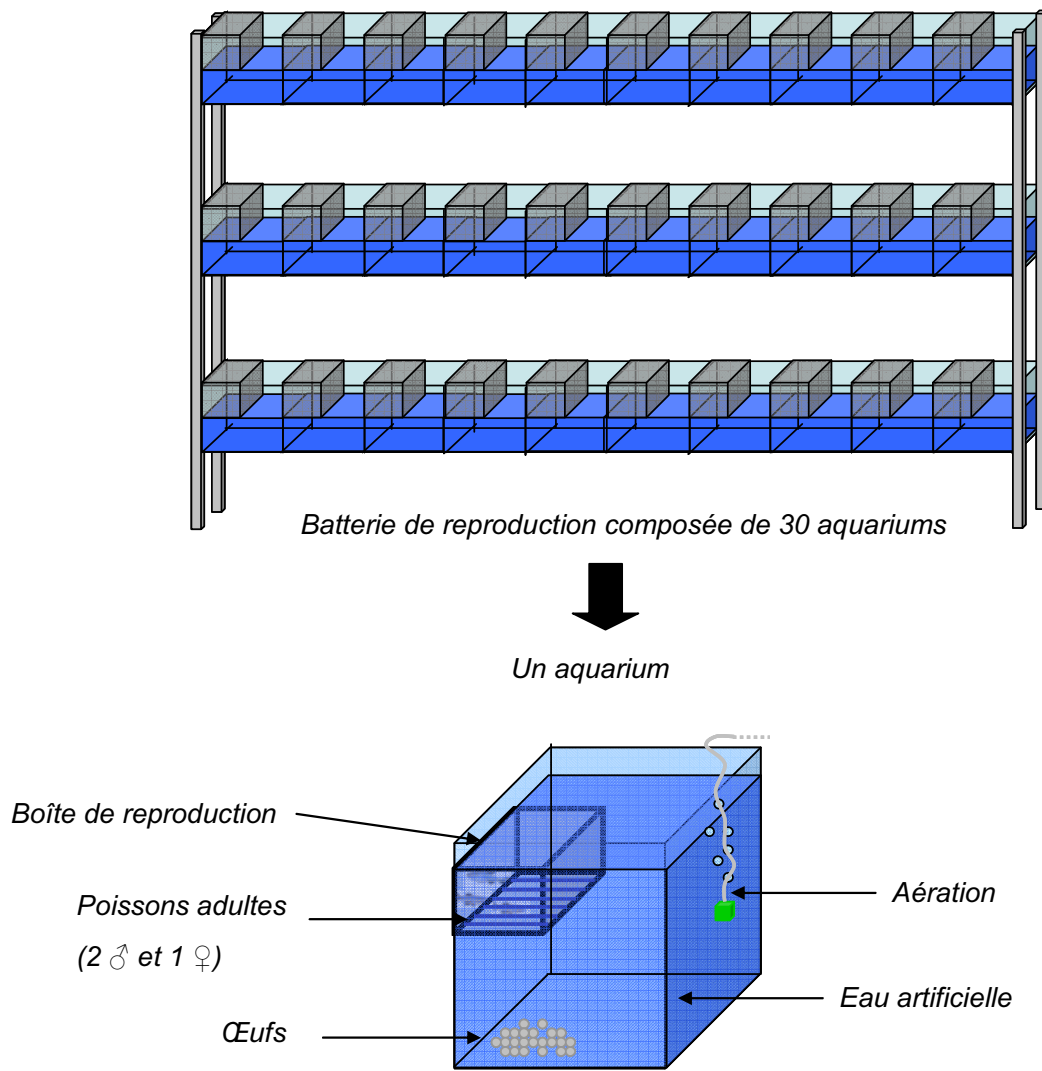
## **Introduction**

Les tableaux ci contre résument l'ensemble des expérimentations (tableau 8) et les critères étudiés pour chacune d'elles (tableau 9).

En effet après avoir présenté le matériel biologique, nous détaillerons les conditions expérimentales testées pour chaque type d'exposition (uranium et irradiation gamma) accompagnées du dispositif expérimental adéquat, avec pour le cas particulier de l'uranium les protocoles de dosages de l'élément suivis des calculs de dosimétrie.

Ensuite, nous décrirons les protocoles utilisés pour l'étude de chaque type de critères d'effets: des critères macroscopiques à l'échelle de l'individu, aux dosages protéiques.

Enfin nous présenterons les analyses statistiques appliqués aux résultats, ainsi que le modèle mathématique appliqué pour l'évaluation des effets sur le recrutement des organismes.



**Figure 10** : Dispositif de reproduction de *Danio rerio* au laboratoire.



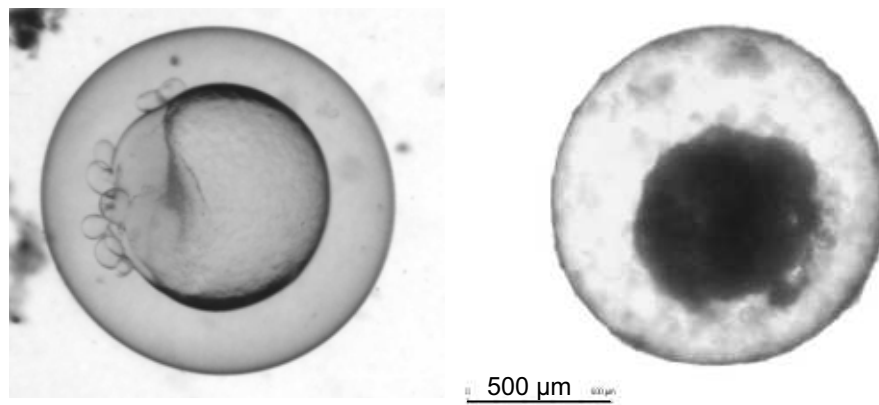
## 1. Matériel biologique

### 1.1 Origine et maintien des organismes adultes au laboratoire

Les poissons utilisés pendant nos expériences provenaient d'un magasin d'aquariophilie (Aquasylla, Pertuis). Lorsque les poissons nouvellement arrivés étaient sexuellement matures (approximativement 3 mois), ils étaient utilisés directement pour des batteries de reproduction. Dans le cas où les poissons étaient immatures, ils étaient placés en élevage pour les laisser atteindre la maturité sexuelle. Ces adultes matures étaient acclimatés à l'eau du réseau du laboratoire préalablement déchlorée puis acclimatés à l'eau artificielle pour les expériences de contamination 3 semaines avant le début des expériences. L'eau des aquariums était filtrée à l'aide d'une pompe (charbon actif + trois filtres mousses), et était manuellement renouvelée de moitié une fois par semaine et complétée si nécessaire quand il y avait évaporation. La densité de poisson était de 4 à 5 par litre maximum. La température a été constamment maintenue à  $25 \pm 1$  °C ainsi que le taux d'oxygène de l'eau qui était assuré par le biais d'un bullage d'air permanent. La photopériode a été fixée à 12/12h. Enfin les organismes étaient nourris deux fois par jour avec des paillettes commerciales (Tetramin, France) ( $\approx 2\%$  du poids), agrémentées de néonates de daphnies (*Daphnia magna*) vivantes, trois à quatre fois par semaine.

### 1.2 Obtention des œufs de *Danio rerio* :

Pour l'obtention des œufs, les adultes sexuellement matures ont été également acclimatés à l'eau synthétique de façon graduelle pendant 15 jours. Durant cette période mâles et femelles ont été séparés afin d'augmenter les chances d'obtenir une reproduction efficace le jour voulu. Le jour de la reproduction, les géniteurs étaient placés très tôt le matin dans des boîtes de reproduction (figure 10) elles mêmes placées dans des aquariums d'eau artificielle propre, afin d'éviter la prédation des œufs fraîchement pondus par les géniteurs. Les poissons étaient appariés selon un sexe ratio d'une femelle pour deux mâles. Les poissons ont été ensuite laissés 4h à l'obscurité pour initier la fraie. Après ces 4 heures, le déclenchement de la lumière induit l'ovulation et donc la ponte des femelles, suivie par la fécondation des mâles (**Westerfield, 1995 ; Lawrence, 2007**). Entre 4 et 10 groupes de poissons sont mis en place dans la batterie de reproduction selon la quantité d'œufs nécessaire pour les expérimentations.



**Figure 11** : Exemples d'œufs non viables âgés de 5 hpf : à gauche non fécondé; à droite coagulé.

Les œufs sont retirés de l'aquarium par un système d'aspiration douce par gravité et sont ensuite manipulés avec précaution à l'aide d'une pipette. Ils sont triés et leur viabilité est admise quand ils atteignent le stade blastula (3/4 hpf) sans anomalie visible à la loupe binoculaire (Figure 11). La ponte est alors considérée de bonne qualité à partir d'un seuil de viabilité de 80 % des œufs. Les œufs sont enfin rincés dans de l'eau artificielle propre et rassemblés, pour être utilisés dans les expériences de contamination.

## **2. Etude des effets de l'uranium**

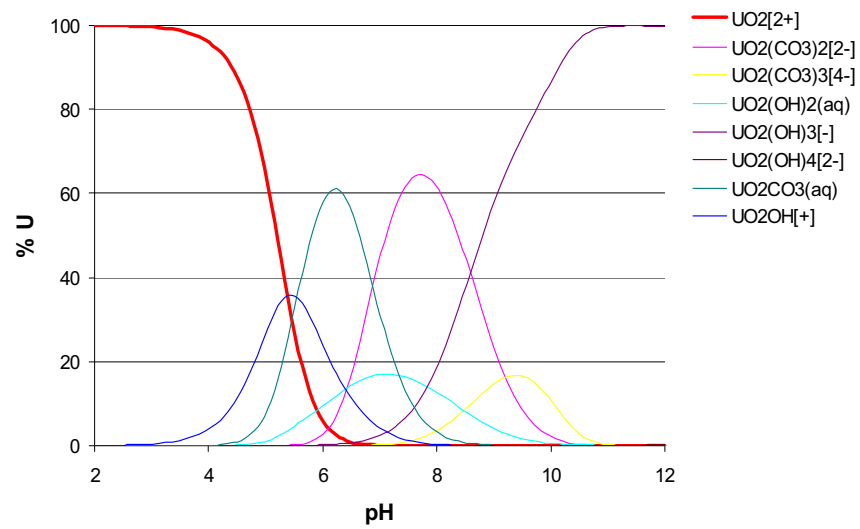
### **2.1 Exposition à l'uranium**

#### 2.1.1 Solutions stocks d'uranium et concentrations testées

L'uranium appauvri utilisé pour les 3 expériences a été obtenu par Sigma –Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) sous forme de nitrate d'uranyle hexahydraté ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Une solution stock a été constituée à une concentration de 2,62 g U /L en milieu nitrique (16 mM). La composition isotopique de cette solution a été déterminée après dosage à l'ICP-MS :  $^{238}\text{U}$  ( $99,65 \pm 0,0089$  %) ;  $^{235}\text{U}$  ( $0,33 \pm 0,0085$  %) ;  $^{234}\text{U}$  ( $0,0018 \pm 0,0001$ ) ;  $^{236}\text{U}$  ( $0,01 \pm 0,0002$  %).

- Pour le 1<sup>er</sup> test visant à étudier les effets de l'uranium sur le stade de vie œuf, les concentrations étudiées étaient : 0, 20, 50, 100, 150, 250 et 500 µg/L. 20 µg/L a été choisie comme la concentration la plus faible simulant une exposition faible dose mesurable aisément par la technique disponible au laboratoire (ICP-AES) et 500 µg/L comme la limite haute de la solubilité de l'uranium dans notre eau artificielle.

- Pour le 2<sup>ème</sup> test visant à étudier les effets de l'uranium appauvri sur le stade de vie œuf et larve, les concentrations étudiées étaient : 0, 20 et 250 µg/L. Ces concentrations ont été réduites à deux en lien avec les effets qui ont observés sur le test précédent. De plus, afin de faire la part des effets chimiotoxiques et radiotoxiques, un autre isotope de l'uranium a été testé, l'uranium 233 (activité spécifique =  $3,57 \cdot 10^8$  Bq/g).



**Figure 12** : Graphique de spéciation de l'uranium dans l'eau artificielle obtenu avec le logiciel J-Chess (pH= 2 à 12 ; [U] = 100 $\mu$ M ; pCO<sub>2</sub> atm) (à pH 6,5 il y a 0.95 % d'uranium sous forme d'ion libre UO<sub>2</sub><sup>2+</sup>).

	$K^+$	$Na^+$	$Mg^{2+}$	$Ca^{2+}$	$Cl^-$	$NO_3^-$	$SO_4^{2-}$	pH
mg/L	5,94	7,46	4,73	11,58	32,57	19,53	9,56	6,5

**Tableau 10** : Composition ionique de l'eau artificielle utilisée pour les expériences.

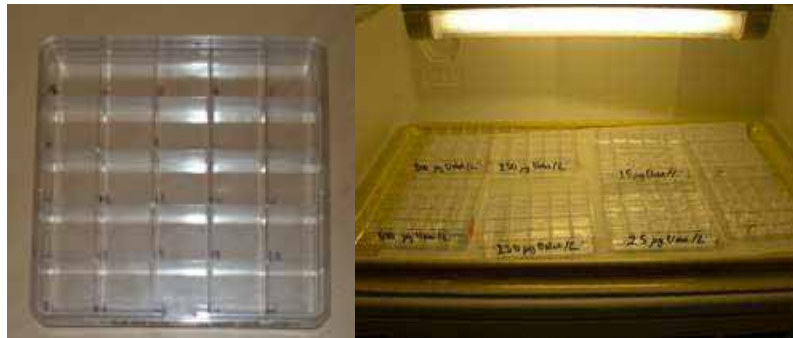
Cet isotope a été obtenu à l'IRMM (Belgique) sous forme d'une solution de nitrate d'uranyle acide à 1,3 g U/L dans un milieu acide. Une solution stock a été constituée pour les expérimentations à 0,3 g/L U à 1M HNO<sub>3</sub>. Les concentrations testées étaient 20 (même concentration basse que pour l'uranium appauvri) et 100 µg/L (concentration maximale utilisable pour rester dans des conditions physicochimiques identiques à l'uranium appauvri, la contrainte forte étant l'acidité de la solution mère).

- Pour le 3<sup>ème</sup> test visant à étudier les effets de l'uranium appauvri sur le stade adulte mature et sa reproduction, les concentrations étudiées étaient : 0, 20 et 250 µg/L. Ces concentrations ont été choisies identiques aux autres tests afin d'appréhender les différences de sensibilité des stades de vie.

### 2.1.2 Composition de l'eau artificielle

Le choix de l'eau artificielle résulte d'un compromis entre les caractéristiques physico chimiques nécessaires pour un bon état physiologique des organismes et optimales pour la biodisponibilité de l'uranium en fonction de sa spéciation chimique de l'uranium dans ce milieu. Le poisson zèbre présentant une large tolérance aux caractéristiques physico chimiques de l'eau dans laquelle il évolue, la composition de l'eau artificielle a été choisie sur la base des critères de biodisponibilité optimaux de l'uranium. Ceux-ci ont été choisis en accord avec les connaissances acquises récemment au laboratoire sur ce sujet (**Denison, 2004 ; Fortin et al., 2004, 2007**) indiquant une biodisponibilité de l'uranium accrue dans les conditions suivantes : pH acide, faible minéralisation (faible dureté de l'eau, faible concentration de ligands organiques) (Figure 12). Nous avons pu recourir au logiciel de modélisation J-CHESS (Chemical Equilibrium of Species and Surfaces) qui a permis de simuler la spéciation à l'équilibre de l'uranium au sein de l'eau artificielle. Pour cela la base de données de **Denison (2004)** a été utilisée. Le Tableau 10 présente la composition ionique finale de l'eau utilisée pour les reproductions et les expositions. La dureté totale de l'eau a été calculée : 48,3 mg CaCO<sub>3</sub> / L, ce qui la place dans la catégorie des eaux douces.

*Préparation de l'eau synthétique* : tous les sels nécessaires à la réalisation de l'eau synthétique ont été ajoutés à de l'eau osmosée. Le milieu est ensuite tamponné par oxygénation (bullage) pendant au moins 24h.



**Figure 13 :** Test embryon : boîte de pétri pour l'exposition à l'uranium du stade œuf ; exposition à l'incubateur.



**Figure 14 :** Test embryo/larve : bouteille de 500 ml pour l'exposition ; nourrice pour le renouvellement du milieu.

Le protocole précis de préparation est adapté à chaque type d'expérience. En effet, l'eau synthétique est préparée de façon à ce que le pH soit toujours de 6,5 après ajout de l'uranium. Les sels ajoutés au départ dans l'eau osmosée sont donc légèrement modifiés de façon à ce que l'ajout d'uranium (nitrate d'uranyle dans de l' $\text{HNO}_3$ ) ne rajoute ni des nitrates, ni n'abaisse le pH.

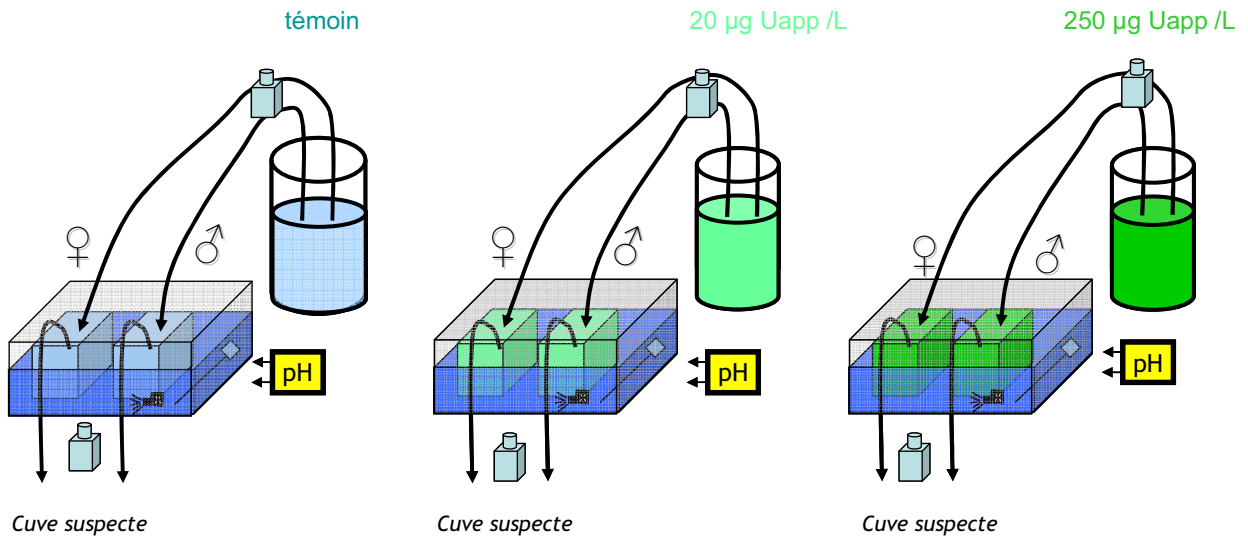
## 2.2 Tests de toxicité

### 2.2.1 Test embryon

Les œufs, obtenus de la reproduction des adultes matures de l'élevage sont aléatoirement distribués après le premier tri de viabilité (table de randomisation) dans des boîtes de Pétri avec logettes (Figure 13) (un œuf par logette). Les logettes sont remplies de milieu contaminé (4 ml) à la concentration voulue ( $n=25$  œufs par plaques et 2 plaques par condition). Ce système a été utilisé dans le but de pouvoir suivre le développement d'un même œuf d'un temps d'observation à un autre. La préparation de l'eau synthétique pour chaque condition est réalisée 24 h avant le début de l'expérimentation et la contamination à l'uranium de la nourrice est faite une heure avant le T0 de façon à laisser l'uranium s'équilibrer dans le milieu à l'aide d'un agitateur magnétique. Le volume de milieu nécessaire pour chaque concentration, pour toute la durée de l'expérience est préparé et conservé à l'incubateur pour être à une température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  et permettre un renouvellement complet de chaque logette toutes les 24h pendant l'expérience. Les boîtes de pétri sont conservées à l'incubateur toute la durée de l'expérience (i.e. 120 h) (température:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; et 12/12 h photopériode).

### 2.2.2 Test embryon /larve

Durant cette expérience, l'exposition est prolongée jusqu'à 15 jours afin d'étudier l'effet de l'uranium sur le stade larve mais aussi d'identifier l'influence d'effets au stade œuf sur le stade larve (exposition de 3 hpf à 15j). Pour cette expérience les organismes ont été exposés à 20 et 250  $\mu\text{g/L}$  suite aux résultats de l'expérience sur œufs. Pour chacune des conditions d'exposition (témoin, uranium appauvri,  $^{233}\text{U}$ ), 3 bouteilles (Figure 14) (en polycarbonate pour limiter l'adsorption sur les parois) de 500 ml ont été utilisées.



**Figure 15** : Test adulte : schéma du dispositif expérimental global pour l'exposition l'uranium appauvri en système ouvert.



**Figure 16** : Photographie du dispositif expérimental de contamination des poissons adultes à l'uranium appauvri.



Chacune contenait 50 œufs âgés de 3 hpf ( $n_{\text{total}} = 750$ ) (densité 1 œuf pour 4 ml). Les bouteilles sont placées à l'incubateur (température de  $25 \pm 1$  °C, avec une photopériode de 12/12 h).

L'eau synthétique est réalisée pour chaque condition de la même façon que pour les expériences œufs, avant le début de l'expérience et la contamination à l'uranium des nourrices est faite une heure avant la première utilisation de façon à laisser l'uranium s'équilibrer dans le milieu à l'aide d'un agitateur magnétique. Le volume nécessaire pour 5 jours d'expérience pour chaque concentration, est préparé dans des nourrices et est conservé dans l'incubateur à une température de  $25 \pm 1$  °C, pour permettre un renouvellement complet de chaque bouteille toutes les 24h pendant l'expérience. Les nourrices sont donc renouvelées 3 fois pendant l'expérience. Deux lots de bouteilles sont utilisés afin de transférer chaque jour les organismes dans une bouteille contenant du milieu propre.

Les larves ont été nourries à partir de 9 jours avec de la nourriture liquide spécialisée pour ce type d'alevins (NobilFluid, JBL, Allemagne).

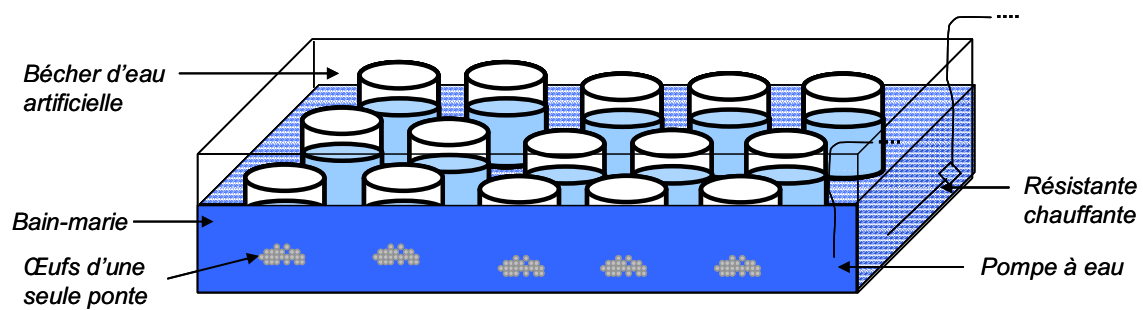
### 2.2.3 Test adulte

Afin d'étudier les effets de l'uranium sur le stade adulte mature et plus particulièrement sur l'étape de reproduction, l'expérience suivante a été réalisée en deux phases :

#### 2.2.3.1 Phase de contamination :

Les femelles et mâles matures (âgés approximativement de 3 mois) ont été exposés à l'uranium séparément pendant 20 jours afin de s'assurer que les cellules sexuelles qui serviront à la reproduction aient bien été formés pendant l'exposition à l'uranium (densité de 4 poissons par litre). Au préalable les poissons ont été acclimatés pendant 3 semaines au système ainsi qu'à l'eau artificielle. La contamination du système a donc eu lieu au jour  $T_0$  de l'expérience.

L'exposition (Figure 15 et Figure 16) se déroule en système ouvert avec un renouvellement quotidien de la moitié de l'unité expérimentale grâce à une nourrice. La contamination initiale est donc faite dans les unités expérimentales mais aussi dans les nourrices qui alimentent chaque unité. Les nourrices sont renouvelées tous les cinq jours. La température ( $25 \pm 1$  °C par bain-marie) et le pH (6,5 par le pHstat couplé à une pompe péristaltique pour l'ajout d' $\text{HNO}_3$  ( $10^{-3}$  M)) étaient régulés et contrôlés quotidiennement.



**Figure 17 :** Dispositif pour le suivi de pontes issus des adultes préalablement exposés à l'uranium appauvri.

Les organismes ont été nourris deux fois par jour avec des flocons Tetramin (Tetramin®, Allemagne). Afin de d'éviter le développement bactérien et l'accumulation de matière organique (nourriture, fèces), les unités ont été nettoyées quotidiennement après la distribution de nourriture avec un aspirateur.

#### 2.2.3.2 Phase de reproduction :

Les 20 jours d'exposition sont suivis de la phase de reproduction de 15 jours où femelles et mâles sont ré-appariés dans des dispositifs de reproduction (Figure 10) plongés dans de l'eau artificielle propre. Ils sont associés selon un sexe ratio d'une femelle pour deux mâles dans chaque unité, 10 unités sont mises en place pour chaque condition d'exposition. L'eau est renouvelée manuellement d'un tiers chaque jour.

Les œufs produits par chaque « triplet » de chaque condition sont collectés quotidiennement par aspiration douce, comptés, nettoyés et placés dans un béccher d'eau artificielle (figure 17) propre afin de suivre l'éclosion, le développement et la mortalité pendant 15 jours. Le milieu est renouvelé de moitié manuellement tout les deux jours.

### 2.3 Suivi des conditions d'exposition

#### 2.3.1 Gestion de l'exposition aux radionucléides en laboratoire

L'utilisation de radionucléides en laboratoire nécessite de respecter des règles de radioprotection humaine (**Guide pratique : Radionucléides et Radioprotection, Delacroix et al., 2004**). Ainsi pour chaque type d'émetteur, une quantité maximale utilisable sur paillasse est définie. C'est une des raisons qui limitent l'utilisation de l'uranium 233 dans de grands volumes (e.g. exposition des poissons adultes) à de fortes concentrations.

De plus la création de déchets actifs nécessite une prise en charge particulière. En effet les effluents sont stockés en cuve à effluents avant évacuation pour traitement, et les déchets solides sont répartis dans les diverses filières de traitement.

## 2.3.2 Prélèvements pour le suivi des milieux d'exposition

### 2.3.2.1 Ions majeurs

Des prélèvements ont été réalisés dans les unités expérimentales et les nourrices pour suivre l'évolution de la composition ionique de l'eau afin de prévenir l'apparition de nitrite ou de trop fortes concentrations de nitrate.

Les cations présents dans les milieux ont été dosés après acidification des prélèvements par ICP-AES. Les anions présents dans les milieux ont été mesurés par chromatographie ionique.

### 2.3.2.2 pH

Le pH des milieux a été mesuré quotidiennement dans le cas des expériences sur les stades de vie précoces à l'aide d'un pH-mètre avant le renouvellement des milieux. Pour l'expérience sur les adultes, une électrode reliée à un pHstat, plongée dans les unités expérimentales, a permis une mesure régulière dans la journée ainsi qu'un ajustement de ce pH grâce à une pompe péristaltique reliée à une bouteille d'acide dilué ( $10^{-3}$  M  $\text{HNO}_3$ ).

### 2.3.2.3 Uranium

*Test embryon et embryon/larve* : des prélèvements quotidiens ont été réalisés afin de suivre la régularité de la pression de contamination en uranium appauvri et uranium 233 dans les unités expérimentales mais aussi dans les nourrices de réserves. Ces prélèvements d'uranium appauvri et 233 ont été analysés après l'expérience respectivement par ICP-AES et par scintillation liquide alpha.

*Test adulte* : deux fois par jour, des prélèvements d'eau ont été réalisés dans les unités et dans les nourrices et dosés tout de suite après prélèvement et acidification par ICP-AES afin de contrôler les concentrations en uranium et de faire des ajouts en cas d'adsorption forte dans le système.

## 2.4 Prélèvements pour la bioaccumulation

Pour réaliser les mesures de bioaccumulation, les organismes sont sacrifiés par un choc thermique, en les plongeant dans la glace.

### 2.4.1 Embryons, chorions et larves

La bioaccumulation de l'uranium (appauvri et <sup>233</sup>) chez les poissons aux stades de vie précoces a été mesurée à différents temps. Concernant le stade œuf, des mesures ont été réalisées 2 jours avant éclosion. Lors du prélèvement, les œufs ont été manuellement déchorionés à l'aide d'aiguilles microscopiques afin d'effectuer un dosage de l'uranium dans l'embryon même et dans le chorion (sur et dans le chorion). Les embryons et chorions ont été rincés dans 3 bains successifs d'eau artificielle propre avant dosage. Après éclosion, des dosages ont été réalisés sur les larves entières à 9 et 15 jours. Tous les échantillons ont été rincés à l'eau artificielle propre.

### 2.4.2 Adultes : gonades et F1

Lors de l'expérience sur les adultes, des mesures de bioaccumulation ont également été réalisées d'une part sur les œufs et larves issus de la première et dernière ponte des adultes exposés, mais également sur les adultes eux-mêmes. De la même façon que pour les expériences sur les stades de vie précoces, le dosage de l'uranium a été effectué dans l'embryon et dans le chorion. Dans le cas des adultes, les gonades femelles et mâles ont été disséquées après 20 jours d'exposition à l'uranium et après 15 jours de reproduction en eau propre. L'uranium a été dosé sur ces organes ainsi que sur les restes du corps.

## 2.5 Préparation des échantillons et dosages

### 2.5.1 Préparation des échantillons d'eau

Les échantillons d'eau prélevés pour les dosages des anions sont conservés à 4 °C avant dosage selon les méthodes décrites par **Orjollet (2008)**.

Les échantillons d'eau contenant de l'uranium appauvri (prélèvement de 5 ml) sont acidifiés avec de l'acide nitrique (ajout de 2% v/v d' $\text{HNO}_3$  à 69 %) avant de pouvoir être mesurés par ICP-AES selon les méthodes décrites par **Camilleri et Adam (2005)**.

Les échantillons d'uranium 233 (prélèvement de 1 ml) sont également acidifiés (+ 69  $\mu\text{L}$  d' $\text{HNO}_3$  à 69%) avant d'ajouter 19 ml de cocktail scintillant (Instagel+, Packard) pour la mesure par scintillation liquide.

### 2.5.2 Préparation des échantillons biologiques et dosages

Après les dissections, tous les échantillons biologiques ont été disposés dans des micro coupelles en aluminium, séchés à l'étuve jusqu'à poids constant (minimum 48 h à 55°C) avant d'être pesés à la micro balance (SE2 ultra-microbalance, Sartorius, Goettingen, Allemagne, précision de 0,1  $\mu\text{g}$ ).

#### ► Œufs, larves :

Pour les organismes exposés à l'uranium appauvri, après rinçage à l'eau artificielle propre, les échantillons sont minéralisés dans 1 ml d'acide nitrique concentré ( $\text{HNO}_3$ , 15,3M) puis 1 ml de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1M). Après minéralisation complète, les échantillons sont évaporés à sec sur bain de sable (180 min, 90 °C), et repris dans 10 ml d'eau UHQ acidifiée (2% v/v,  $\text{HNO}_3$ , 15,3M) avant d'être analysés par ICP-MS.

Les échantillons exposés à l'uranium 233 sont minéralisés de la même façon que ceux exposés à l'uranium appauvri, puis repris dans 1 ml d'eau acidifiée ( $\text{HNO}_3$ , 1M) auquel on ajoute 19 ml de liquide scintillant avant l'analyse par scintillation liquide alpha.

► Gonades et corps entiers: ces tissus ont été minéralisés à chaud dans 3 ml d'acide concentré ( $\text{HNO}_3$ , 15,3 M) (180 min à 90°C sur bain de sable). Après digestion complète les échantillons ont été évaporés à sec (100 °C) et soumis à une deuxième attaque avec ajout de 2 ml de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1 M), suivie d'une nouvelle évaporation (60 min, 100 °C). Cinq ml d'eau UHQ acidifiée (2 % v/v,  $\text{HNO}_3$  15,3 M) ont été ajoutés avant la mesure par ICP-AES.

Dans tout le document les concentrations massiques d'uranium sont exprimées en  $\mu\text{g U/ g}$  poids sec (p.s.) ou  $\text{mg U/ g}$  poids sec (p.s.).

### 2.5.3 Techniques de dosage

#### 2.5.3.1 L'ICP-AES

L'uranium appauvri a été dosé par ICP-AES (spectrométrie d'émission atomique à source plasma à couplage inductif ; Optima 4300 DV, Perkin Elmer, limite de détection = 10 µg/L) ainsi que les cations (limites de détection :  $Mg^{2+}$  : 1 µg/L ;  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$  : 5µg/L ;  $K^+$  : 10 µg/L). Le principe de cette méthode consiste à exciter les éléments à l'aide d'un plasma (gaz partiellement ionisé et macroscopiquement neutre) atteignant la température de 8000 K. L'échantillon introduit sous forme liquide est transformé en aérosol à l'aide d'un nébulisateur pneumatique, puis est transporté dans le plasma d'argon où il subit différentes étapes de décompositions (atomisation et ionisation), conduisant à une excitation des atomes et des ions. Afin de revenir à un état stable, les éléments excités vont émettre des photons à des longueurs d'ondes caractéristiques de chaque élément.

Les raies spécifiques de la détection de l'uranium sont celles associées aux longueurs d'ondes de 409, 417, 424 et 386 nm. L'uranium appauvri a été dosé par ICP AES calibré pour une gamme de concentration entre 10 et 400 µg/L, avec l'utilisation d'indium comme étalon interne, selon les méthodes décrites par **Adam *et al.* (2002)**.

#### 2.5.3.2 L'ICP-MS

Pour la mesure en ICP-MS (spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif ; VARIAN 810-MS; limite de détection: 10 ng/L), l'échantillon acidifié est introduit à l'aide d'une pompe péristaltique dans une chambre de vaporisation où il est transformé en un aérosol de très fines gouttelettes à l'aide d'argon gazeux. L'aérosol ainsi formé est envoyé dans un plasma d'argon à très haute température (entre 6 000 et 10 000 °C), suffisante pour ioniser complètement la plupart des éléments. Un système de vide différentiel accélère les ions du plasma vers un ensemble de lentilles électrostatiques qui extrait les ions chargés positivement et les transporte vers un filtre de masse quadripolaire. Ce filtre de masse transmet seulement les ions présentant un rapport masse sur charge particulier, déterminé en fonction de la fréquence appliquée au quadripôle. Un détecteur d'ions enregistre alors les ions transmis; pour un isotope donné, le nombre d'ions mesuré permet de calculer directement la concentration de l'élément analysé grâce à un logiciel permettant le traitement quantitatif et qualitatif de l'enregistrement.

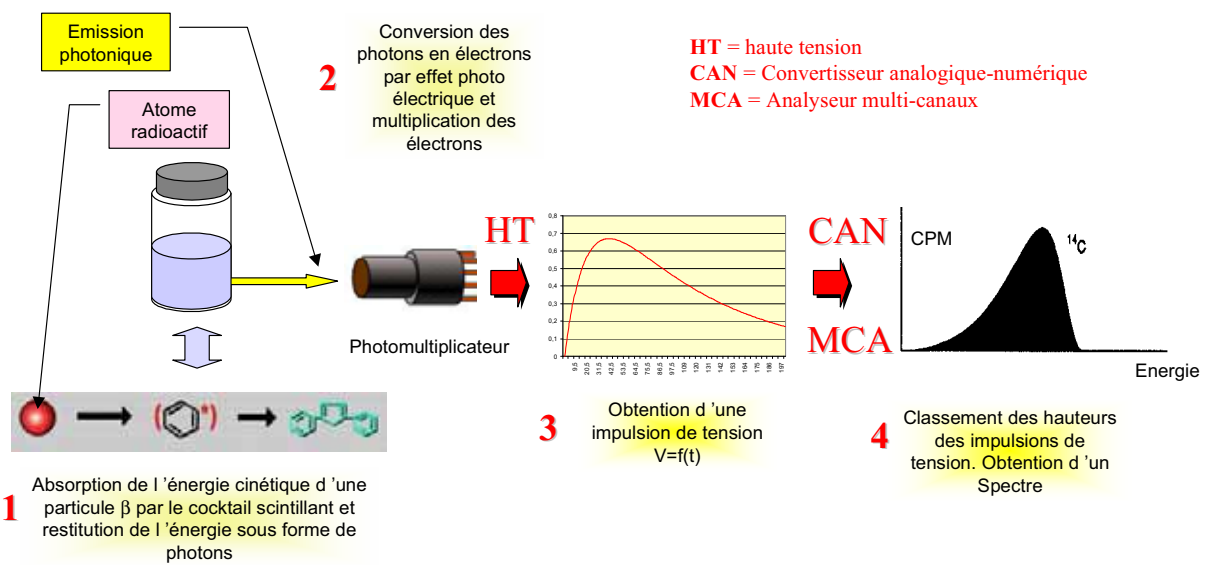


Figure 18 : Principe du dosage de la radioactivité par scintillation liquide (d'après Morello et al., 2001).



### 2.5.3.3 La scintillation liquide alpha

L'uranium 233 a été dosé par scintillation liquide alpha. Cette technique consiste à convertir l'énergie cinétique de la particule radioactive en émission de lumière (photons) grâce au liquide scintillant (Figure 18). Ces photons sont alors susceptibles d'être détectés par le photomultiplicateur. Le nombre d'électrons primaires est ensuite amplifié pour donner un flux d'électrons recueilli sur une électrode polarisée par application d'une haute tension. La variation de la tension consécutive à la collection de ce flux d'électrons est proportionnelle à l'énergie de la particule à l'origine du phénomène. Le cumul de ces événements permet de former un spectre représentatif de l'énergie des particules détectées.

### 2.5.3.4 La chromatographie ionique

La chromatographie ionique (DIONEX-120, Sunnyvale, CA, USA ; limites de détection :  $\text{Cl}^-$  : 50  $\mu\text{g/L}$  ;  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  : 100  $\mu\text{g/L}$ ) a été utilisée pour le dosage des anions.

## 2.6 Calculs de dose

### 2.6.1 Définitions et outils

L'accumulation d'uranium dans les organismes va induire une irradiation interne des tissus de ces organismes. La grandeur utilisée pour quantifier cette irradiation ainsi que l'énergie délivrée par le rayonnement s'appelle la dose absorbée et s'exprime en Gy. Pour les espèces environnementales et les écosystèmes, seule cette dose absorbée est accessible car les facteurs de pondération « rayonnements » et « tissulaires », permettant le calcul des doses équivalente (Sv) et efficace (Sv), ne sont pas connus à ce jour (cf. fiche sur les radionucléides p 13).

Pour ces travaux les doses ont été estimées par modélisation *via* le logiciel EDEN (Elementary Dose Evaluation for Natural Environment) (EDEN 2.0 ; **Beaugelin-Sellier *et al.*, 2004 et 2006**) conçu pour le calcul de la dose radiologique reçue par les espèces non humaines exposées à une substance radioactive. Cette dose est estimée par le biais de facteurs de conversion de l'activité présente qui prennent notamment en compte le type de rayonnement émis par chaque isotope à considérer ainsi que son énergie. Les facteurs de conversion de dose sont appelés DCCs (dose conversion coefficient), exprimés en gray par unité (i) de temps et (ii) d'activité par unité de masse du compartiment qui le contient : soit le milieu environnant s'il

s'agit d'une irradiation externe, soit de l'organisme même s'il s'agit d'une irradiation interne (Gy/ j par Bq/g poids frais).

On obtient ainsi un débit de dose, correspondant à l'accroissement de la dose par intervalle de temps et traduisant l'intensité de l'irradiation (énergie absorbée par matière par unité de temps en Gy/h ou Gy/j).

Dans cette étude le débit de dose total ( $ddd_{tot}$ ) résultant de la somme du débit de dose interne ( $ddd_{int}$ ), plus le débit de dose externe ( $ddd_{ext}$ ) a été calculé pour les différents échantillons, à 48 hpf :

$$\text{avec } ddd_{int} = \sum (DCC_{orga\ i} \times bioAc\ i) \quad \text{et} \quad ddd_{ext} = \sum (DCC_{source\ i} \times conc_{eau\ i})$$

où  $i$  est un isotope ou descendant donné ;  $bioAc\ i$  est l'activité de l'élément  $i$  dans l'organisme (Bq/kg) calculée à partir de la concentration mesurée ( $g\ i / kg$  de poids frais) multipliée par l'activité spécifique de  $i$  (Bq/g) et  $conc_{eau\ i}$ , la concentration en élément  $i$  dans le milieu (Bq/g),  $DCC_{orga\ i}$ , le coefficient de conversion calculé par EDEN pour l'élément  $i$  pour l'organisme et  $DCC_{source\ i}$ , le coefficient de conversion calculé par EDEN pour l'élément  $i$  pour le milieu extérieur (=la source).

Les hypothèses utilisées pour ces calculs sont listées ci-dessous.

## 2.6.2 Hypothèses de calculs

### 2.6.2.1 Géométrie et distribution

- Les principes de calcul du logiciel EDEN pour les DCCs sont fonction des radionucléides étudiés mais aussi du scénario d'exposition ainsi que de la géométrie de l'organisme étudié :

*Hyp* : Les calculs de  $DCC_S$  ont été réalisés pour le stade de vie œuf, la géométrie de l'organisme est alors assimilée à une sphère ( $\emptyset = 1\text{ mm}$ ).

*Hyp* : La distribution de l'uranium a été considérée homogène dans l'œuf pour l'utilisation du logiciel.

## 2.6.2.2 Prise en compte des descendants

*Débit de dose externe ( $ddd_{ext}$ ) :*

Quel que soit l'uranium utilisé, on considère pour le calcul du débit de dose externe l'activité de tous les isotopes de cet uranium (mesurés par ICP-MS) ainsi que celle de l'ensemble des descendants

(i) à l'équilibre dans la solution d'eau témoin (activité considérée à 10 périodes par le logiciel Nuclides 2000 et mesurée en spectrométrie gamma) pour l'uranium naturel des témoins et,

(ii) à 20 ans (activité à 20 ans calculée via Nuclides 2000) pour les solutions d'uranium appauvri et 233.

A noter que dans nos conditions expérimentales, seuls 22% du radon sont solubles dans l'eau (Figure 1). L'activité de tous les descendants à partir du radon calculée via Nuclides a donc été pondérée par ce facteur de 0,22.

*Débit de dose interne ( $ddd_{int}$ ) :*

Pour ce calcul, l'activité de l'uranium accumulé a été calculée à partir des données de bioaccumulation mesurées et de la connaissance précise de l'isotopie de nos différentes solutions :

**Unaturel** :  $^{238}\text{U}$  (99,275) ;  $^{235}\text{U}$  (0,719) ;  $^{234}\text{U}$  (0,0055).

**Uappauvri** :  $^{238}\text{U}$  ( $99,6543 \pm 0,0089$  %) ;  $^{235}\text{U}$  ( $0,3336 \pm 0,0085$  %) ;  $^{234}\text{U}$  ( $0,0018 \pm 0,0001$ ) ;  $^{236}\text{U}$  ( $0,0101 \pm 0,0002$  %).

**Uranium 233** :  $^{233}\text{U}$  (100%)

	DCCs (Gy/j par Bq/g)		Facteurs de transfert (ou BCF en l/kg)	Activité normalisée par rapport au père Bq (Nuclides)		
	organisme	milieu		activité 10 période	activité 20 ans	activité 48 h
<b>U238</b>	5,30E-05	1,34E-06	30	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00
Th 234	5,34E-07	9,98E-08	110	1,00E+00	1,00E+00	5,59E-02
Pa234m	1,22E-06	6,15E-06	10	1,00E+00	1,00E+00	0,00E+00
<b>U234</b>	5,99E-05	1,90E-06	30	1,00E+00	5,61E-05	4,35E-10
Pa 234	2,08E-06	4,73E-06	10	1,30E-03	1,30E-03	0,00E+00
Th230	5,88E-05	1,80E-06	110	1,00E+00	5,13E-09	0,00E+00
Ra226	6,00E-05	1,92E-06	80	2,20E-01	1,47E-11	0,00E+00
Rn222	6,83E-05	2,74E-06	0,8	2,20E-01	3,23E-12	0,00E+00
Po218	7,42E-05	3,52E-06	240	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
At218	8,24E-05	4,81E-06	nd	2,20E-01	0,00E+00	0,00E+00
Bi214	1,45E-06	8,24E-06	15	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Po214	9,27E-05	6,86E-06	240	2,20E-01	0,00E+00	0,00E+00
Pb214	1,52E-06	1,95E-06	300	2,20E-01	0,00E+00	0,00E+00
Bi210	1,49E-06	2,62E-06	15	2,20E-01	4,42E-13	0,00E+00
Po210	6,62E-05	2,51E-06	240	2,20E-01	3,98E-13	0,00E+00
Pb210	3,95E-07	7,35E-08	300	4,61E-05	4,43E-13	0,00E+00
Tl210	1,35E-06	1,20E-05	nd	2,20E-01	0,00E+00	0,00E+00
<b>U234</b>	5,99E-05	1,90E-06	30	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00
Pa 234	2,08E-06	4,73E-06	10	1,30E-03	2,32E+01	0,00E+00
Th230	5,88E-05	1,80E-06	110	1,00E+00	9,14E-05	0,00E+00
Ra226	6,00E-05	1,92E-06	80	1,00E+00	2,62E-07	0,00E+00
Rn222	6,83E-05	2,74E-06	0,8	0,220018114	5,75189E-08	0
Po218	7,42E-05	3,52E-06	240	0,220018114	0	0
At218	8,24E-05	4,81E-06	nd	0	0	0
Bi214	1,45E-06	8,24E-06	15	0,220018114	0	0
Po214	9,27E-05	6,86E-06	240	0	0	0
Pb214	1,52E-06	1,95E-06	300	0,219963771	0	0
Bi210	1,49E-06	2,62E-06	15	0,220018114	7,87106E-09	0
Po210	6,62E-05	2,51E-06	240	0,220018114	7,09269E-09	0
Pb210	3,95E-07	7,35E-08	300	0,220018114	7,90132E-09	0
Tl210	1,35E-06	1,20E-05	nd	4,61339E-05	0	0
<b>U235</b>	5,58E-05	2,13E-06	30	1	1	1
Th 231	1,04E-06	3,51E-07	110	1	1	0,728489245
Pa 231	6,29E-05	2,33E-06	10	1,000051226	0,000422699	5,11193E-08
Ac 227	9,67E-07	4,10E-08	25	1,000051226	0,000109957	3,26263E-12
Th 227	7,38E-05	3,83E-06	110	0,986245934	0,000107716	0
Ra 223	7,13E-05	3,63E-06	80	1,000051226	0,000108786	0
Fr223	1,52E-06	2,45E-06	nd	0,013800169	1,51738E-06	0
Rn 219	8,28E-05	5,03E-06	0,8	0,22001127	2,39328E-05	0
Po 215	8,95E-05	6,17E-06	240	0,22001127	0	0
Bi 211	8,04E-05	4,67E-06	15	0,22001127	2,39326E-05	0
Po211	9,01E-05	6,32E-06	240	0,000592332	0	0
Pb 211	1,42E-06	3,25E-06	300	0,22001127	2,39326E-05	0
Tl 207	1,41E-06	3,45E-06	nd	0,219408345	2,38674E-05	0
<b>U236</b>	5,66E-05	1,61E-06	30	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00
Th232	5,08E-05	1,18E-06	110	1,69E+00	9,86E-10	2,70E-13
Ra228	1,64E-07	3,51E-08	80	1,69E+00	6,14E-10	0,00E+00
Ac228	1,46E-06	5,05E-06	25	1,69E+00	6,14E-10	0,00E+00
Th228	6,75E-05	2,67E-06	110	1,69E+00	4,96E-10	0,00E+00
Ra224	7,05E-05	3,06E-06	80	1,69E+00	4,95E-10	0,00E+00
Rn220	7,75E-05	4,00E-06	0,8	3,71E-01	0,00E+00	0,00E+00
Po216	8,29E-05	4,87E-06	240	3,71E-01	0,00E+00	0,00E+00
Pb212	1,07E-06	7,56E-07	300	3,71E-01	1,09E-10	0,00E+00
Bi212	2,77E-05	5,22E-06	15	3,71E-01	1,09E-10	0,00E+00
Po212	1,04E-04	9,88E-06	240	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Tl208	1,41E-06	1,14E-05	nd	1,33E-01	0,00E+00	0,00E+00
<b>U233</b>	6,05E-05	1,95E-06	30	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00
Th229	6,23E-05	2,50E-06	110	1,05E+00	1,89E-03	5,17E-07
Ra225	1,03E-06	3,00E-07	80	1,05E+00	1,88E-03	2,35E-08
Ac225	7,18E-05	3,28E-06	25	1,05E+00	1,88E-03	1,06E-09
Fr221	7,83E-05	4,18E-06	nd	1,05E+00	1,88E-03	1,05E-09
At217	8,61E-05	5,44E-06	nd	1,05E+00	1,88E-03	0,00E+00
Rn217	9,32E-05	6,98E-06	0,8	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Po213	9,98E-05	8,69E-06	240	2,26E-01	4,04E-04	0,00E+00
Bi213	2,98E-06	3,38E-06	15	2,31E-01	4,13E-04	2,16E-10
Pb209	1,50E-06	9,57E-07	300	2,31E-01	4,13E-04	1,63E-10
Tl209	1,32E-06	1,01E-05	nd	4,98E-03	8,92E-06	4,65E-12

**Tableau 11** : Liste des isotopes d'uranium utilisés, ainsi que leurs descendants respectifs qui ont été sélectionnés en fonction des différentes hypothèses d'exposition. Ce tableau présente également les DCCs (dose par unités de concentration en Gy/j par Bq/g) pour l'organisme (dose interne) et le milieu (dose externe) cumulés pour tous les types de rayonnements ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), obtenus grâce à EDEN ainsi que les facteurs de transferts utilisés qui sont issus de la littérature (Beaugelin-Sellier et Garnier-Laplace, 2007).

En ce qui concerne l'activité des descendants de l'uranium, elle a été calculée pour chaque élément en faisant la somme de

(i) leur activité présente dans la solution initiale et entrant dans l'organisme avec un facteur de transfert  $f_i$  et ;

(ii) leur activité in vivo due à l'accumulation d'uranium calculé après 48h de décroissance *via* Nuclides 2000, puisque les mesures de bioaccumulation ont été faites après 48 h d'exposition.

Le tableau 11 résume les DCCs calculés pour chaque isotope de l'uranium et les descendants, ainsi que le facteur de transfert correspondant décrit dans la littérature par **Beaugelin-Sellier et Garnier-Laplace (2007)**

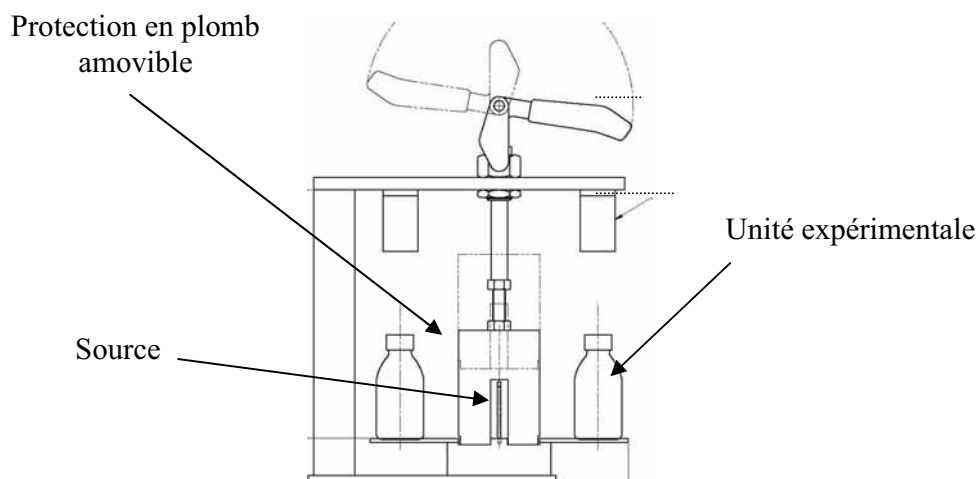


Figure 19: Schéma du dispositif d'irradiation contenu dans un incubateur.



Figure 20 : Photographie des dispositifs d'irradiation gamme externe.

### 3. Etude des effets de l'irradiation $\gamma$ externe

#### 3.1 Source et gamme de dose testée

Le  $^{137}\text{Cs}$  a une origine artificielle et est notamment issu de la fission de l'uranium dans le cœur du réacteur nucléaire. Le  $^{137}\text{Cs}$  est un émetteur  $\beta$ -, qui donne naissance au  $^{137}\text{mBa}$  (rendement de 94,6%) et au baryum 137 stable (rendement 5,4%). Le  $^{137}\text{mBa}$  avec une période de 2,55 minutes donne naissance à son tour au baryum 137 stable, qui présente alors une émission gamma (661,7keV avec un rendement de 85%). Le dispositif est constitué de sources liquides et linéiques de césium 137 permettant d'exposer les organismes à une gamme de débit de dose encadrant la valeur limite guide (10 mGy/j), recommandée par l'AIEA (1992) : 0, 1, 10, 100, 1000 mGy/j. Les débits de dose ont été vérifiés par mesure TLD (Thermo Luminescent Dosimeter) (Gilbin *et al.*, 2008).

#### 3.2 Test embryon et embryon/larve :

Les œufs, obtenus de la reproduction des adultes matures de l'élevage sont aléatoirement distribués dans les unités expérimentales remplies de milieu artificiel propre. Pour les tests embryon, 5 œufs viables (âgés de 3 hpf) sont placés dans les 5 unités expérimentales contenant 20 ml de milieu synthétique pour chaque condition au T0. Pour les tests embryon-larve, 15 œufs sont placés dans les unités contenant 20 ml de milieu synthétique au T0.

Les unités expérimentales contenant les organismes à irradier sont disposées en cercle autour de la source de césium (figure 19 et 20). Le milieu d'exposition utilisé pour ces expériences est également l'eau artificielle présentée précédemment pour pouvoir être dans les mêmes conditions que les expériences avec uranium même si dans ce type d'exposition il n'y a pas de paramètres de spéciation chimique à prendre en compte. Le milieu est renouvelé tous les deux jours de moitié par du milieu propre.

Les larves ont été nourries à partir de 9 jours avec de la nourriture liquide spécialisée pour ce type d'alevins (NobilFluid, JBL, Allemagne). L'exposition en incubateur permet d'obtenir des conditions de température et photopériode identique aux expériences de contamination à l'uranium (T=25  $\pm$  1°C et P=12/12h). Une photographie du dispositif est présentée Figure 20.

## **4. Critères d'effets étudiés lors des différentes expositions**

### 4.1 Critères d'effets biologiques à l'échelle de l'individu

#### 4.1.1 Survie des organismes

Pour toutes les expériences, embryon, embryon-larve et adulte, la mortalité a été suivie quotidiennement.

Pour chaque stade des critères d'effets particuliers liés au stade en question ont été étudiés et sont présentés ci-après.

#### 4.1.2 Au stade de vie précoce œuf :

##### *4.3.2.1 Développement embryonnaire :*

Pour les expériences sur les stades de vie précoces, les différentes étapes du développement embryonnaire ont été suivies quotidiennement à l'aide d'une loupe binoculaire. La distinction entre un développement normal ou non a été établi en utilisant l'embryogénèse du Zebrafish décrite par **Kimmel *et al.* (1995)** avec comme étapes clefs du développement embryonnaire : blastula (3 hpf), gastrula (5 hpf), segmentation (10–24 hpf), et pharyngula (24–48 hpf) (figure 8).

Aucune quantification de la morphologie ne peut être absolument objective, donc pour le critère morphologique, seules les anomalies les plus importantes comparées aux témoins sont considérées. Dans cette étude, les critères retenus sont l'observation du décollement de la queue de la vésicule vitelline à 48h et de ses mouvements, ainsi que les battements cardiaques. A 48 h, le cœur est formé par 2 chambres et présente un battement régulier, ce critère est alors mesuré par observation directe des battements pendant 10s.



#### 4.3.2.2 Eclosion :

A 48 hpf, les embryons commencent à éclore, et le nombre d'œufs éclos à chaque temps d'observation est noté jusqu'à 120 hpf. Les œufs sont considérés éclos quand le corps entier est complètement sorti de son enveloppe (chorion).

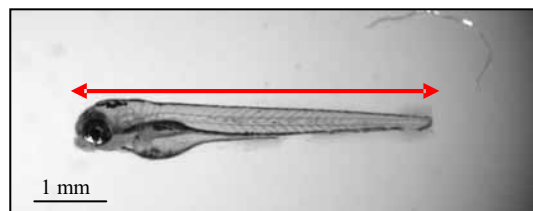
Un taux d'éclosion est alors déterminé comme le pourcentage d'œufs éclos vivants pour chaque temps. De plus le temps d'éclosion moyen ( $HT_{50}$  = median hatching time), qui représente le temps pour lequel 50 % des œufs observés ont éclos, a été calculé. Le  $HT_{50}$  a pu être calculé pour chaque condition (Reg Tox, Excel TM ; **Vindimian, 2003**) avec l'intervalle de confiance à 95 % associé.

#### 4.1.3 Au stade de vie précoce larve

La croissance des larves a été suivie par mesure de biomasse sèche et de longueur totale. Ces mesures ont été réalisées pour l'expérience d'exposition directe des stades de vie précoces à l'uranium et également pour les larves issues de la reproduction des adultes exposés à l'uranium.

Les temps 9 et 15 jours post fertilisation ont été choisis pour ces mesures comme des temps significatifs de croissance des larves. En effet 9 jours représentent le temps approximatif auquel les larves commencent à se nourrir de façon autonome puisqu'elles ont consommé leur réserve vitelline. Le temps 2 jours a été ajouté, temps auquel le chorion a été disséqué manuellement à l'aide d'aiguilles microscopiques pour déterminer la biomasse de l'embryon seul.

Les organismes ont été préalablement rincés (3 rinçages de 10 minutes dans des plaques multipuits) dans de l'eau synthétique propre et puis euthanasiés en les plongeant dans de la glace.



**Figure 21** : Photographie d'une pro larve âgée de 5 jours de *Danio rerio* et de la mesure réalisée.

Une photo de la larve est ensuite acquise pour la mesure de la longueur antéropostérieure (figure 21) à l'aide d'une loupe binoculaire équipée d'une caméra (DS Camera Control Unit DS-U1, Nikon). Après acquisition de l'image, les échantillons sont transférés dans des micro coupelles en aluminium et placés à l'étuve pour séchage (48h à 55°C). Après séchage les coupelles sont pesées à l'aide de la microbalance (SE2 ultramicrobalance, précision de 0,1 µg, Sartorius, Goettingen, Allemagne).

#### 4.1.4 Au stade adulte:

##### 4.3.4.1 Indice gonado somatique (IGS) et Indice de condition (K) :

L'IGS permet d'avoir des informations quant à la maturité des organes sexuels et l'indice K permet d'obtenir des informations quant à l'état de santé de l'organisme dans son milieu.

Ces mesures d'indices ont été réalisées sur les poissons adultes après les 20 jours d'exposition à l'uranium et après les 15 jours de reproduction d'après les mesures de taille des poissons et de leur poids frais, relevés au deux temps.

Les indices ont été calculés selon les formules suivantes :

$$K = (\text{poids frais (g)} / \text{longueur à la fourche (cm)}^3) \times 100$$

$$\text{GSI} = (\text{poids frais des gonades} / \text{poids du reste du corps}) \times 100$$

##### 4.3.4.2 Reproduction

Afin de quantifier les performances de reproduction des triplets (sexe ratio d'une femelle pour 2 mâles) pendant les 15 jours en eau propre, la production d'œufs par femelle a été relevée.

La fécondité des femelles a ainsi pu être calculée pour chaque condition: nombre d'œufs moyen par femelle par jour ou sur 15 jours de test, ainsi que les quantités et fréquences de pontes : nombre de pontes par jour sur 15 jours de test et nombre de jours de ponte sur 15 jours.

## 4.2 Critères d'effets à l'échelle tissulaire

Les effets à l'échelle tissulaire ont été recherchés sur les gonades mâles et femelles après 20 jours d'exposition à l'uranium appauvri. Pour chaque individu une gonade a été réservée pour les observations en microscopie optique et une gonade a été réservée pour la microscopie électronique à transmission (MET).

### 4.2.1 Observations histologiques en microscopie optique

La préparation des échantillons ainsi que les observations ont été réalisées à l'INERIS dans les locaux de l'unité d'évaluation des risques écotoxicologiques.

Les tissus destinés à l'observation en microscopie optique ont nécessité une préparation particulière pour pouvoir réaliser des coupes assez fines pour faire des observations microscopiques. Ainsi les tissus ont du être inclus dans des blocs durs de paraffine. Les inclusions en paraffine ont été réalisées seulement sur les gonades mâles. Le protocole pour la gonade femelle de poisson zèbre est en cours d'optimisation pour obtenir des coupes de qualités permettant le comptage des stades de maturité.

#### *4.2.1.1 Préparation des échantillons*

Les tissus ont été disséqués, puis fixés dans du formol tamponné (10 %) de façon à figer les structures. Après rinçage (PBS à pH 7,4), les échantillons subissent les étapes de déshydratation dans des bains d'alcool successifs sous vide (réalisé à l'automate : Tissue-Tek VIP, Sakura). Ils sont ensuite imprégnés et finalement inclus dans la paraffine. Des coupes ont été réalisées à 5 µm d'épaisseur sur toute l'épaisseur de l'organe à l'aide d'un microtome (LEICA RM 2235). Les rubans de paraffine sont alors montés sur des lames. Pour cela les lames sont préalablement recouvertes d'une colle spéciale (Stick-on, Labonord). Le ruban est ensuite déposé sur la lame, elle-même disposée sur une plaque chauffante afin de déplier la coupe. Le surplus de colle est enlevé et les lames sont mises à sécher pendant 24h. Ces étapes sont suivies de la phase de coloration composée elle-même de plusieurs séquences : déparaffinage (toluène), réhydratation (bains d'éthanol successifs), coloration à l'hémalum/éosine (Hématoxyline Mayer et éosine aqueuse 0,2%) et déshydratation (éthanol

puis toluène) qui sont réalisées à l'automate (LEICA auto-stainer XL). La préparation se termine par le collage d'une lamelle pour la conservation de la coupe.

#### 4.2.1.2 Observations

Les lames ont ensuite été observées au microscope (grossissement max 20x) (Zeiss axio imager, Carl Zeiss). Des photos ont été réalisées à l'aide du logiciel Axio vision afin de pouvoir examiner la différenciation des cellules germinales. De plus des mesures de surfaces occupées par différents stades cellulaires ont été réalisées, ici pour les spermatozoïdes matures, à l'aide du logiciel Image J.

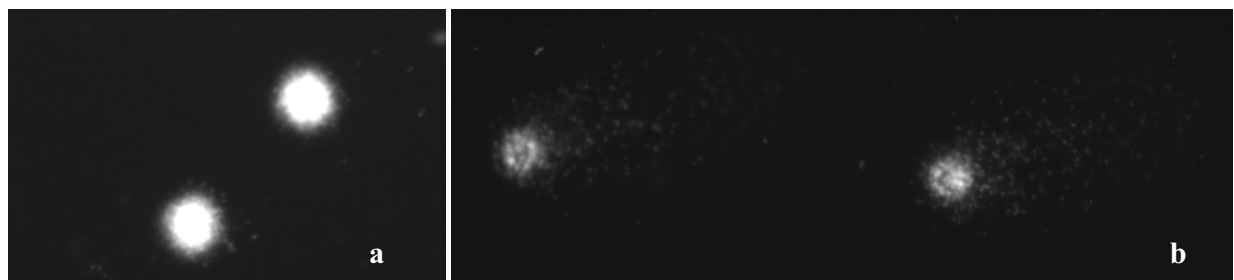
### 4.2.2 Microscopie Electronique à Transmission couplée à une sonde EDX:

#### 4.2.2.1 Principe

La microscopie électronique est une technique qui permet de visualiser des structures grâce à des appareils dont la source de rayonnement émet des électrons, ce qui permet d'obtenir une résolution bien plus fine qu'en microscopie optique (0,2 nm vs 0,2 µm). Au contact de la préparation, les électrons incidents (provenant de la source) sont soit arrêtés, soit déviés et ralentis, soit transmis. Le diaphragme objectif éliminant les électrons déviés, la formation de l'image se fait à partir des électrons arrêtés (zones sombres) et des électrons transmis (zones claires). Le microscope utilisé (Tecnai 12 G<sup>2</sup> Biotwin ; FEI, Eindhoven, Pays-Bas) possède une résolution de 0,2 nm, une tension d'accélération maximale de 120 kV et un grossissement possible de 390 à 300 000 fois. Une sonde EDX couplée au microscope peut permettre une analyse chimique élémentaire de l'échantillon. Par interactions des échantillons avec les électrons incidents, des photons x sont émis et l'énergie de ces photons x est caractéristique des atomes dont ils sont issus. L'analyse chimique par EDX consiste en une détection de ces photons en utilisant un détecteur solide Si-Li (diode en silicium dopé en lithium).

#### 4.2.2.2 Préparation des échantillons

Les tissus ont été plongés immédiatement après dissection dans un tampon (solution à 1,5 % de glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate maintenu à 4°C) assurant une fixation chimique de la matière. Les échantillons y sont conservés pendant 24h à 4°C.



**Figure 22 :** Photographie à microscopie en épifluorescence de nucléotides de cellules embryonnaires X 400. (a) ADN intact ; (b) ADN endommagé.

La seconde étape consiste à faire un marquage des tissus à l'osmium pour obtenir un meilleur contraste lors des observations. Pour cela l'échantillon subit plusieurs rinçages de tampon cacodylate et est plongé 1 heure dans une solution d'acide osmique. L'étape suivante consiste à déshydrater les tissus par des bains successifs d'alcool éthylique. Enfin l'échantillon est imprégné par un monomère (Epon 812) qui va polymériser à 60°C et former un bloc de résine (quelques mm). Des coupes ultrafines (de 80 à 110 nm) peuvent alors être réalisées grâce à un ultramicrotome équipé d'un couteau de diamant (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France).

#### 4.2.2.3 Observations

Des observations au microscope optique ont tout d'abord été réalisées (épaisseur 500 nm) afin de cibler les tissus à observer en MET. Pour les observations en imagerie au MET, des coupes d'une épaisseur de 80 nm ont été déposées sur des grilles de cuivres. Pour les analyses chimiques par la sonde EDX des coupes d'une épaisseur de 110 nm sont alors utilisées.

### 4.3 Critères d'effets à l'échelle moléculaire

#### 4.3.1 Génotoxicité

##### 4.3.1.1 Principe de l'essai des comètes

L'essai des comètes s'applique sur des cellules isolées et incluses dans un gel d'agarose déposé sur une lame de microscope. Dans sa version classique (condition alcaline), l'essai des comètes permet de révéler des cassures simple brin et double brin et des sites alcali-labiles (**Singh et al., 1988**).

Après une étape de lyse aboutissant à la destruction du matériel extranucléaire, l'ADN se retrouve sous la forme de nucléoïdes. Ceux-ci sont ensuite placés dans un bain de soude et soumis à une électrophorèse en milieu alcalin (pH>13). L'ADN comportant des lésions favorisant sa relaxation et sa dénaturation pourra migrer vers l'anode, tandis que l'ADN intact, surenroulé et volumineux ne bouge pas. Après coloration par une fluorochrome, les images de nucléoïdes sont capturées grâce à une caméra couplée à un microscope à épifluorescence et un logiciel d'analyse d'image (Comet IV, Perspective instrument) (Figure 22).

#### 4.3.1.2 Application du test des comètes version alcaline aux œufs :

Ce test a été appliqué à des œufs âgés de 24 et 48 hpf lors d'expositions directes à l'uranium via l'eau artificielle, d'exposition indirecte pour les œufs issus des parents exposés à l'uranium et également lors d'expositions à l'irradiation gamma externe. Pour chaque condition, 3 réplicats de 10 œufs ont été utilisés, et pour chaque réplicat 2 lames ont été réalisées. Un test positif préliminaire, *in vivo*, a été réalisé avec le peroxyde d'hydrogène (agent génotoxique de référence) afin de valider la technique. Les œufs âgés de 24 hpf ont été exposés pendant une heure à une gamme de peroxyde d'hydrogène (0 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 et 20 mM) (**Kosmehl et al., 2006**).

#### *Dissociation des cellules embryonnaires*

Deux principales techniques d'isolement cellulaire existent : enzymatique (*e.g.* exposition à de la collagénase) et mécanique (homogénéisation manuelle). La dissociation des cellules embryonnaires a été optimisée dans le cadre d'un stage de Master II (**Massarin, 2007**) sur la base de critères de rendement cellulaire supérieur, de maintien de l'intégrité de l'ADN et de rapidité. L'isolement mécanique mis au point s'inspire de travaux effectués par **Kosmehl et al. (2006)**. Après un rinçage dans 1,5 ml de solution de PBS à 10 mM contenant 0,02 % d'EDTA, les embryons de 24 ou 48 hpf sont transférés dans un homogénéisateur de type "Potter-Elvehjem". Une rotation manuelle de la tige, de 90°C, permet la désagrégation des embryons. La suspension cellulaire est ensuite filtrée au travers d'une gaze de vide de maille de 100 µm, puis soumise à une centrifugation à 110 g, à 8°C pendant 10 minutes. Après élimination du surnageant et remise en suspension du culot dans 1 ml de solution L15 contenant de l'Hépès à 10 mM, une seconde centrifugation est réalisée.

#### *Test de viabilité cellulaire*

La viabilité des cellules est déterminée grâce au test d'exclusion au bleu Trypan. 20 µl de suspension cellulaire sont incubés pendant 5 minutes avec 20 µl de solution de bleu Trypan, puis déposés sur une cellule de Malassez. Les cellules non viables apparaissent colorées en bleu intense, tandis que les cellules viables demeurent incolores, après observation au microscope à un grossissement ×400. La viabilité des cellules doit être supérieure à 80 %. L'observation au microscope permet également d'estimer la densité cellulaire qui doit être au minimum égale à  $1,35 \cdot 10^6$  cellules/ml pour continuer l'essai et réaliser le test des comètes.

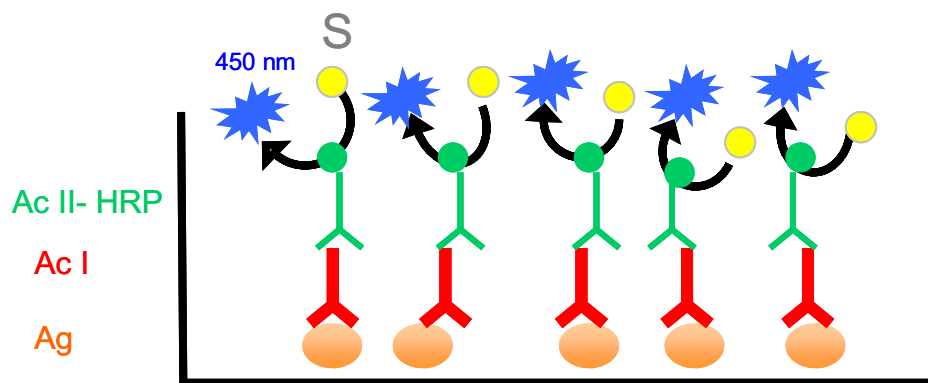


*Test des comètes en conditions alcalines*

Le test des comètes en conditions alcalines a été réalisé selon la procédure de **Singh et al. (1988)**, avec quelques modifications. Un volume de suspension cellulaire est mélangé à de l'agarose LMP à 1 % (m/v dans un tampon PBS) maintenue à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  sur une lame de verre pré-coatée avec de l'agarose NMP à 0,8 % (m/v dans un tampon PBS). L'étalement est réalisé par dépôt délicat d'une lamelle de verre sur ce mélange agarose-suspension cellulaire. La polymérisation de ce mélange est faite sur un plateau métallique déposé sur un lit de glace à  $4^\circ\text{C}$ . La lamelle est enlevée après 5 minutes et une troisième couche d'agarose à 0,5 % LMP (m/v dans un tampon PBS) est déposée, puis polymérisée selon le même protocole. Les cellules sont ainsi préservées de la dessiccation. Les lames sont ensuite immergées dans un tampon de lyse (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,01 M Tris, pH 10, 1 % Triton X-100, 10 % DMSO) pendant 1 heure à l'obscurité, pour protéger l'ADN des rayonnements lumineux. Les fortes concentrations en sels et détergents permettent de lyser les membranes plasmiques et nucléaires, et de dénaturer les histones liées à l'ADN. Après récupération des lames, celles-ci sont séchées et transférées dans une cuve électrophorétique contenant un tampon alcalin fraîchement préparé (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) pour permettre le déroulement de l'ADN, pendant 40 minutes. La migration des fragments a lieu sous l'influence d'un champ électrique (20 V, 200 mA) pendant 24 minutes. Après cette étape, les lames sont égouttées, puis recouvertes d'un tampon de neutralisation à deux reprises (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) pendant 5 minutes. Cette étape rend l'ADN bicaténaire, permettant ainsi l'intercalation de bromure d'éthidium (50  $\mu\text{l}$ ) pour le marquage de l'ADN. Si l'observation des lames n'est pas faite le jour même, celles-ci sont déshydratées pendant 10 minutes dans l'éthanol absolu puis conservées à l'abri.

*Observations des lames*

L'observation des lames est réalisée à un grossissement  $\times 400$  avec un microscope en épi fluorescence (Nikon Eclipse E600), équipé d'un filtre d'excitation de 515-560 nm et d'un filtre barrière de 590 nm. Le microscope est couplé à une caméra vidéo QImaging Retiga 1300R connectée à un système d'analyse d'images informatisé. Ce système emploie le logiciel Comet Assay IV (Perspective Instrument).



**Figure 23** : Schéma simplifié d'un test ELISA compétitif (Ag = Antigène ; AcI = anticorps primaire ; AcII = anticorps secondaire couplé à une peroxydase –Horseradish peroxidase ; S = substrat).

Cent "comètes" sont capturées aléatoirement sur chaque lame, en évitant les bords et les parties endommagées du gel. Avec l'utilisation de systèmes d'analyse d'images, il est possible de mesurer l'intensité de fluorescence et donc la distribution de l'ADN dans la comète. Ainsi, le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète ("tail intensity"), la longueur de la queue ("tail length") ou le produit longueur de la queue par l'intensité de l'ADN migrant ("tail moment") peuvent être déterminés. Le critère retenu est le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète, la précision de la mesure étant meilleure sur ce paramètre.

#### 4.3.1.3 Application aux organes de la reproduction :

Le même test des comètes alcalin a été appliqué sur les gonades mâles (**Giraud, 2006**) et femelles disséquées après 20 jours d'exposition à l'uranium appauvri. La technique reste sensiblement la même, hormis l'étape de filtration des homogénats de cellules germinales sur gaze : pour les femelles, l'homogénat a été filtré au travers d'une gaze de vide de maille de 100  $\mu\text{m}$  et pour les mâles, 60  $\mu\text{m}$ .

Un test positif préliminaire, *in vitro*, a également été réalisé avec le peroxyde d'hydrogène (agent génotoxique de référence) afin de valider la technique. Les cellules isolées de gonades ont été exposées pendant 1 heure à plusieurs concentrations de peroxyde d'hydrogène (0 ; 10 ; 50  $\mu\text{M}$ ).

### 4.3.2 Dosage de la vitellogénine (Vtg)

#### 4.3.2.1 Principe du dosage :

La vitellogénine présente dans le plasma des poissons adultes a été dosée par la méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) compétitive (**Brion et al., 2002**), à l'INERIS dans les locaux de l'unité d'évaluation des risques écotoxicologiques. Le dosage repose sur une réaction de compétition entre la Vtg présente dans l'échantillon et la Vtg purifiée de poisson zèbre de la phase solide d'une microplaque pour la reconnaissance des sites de fixation de l'anticorps anti-Vtg (Figure 23).

L'échantillon a été incubé avec des anticorps anti-Vtg (anticorps primaires) puis déposé dans les puits de microplaques dans lesquels une adsorption de Vtg purifiée a été préalablement réalisée (phase de coating). Une solution d'anticorps secondaires couplés à une peroxydase a été rajoutée. L'activité peroxydase est ensuite révélée par l'ajout de substrat. La réaction

enzymatique est bloquée après 30 min d'incubation à l'aide d'acide phosphorique et l'absorbance est lue à 450 nm par un lecteur de microplaque.

Pour chaque échantillon le pourcentage d'inhibition de fixation de l'anticorps primaire à l'antigène adsorbé sur la microplaque, Bi/Bo, est calculé. Les résultats sont modélisés par une courbe  $Bi/Bo = f(Vtg)$  selon une équation à 4 paramètres (équation de Hill). Les teneurs en Vtg des échantillons dans les puits sont ensuite calculées à partir de leur Bi/Bo et de la courbe d'étalonnage uniquement lorsque  $20\% < (Bi/Bo)_{\text{échantillon}} < 80\%$ .

#### 4.3.2.2 Application sur mâle et femelle exposés à l'uranium appauvri :

Les concentrations de Vtg ont été mesurées sur des homogénats de corps entier. En effet, pour des poissons plus gros cette mesure peut être réalisée sur le plasma, mais dans le cas du poisson zèbre, la quantité de plasma obtenue serait insuffisante.

#### Préparation des échantillons

Cette mesure de Vtg a été réalisée sur les mâles et les femelles après 20 jours d'exposition à l'uranium et sur un second lot de poissons après les 15 jours de reproduction (n= 10 poissons par sexe et par temps).

Sachant que les gonades sont les organes où la dégradation de la Vtg en lipovitelline et phosvitine a lieu, le dosage a été réalisé sur des corps entiers dont les gonades ont été prélevées. Les poissons sont alors homogénéisés (ultraturax) dans du tampon ELISA (PBS, 1% BSA, PMSF 1mM, pH 7,3 ; 1/2 poids/volume). Après centrifugation des homogénats (3000 g, 15 min, 4°C°), le surnageant est récupéré et conservé à - 80 °C jusqu'à la mesure.

#### Dosage des échantillons

La courbe de calibration (0,3 à 1000 ng/ml) a été réalisée à partir d'un échantillon standard de zf-Vtg purifiée (Std = 53,4 µg/ml) obtenue préalablement à l'INERIS. La limite de détection était de 0,4 ng/ml pour la zf-Vtg purifiée et 40 ng/ml pour un homogénat de corps entier après dilution des échantillons (au 1/100).

Les anticorps primaires qui ont été utilisés, étaient des anticorps anti-Vtg polyclonaux de lapin (DR-264, Biosense) et les anticorps secondaires (anti-IgG de lapin, Biosense) étaient couplés à une peroxydase. Le substrat employé était le TMB (Tetramethyl benzidine) et la réaction a été stoppée avec de l'acide phosphorique (1M).

## **5. Traitements statistiques des résultats**

Les données des différentes variables étudiées ont été représentées graphiquement en reportant les moyennes observées sur les  $n$  réplicats testés, ainsi que leurs erreurs standards (ES).

Les analyses statistiques ont été menées avec l'aide de Claire Della-Vedova ( Société Magelis) et réalisées à l'aide des logiciels Statistica 7.1 (StatSoft Inc., 2005) et R 2.7 (Development Core Team, 2008) avec le package stat.

Les variables quantitatives ont été analysées de façon identique. Pour différents temps d'observation, des analyses de variances hiérarchiques à 2 facteurs (le facteur réplicat étant emboîté dans le facteur condition) ont tout d'abord été réalisées afin de comparer les moyennes des réponses obtenues sous les différentes conditions d'exposition. Dans un second temps, les hypothèses de normalité et d'homogénéité des résidus ont été évaluées. L'hypothèse de normalité a été évaluée visuellement en réalisant un graphique reportant les résidus standardisés en ordonnée et les quantiles normaux correspondant en abscisse. Un test de Shapiro-Wilks sur les résidus a également été réalisé. L'hypothèse d'homogénéité a été évaluée visuellement en réalisant un graphique reportant les résidus en ordonnée et les valeurs prédites correspondantes en abscisse. Lorsque ces deux hypothèses étaient validées des comparaisons multiples ont ensuite été réalisées. Des tests de Dunnett ont été employés lorsqu'il s'agissait de comparer chacun des groupes exposés au témoin, et des tests post-hoc de Tukey ont été employés lorsqu'il s'agissait de comparer tous les groupes deux à deux.

Lorsque les hypothèses de normalité et d'homogénéité des résidus n'étaient pas satisfaites, des transformations Box-Cox ont été réalisées avant de reconduire l'ANOVA hiérarchique. Lorsque l'une ou l'autre de ces hypothèses n'était pas satisfaite, malgré la transformation Box-Cox, une analyse de variance non paramétrique a alors été menée en utilisant le test de Kruskal-Wallis. Lorsque le test était significatif ( $p < 0.05$  pour  $\alpha = 5\%$ ), des comparaisons multiples ont été réalisées en utilisant de tests de Wilcoxon. Une correction de Holm (1979) a alors été apportée aux degrés de significativité ( $p$ -values) afin de conserver un risque alpha global de 5%.

Les variables qualitatives d'éclosion et de mortalité ont également été analysées selon un même schéma. Pour différents temps d'observation, un test du Chi-2 a d'abord été réalisé afin

de comparer globalement les pourcentages mesurés sous les différentes conditions. Lorsque le test était significatif ( $p < 0.05$  pour  $\alpha = 5\%$ ), les pourcentages ont ensuite été comparés deux à deux à l'aide d'un test du Chi-2 si ses conditions d'utilisation étaient remplies, et d'un test de Fisher dans le cas contraire. Afin de conserver un risque alpha global de 5%, les degrés de significativité (p-values) de ces comparaisons multiples ont également été ajustés par la méthode de Holm (1979).

## **6. Modélisation du recrutement des générations de poisson zèbre**

- Une modélisation simple a permis la synthèse des résultats obtenus lors des expériences de contamination à l'uranium appauvri. Le modèle employé a déjà été utilisé pour la daphnie exposée à une contamination alpha interne et le ver de terre lors d'une irradiation gamma externe dans les travaux d'Alonzo *et al.* (2008). Les données utilisées sont celles des trois stades de vie du poisson zèbre : œuf, larve et adulte décrivant la mortalité des organismes pour chaque stade ainsi que la fécondité des femelles.

Le recrutement d'une nouvelle génération a ainsi été simulé à partir d'une population théorique de 10 femelles (âgées approximativement de 75 jours) sur une période de 15 jours, correspondant à la durée d'exposition de nos expériences.

Deux scénarios d'exposition à l'uranium ont été envisagés:

*Scénario 1* : Exposition des stades de vie précoce par la voie parentale : le recrutement est simulé en milieu non contaminé après une période d'exposition des femelles à l'uranium appauvri de 20 jours, prenant fin à  $t_0$ . Ce scénario est basé sur les données de l'expérience de contamination des adultes.

*Scénario 2* : Exposition des stades de vie précoces par la voie parentale et directe par le milieu: le recrutement est simulé dans le cas où les femelles et les stades de vie précoces (embryons et larves) seraient exposés à une contamination continue à l'uranium appauvri. Ce scénario prend en compte les données correspondant aux expériences de contamination directe des stades de vie précoces, et de contamination des adultes.

▪ Le modèle utilisé est fondé sur une population structurée décrivant de jour en jour la distribution d'âge de la population au temps  $t$ , où  $N_i(t)$  est le nombre d'individus de classe d'âge  $i$ . Les simulations commencent à  $t_0$  avec les 10 femelles :

$$\begin{cases} N_{\text{♀}}(t_0) = 10 \\ N_i(t_0) = 0 \quad \forall i \text{ de } 1 \text{ à } 15 \text{ jours} \end{cases}$$

▪ A chaque pas de temps, le nombre de nouveaux individus (de 0 jour) a été calculé à l'aide de l'équation :

$$N_0(t) = N_{\text{♀}} \times f$$

Où  $f$  est le taux de fécondité moyen mesuré pour 10 femelles chaque jour sur 15 jours de tests de reproduction dans chaque condition d'exposition (tableau 11). La maturité sexuelle étant atteinte approximativement vers 75 jours (**Eaton et Farley, 1974**), il n'est pas nécessaire de prendre en compte la reproduction des individus issus du recrutement, dont l'âge maximal atteindra 15 jours au cours des simulations.

▪ L'espérance de vie de *D. rerio* varie de 42 à 66 mois (**Gerhard et al., 2002**). Les femelles adultes âgées d'environ 90 jours à  $t_0$  ne mourront donc pas de vieillesse au cours des simulations qui se limitent à 15 jours. De plus, l'uranium n'induisait pas de mortalité chez les adultes à nos concentrations d'expositions. La seule source de mortalité susceptible d'intervenir au stade adulte est donc d'origine naturelle (par prédation par exemple). Nous avons choisi de la négliger durant les 15 jours de simulations par souci de simplicité, dans la mesure où elle devrait toucher toutes les conditions de façon identique. Le nombre de femelle ne varie donc pas dans notre modèle :

$$N_{\text{♀}}(t) = 10 \text{ sur l'intervalle de temps considéré}$$

		Fécondité mesurée (nb œuf moyen /femelle)														
		Temps (jours)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
condition	témoin	72	36	61	36	55	55	32	35	30	13	16	29	18	26	
	20 µg U/L	23	7	10	25	18	14	18	9	0	18	0	11	22	31	
	250 µg U/L	0	9	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	

**Tableau 12 :** Résumé des taux de fécondité pour chaque condition d'exposition utilisés pour la simulation du recrutement (n = 10 femelles pour chaque condition).

Condition	Scénario	Taux de mortalité: œuf (i de 0 à 3 jours)			Taux de mortalité: larve (i de 4 à 9 j + i 10 à 15 j) ou (i de 4 à 15 j)		
		m NAT	m DIR	m MAT	m NAT	m DIR	m MAT
témoin		0,08	-	-	0,0256	-	-
20 µg U/L	1	-	-	0,06	-	-	0,0141
	2	-	0,01	0,06	-	0,015 (4-9j) 0,3635 (10 à15j)	0,0141
250 µg U/L	1	-	-	0,92	-	-	0,97
	2	-	0,74	0,92	-	0,154 (4-9j) 0,976 (10à15j)	0,97

**Tableau 13 :** Résumé des taux de mortalité (Naturel, Direct et Maternel) utilisés pour la simulation du recrutement.



▪ Pour chaque stade et scénario, les taux de mortalité des stades de vie précoces ont été calculés à partir de :

$m_{NAT}$  le taux de mortalité naturel issus des témoins de toutes les expériences,

$m_{DIR}$  le taux de mortalité des stades de vie précoces induit par l'exposition directe à l'uranium.

$m_{MAT}$  le taux de mortalité des stades de vie précoces induit par l'exposition maternelle à l'uranium.

Leurs valeurs (tableau 13) ont été estimées en ajustant une courbe exponentielle à la survie des stades de vie précoces mesurée au cours du temps dans les différentes expériences. Entre le temps  $t$  et  $t + 1$ , le nombre d'individu des classes d'âge 1 à 15 jours a été calculé à l'aide des équations suivantes:

$$\text{Pour } i \text{ de 1 à 15 jours, } N_i(t+1) = N_{i-1}(t) \times e^{-m_i}$$

avec  $m_i$  le coefficient de mortalité exponentielle de la classe d'âge  $i$  et :

$$m_i = m_{NAT} + m_{DIR} + m_{MAT} \quad \text{dans le scénario 1}$$

$$\text{et } m_i = m_{NAT} + m_{MAT} \quad \text{dans le scénario 2}$$



## Chapitre 2. Résultats et discussion

### *Plan détaillé*

- Suivi des milieux expérimentaux –

#### 1. Effets des radionucléides sur les principaux traits d’histoire de vie de *D. rerio*

##### 1.1 Test sur les stades de vie précoces

###### 1.1.1 Test embryon

###### 1.1.1.1 Exposition à l’uranium appauvri

- a) Mortalité
- b) Développement embryonnaire
- c) Ecllosion

###### 1.1.1.2 Exposition à l’irradiation gamma externe

- a) Mortalité
- b) Développement embryonnaire
- c) Ecllosion

###### 1.1.2 Test embryon/larve

###### 1.1.2.1 Exposition à l’uranium appauvri et 233

- a) Mortalité
- b) Développement embryonnaire
- c) Ecllosion
- d) Croissance
- e) Bioaccumulation de l’uranium par les œufs et les pro- larves
- f) Conversion en débit de dose

###### 1.1.2.2 Exposition à l’irradiation gamma externe

- a) Mortalité
- b) Développement embryonnaire
- c) Ecllosion
- d) Croissance

##### **1.1.3 Principales conclusion sur les effets aux stades de vie précoces**

##### 1.2 Test adultes matures

###### 1.2.1 Indice gonado somatique (IGS) et Indice de condition (K)

###### 1.2.2 Succès reproducteur

###### 1.2.3 Suivi de la génération F1 après exposition parentale

###### 1.2.4 Bioaccumulation de l’U

###### 1.2.4.1 Chez les adultes

###### 1.2.4.2 Transfert des adultes vers les œufs:

##### **1.2.5 Principales conclusions sur les effets de l’uranium appauvri sur la reproduction des adultes**

##### 1.3 Simulation du recrutement des stades de vie précoces

#### 2. Histopathologie

##### 2.1 Observation en microscopie optique

###### 2.1.1 Inclusion en paraffine

###### 2.1.2 Inclusion en résine époxy

##### 2.2 Observations en microscopie électronique à transmission (MET)

##### **2.3 Principales conclusions sur les effets de l’uranium sur les tissus gonadiques**



3. Effets moléculaires

3.1 Marqueurs de génotoxicité

3.1.1 Génotoxicité dans les cellules embryonnaires lors d'exposition directe des œufs

3.1.1.1 *Test positif in vivo*

3.1.1.2 *Exposition à l'uranium appauvri et  $^{233}$*

3.1.1.3 *Exposition à l'irradiation  $\gamma$  externe*

3.1.2 Génotoxicité dans les cellules germinales et embryonnaires après exposition des adultes

3.1.2.1 *Chez les cellules germinales*

3.1.2.2 *Chez les cellules d'embryon*

3.2 Marqueurs de perturbations endocriniennes : vitellogénine (Vtg)

**3.3 Principales conclusions sur les perturbations moléculaires**



*Les 3 stades de vie étudiés ont permis de mettre en évidence des effets de l'uranium appauvri à différents niveaux d'organisation biologique.*

*Les résultats à chaque niveau d'intégration biologique sont présentés dans des paragraphes différents. Ainsi, après la présentation des effets biologiques sur les principaux traits d'histoire de vie, sont présentés les résultats obtenus pour des échelles biologiques plus fines, de l'histopathologie vers les effets moléculaires. Des premiers points de discussions seront également réalisés en fin de chaque grand paragraphe afin de mieux visualiser l'ensemble des résultats avant le chapitre de synthèse.*

*Les résultats concernant les effets de l'uranium sur les stades de vie précoces ont fait l'objet d'une publication présentée en annexe (Bourrachot et al., 2008).*





### Suivi des milieux d'exposition

Le suivi des paramètres physico-chimiques pouvant influencer la spéciation de l'uranium a montré que l'ajustement initial de ces paramètres avait été suffisant pour maintenir des conditions stables durant les expériences embryon et embryon/larve dans des petites unités expérimentales. Le pH a ainsi été maintenu à  $6,5 \pm 0,1$  et la perte d'uranium par adsorption sur les surfaces des unités expérimentales, n'a pas été supérieure à 20 %.

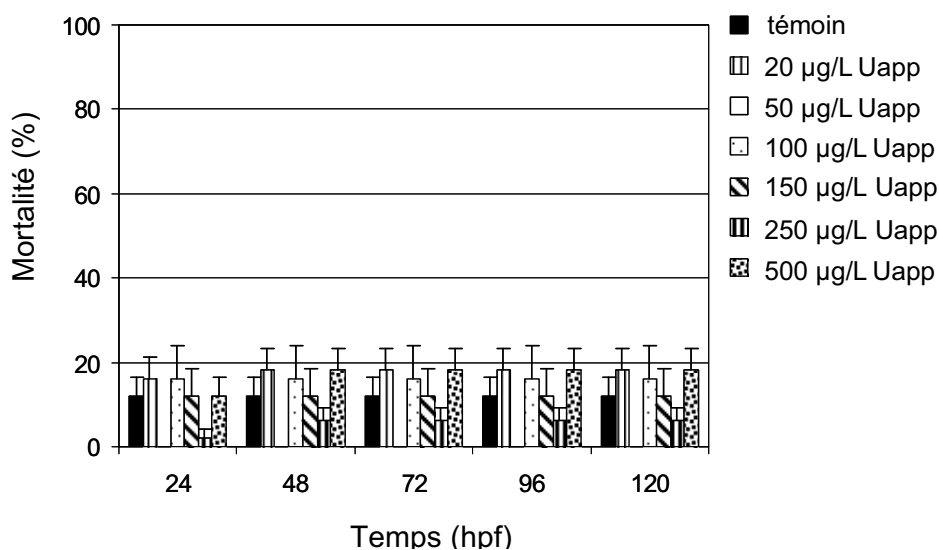
Pour l'expérimentation en système ouvert avec le stade adulte, l'ajustement des paramètres physico-chimiques a été réalisé tout au long de l'expérience. En effet le flux quotidien d'eau nécessitait un réajustement des concentrations en uranium appauvri dans les unités expérimentales afin que la pression de contamination soit constante tout au long de l'exposition. Quant au pH, des ajouts d'acide nitrique dilué (négligeables par rapport à la concentration initiale en nitrate du milieu expérimental) ont été réalisés par pompe péristaltique afin de le maintenir le plus constant possible ( $\text{pH } 6,5 \pm 0,2$ ).

L'absence de dérive significative des conditions physico-chimiques durant l'ensemble des expériences présentées, ainsi que le maintien des concentrations d'exposition en uranium à des valeurs proches ( $\pm 25\%$  max) des concentrations nominales, permettent de représenter l'ensemble des résultats par rapport aux concentrations nominales d'exposition.

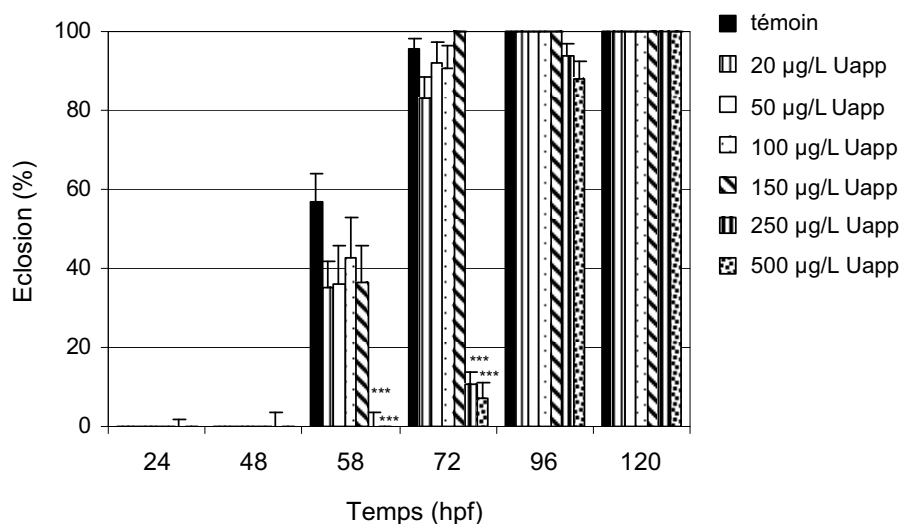
De la même façon pour l'irradiation  $\gamma$  externe, les résultats sont représentés par rapport aux débits de doses théoriques. En effet, les mesures réalisées par TLD (Gilbin *et al.*, 2008) ont montré qu'il n'y avait pas plus de 19% de variation entre les débits de doses mesurés et théoriques.

Conditions expérimentales		Concentrations nominales ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentrations mesurées ( $\mu\text{g/L}$ )	
<i>Test embryon (5j)</i>	témoin	0	n.d.	
	Uapp	20	17,7 (0,6)	
		50	52,9 (2,1)	
		100	103,8 (3,8)	
		150	138,2 (4,3)	
		250	215,2 (6,6)	
		500	428,7 (12,6)	
<i>Test embryon/larve (15j)</i>	témoin	0	n.d.	
	Uapp	20	16,8 (1,5)	
		250	212 (3,6)	
		$^{233}\text{U}$	20	16,8 (0,2)
		100	87 (1,5)	
<i>Test adulte (20j)</i>	témoin	0	n.d.	
	Uapp	20	femelle	19,7 (2,6)
			mâle	25,4 (2,3)
		250	femelle	213 (7)
			mâle	252,3 (8)

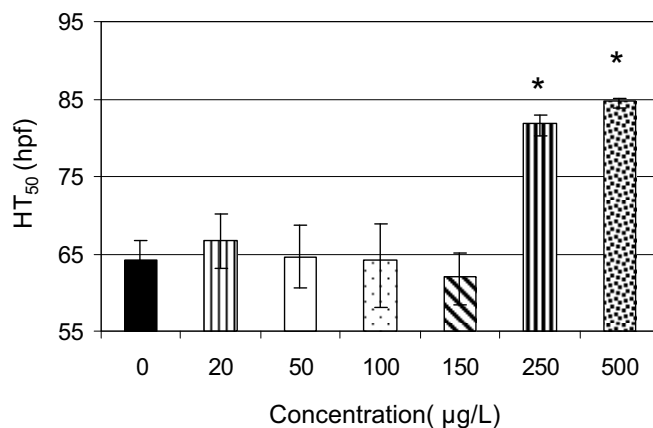
Résumé des concentrations d'exposition pour chaque expérience (moyenne  $\pm$  ES ; n=3 par jour).



**Figure 24 :** Effet de l'uranium appauvri sur l'évolution du pourcentage de mortalité des œufs exposés pendant 120h. (Moyenne ± ES ; n = 2 avec 25 œufs par réplicats).



**Figure 25 :** Effet de l'uranium appauvri sur le pourcentage d'éclosion des œufs exposés pendant 120 h. (Moyenne ± ES ; n = 2). Test de Chi2, (\*\*\*) Différence significative par rapport au témoin pour p < 0,001.



**Figure 26 :** Effet de l'uranium appauvri sur le temps d'éclosion moyen HT50 (IC 95%). (\*) Différence significative par rapport au témoin basé sur le non recouvrement des intervalles de confiance.

## 1. Effets des radionucléides sur les traits d'histoire de vie de *D. rerio*

### 1.1 Test sur les stades de vie précoces

#### 1.1.1 Test embryon

##### 1.1.1.1 Exposition à l'uranium appauvri

Stade de vie Scénarios	Œuf	Pro larve	Adulte
Contamination interne à l' Uapp	0, 20, 50, 100, 150, 250 et 500 µg/L	0, 20, 250 µg/L	0, 20, 250 µg/L
Contamination interne à l' <sup>233</sup> U	0, 20, 100 µg/L	0, 20, 100 µg/L	
Irradiation $\gamma$ externe	0, 1, 10, 100, 1000 mGy/j	0, 1, 10, 100, 1000 mGy/j	

##### a) Mortalité

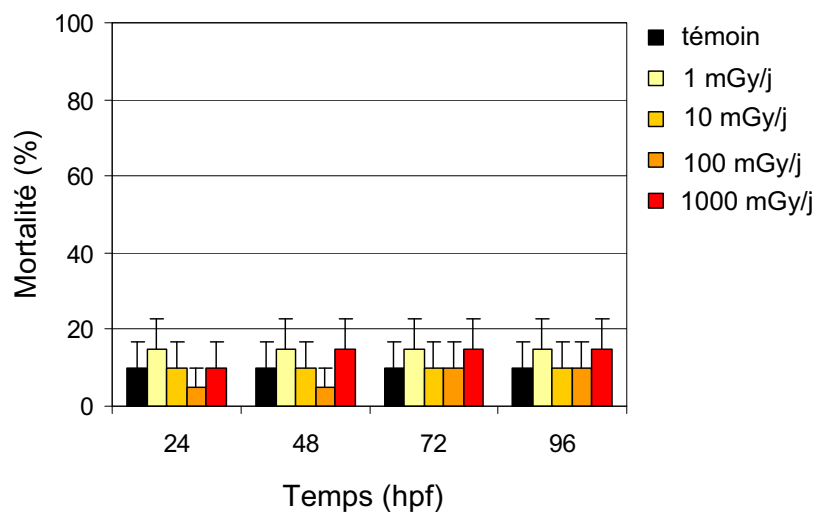
Dans le test embryon balayant une large gamme de concentration, le taux de mortalité moyen n'a pas dépassé 20 % pour toutes les concentrations d'exposition comme le montre la Figure 24. Aucune différence significative entre les conditions n'a été observée.

##### b) Développement embryonnaire

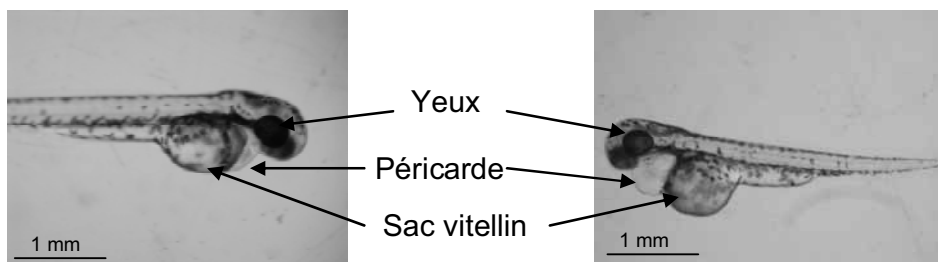
Aucune perturbation du développement embryonnaire n'a été observée pendant cette expérience, quel que soit le temps d'observation. Les comptages de battements cardiaques n'ont pas non plus révélé d'effet de l'uranium appauvri sur ce critère à 48 hpf.

##### c) Ecllosion

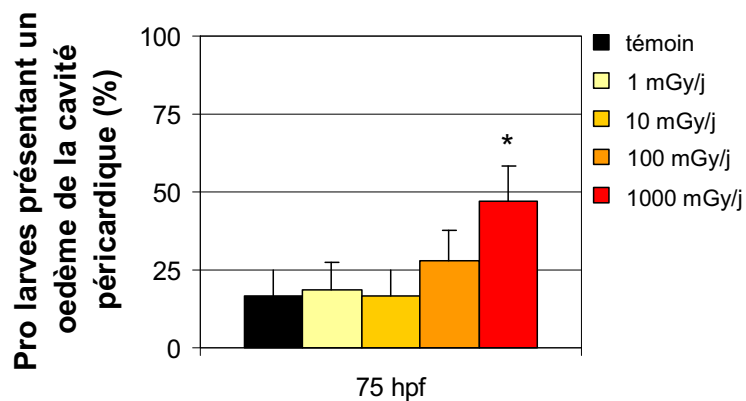
La Figure 25 montre les résultats de pourcentage d'écllosion pour la gamme de concentrations d'uranium appauvri testée pour chaque temps d'observation. Le laps de temps entre le début et la fin de l'écllosion est de 48h. L'uranium a un effet sur la vitesse d'écllosion. Seules les fortes concentrations (250 et 500 µg/L) montrent des pourcentages d'écllosion statistiquement différents du témoin à 58 et 72 hpf (test de Chi<sup>2</sup>, p < 0,001). La Figure 26 montre les valeurs de HT<sub>50</sub> calculés pour chaque condition. Le temps d'écllosion moyen (HT<sub>50</sub> (95 % CI)) calculé pour la condition témoin est de 64,2 hpf (61,7-66,8).



**Figure 27 :** Effet de l'irradiation  $\gamma$  externe sur l'évolution du pourcentage de mortalité des œufs exposés pendant 96 h. (Moyenne  $\pm$  ES ; n = 5).



**Figure 28 :** Photographie de larves écloses (75 hpf) témoin à gauche et condition 1000 mGy/j à droite.



**Figure 29 :** Effet de l'irradiation  $\gamma$  externe sur le pourcentage de larve présentant un œdème de la cavité péricardique (Moyenne  $\pm$  ES, n= 5). ANOVA (\*) différence significative par rapport au témoin  $p < 0,05$ .

Le processus d'éclosion n'est pas synchrone ce qui peut expliquer de légères différences mais ces données sont compatibles avec celles de la littérature (Frayse *et al.*, 2006). L'exposition à l'uranium appauvri provoque un retard dans l'éclosion, significatif à partir de 250 µg/L (basé sur le non recouvrement des intervalles de confiances). Le retard d'éclosion par rapport au témoin est estimé à 27 et 32 %, respectivement pour les concentrations 250 et 500 µg/L (HT<sub>50</sub> de 81,76 (80,5 ; 83) et HT<sub>50</sub> de 84,64 (84 ; 85,5)).

### 1.1.1.2 Exposition à l'irradiation $\gamma$ externe

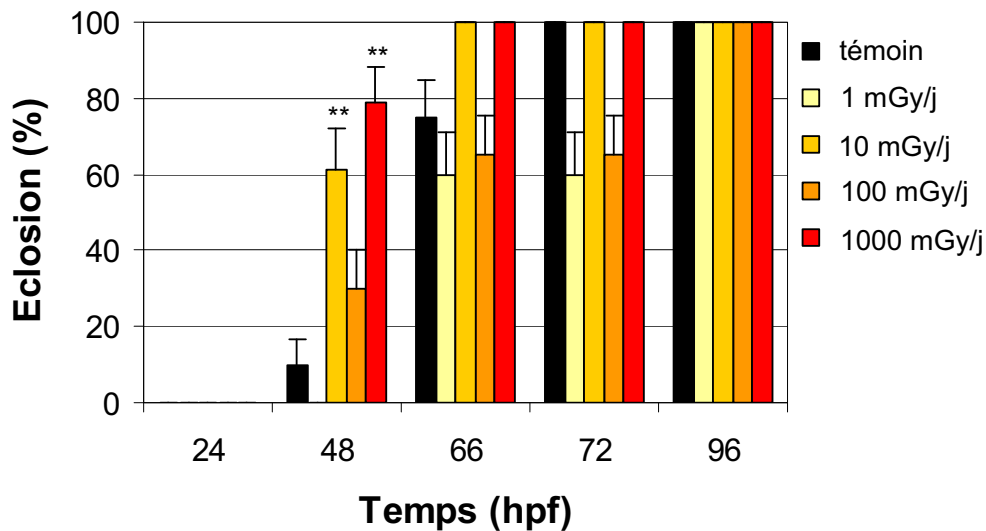
Stade de vie Scénarios	Œuf	Pro larve	Adulte
Contamination interne à l' Uapp	0, 20, 50, 100, 150, 250 et 500 µg/L	0, 20, 250 µg/L	0, 20, 250 µg/L
Contamination interne à l' <sup>233</sup> U	0, 20, 100 µg/L	0, 20, 100 µg/L	
Irradiation $\gamma$ externe	0, 1, 10, 100, 1000 mGy/j	0, 1, 10, 100, 1000 mGy/j	

#### a) Mortalité

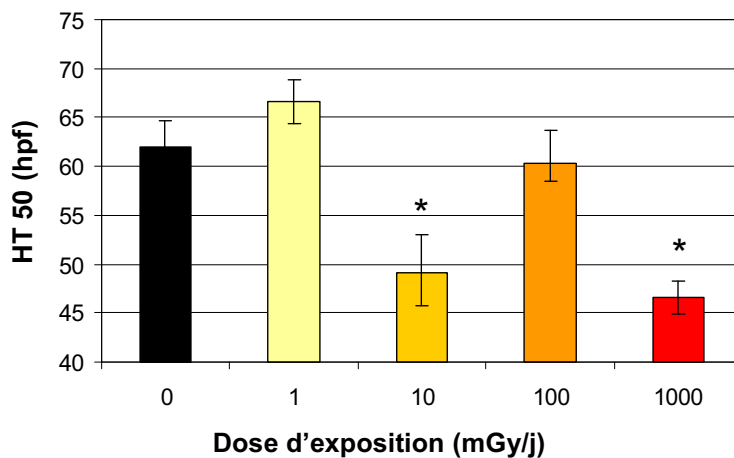
Dans ce test la mortalité moyenne n'a jamais dépassé 20 % et il n'y a aucune différence significative entre les différentes conditions (Figure 27).

#### b) Développement embryonnaire

Lors d'un seul test préliminaire, une anomalie du développement a été mise en évidence au niveau de la cavité péricardique à 75 hpf (Figure 28) pour les larves exposées à l'irradiation  $\gamma$  externe. Toutefois cette anomalie n'a été visible que dans un test et était présente également chez les témoins (Figure 29). Cette anomalie n'a pas engendré de mortalité accrue et était inférieure à 20 %.



**Figure 30 :** Effet de l'irradiation  $\gamma$  externe sur le pourcentage d'éclosion des œufs exposés pendant 96h. (Moyenne  $\pm$  ES ; n = 5). Test de Chi2, (\*\*) Différence significative par rapport au témoin pour  $p < 0,01$ .

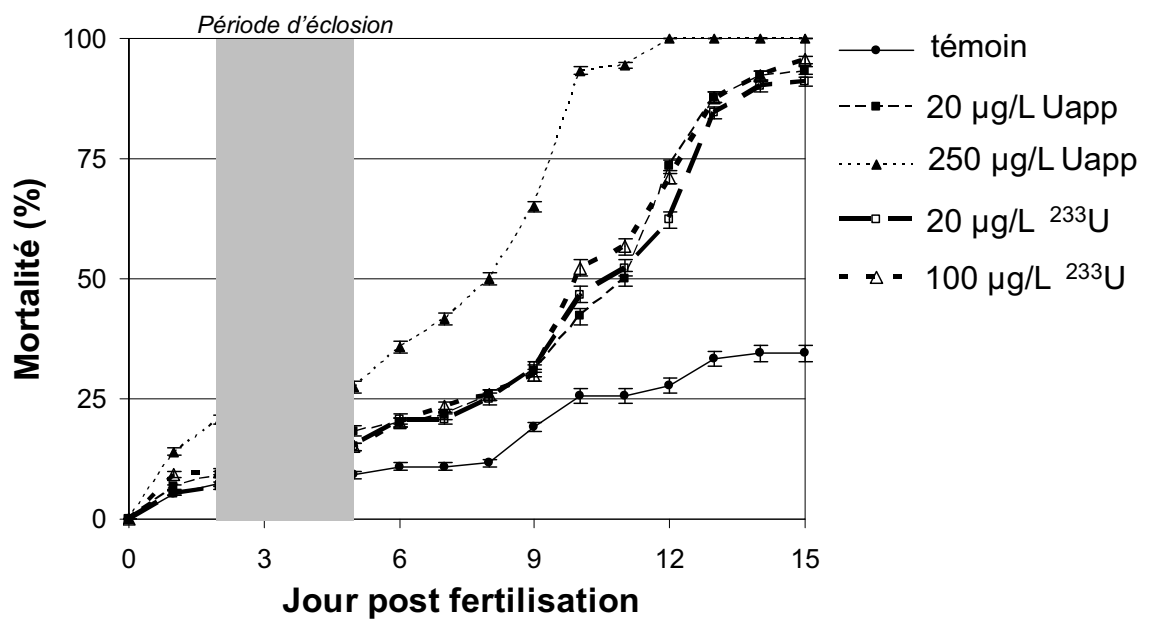


**Figure 31 :** Effet de l'irradiation  $\gamma$  externe sur le temps d'éclosion moyen  $HT_{50}$  (IC 95%). (\*) Différence significative par rapport au témoin base sur le non recouvrement des intervalles de confiance.

*c) Eclosion*

La Figure 30 présente les résultats de pourcentage d'éclosion pour les œufs exposés à la gamme d'irradiation  $\gamma$  externe pour chaque temps d'observation. Ces résultats montrent que tous les œufs sont éclos à 96 hpf et que ceux exposés à l'irradiation gamma présentent des cinétiques d'éclosion plus rapides que les témoins. Les conditions 10 et 1000 mGy/j présentent un pourcentage d'éclosion statistiquement différent du témoin à 48 hpf (test de Chi 2,  $p < 0,01$ ).

La Figure 31 montre les valeurs de temps d'éclosion moyen  $HT_{50}$  calculées pour chaque condition. L'exposition à l'irradiation externe provoque une accélération de l'éclosion, significative à 10 et 1000 mGy/j respectivement de 20,8 à 24,8 % de temps en moins ( $HT_{50} = 49,05$  (47,4 ; 51) et  $HT_{50} = 46,57$  (44,9 ; 47,38) que le témoin ( $HT_{50} = 61,97$  (58,8 ; 64,61)).



**Figure 32 :** Effet de l'uranium appauvri et de l'uranium 233 sur la mortalité des embryons et des larves pendant 15 jours. (Moyenne  $\pm$  ES ; n = 3).



## 1.1.2 Test embryon/larve

## 1.1.2.1 Expositions à l'uranium appauvri et à l'uranium 233






Stade de vie Scénarios	Œuf	Œuf /Pro larve	Adulte
Contamination interne à l' U <sub>app</sub>	0, 20, 50, 100, 150, 250 et 500 µg/L	0, 20, 250 µg/L	0, 20, 250 µg/L
Contamination interne à l' <sup>233</sup> U	0, 20, 100 µg/L	0, 20, 100 µg/L	
Irradiation $\gamma$ externe	0, 1, 10, 100, 1000 mGy/j	0, 1, 10, 100, 1000 mGy/j	

Pour cette expérience les concentrations d'exposition ont été réduites au nombre de deux. En effet à la vue des résultats du test œuf, les concentrations 20 et 250 µg/L ont pu être retenues comme respectivement, la concentration la plus faible qui n'induisait pas d'effet sur le critère le plus significatif au test embryon (le taux d'éclosion) et la concentration la plus faible qui induisait un effet significatif sur ce même critère. En parallèle, des concentrations d'uranium 233 ont été testées : 20 µg/L comme pour l'uranium appauvri et 100 µg/L (concentration maximale manipulable en condition d'acidité identique à l'uranium appauvri). Les paramètres d'éclosion et du développement embryonnaire ont été suivis afin de pouvoir comparer les effets de l'uranium appauvri et l'uranium 233 sur une même expérience.

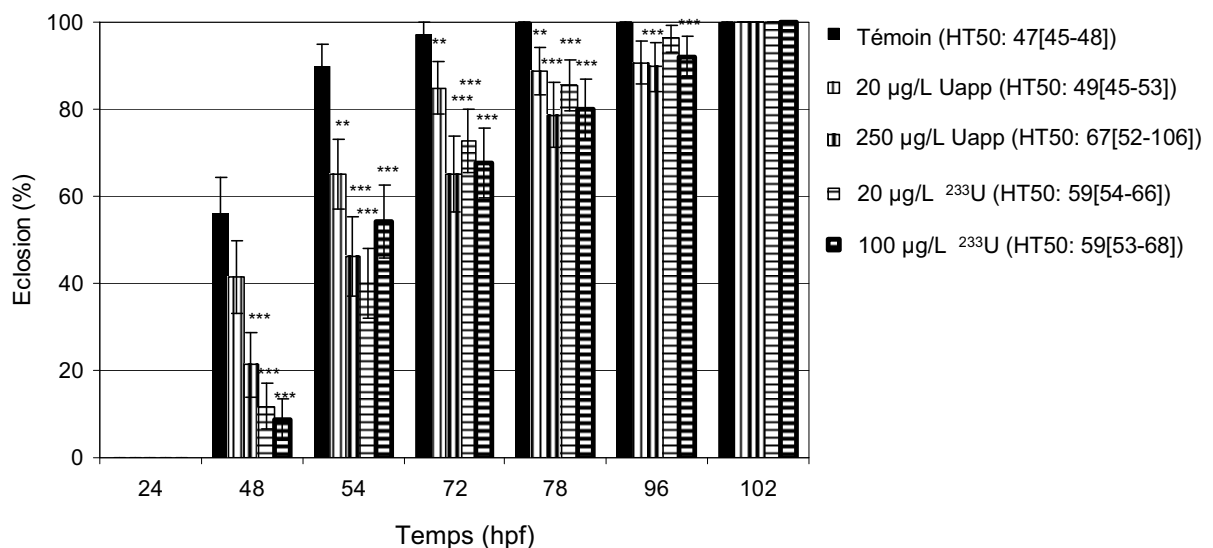
## a) Mortalité

La Figure 32 montre l'évolution du pourcentage de mortalité des larves jusqu'à 15 jours post fertilisation pour les 3 conditions d'exposition. Ce pourcentage de mortalité n'excède pas 20 % les 2 premiers jours comme dans le test embryon, mais il augmente avec le temps et principalement après la période d'éclosion (à partir de 5 jours). Cette augmentation se voit aussi dans la condition témoin, particulièrement à partir de 9 jours et atteint 34 % au 15<sup>ème</sup> jour. Ces temps correspondent à la période à laquelle les larves commencent à avoir une alimentation extérieure autonome, qui est une période sensible.

Les pourcentages de mortalité pour les larves exposées à 250 µg/L sont significativement différents du témoin pour plusieurs temps d'observation: 3, 4, 9 et 15 jours (Test Chi 2,  $p < 0,01$  pour tous les temps). A cette concentration les pourcentages de mortalité sont également différents des 3 autres conditions au temps 9 jours (Test Chi 2,  $p < 0.01$ ). Au temps 15 jours, les pourcentages de mortalité des 4 conditions exposées sont différents du témoin (Test Chi 2,  $p < 0.01$  pour tous) et quasiment 95% des larves sont mortes (seulement 34 % chez les témoins).

	Temps d'observation 24 hpf	Pourcentage d'œuf avec la queue détachée du sac vitellin
<b>Témoin</b>		<b>96 %</b>
<b>Uapp</b>	20 µg/L 	<b>100 %</b>
	250 µg/L 	<b>100 %</b>
<b><sup>233</sup>U</b>	20 µg/L 	<b>8 %</b>
	100 µg/L 	<b>0 %</b>

**Figure 33 :** Photographie du développement de la queue des embryons de 24h lors de l'exposition à l'uranium appauvri et <sup>233</sup>U associées au pourcentage d'œufs avec la queue détachée. Echelle: 1 mm.



**Figure 34 :** Effet de l'uranium appauvri et de l'uranium <sup>233</sup>U sur les pourcentages d'éclosion. Moyenne ± ES ; n = 3. Les HT<sub>50</sub> (IC 95 %) sont notés dans la légende pour chaque condition. Test de Chi, avec (\*\*) (\*\*\*) Différence significative par rapport au témoin avec respectivement p < 0,01 et p < 0,001.

*b) Développement embryonnaire*

La Figure 33 montre les photographies d'embryon à 24 hpf pour chaque condition, accompagnées du pourcentage d'œuf qui ont la queue détachée du sac vitellin au même temps. Ces résultats montrent un effet spécifique de l'uranium  $^{233}\text{U}$  sur ce critère puisque 8 % et 0 % des œufs exposés respectivement à 20  $\mu\text{g/L}$  à 100  $\mu\text{g/L}$  présentent un détachement normal de la queue. Chez les œufs témoins et exposés à l'uranium appauvri, la quasi-totalité des œufs a la queue détachée du sac vitellin.

*c) Ecllosion*

De la même façon que pour l'expérience embryon précédente, le pourcentage d'éclosion a été suivi au cours du temps et des valeurs de  $\text{HT}_{50}$  ont pu être calculées (Figure 34).

L'éclosion a été suivie toutes les 24h et des temps additionnels ont été rajoutés (54, 78 et 102 hpf). Pour la condition témoin, les œufs ont commencé à éclore à 48hpf (56 %) et ont terminé à 78 hpf, ce qui est légèrement plus tôt que dans le test embryon précédent mais toujours en accord avec la littérature: l'éclosion n'est pas un processus synchrone et quelques différences peuvent apparaître (**Fraysse et al., 2006**).

Pour les conditions exposées à l'uranium appauvri, l'éclosion commence aussi à partir de 48 hpf mais se termine à 102 hpf. Les pourcentages d'éclosion à la concentration 20  $\mu\text{g/L}$  d'uranium appauvri sont statistiquement différents du témoin aux temps 54, 72 et 78 hpf mais aussi de la concentration 250  $\mu\text{g/L}$  à 48, 54, 72 hpf ; de la concentration 20  $\mu\text{g/L}$  d'  $^{233}\text{U}$  à 48, 54 hpf et de la concentration 100  $\mu\text{g/L}$  d'  $^{233}\text{U}$  à 48, 72 hpf (Test Chi 2,  $p < 0.01$ ).

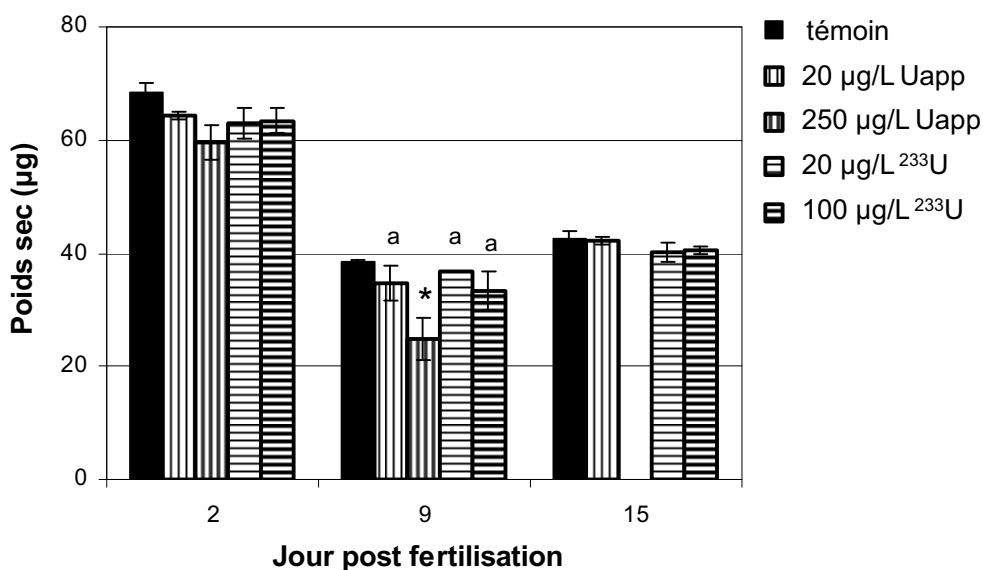
Enfin la concentration 250  $\mu\text{g/L}$  montre des différences significatives par rapport au témoin à tous les temps (Test Chi 2,  $p < 0,001$  pour tous les temps).

Comme dans le test embryon précédent, la concentration 20  $\mu\text{g/L}$  présente le plus faible retard d'éclosion (4 %) comparé au témoin. Par contre pour la concentration 250  $\mu\text{g/L}$  on retrouve un  $\text{HT}_{50}$  significativement différent du témoin avec un retard de 42%. Les deux conditions d'exposition à l'  $^{233}\text{U}$  montrent également un retard qui est de 25%.

On note que le  $\text{HT}_{50}$  de la concentration 100  $\mu\text{g/L}$  d'  $^{233}\text{U}$  est différent du témoin alors que dans le test embryon le  $\text{HT}_{50}$  de la concentration 100  $\mu\text{g/L}$  uranium appauvri n'était pas différent du témoin.

		Longueur totale (mm)	
		9 jours	15 jours
Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )		Moyenne $\pm$ ES (n=30)	Moyenne $\pm$ ES
0		4,37 $\pm$ 0,04	4,75 $\pm$ 0,02 (n=30)
Uapp	20	4,00 $\pm$ 0,05***	4,49 $\pm$ 0,07 (n=6) ***
	250	3,75 $\pm$ 0,07***a	-
<sup>233</sup> U	20	3,89 $\pm$ 0,02***	4,37 $\pm$ 0,04 (n=8) ***
	100	3,80 $\pm$ 0,03***a	4,36 $\pm$ 0,13 (n=4) ***

**Tableau 14 :** Effets de l'uranium appauvri et <sup>233</sup>U sur la taille totale des larves à 9 et 15 jours post fertilisation. ANOVA Kruskal Wallis (\*\*\*) différence significative par rapport au témoin pour  $p < 0,001$ ; (a) différence significative par rapport à la concentration 20  $\mu\text{g/L}$  pour  $p < 0,05$ .



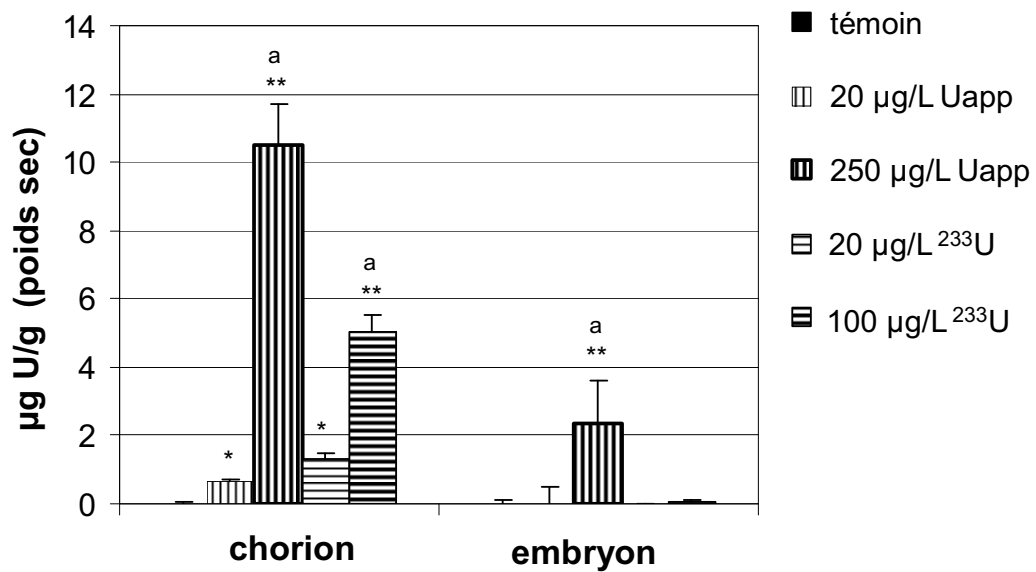
**Figure 35 :** Effets de l'uranium appauvri sur le poids sec à 2 jours (embryons déchorionés), 9 et 15 jours (larves). Moyenne  $\pm$  ES ; n = 30 à 2 et 9 jours et à 15 jours : témoin : n = 30, 20  $\mu\text{g/L}$  : n = 8. ANOVA (\*) différence statistique par rapport au témoin pour  $p < 0,05$  et (a) par rapport à la concentration 250  $\mu\text{g/L}$  pour  $p < 0,05$ .

*d) Croissance*

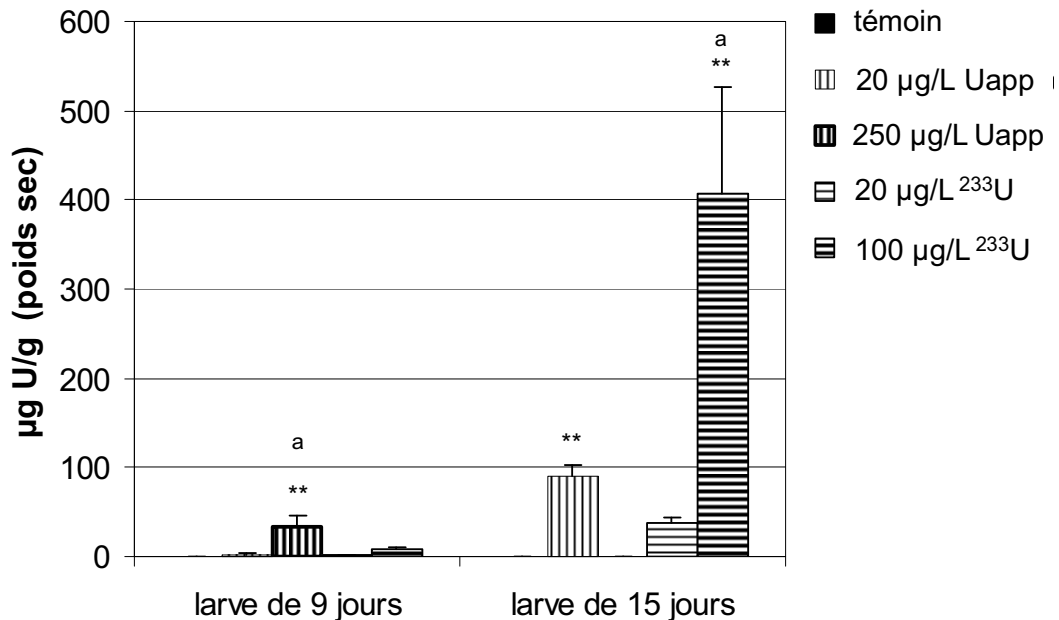
Le Tableau 14 montre les résultats concernant les mesures de longueurs totales des larves à 2 temps (9 et 15 jours). Au 9<sup>ème</sup> jour, la longueur totale des larves exposées est significativement inférieure pour les 4 concentrations d'uranium testées (appauvri et 233) par rapport au témoin. De plus, une différence statistique est à noter entre les deux concentrations pour chaque composition d'uranium (appauvri et 233). Le faible nombre d'échantillon au temps 15 jours est dû à l'importante mortalité observée. Cependant la taille totale est toujours significativement inférieure au témoin, pour les larves restantes des 3 conditions d'uranium.

La Figure 35 montre les résultats de poids sec des organismes à 2 jours (embryons déchorionés) 9 et 15 jours (larves). Pour la condition témoin le poids sec moyen diminue de 43 % entre 2 et 9 jours (respectivement  $68,6 \pm 1,5 \mu\text{g}$  poids sec et  $38,5 \pm 0,2 \mu\text{g}$  poids sec), baisse due à la consommation de la réserve vitelline, et entre 9 et 15 jours, augmente de 11 % ( $42,6 \pm 6,1 \mu\text{g}$  poids sec).

Dans le cas de l'exposition à l'uranium, la même tendance est observée. Ainsi, au 9<sup>ème</sup> jour, les larves de la condition 250  $\mu\text{g/L}$  d'uranium appauvri, ont un poids sec significativement plus petit que celui des témoins (58 %) mais également plus petit que celui des 3 autres conditions d'uranium.



**Figure 36 :** Concentration d'uranium mesurée ( $\mu\text{g U/g}$  poids sec) au niveau de l'embryon et du chorion après 2 jours d'exposition. Moyenne  $\pm$  ES ;  $n = 30$ . ANOVA Kruskal Wallis, (\*) (\*\*) différence significative par rapport au témoin avec  $p < 0,05$  et  $p < 0,01$  et (a) différence significative avec  $20 \mu\text{g/L}$  avec  $p < 0,05$ .



**Figure 37 :** Concentration d'uranium mesurée chez les larves à 9 et 15 jours. Moyenne  $\pm$  ES ;  $n = 30$  à 9j et à 15j ; témoin :  $n = 30$ ,  $20 \mu\text{g/L}$  :  $n = 6$ ). ANOVA Kruskal Wallis, (\*\*) différence significative par rapport au témoin avec  $p < 0,01$  et (a) différence significative avec  $20 \mu\text{g/L}$  avec  $p < 0,05$ .

*e) Bioaccumulation de l'uranium par les œufs et larves :*

La bioaccumulation de l'uranium appauvri par les stades de vie précoces a été mesurée dans l'expérience embryon –larve, et aux deux concentrations d'exposition, 20 et 250 µg/L.

La Figure 36 montre les résultats relatifs au stade œuf, au niveau de l'embryon et du chorion après dissection, pour les 3 conditions tandis que la figure 37 montre les résultats pour le stade larve (corps entier) après 9 et 15 jours d'exposition.

Une adsorption significative d'uranium a été mesurée dans le chorion avec la concentration d'exposition. Une différence significative est mise en évidence entre les deux concentrations d'exposition pour l'uranium appauvri et l'<sup>233</sup>U. Pour l'embryon, seule la plus forte concentration d'uranium appauvri montre une accumulation significative différente du témoin et des 3 autres conditions.

Les concentrations en U mesurées dans le chorion sont proportionnelles aux concentrations d'exposition. En effet pour l'uranium appauvri, les ratios entre les concentrations d'exposition (250/20 = 12,5) et bioaccumulées sur le chorion (16,8) sont très proches. Ces résultats semblent indiquer que l'accumulation de l'U sur le chorion est un processus passif (adsorption), en équilibre rapide avec la concentration d'exposition.

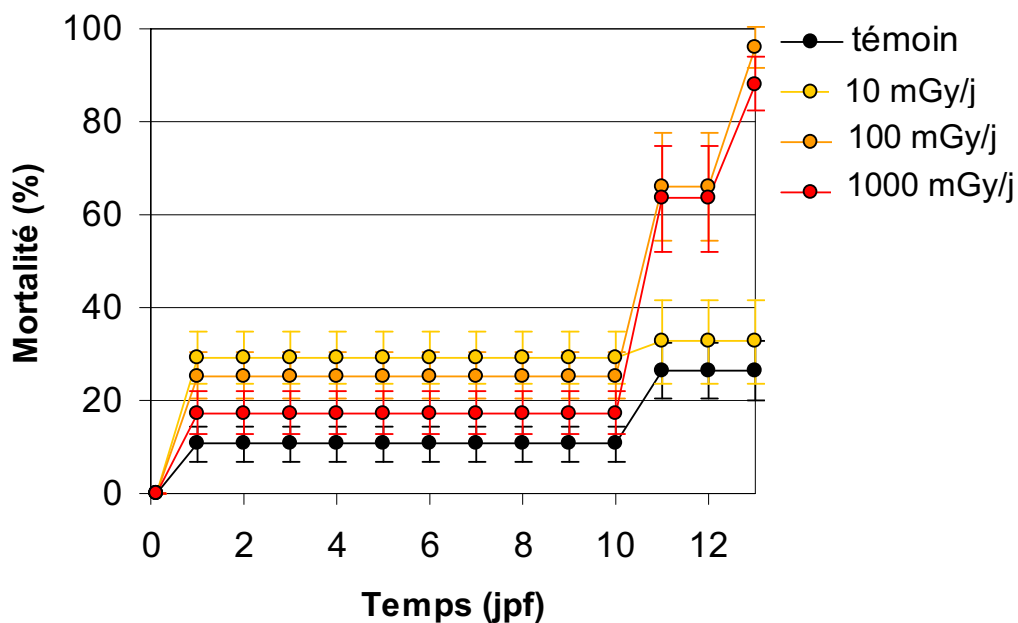
La Figure 37 présente l'accumulation d'U dans les larves après 9 et 15 jours d'exposition (l'absence de mesure à 15 jours pour la concentration 250 µg/L d'uranium appauvri est due à la mortalité des larves). Pour le temps 9 jours, l'accumulation d'uranium appauvri augmente avec la concentration d'exposition et est significativement différente du témoin dans le cas de la concentration 250 µg/L.

Il y a de plus une augmentation de l'accumulation de l'uranium entre les temps 9 et 15 jours :

- pour les concentrations 20 µg/L d'uranium appauvri et d'<sup>233</sup>U : 30 fois plus à 15 jours
- pour 100 µg/L d'<sup>233</sup>U: 44 fois plus à 15 jours.

débit de dose (mGy/j)	calcul sans les descendants			calculs avec prise en compte des descendants			
	ddd interne	dddexterne	ddd totale	ddd interne	dddexterne	ddd totale	
témoin	2,99E-04	2,90E-09	<b>2,99E-04</b>	1,30E-03	2,15E-08	<b>1,30E-03</b>	
U <sub>app</sub>	20 µg/L	1,43E-03	5,10E-07	<b>1,43E-03</b>	1,48E-03	2,04E-06	<b>1,48E-03</b>
	250 µg/L	3,18E-02	6,37E-06	<b>3,18E-02</b>	3,28E-02	2,55E-05	<b>3,32E-02</b>
U233	20 µg/L	78,92	0,01	<b>78,94</b>	80,07	0,01	<b>80,08</b>
	100 µg/L	286,05	0,07	<b>286,12</b>	290,20	0,07	<b>290,27</b>

**Tableau 15 :** Débits de dose (mGy/j) associés aux valeurs de bioaccumulation pour les œufs de 48 hpf exposés à l'uranium appauvri et l'<sup>233</sup>U lors du test embryon/larve.



**Figure 38 :** Effet de l'irradiation  $\gamma$  externe sur la mortalité des œufs et larves exposés pendant 15 jours. (Moyenne  $\pm$  ES ; n = 5).



## f) Conversion en débit de dose

La conversion des données de bioaccumulation en débit de dose a été réalisée au stade œuf 48 hpf pour permettre la comparaison des différentes expositions pour un même critère d'effet étudié selon deux hypothèses majeures de prise en compte ou non des descendants de l'uranium (Tableau 15).

Les débits de dose sont donc de l'ordre de  $1,4 \cdot 10^{-3}$  à  $3,3 \cdot 10^{-2}$  mGy/j pour les œufs exposés à l'uranium appauvri, et de 80 à 290,2 mGy/j lorsqu'ils sont exposés à l'uranium 233 et  $1,3 \cdot 10^{-3}$  chez les organismes témoins.

On notera que selon si on prend en compte les activités des chaînes de descendants de l'uranium, le débit de dose totale est affecté. Dans notre cas, la non prise en compte des descendants de l'uranium engendre une sous estimation du débit de dose. Ainsi le débit de dose des témoins (calculé à partir des descendants de l'uranium naturel) devient très proche du débit de dose chez les organismes exposés à 20 µg/L d'uranium appauvri et de la valeur de bruit de fond ( $2,4 \cdot 10^{-4}$  à 0,144 mGy/j d'après **Gómez-Ros et al., 2004**).

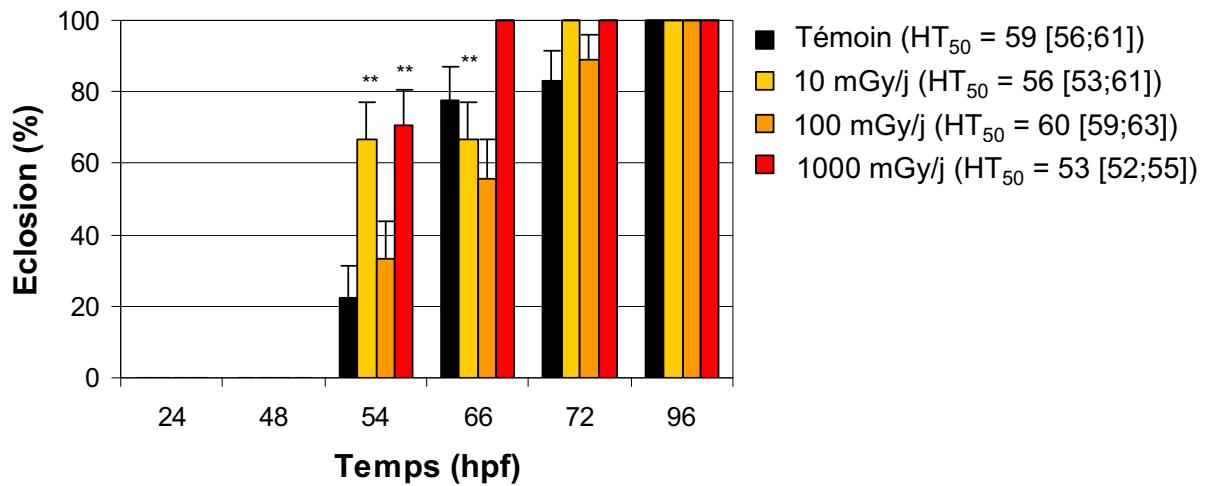
1.1.2.2 Exposition à l'irradiation  $\gamma$  externe

Stade de vie Scénarios	Œuf	Œuf /Pro larve	Adulte
Contamination interne à l' Uapp	0, 20, 50, 100, 150, 250 et 500 µg/L	0, 20, 250 µg/L	0, 20, 250 µg/L
Contamination interne à l' <sup>233</sup> U	0, 20, 100 µg/L	0, 20, 100 µg/L	
Irradiation $\gamma$ externe	0, 1, 10, 100, 1000 mGy/j	0, 1, 10, 100, 1000 mGy/j	

Pour ce test l'exposition à 1 mGy/j a été arrêtée au bout de 2 jours à cause d'un problème expérimental dans l'enceinte d'irradiation.

## a) Mortalité

La Figure 38 montre l'évolution du pourcentage de mortalité des larves jusqu'à 13 jours post fertilisation pour les 4 conditions d'exposition. Ce pourcentage de mortalité n'excède pas 20 % chez les témoins jusqu'à 10 jours puis augmente jusqu'à 30 % à 13 jours. Alors que peu de mortalité était notée dans l'expérience embryon, ces résultats montrent une mortalité dès le second jour pour les conditions exposées à l'irradiation  $\gamma$  externe qui augmente fortement dès le 10<sup>ème</sup> jour. Ces temps correspondent à la période à laquelle les larves commencent à avoir une nourriture extérieure autonome, qui est apparemment une période sensible.



**Figure 39 :** Effet de l'irradiation  $\gamma$  externe sur les pourcentages d'éclosion. Moyenne  $\pm$  ES ; n = 5. Les HT50 (IC 95 %) sont notés dans la légende pour chaque condition. Test de Chi2, (\*\*) différence significative par rapport au témoin pour  $p < 0,01$ .

Les pourcentages de mortalité pour les larves exposées à 100 et 1000 mGy/j sont significativement différents du témoin et de la condition 10 mGy/j à partir du 11<sup>ème</sup> jour (Test Chi 2,  $p < 0.01$  pour tous les temps). Au temps 13 jours, les pourcentages de mortalité pour ces deux conditions, atteignent quasiment 100 % (96 et 88%) alors qu'ils ne sont que de 26 % chez les témoins et 2 % pour les larves exposées à 10 mGy/j.

#### *b) Développement embryonnaire*

Aucun effet n'a été enregistré pour le développement et les battements cardiaques.

#### *c) Ecllosion*

De la même façon que pour l'expérience embryon, ce critère a été suivi au cours du temps et des valeurs de  $HT_{50}$  ont pu être calculées (Figure 39).

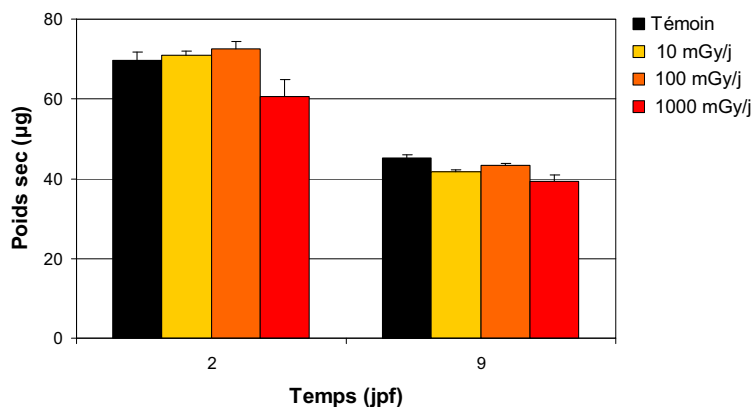
L'écllosion a été suivie toutes les 24h et des temps additionnels ont été rajoutés (54 et 66 hpf). L'écllosion a commencé à 54 hpf (22 %) et s'est terminée à 96 hpf pour les témoins.

Pour les conditions exposées à l'uranium appauvri, l'écllosion commence aussi à partir de 54 hpf mais se termine plus tôt pour les œufs exposés à 1000 mGy/j (66 hpf) et à 10 mGy/j (72 hpf). Les pourcentages d'écllosion pour la condition 1000 mGy/j sont significativement différents du témoin au temps 54 et 66 hpf mais aussi de la condition 100 mGy/j aux mêmes temps (Test Chi 2,  $p < 0.01$ ). La condition 10 mGy/j est différente du témoin à 54 et 66 hpf également et aussi de la condition 100 mGy/j à 54 hpf (Test Chi 2,  $p < 0.01$ ).

Cependant seule la condition 1000 mGy/j montre un  $HT_{50}$  significativement différent du témoin (basé sur le non recouvrement des intervalles de confiances) signifiant une accélération de l'écllosion de 10%.

Longueur totale (mm)	
9 jours	
Condition (mGy/j)	Moyenne $\pm$ ES (n=5)
0	4,26 $\pm$ 0,06
10	4,34 $\pm$ 0,14
100	4,30 $\pm$ 0,22
1000	4,13 $\pm$ 0,12

**Tableau 16 :** Effets de l'irradiation  $\gamma$  externe sur la taille totale des larves à 9 jours post fertilisation.



**Figure 40 :** Effets de l'irradiation  $\gamma$  externe sur le poids sec à 2 jours (embryons déchorionés), 9 jours (larves). Moyenne  $\pm$  ES ; n= 12.

*d) Croissance*

Le Tableau 16 montre les résultats concernant les mesures de longueurs totales des larves à 9 jours. La forte mortalité à partir de 13 jours n'a pas pu permettre la mesure à 15 jours. Cependant aucune différence significative n'apparaît entre les conditions exposées à l'irradiation et le témoin. La Figure 40 montre les résultats de poids sec des organismes à 2 jours (embryons déchorionés) et 9 jours (larves). Pour la condition témoin le poids sec moyen diminue de 35 % entre 2 et 9 jours (respectivement  $69.65 \pm 2.11 \mu\text{g DW}$  et  $45.06 \pm 0.84 \mu\text{g DW}$ ), baisse due à la consommation de la réserve vitelline. Au 9ème jour, les conditions exposées à l'irradiation subissent approximativement la même diminution, mais il n'y a pas de différence significative entre les conditions exposées et le témoin.

### 1.1.3 Principales conclusions sur les effets aux stades de vie précoces

#### *1.1.3.1 Effets de l'uranium sur les stades de vie précoces*

- Les résultats de ces expériences montrent que l'exposition à l'uranium induit des effets significatifs sur les stades de vie précoces embryon et larve.
- Le test embryon/ larve permet de mettre en évidence un *effet mortalité* significatif, particulièrement après l'étape d'éclosion. En effet la totalité des larves exposées à 250  $\mu\text{g/L}$  d'uranium appauvri est morte après 15 jours d'exposition et dans les trois autres concentrations les pourcentages de mortalité avoisinent 95 %. Notamment *dès la première concentration d'exposition, 20  $\mu\text{g/L}$  d'uranium appauvri*, 93 % de mortalité sont observés après 15 jours d'exposition. Pour le critère mortalité, le *stade larve* semble être *plus sensible que le stade embryon*, comme ceci a déjà été décrit par **Gatesoupe et al. (2001)**. Les travaux de **Holdway (1992)** ont indiqué que les larves de goujons mouchetés (*Morgunda morgunda*) fraîchement écloses étaient plus sensibles à l'exposition à l'uranium que des individus plus matures exposés à des concentrations supérieures à 560  $\mu\text{g/L}$ . Généralement les données des expériences de toxicité sur le cycle de vie indiquent que les stades embryon-larvaires peuvent être plus sensibles aux toxiques que les stades avancés (**McKim, 1985 ; Shazili et Pascoe, 1986**). Les larves se sont montrées plus sensibles que les embryons pour des métaux comme le cadmium (**Shazili et Pascoe, 1986 ; Eaton et al., 1978**). Les travaux de **Brinkman et Hansen (2007)** menés chez une espèce de salmonidé, indiquent également que le stade œuf, est généralement plus tolérant à l'exposition au métal que le stade de nage libre chez la larve.

- Dans nos travaux, l'exposition à l'uranium (appauvri et 233) a également affecté le *temps d'éclosion*, qui semble être un *critère précoce de l'exposition*. Comme pour la mortalité, le temps d'éclosion moyen a été affecté à la concentration 250 µg /L, montrant *un retard d'éclosion* maximum de 42% comparé au témoin. Le retard d'éclosion est un effet qui a déjà été observé chez diverses espèces de poissons d'eau douce exposées aux métaux tels que le cadmium, le cuivre, le nickel, et le plomb (Eaton *et al.*, 1978 ; Michibata, 1981 ; Shazili et Pascoe, 1986 ; Dave et Xiu, 1991 ; Pyle *et al.*, 2002 ; Fraysse *et al.*, 2006). Cependant, les retards d'éclosion n'ont pas toujours été suivis d'une forte mortalité au stade larve pour tous ces métaux. C'est le cas du cuivre, qui est supposé avoir un effet spécifique sur le processus d'éclosion, mais qui n'est pas corrélé avec un taux de mortalité larvaire élevé, tandis que l'inverse est observé pour le mercure (Dave et Xiu, 1991) et l'argent (Dethloff *et al.*, 2007). Pour ce dernier, Dethloff *et al.* (2007) ont observé qu'une exposition chronique des stades de vie précoces de la truite arc en ciel induisait une augmentation significative de la mortalité larvaire sans affecter le temps d'éclosion. La sensibilité des étapes précoces du cycle de vie dépend du mode d'action des composés auxquels les oeufs ou les larves sont exposés (Roex *et al.*, 2002).

- La corrélation entre les observations des retards d'éclosion et les résultats de la bioaccumulation d'U dans les œufs, laisse supposer que *la forte adsorption d'uranium à la surface de chorion* et non pas *la faible absorption dans l'embryon* est à l'origine de la perturbation du processus d'éclosion. Lors de l'éclosion, un processus du ramollissement de chorion se produit, permettant au chorion de devenir plus perméable aux activités protéolytiques (Kim et autres, 2005). Cette augmentation de perméabilité pourrait être à l'origine de l'entrée en faible quantité de l'uranium au niveau de l'œuf avant son contact direct avec le milieu. La faible accumulation a pu alors être suffisante pour affecter également le processus d'éclosion sans induire de mortalité à ce stade.

- La période suivant l'éclosion est connue pour être une étape sensible et critique due au début de la nutrition exogène des larves et de la nage libre (Shazili et Pascoe, 1986 ; Goolish *et al.*, 1999 ; Gatesoupe *et al.*, 2001). En effet, nous avons observé une *réduction significative de croissance des larves exposées*. *La biomasse* de toutes les populations exposées *a été réduite* pendant les 9 premiers jours comparés au témoin (surtout à 250 µg/L d'uranium appauvri). La forte perte de biomasse observée à 250 µg/L (diminution de 58 %

entre 2 et 9 jours vs 43 % chez les témoins) peut être attribuée à une consommation plus rapide des réserves du sac vitellin que chez les témoins, due au stress de l'exposition à l'uranium.

De plus, *la longueur totale des larves a été affectée par l'uranium*, les larves exposées sont plus petites que les témoins aux jours 9 et 15. Cependant, on notera que la croissance observée dans les groupes témoins diffère légèrement de celle rapportée dans des études précédentes (**Goolish et al., 1999 ; Bagatto et al., 2001**). Ces différences sont probablement liées à une différence de température de milieu et à la qualité du régime de l'alimentation utilisé dans ces études.

- Les *retards d'éclosion* et *de développement embryonnaire* ont été *davantage prononcés lors de l'exposition à l'isotope 233 à faible concentration* bien qu'aucune différence n'ait été observée entre les deux traitements en termes de mortalité. Dans ce cas ces résultats suggèrent que le *retard dans le détachement de queue de l'embryon* soit une *réponse spécifique à la radiotoxicité*. Bien que cet effet soit mineur comparé à ceux qui peuvent affecter globalement le développement embryonnaire (**Kimmel et al., 1995**), nous pouvons l'associer au retard d'éclosion probablement lié à un retard de développement non observé à notre échelle. En effet, les différences d'effets entre l'uranium 233 et l'uranium appauvri, observées à 20µg/L, peuvent être dans les deux cas reliés à l'éclosion. Le processus d'éclosion est une combinaison de mécanismes biochimiques et physiques, qui pourraient être affectés indépendamment par un effet radiologique et chimique. Le processus biochimique comporte la digestion de l'enveloppe de l'œuf (chorion) par des réactions enzymatiques choriolytiques (**De Gaspar et al., 1999**). Ces enzymes appartiennent à une famille de zinc-métalloprotéases, et leur fonction pourrait être perturbée par un effet chimiotoxique (uranium appauvri). Les réactions enzymatiques sont suivies d'un processus comportemental dans lequel le mouvement physique de l'embryon déchire le chorion (**von Westernhagen, 1988**).

Nos résultats laissent suggérer que le processus physique pourrait être perturbé par un effet radiologique traduit en termes de retard dans le détachement de queue puis en retard d'éclosion. Ces résultats pourraient suggérer également une certaine neurotoxicité, qui a déjà été proposée par **Barillet et al. (2007)** par l'observation de l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase chez le poisson zèbre exposé à 100 µg/L d'uranium.

### 1.1.3.2 Effets de l'irradiation $\gamma$ externe sur les stades de vie précoces:

- Nos travaux sur *l'irradiation des stades de vie précoces* ont montré que *le critère mortalité* semble le plus sensible pour le *stade larve* que pour *le stade œuf*. En effet alors que *la mortalité* n'excède pas 20 % au stade œuf, elle atteint rapidement 96 et 88 % au stade larve respectivement aux doses 100 et 1000 mGy/j.

Cet effet mortalité a déjà été mis en évidence, cependant à des débits de dose très supérieurs à ceux testés dans cette étude (supérieurs au Gy) (**Aizawa et al., 2004 ; McAleer et al., 2004**). Ces études ont montré dans le cas du poisson zèbre, que plus les œufs étaient exposés tôt dans le développement embryonnaire (2hpf), et plus ils étaient sensibles aux fortes doses (à partir de 2 Gy).

- Dans ces mêmes travaux, il a été observé à 72 hpf et dès 4 Gy, diverses malformations dont certaines de la cavité péricardique (**McAleer et al., 2004**). L'augmentation des *œdèmes péricardiques* est apparue dans nos travaux au cours d'un seul test et de façon significative à partir de 1000 mGy/j. Cependant cet effet n'a pas été retrouvé dans les tests embryon-larvaires. Cet effet pourrait être expliqué par le fait que les œufs ont été dans ce cas uniquement, exposés légèrement plus tôt que les autres tests et que la période de clivage peut être sensible à l'exposition gamma et jouer un rôle dans la formation de la cavité cardiaque. Des expositions débutant encore plus tôt que 3 hpf, pourraient apporter des informations sur ces critères.

- Comme pour l'uranium, l'étude du critère éclosion montre un effet significatif de l'exposition à l'irradiation. Cependant dans ce cas, c'est *une accélération de l'éclosion* qui est mise en évidence, de façon significative à 10 et 1000 mGy/j dans le test œuf et seulement à *1000 mGy/j* dans le test embryon/larve. Ce type d'effet est rare, puisque l'on trouve plus généralement des retards d'éclosion comme pour les travaux de **Aizawa et al. (2004)**. Cependant les travaux de **Miyachi et al. (2003)** ont montré qu'une exposition à de faibles doses de rayons X des embryons au stade blastula induisait une accélération de l'éclosion. En effet ces auteurs ont montré que l'accélération de l'éclosion se produisait *seulement à faible dose* et plus particulièrement quand l'exposition avait lieu pendant la période de blastula. C'est également le cas lors de nos expositions où les œufs ont été exposés le plus tôt possible après la fertilisation et avec un début d'exposition à 3 hpf. *La phase de blastula* est une phase de développement importante et semble jouer *un rôle dans le processus d'éclosion*.

Comme dans les travaux précédemment publiés, on ne trouve *pas de relation dose effet*

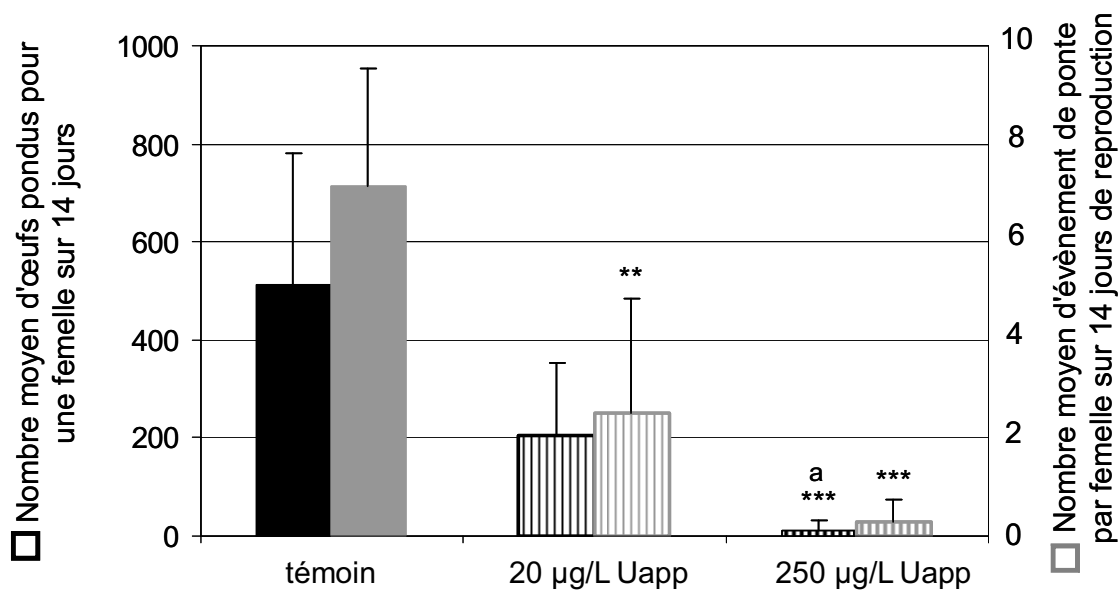


pour l'exposition à l'irradiation  $\gamma$ , la seule dose ayant engendré un effet significatif étant la plus forte. Il apparaîtrait que l'exposition à des faibles doses pourrait avoir un effet stimulateur sur des processus cellulaires. Il a d'ailleurs été reporté que l'exposition à des faibles niveaux activait les défenses antioxydantes et les réactions immunitaires (**Miyachi, 2000**). Des auteurs ont émis l'hypothèse d'un effet hormesis de l'irradiation externe puisqu'un effet stimulant peut être obtenu par l'utilisation de faibles doses qui a, à plus fortes doses, devient un effet nocif (**Macklis et Beresford, 1991**).

- Le critère éclosion permet de mettre en évidence une accélération dans le développement, cependant une fois l'étape passée, nous n'avons pas observé d'effet sur la croissance des larves, ni en biomasse ni en longueur.

	Longueur (mm)		Poids (g)		K		IGS (%)	
	Femelle	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle	Mâle
<b>Après 20 jours d'exposition à l'Uapp</b>								
témoin	33.1 ± 2.8	33.3 ± 2.0	0.394 ± 0.115	0.300 ± 0.049	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	11.7 ± 5.6	2.5 ± 0.9
20 µg/L	35.6 ± 4.1	33 ± 2.3	0.461 ± 0.141	0.287 ± 0.034	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	12.9 ± 4.1	2.4 ± 0.8
250 µg/L	33 ± 2.3	31.9 ± 1.1	0.414 ± 0.084	0.288 ± 0.056	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	10.8 ± 2.8	2.4 ± 0.6
<b>Après les 15 jours de reproduction en eau non contaminée</b>								
témoin	34.2 ± 3.6	33 ± 2.3	0.367 ± 0.128	0.289 ± 0.054	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.2	8.9 ± 2.8	1.1 ± 0.8
20 µg/L	35 ± 3.6	33.3 ± 2.7	0.358 ± 0.072	0.280 ± 0.072	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	8.1 ± 3.0	0.5 ± 0.1
250 µg/L	35.3 ± 3.5	32.3 ± 2.0	0.385 ± 0.130	0.288 ± 0.040	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2	8.3 ± 2.5	0.6 ± 0.3

**Tableau 17** : Effet de l'uranium appauvri sur la longueur, le poids, l'indice de condition K, l'Indice Gonado-Somatique sur les adultes après l'exposition pendant 20 jours et après la phase de reproduction en eau non contaminée pendant 15 jours. (Moyenne ± ES, n = 10).



**Figure 41** : Nombre d'œufs moyen et d'évènements moyen par femelle sur 14 jours des tests de reproduction pour chaque concentration. Moyenne ± ES. n = 7, 8 et 7 pour respectivement les témoins, exposés à 20 µg/L et 250 µg/L. ANOVA (\*\*\*) (\*\*) différence significative par rapport au témoin p < 0,001 et p < 0,01; (a) différence significative par rapport à la concentration 20 µg/L pour p < 0,05.

## 1.2 Test adulte mature

Stade de vie Scénarios	Œuf	Œuf /Pro larve	Adulte
Contamination interne à l' U <sub>app</sub>	0, 20, 50, 100, 150, 250 et 500 µg/L	0, 20, 250 µg/L	0, 20, 250 µg/L
Contamination interne à l' <sup>233</sup> U	0, 20, 100 µg/L	0, 20, 100 µg/L	
Irradiation $\gamma$ externe	0, 1, 10, 100, 1000 mGy/j	0, 1, 10, 100, 1000 mGy/j	

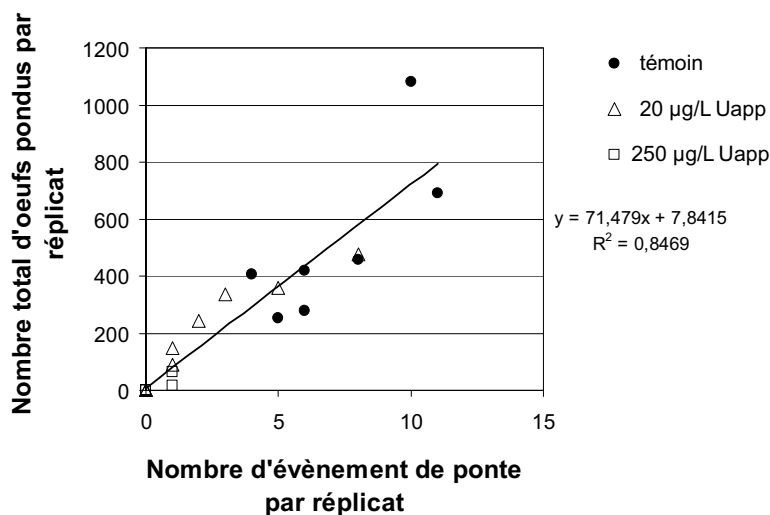
### 1.2.1 Indice gonado somatique (IGS) et Indice de condition (K)

Le Tableau 17 présente les données biométriques, ainsi que les indices calculés, pour les adultes après exposition à l'uranium appauvri et après les 15 jours de tests de reproduction en eau propre. L'analyse statistique n'a pas mis en évidence de différence significative.

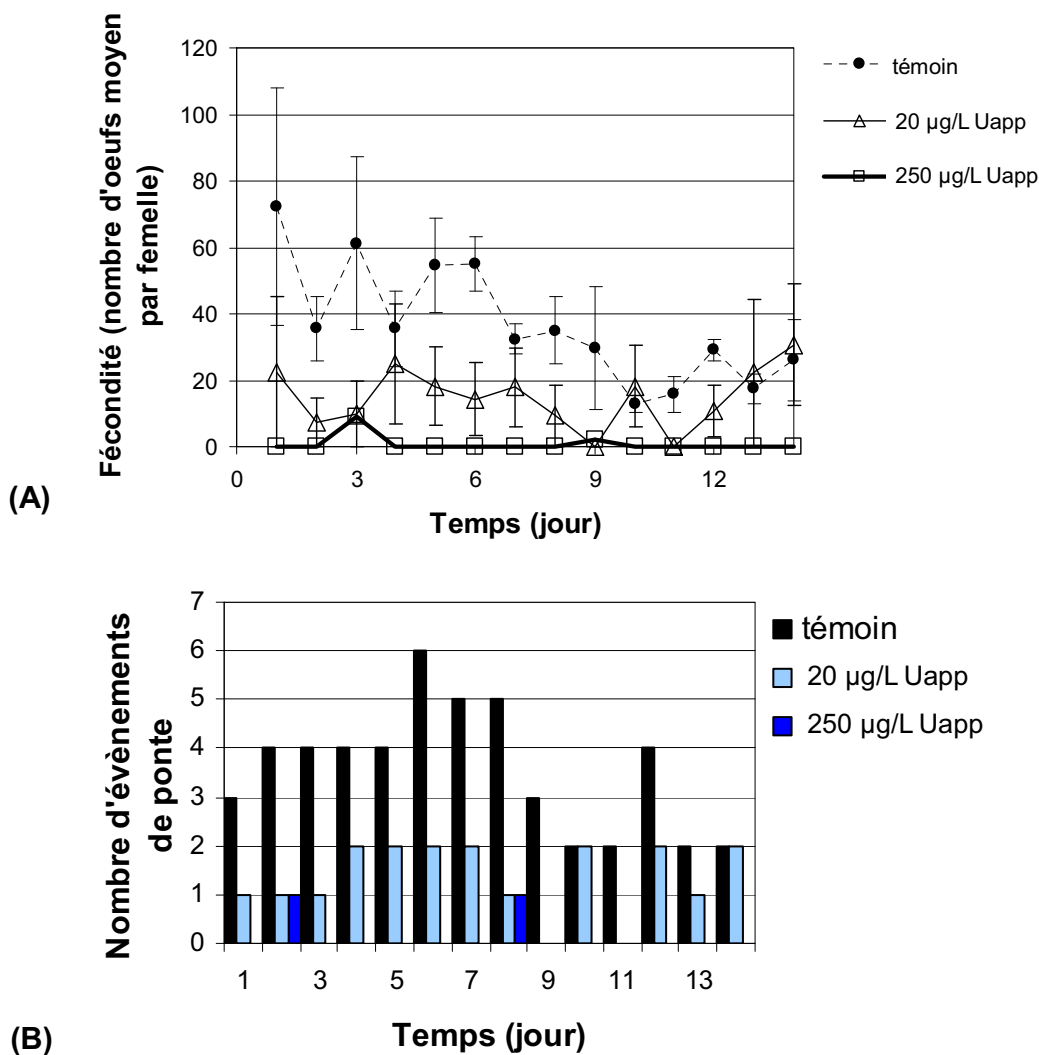
### 1.2.2 Succès reproducteur

Le nombre de réplicats (« triplets »), initialement de 10 « triplets », a été réduit à 7, 8 et 7 pour respectivement les témoins, 20 µg/L et 250 µg/L en raison d'erreurs de sexage. La Figure 41 indique les résultats des performances de reproduction des géniteurs durant 14 jours après avoir été exposés aux différentes concentrations d'uranium appauvri.

Les résultats sont présentés par deux paramètres : le nombre moyen d'œufs pondus par femelle sur 14 jours et le nombre moyen d'événements de ponte par femelle sur 14 jours. Les deux paramètres sont significativement réduits avec la concentration d'exposition croissante.



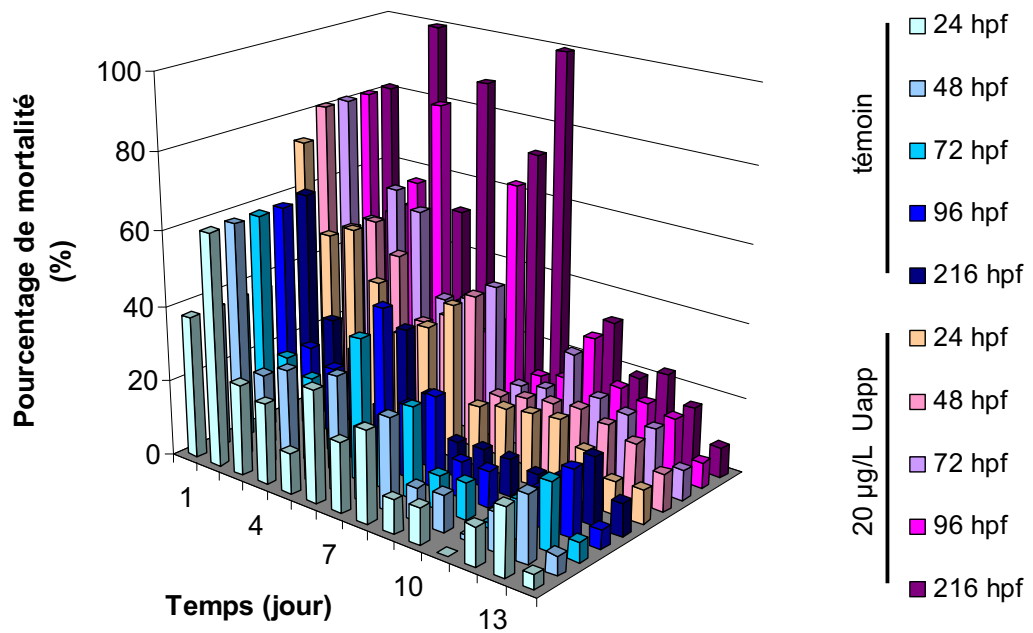
**Figure 42 :** Relation entre le nombre d'œufs pondus et le nombre d'évènements de ponte pour chaque réplicat de chaque condition.



**Figure 43 :** Effets de l'uranium appauvri sur (A) la fécondité (nombre moyen d'œufs pondus par femelle par jour) pendant les 14 jours de reproduction en eau claire consécutifs à l'exposition à l'uranium pendant 20 jours (moyenne  $\pm$  ES) et (B) le nombre d'évènements de ponte par jour.  $n = 7, 8$  et  $7$  pour respectivement les témoins, exposés à  $20 \mu\text{g/L}$  et  $250 \mu\text{g/L}$ .

De surcroît, il existe une corrélation positive entre ces deux paramètres ( $R^2 = 0,85$ ). Cette corrélation (figure 42) nous indique que le nombre d'œufs par événement de ponte n'est pas impacté et donc que ce n'est pas ce paramètre qui explique directement la baisse du succès reproducteur. En effet la diminution du succès reproducteur apparaît directement lié à la diminution du nombre d'évènements de ponte.

La figure 43 montre les résultats de fréquences de ponte, c'est à dire le nombre moyen d'œuf par femelle par jour sur les 14 jours de tests. Chez les témoins, les poissons ont pondu tous les jours, mais il apparaît une légère diminution à partir du 8<sup>ème</sup> jour. Les poissons exposés à 20 µg/L ont pondu presque tous les jours mais beaucoup moins que les témoins. Après 10 jours le nombre moyen d'œufs pour la concentration 20 µg/L se retrouve proche de celui des témoins qui a naturellement diminué. Pour la concentration 250 µg/L, seulement 2 pontes ont été obtenues au second et 8<sup>ème</sup> jour.

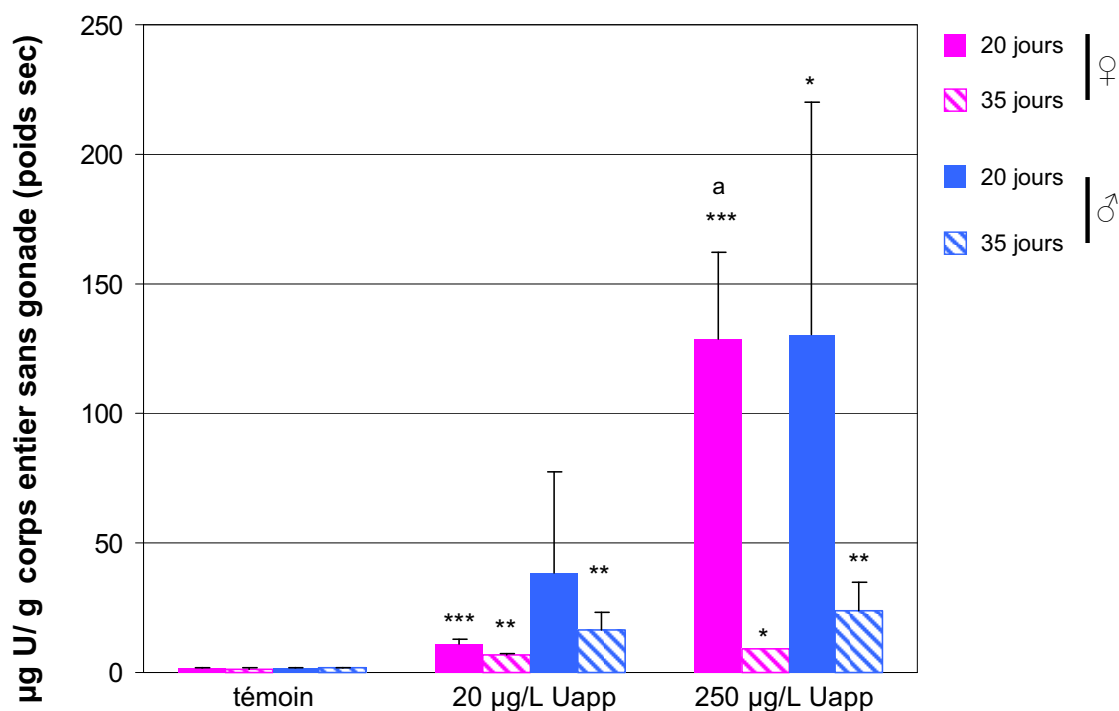


**Figure 44 :** Effet de l'uranium appauvri sur le pourcentage de mortalité des générations F1 issues de parents exposés à 0 et 20 µg/L pour chaque jour de ponte et plusieurs temps clefs du développement (24, 48, 72, 96 et 216 hpf).

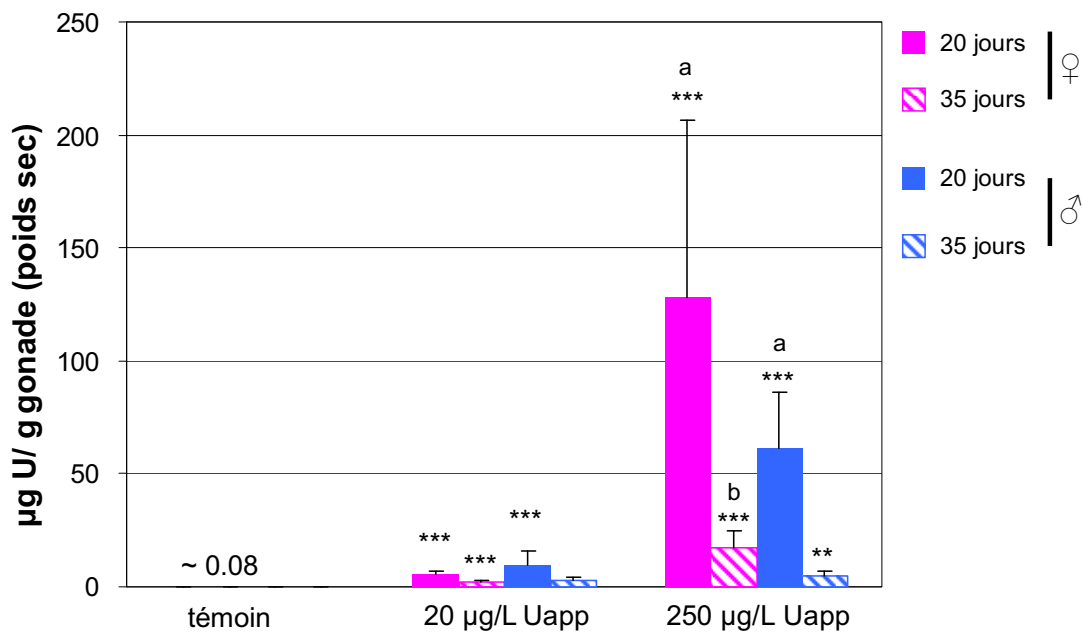
### 1.2.3 Suivi de la génération F1 après exposition parentale

La Figure 44 montre les résultats concernant la mortalité des organismes issus de la reproduction des adultes exposés à l'uranium appauvri aux stades embryon et larve. Les résultats pour la concentration 250  $\mu\text{g/L}$  ne sont pas représentés graphiquement dans la mesure où sur les deux pontes, l'une était non viable et l'autre morte au bout de 24 h (un seul organisme a survécu jusqu'à 10 j).

Après 2 jours de reproduction, chez les témoins la mortalité diminue et on obtient des pontes de bonne qualité avec un pourcentage de mortalité globalement inférieur à 20 %. Pour la concentration 20  $\mu\text{g/L}$ , la mortalité est supérieure à celle du témoin (plus 60%) et reste élevée du stade œuf jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour de reproduction. Pour le stade larve, la mortalité est très élevée (parfois supérieure à 80%), jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour. A partir du 7<sup>ème</sup> jour la mortalité diminue fortement (maximum 30 % au stade larvaire), jusqu'à retrouver des valeurs proches des témoins.



**Figure 45 :** Concentration d'U mesurées dans le corps entier de poisson adulte (mâle et femelle) après 20 jours d'exposition et 35 jours (20 jours d'exposition + 15 jours de reproduction en eau non contaminée). Moyenne  $\pm$  ES. ANOVA, (\*) (\*\*) (\*\*\*) différence significative par rapport au témoin respectivement avec  $p < 0,05$   $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  et (b) différence significative avec 20 µg/L avec  $p < 0,001$ .



**Figure 46 :** Concentration d'U mesurées dans les gonades mâle et femelle après 20 jours d'exposition et 35 jours (20 jours d'exposition + 15 jours de reproduction en eau non contaminée). Moyenne  $\pm$  ES;  $n = 9$ . ANOVA, (\*\*) (\*\*\*) différence significative par rapport au témoin respectivement avec  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  et (b) différence significative avec 20 µg/L avec  $p < 0,01$ .



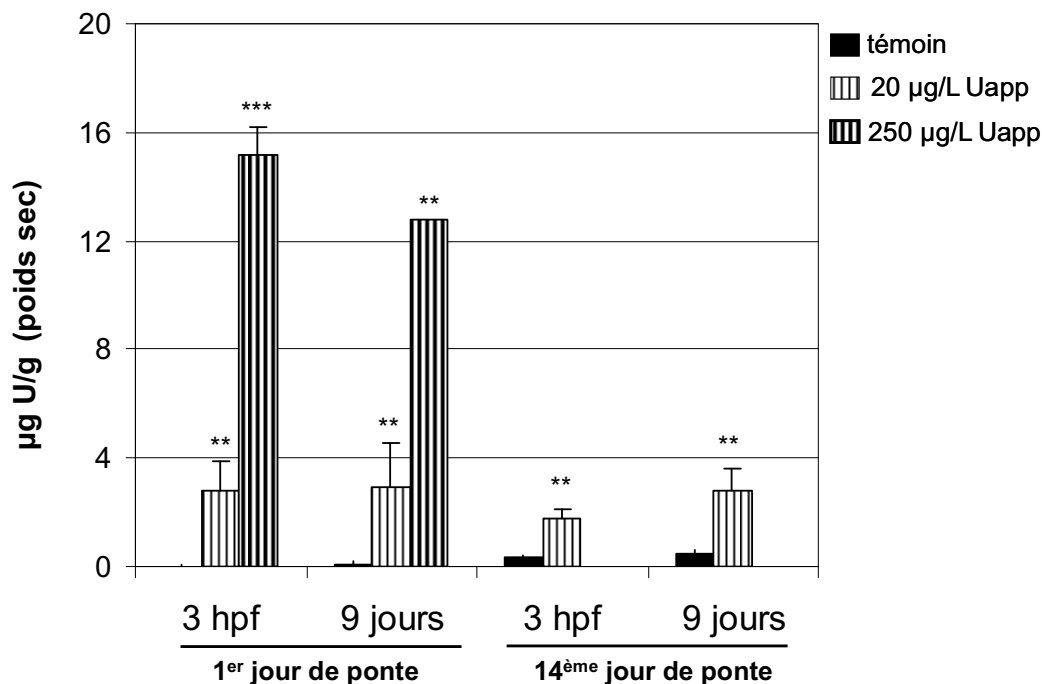
## 1.2.4 Bioaccumulation de l'uranium

### 1.2.4.1 Chez les adultes

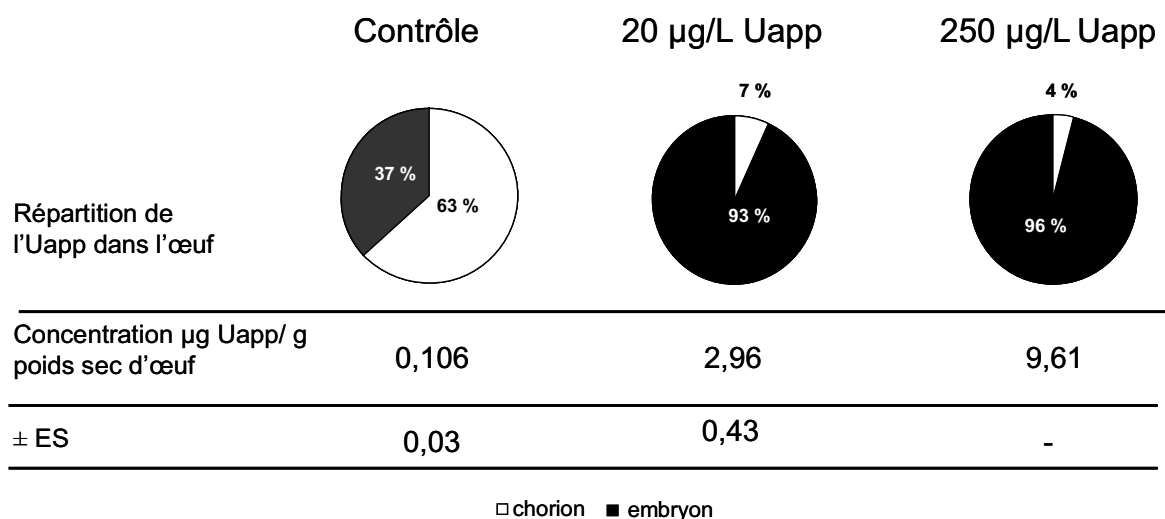
La Figure 45 représente les concentrations d'U mesurées dans le corps entier des poissons mâles et femelles après 20 jours d'exposition et après 35 jours (exposition + reproduction de 15 jours en eau propre). Trois réplicats ont été mesurés à 20 jours pour toutes les conditions puis à 35 jours, 2 réplicats pour les femelles exposées à 20 µg/L et 1 pour celles exposées à 250 µg/L. Cette réduction du nombre de réplicats repose sur des erreurs de sexage en amont de l'expérience, vues seulement au moment de la dissection. L'analyse statistique de ces données montre un effet concentration ; plus la concentration d'exposition est forte, et plus l'accumulation est élevée pour les deux temps de mesure (analyse de covariance,  $p=0,02$ ). En effet, au temps 20 jours, à 20 µg/L, on retrouve 5,4 fois plus d'U chez les femelles et 21,2 fois plus chez les mâles comparés au témoin. Et à 250 µg/L, on a 64 fois plus d'U chez les femelles et 72 fois plus chez les mâles comparés au témoin.

Au temps 20 jours, des facteurs d'accumulation ( $FA = \text{concentration } U_{\text{poisson entier}} / \text{concentration } U_{\text{eau expérimentation}}$ ) ont pu être calculés : les mâles exposés à 20 µg/L semblent avoir le facteur le plus élevé traduisant une forte capacité de transfert de l'U de l'eau vers le corps entier (1514 pour les mâles contre 546 pour les femelles). On note une forte tendance à la diminution de la concentration en uranium entre les deux temps 20 et 35 j, mais l'analyse de données ne révèle pas d'effet significatif temps. A 20 µg/L, cette diminution est de 37 et 57 % pour les femelles et les mâles. A 250 µg/L, cette diminution est plus forte, 92 et 82 % pour femelles et mâles.

La Figure 46 montre les résultats des concentrations mesurées au niveau des gonades mâles et femelles aux temps 20 et 35 jours. Le niveau de base mesuré chez les témoins est de l'ordre de 0,08 µg d'U /g de poids sec. L'analyse statistique a montré un effet concentration (analyse de covariance,  $p = 6,07.10^{-8}$ ) mais aussi des interactions entre la concentration et le temps ( $p= 0,01$ ) ainsi qu'entre la concentration et le sexe ( $p=0,0008$ ).



**Figure 47 :** Concentrations d’uranium appauvri mesurées dans les œufs de la génération F1 issus de la reproduction des adultes exposés à l’uranium appauvri, de la 1<sup>ère</sup> ponte du test et de la dernière ponte du test. Moyenne ± ES ; (n=3). ANOVA, (\*\*) (\*\*\*) différence significative par rapport au témoin respectivement avec  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ .



**Figure 48 :** Concentrations et répartitions de l’uranium appauvri mesuré dans les œufs à la 1<sup>ère</sup> ponte issue des adultes exposés. Moyenne ± ES, n=3 sauf à 250 µg/L n= 1.

A l'inverse du corps entier, les femelles montrent des concentrations moyennes dans les gonades (à 20 jours, 190 et 4630 fois plus, respectivement à 20 et 250  $\mu\text{g/L}$  que pour le témoin) significativement plus élevées que les mâles (à 20 jours, 75 et 471 fois plus, respectivement à 20 et 250  $\mu\text{g/L}$  que pour le témoin) par rapport à leur témoin respectif. Des calculs de teneur relative (%) des gonades ( $[\text{Teneur moyenne gonade}] / (\text{Teneur corps entier}) \times 100$ ) montrent en effet des valeurs plus élevées chez les femelles, même au temps 35 jours (de 2,5 à 10 % contre 0,18 à 0,33 pour les mâles).

Tout comme pour le corps entier, la concentration en uranium de la gonade diminue au temps 35 jours après la reproduction en eau non contaminée : d'un facteur 2 et 7 chez les femelles préalablement exposées à 20 et 250  $\mu\text{g/L}$  et d'un facteur 4 et 12 pour les mâles.

#### 1.2.4.2 Transfert des adultes vers les œufs :

Les mesures de bioaccumulation réalisées sur les organismes (à 3 hpf et 9 jours) issus de la reproduction d'adultes préalablement exposés à l'uranium pendant 20 jours sont présentées Figure 47. Les résultats montrent un transfert significatif de l'U à la génération F1 en particulier pour la 1<sup>ère</sup> ponte fonction de la concentration d'exposition. Une tendance similaire s'observe pour la dernière ponte seulement à 20  $\mu\text{g/L}$  (il n'y a plus eu de ponte à 250  $\mu\text{g/L}$ ). On notera de plus que pour la condition 20  $\mu\text{g/L}$ , il n'y a pas de différence significative de mesure d'uranium entre la première ponte et la dernière ponte à 14 jours.

La Figure 48 montre le détail de la répartition de l'uranium au niveau de l'embryon et du chorion mesuré à 48 hpf lors de la première ponte. On observe que plus de 90 % de l'uranium se situe au niveau de l'embryon à l'intérieur de l'œuf. Pour une concentration totale internalisée relativement proche, ces résultats sont à l'inverse des mesures de bioaccumulation réalisées lors des expositions directes des œufs (Figure 36) où l'uranium était majoritairement localisé sur le chorion.

### 1.2.5 Principales conclusions sur les effets de l'uranium appauvri sur la reproduction des adultes

- Les indices de condition K ont montré que les poissons étaient dans des états de santé similaire. L'indice gonado somatique n'a pas révélé non plus d'effet sur la taille des gonades.

- Ces résultats ont montré que l'*uranium appauvri s'accumule dans le corps entier du poisson et dans ses organes de reproduction*, aussi bien chez le mâle que chez la femelle de façon significative aux deux concentrations d'exposition (20 et 250 µg/L) avec une augmentation entre les deux concentrations. Nos résultats indiquent donc l'existence d'un effet concentration sur l'accumulation. Cependant, cet effet n'est pas linéairement proportionnel à la concentration en uranium dans le milieu d'exposition. Les données obtenues pour le corps entier (sans gonade) montrent que *la capacité de transfert de l'uranium* de l'eau vers le corps du poisson était *plus forte chez les mâles et à faible concentration* d'exposition (20 µg/L). L'accumulation à forte concentration pourrait être ralentie par une diminution des capacités de transfert en lien direct avec des effets toxiques de l'uranium, notamment sur les branchies (Barillet, 2007).

A l'inverse des résultats sur le corps entier, *les femelles*, quelle que soit la concentration d'exposition, ont montré *une accumulation plus forte* que les mâles *au niveau des gonades*. Chez *Danio rerio* l'accumulation de l'uranium a déjà été observée dans les gonades mâles après exposition directe (Barillet et al, 2007), cependant il a été observé que la concentration dans les gonades était 11 fois moins forte que dans d'autres organes et que c'était un tissu faiblement contaminé. Il a également été montré que l'uranium pouvait traverser la barrière hémato testiculaire chez les mammifères (Calmet et al., 2003) et donc être accumulé dans les testicules de rats après exposition trophique dans ce cas (Pellmar et al, 1999). Chez le corégone après une exposition trophique à très forte concentration, Cooley et Klaverkamp (2000) ont mesuré de l'uranium bioaccumulé dans les gonades mais à l'inverse de nos résultats, l'accumulation était plus importante dans les gonades mâles. Ils émettaient l'hypothèse d'une forte dilution tissulaire étant donnée la taille plus importante des gonades femelles comparées aux mâles. Ces auteurs avaient suggéré que les femelles dont les gonades montraient *des stades de maturité avancées* accumulaient plus d'uranium que celles dont les

gonades n'étaient pas matures. Dans la mesure où les femelles de notre expérience sont à un stade de maturité avancé (accentué par la séparation des sexes pendant l'exposition), cela expliquerait que les gonades des femelles aient plus accumulé dans notre expérience. Il a été suggéré que *l'uranium pouvait être transporté par la vitellogénine* dans le sang jusqu'aux gonades femelles (Ghosh et Thomas, 1995).

- Parallèlement, *le succès reproducteur* des poissons a été fortement *diminué par l'exposition à l'uranium*. A la forte concentration de 250 µg/L une seule femelle a pondu (2 fois) et à 20 µg/L on a observé une réduction de plus de moitié du nombre moyen d'œufs par femelle. Le succès reproducteur semble principalement impacté par *une réduction du nombre d'évènements de ponte par femelle*, que par une diminution de la fécondité, car le nombre d'œufs par ponte reste similaire chez les exposés et les témoins. De nombreux travaux ont montré que les métaux pouvaient réduire fortement le succès reproducteur des poissons. Des travaux, notamment sur le cadmium, montrent le même type d'effet sur le succès reproducteur. En effet **Sellin et Kolok(2006)** ont montré que l'exposition du poisson Tête de boule à 50 µg/L de cadmium diminuait son succès reproducteur en affectant les fréquences de pontes qui sont divisées par 4 par rapport au témoin. **Foran et al. (2002)** et **Tilton et al. (2003)** mettaient déjà en avant que l'exposition au cadmium réduisait le succès reproducteur mais pas la fertilité et le succès d'éclosion de la nouvelle génération. L'effet sur le succès reproducteur est attribué à un effet sur le comportement de reproduction et plus particulièrement sur la phase de fraie (**Foran et al., 2002 ; Brion et al., 2002 et 2004**).

Comme dans nos travaux lors de l'exposition à l'uranium, **Sandheinrich et Miller (2006)** ont observé que les poissons exposés au méthylmercure montraient une diminution du succès reproducteur et étaient quasiment inactifs et sans comportement de fraie (**Hammerschmidt et al., 2002 ; Drevnick et al., 2003**). A l'inverse, des auteurs ont pu noter des comportements agressifs chez la truite arc en ciel exposée au cadmium, laissant supposer que des perturbations des mécanismes de l'olfaction pouvaient être à l'origine de ces modifications de comportement (**Sloman et al., 2003a et b**). En effet il est reconnu que l'ovulation des femelles dépend de leur exposition aux phéromones mâles (**Van den Hurk and Resink, 1992**) et de la même façon que le comportement de fraie des mâles dépend de leur exposition aux phéromones femelles lors du déclenchement de l'ovulation (**Van den Hurk and Lambert, 1983**). On peut imaginer que les individus n'émettent pas ou ne

reçoivent pas correctement les signaux hormonaux pour déclencher l'événement de ponte. **Drevnick et al. (2003)** ont par ailleurs corrélé une diminution des taux d'hormones (testostérones et œstrogènes) chez les poissons exposés au méthylmercure à la diminution du succès reproducteur.

- **Les effets de l'uranium appauvri sur la génération F1:**

Les mesures de bioaccumulation ont montré que *l'uranium appauvri s'accumule dans les gonades* mais est aussi *transféré à l'œuf issu de la reproduction* de ces mêmes adultes. En effet de l'uranium appauvri a été dosé dans les œufs, d'autant plus quand la concentration d'exposition des adultes était forte. On retiendra également que l'uranium appauvri dans ce type de contamination parentale est situé, à l'inverse de l'exposition directe, *majoritairement au niveau de l'embryon à l'intérieur de l'œuf*.

L'uranium appauvri mesuré dans les œufs F1 semble de plus rester constant au cours du temps. Il n'y a donc *pas de forte dépuración*, contrairement à ce que l'on observe pour les adultes qui se reproduisent en eau non contaminée. Les résultats de suivi des individus de la génération de F1 montrent que *la survie des embryons issus des géniteurs exposés à 20 µg/L est atteinte* en particulier les 8 premiers jours. On a ensuite une amélioration de cette survie entre le 8<sup>ème</sup> et 15<sup>ème</sup> jour de reproduction qui peut être potentiellement reliée à une dépuración des gonades. Les travaux récents de **Sellin et al. (2007)** ont mis en évidence que l'exposition à 50 µg/L de cadmium des adultes pendant 21 jours, affecte également la survie de la génération F1. Ces expériences visaient à tester différentes combinaisons (e.g. femelle témoin x mâle contaminé ou encore femelle contaminée x mâle témoin), et il a été montré que le taux de mortalité de la nouvelle génération était plus important lors du croisement « femelle témoin x mâle contaminé ». Ils ont donc émis l'hypothèse d'un effet paternel élevé dans l'impact sur la mortalité des F1. Notre expérience ne permet pas de montrer un impact plus fort d'un des deux sexes mais on peut noter que chez le mâle, la dépuración de l'uranium est la plus forte pendant les 15 jours de reproduction, et parallèlement la survie des individus de la génération F1 s'améliore.

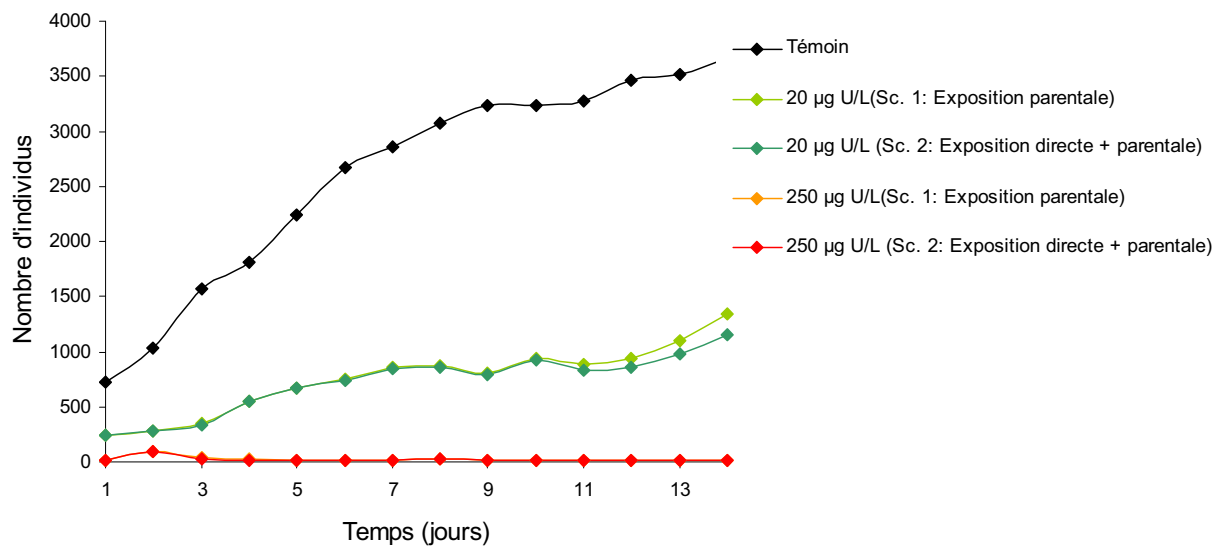
### 1.3 Simulation du recrutement des stades de vie précoces

Une modélisation simple a permis la synthèse des résultats obtenus sur les différents traits d'histoire de vie présentés précédemment afin de simuler le recrutement des nouvelles générations de poissons. Grâce aux différentes expériences, deux scénarios ont pu être envisagé pour simuler ce recrutement :

- le scénario n°1, prend en compte seulement la voie d'exposition parentale (prise en compte des données expérimentales tirées de la contamination des adultes uniquement),
- le scénario n°2, prend en compte la voie d'exposition parentale, plus la voie d'exposition directe par le milieu (prise en compte des données expérimentales tirées d'une part de la contamination directe des stades de vie précoces et de celle des adultes).

Les résultats de cette simulation des effets de l'uranium appauvri sur le recrutement sont présentées figure 49. Le recrutement est réduit de façon importante à 20  $\mu\text{g/L}$  et n'existe quasiment plus à 250  $\mu\text{g/L}$ . Si on prend le cas de la concentration 20  $\mu\text{g/L}$ , la simulation des deux scénarios montre tout à fait que les effets via la voie d'exposition parentale sont finalement aussi forts que les effets d'une exposition directe puisque dans les deux cas les stades de vie précoce embryon et larve sont fortement touchés par la mortalité.

• Dans les deux cas *la sensibilité des stades de vie précoces* influence directement le recrutement. L'ensemble des résultats a permis de montrer que les stades de vie précoces étaient les plus sensibles simplement en raison des nombreux événements critiques qui ont lieu dans une très brève durée, et que les pressions environnementales peuvent perturber la synchronisation de ces phases de développement, et de ce fait réduire les chances de survie des organismes. Le scénario de contamination par la voie parentale et directe par le milieu est plus proche d'une réalité environnementale, nous pouvons alors supposer que cet effet aurait des conséquences importantes sur la population ( **Jha , 2008**). Ces résultats soulignent également *l'importance de considérer les stades de vie précoces dans l'évaluation de la toxicité de l'uranium.*



**Figure 49 :** Effets de l'exposition parentale ou parentale +directe à l'uranium appauvri sur le recrutement de poissons zèbre pendant 15 jours.



**Figure 50 :** Rapport entre la surface d'occupation des spermatozoïdes et la surface de la coupe observée (%). Moyenne  $\pm$  ES, témoin n = 10, 20 µg/L n = 15 et 250 µg/L n = 10.



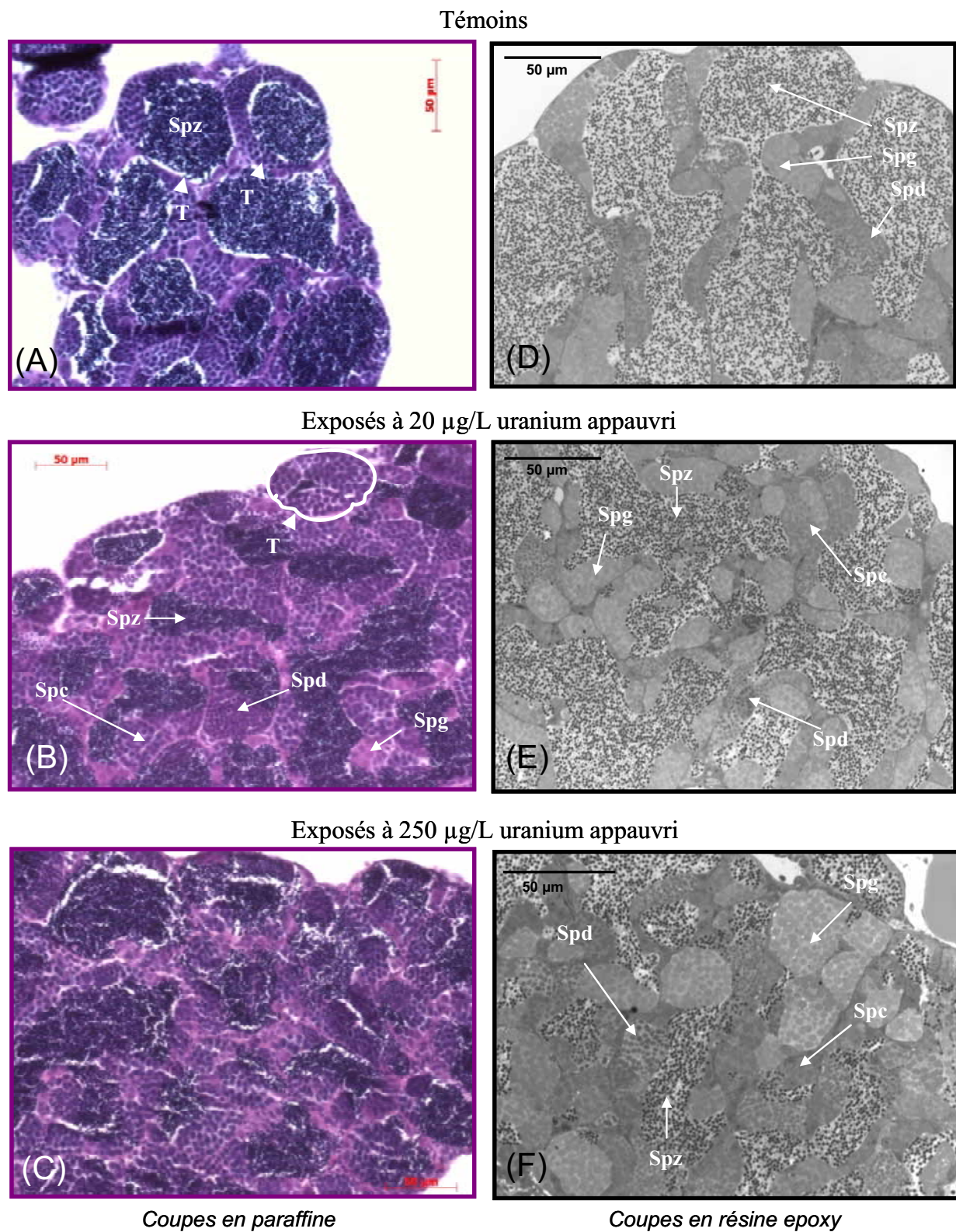
## **2. Histopathologie**

Les analyses histologiques ont été ciblées sur les organes majeurs de la reproduction : gonades mâles et femelles.

### **2.1 Observation en microscopie optique**

#### **2.1.1 Inclusion en paraffine**

La technique d'inclusion en paraffine a permis d'observer à l'aide d'un microscope optique les coupes réalisées sur testicules. L'inclusion en paraffine des gonades femelles n'a pas été réalisé : la paraffine ne pénètre pas le tissu en profondeur et le rend alors friable au moment de la coupe. Au moment de la phase d'enrobage des échantillons ont été perdus. Le nombre de réplicats de gonades mâles a donc été réduit : pour le témoin à 2, pour 20 µg/L d'uranium appauvri à 3 et pour 250 µg/L à 2 ( 1 réplicat correspond à 1 gonade). Pour chaque réplicat, toutes les coupes ont été observées, et 5 d'entre elles, prises aléatoirement ont servi aux mesures de surface d'occupation de spermatozoïde par rapport à la surface de coupe observée. Aucune différence statistique n'est observée entre les différentes concentrations pour la surface d'occupation des spermatozoïdes. (Figure 50).



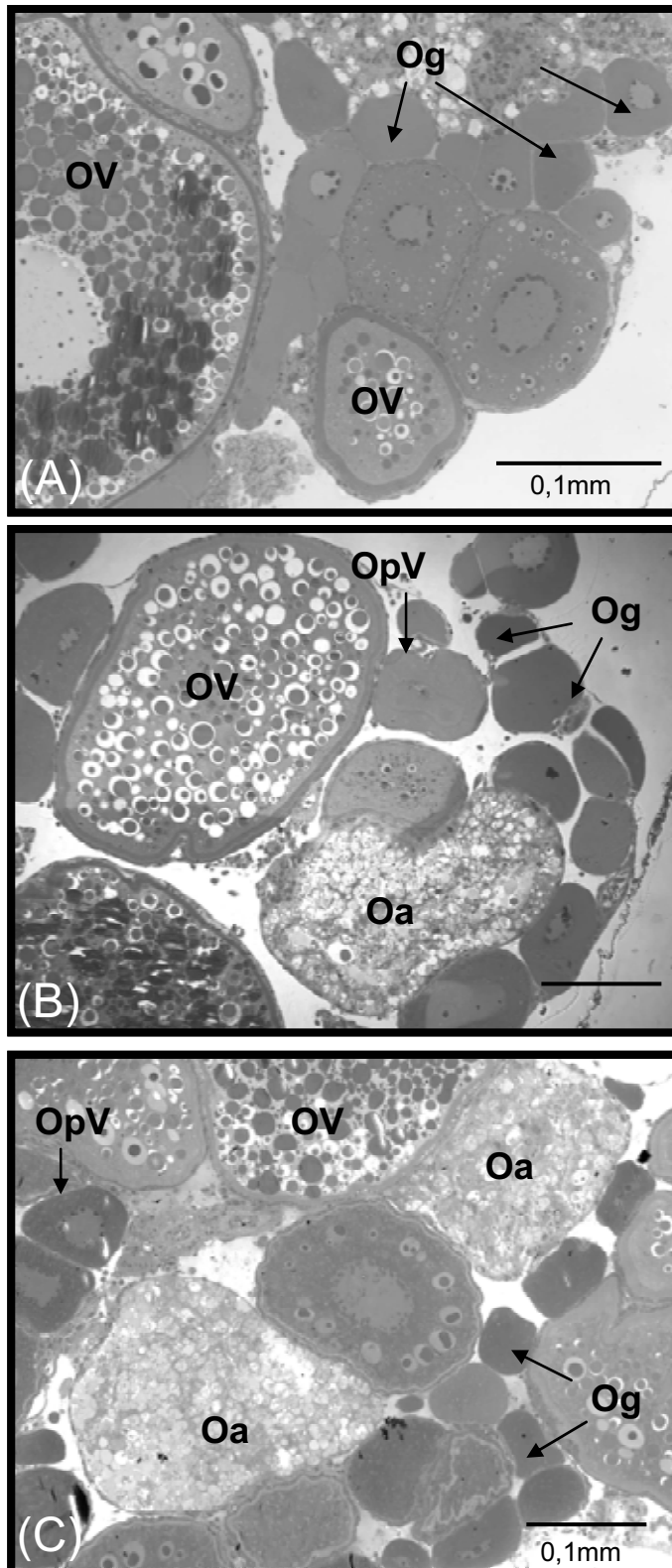
**Figure 51 :** Observations en microscopie optique de gonades mâles. (A et D) Témoins, (B) et (E) exposés à 20  $\mu\text{g/L}$  et (C) et (F) exposés à 250  $\mu\text{g/L}$  Spg = spermatogonies ; Spc = spermatocytes ; Spd = spermatides ; Spz, spermatozoïdes ; T, tubules.

Cependant, les observations au microscope optique, des coupes (Figure 51 (A) (B)(C)) de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur montrent que la structure des tubules semble modifiée avec l'exposition à l'uranium (250  $\mu\text{g/L}$ ).

### 2.1.2 Inclusion en résine epoxy

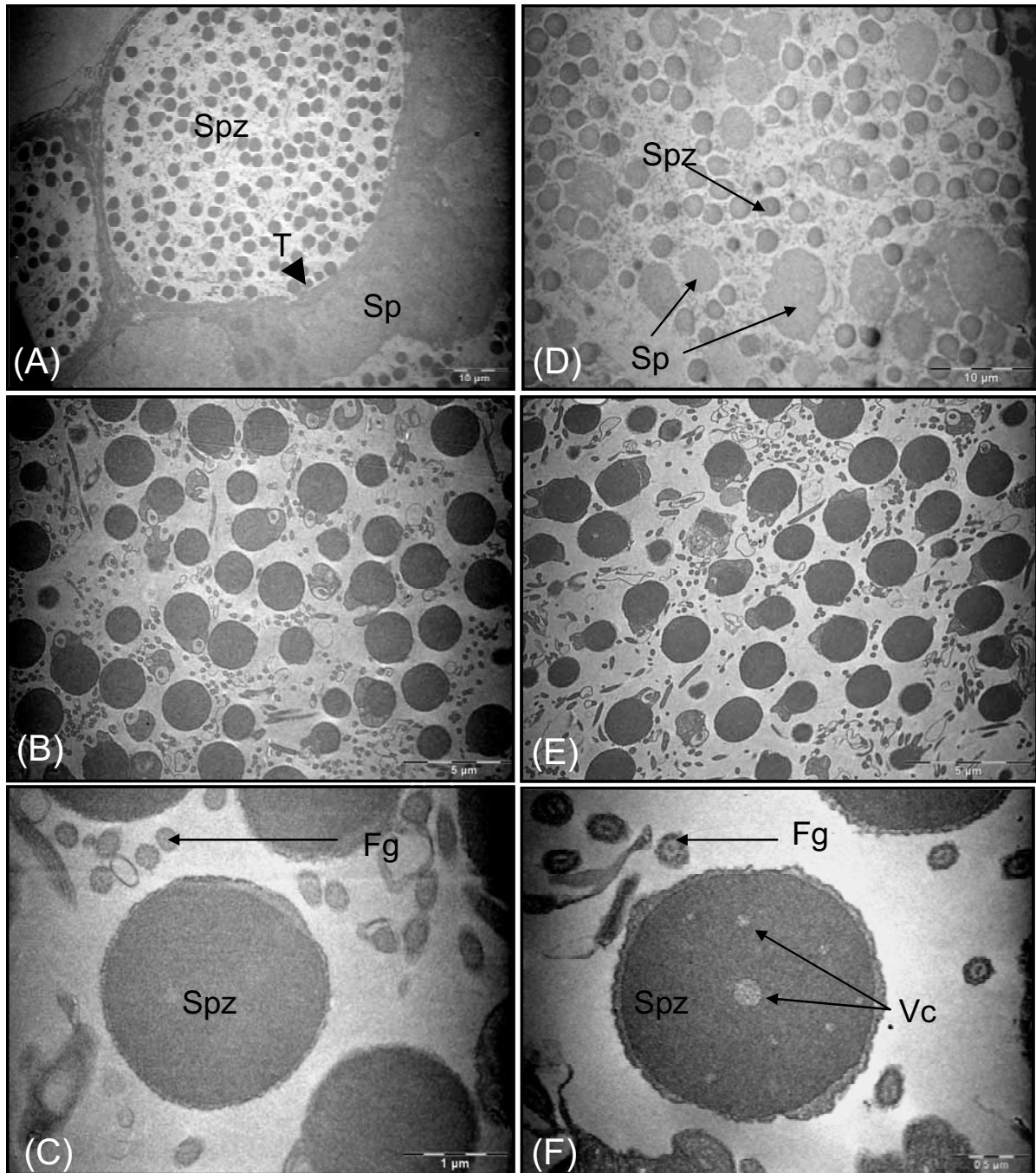
En parallèle des échantillons enrobés en résine epoxy ont été également observés en microscopie optique (figure 51 (D) (E) (F)). Elles confirment la désorganisation des tubules quand les poissons sont exposés à la forte concentration en uranium. Les différents stades cellulaires semblent se mélanger. Les coupes (D) (E) et (F), étant plus fines (0,5  $\mu\text{m}$  ; inclusion en résine), elles permettent de mieux visualiser les différents types cellulaires et d'apprécier les différences de structure.

On peut noter que quelle que soit la concentration d'exposition à l'uranium appauvri, l'ensemble des coupes observées montre les différents stades de maturité des cellules germinales mâles au cours de la spermatogenèse.



**Figure 52 :** Observations en microscopie optique de gonades femelle. (A) Témoin, (B) exposés à 20 µg/L et (C) exposés à 250 µg/L (épaisseur 0,5µm). Og = Ovogonie ; OpV = Ovocyte prévitellogénique ; OV = Ovocyte en cours de vitellogénèse ; Oa = Ovocyte atrétique.

La figure 52 montre des coupes fines de gonades femelles réalisées sur les gélules de résines époxy. La surface de coupe du couteau de diamant est de 3 mm, ce qui rend impossible d'avoir une image entière de la gonade femelle avec cette technique (la gonade femelle pouvant atteindre plusieurs mm). Il n'a donc pas été possible de faire de comptage des différents stades de cellules germinales femelles. Néanmoins, on note pour les trois conditions une diversité des stades de maturité des ovocytes avec des ovogonies, des ovocytes pré vitellogéniques et des ovocytes en cours de vitellogénèse. Par contre pour les gonades exposées à l'uranium appauvri (20 et 250 µg/L), on observe l'apparition d'ovocytes atrétiques c'est-à-dire en dégénérescence.



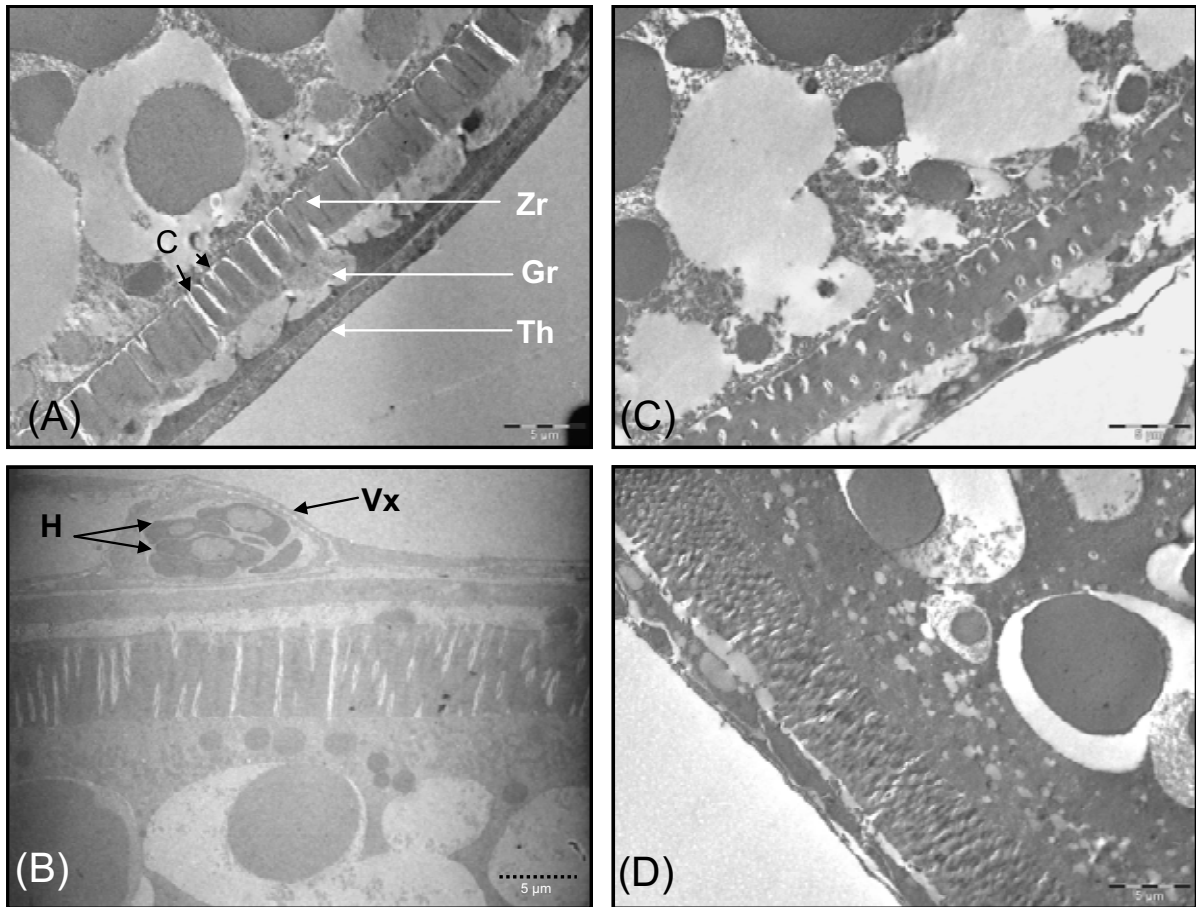
**Figure 53 :** Observations en microscopie électronique à transmission de gonades mâles. (A) (B) (C) Témoin, (D) (E) (F) exposés à 250 µg/L. Sp = Spermatogonies et spermatides ; Spz = spermatozoïdes ; T = tubules ; Fg = flagelle ; Vc = vacuole.

## 2.2 Observations en microscopie électronique à transmission (MET)

Les observations des coupes au MET ont été réalisées chez les témoins et chez les poissons exposés à 250 µg/L d'uranium appauvri. Les analyses élémentaires réalisées à l'aide de la sonde EDX sur des coupes plus épaisses, pour l'éventuelle microlocalisation de l'uranium dans ces types cellulaires, n'ont pas permis de localiser d'uranium au niveau des ces tissus.

Ces observations semblent confirmer que chez le mâle, un effet sur l'organisation des tissus apparaît avec l'exposition à l'uranium appauvri (Figure 53 (A) et (D)). A 250 µg/L, on confirme la désorganisation des différents stades de différenciation cellulaires alors que chez les témoins il y a une structuration bien définie en tubule avec chaque stade de maturation séparé des autres. L'observation à plus fort grossissement (B et E) montre la présence de débris cellulaires au milieu des spermatozoïdes en plus grande quantité chez les exposés. On observe également que chez le témoin les têtes de spermatozoïdes apparaissent plus rondes avec une membrane régulière alors que chez les exposés, certains spermatozoïdes montrent un contour plus ovale et même très irrégulier dans certains cas. Le grossissement à l'échelle du spermatozoïde (C et F) confirme un effet de l'exposition à l'uranium sur la régularité de la membrane de la tête spermatique. Cette membrane apparaît crénelée. De plus on remarque dans quelques cas l'apparition de plusieurs petites vacuoles au niveau de la tête spermatique.





**Figure 54 :** Observations en microscopie électronique à transmission de membrane d'ovocyte sur les coupes gonades femelles (A) et (B)Témoin, (C) et (D) exposé à 250 µg/L. Zr = zona radiata ; Gr = granulosa ; Th = thèque ; C= canaux ; Vx = vaisseaux sanguins ; H = hématie



La figure 54 montre les observations réalisées à partir de coupes de gonades femelles. Les coupes (A) et (B), représentatives de l'ensemble des échantillons témoins montrent la membrane d'ovocyte en phase de vitellogénèse avec (B) plus avancée que (A). En effet la zona radiata montre beaucoup plus de canaux où passent toutes les molécules nécessaires au grossissement de l'ovocyte ce qui donc révèle un stade de développement plus avancé. Sur l'ensemble des réplicats témoins observés, les couches cellulaires sont très régulières et se distinguent facilement entre elles.

Les coupes (C) et (D), représentatives des échantillons de femelles exposées à 250 µg/L, montrent également les membranes d'ovocytes en cours de vitellogénèse, avec (D) en stade plus avancé que (C).

On remarque que pour les organismes exposés, l'empilement des couches cellulaires paraît moins régulier. Les cellules de la thèque sur la coupe (C) sont désorganisées, comparées au témoin (A). Les canaux semblent moins réguliers dans la zona radiata. La coupe (D) montre également une différence au niveau de la structure des cellules de la thèque, comparée à la coupe (B).

### 2.3 Principales conclusions sur les effets de l'uranium sur les tissus gonadiques

L'étude histologique des gonades de poissons exposés à l'uranium a fait, à notre connaissance, l'objet d'une seule étude (**Adam et al., 2008**).

- Pour les deux sexes, tous les stades de cellules germinales intervenant dans l'*ovogénèse* et la *spermatogénèse* ont été *observés*. Les organismes ont donc la capacité de fournir des cellules germinales pour la reproduction : spermatozoïdes et ovocytes matures.

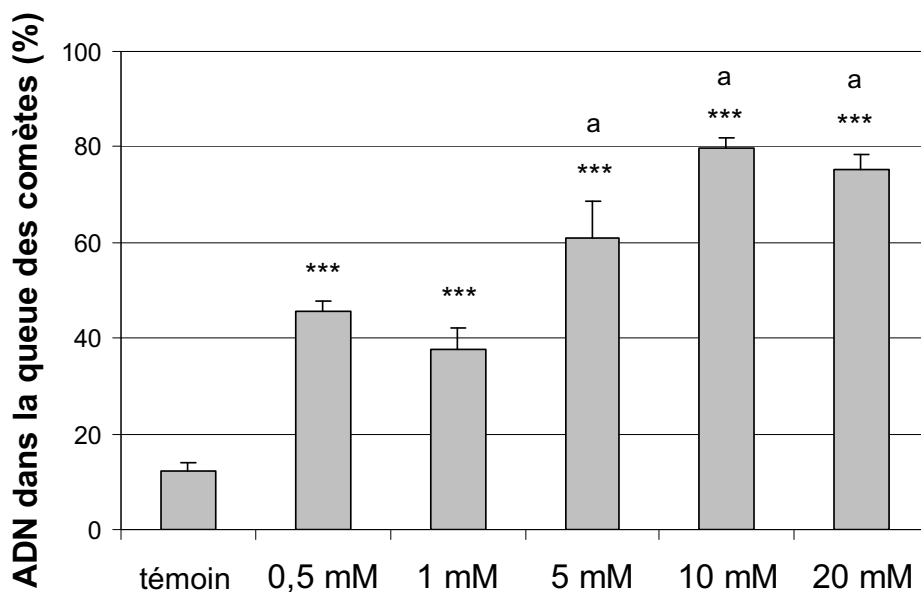
- Cependant chez *les mâles*, l'exposition à l'uranium semble provoquer une *désorganisation globale* du tissu et en particulier l'organisation *en tubes séminifères*. Cette désorganisation pourrait s'expliquer par une atteinte des cellules des tissus interstitiels qui entourent les tubes séminifères. En effet des altérations histologiques de ces types cellulaires et notamment l'apparition de vacuolisations chez les cellules de Leydig (cellules de soutien dans les testicules, responsables de la production d'hormones stéroïdes) (**Lloblet et al., 1991**) ou la potentielle diminution du nombre de cellules de Sertoli (**Linares et al., 2005**) ont déjà été rapportées chez des rongeurs exposés à l'uranium par l'eau de boisson. L'altération de ces cellules peut engendrer une perturbation de la production des hormones et donner un sperme de mauvaise qualité (**Maynard et al., 1953**) mais n'influençant pas sa concentration dans notre cas puisque les observations n'ont pas révélé de différence en terme de quantité de cellules au stade spermatozoïde.

Par contre *des anomalies ultra structurales* au niveau de la tête des spermatozoïdes ont pu être observées et sont reconnues comme pouvant être à l'origine d'une mauvaise qualité des cellules germinales pour la reproduction. En effet il a été observé que la forme de *la tête* des spermatozoïdes n'était *pas régulière*, voire que *les membranes étaient endommagées* et plus rarement *l'apparition de vacuoles*. Ces résultats semblent confirmer les précédentes observations d'**Adam et al. (2008)**.

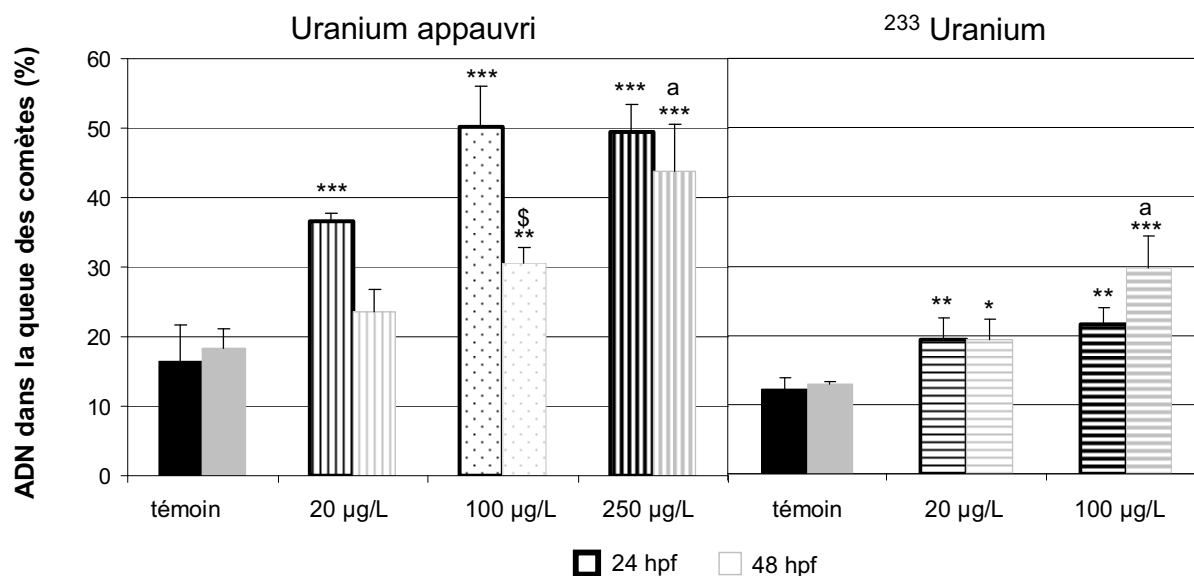
- Chez les femelles également, des altérations ont pu être observées et peuvent être à l'origine d'une mauvaise qualité de cellules germinales. Des ovocytes atrétiques ont été mis en évidence dans les gonades des femelles exposées à l'uranium. L'atrésie est un processus de dégénérescence dans lequel intervient un grand nombre de facteur (hormonaux

notamment) par lequel l'ovocyte perd son intégrité et est éliminé avant l'ovulation (**Janz, 2000**). Des travaux ont pu établir d'une part que les mécanismes sous jacents étaient la mort cellulaire par apoptose (**Kaipia et Hsueh, 1997**). D'autres auteurs ont montré que le taux de fragmentation d'ADN apoptotique était augmenté dans des ovocytes de poissons exposés à des effluents toxiques de papeteries (**Janz et al., 1997**), mais ces mécanismes restent peu clairs chez les poissons. Cependant l'atrésie des follicules ovariens pourrait être une cause déterminante pour une baisse du succès reproducteur. Ce type d'effet a déjà été mis en évidence chez le poisson zèbre exposé à des perturbations endocriniennes (**Weber et al., 2003**).

De plus il a été observé une légère désorganisation au niveau des couches cellulaires entourant l'ovocyte pendant la vitellogénèse. La couche externe (la thèque) présente le plus de perturbations. Cette couche étant impliquée dans la synthèse d'hormone œstrogénique (E<sub>2</sub>), sa désorganisation pourrait impliquer des dysfonctionnements hormonaux.



**Figure 55 :** Effet du peroxyde d'hydrogène (exposition *in vivo*) sur le pourcentage de dommages à l'ADN dans les cellules d'embryons âgés de 24 hpf exposés 1h. Moyenne  $\pm$  ES, n = 3. ANOVA, (\*\*\*) différence significative par rapport au témoin respectivement avec  $p < 0,001$  et (a) différence significative avec 1mM avec  $p < 0,01$ .



**Figure 56 :** Effet de l'uranium appauvri et l'uranium 233 (exposition *in vivo*) sur le pourcentage de dommages à l'ADN dans la queue des comètes de cellules d'embryons âgés de 24 et 48 hpf après respectivement 20 h et 44 heures d'exposition. Moyenne  $\pm$  ES, n = 3. ANOVA, (\*) (\*\*) (\*\*\*) différence significative par rapport au témoin respectivement avec  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  et (\$) différence significative entre les temps 24 et 48h pour la concentration donnée avec  $p < 0,05$  et (a) différence significative avec la concentration 20 µg/L pour  $p < 0,01$ .

### **3. Effets moléculaires**

#### 3.1 Marqueurs de génotoxicité

##### 3.1.1 Génotoxicité dans les cellules embryonnaires lors d'exposition directe des œufs

###### *3.1.1.1 Test positif in vivo*

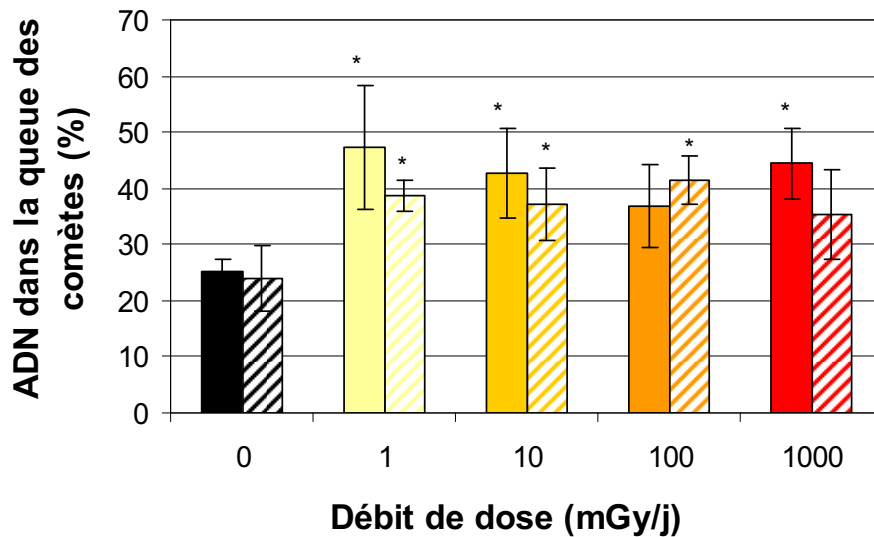
La Figure 55 montre les résultats obtenus pour le test positif préliminaire au peroxyde d'hydrogène en pourcentage d'ADN dans la queue des comètes pour la gamme de concentration testée (0 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20 mM). L'analyse statistique met en évidence une augmentation significative des dommages à l'ADN par rapport au témoin en fonction de la concentration d'exposition (ANOVA,  $p = 1.10^{-6}$ ). Cette expérience nous a permis de montrer que les cellules embryonnaires pouvaient répondre à un agent génotoxique.

###### *3.1.1.2 Exposition à l'uranium appauvri et $^{233}\text{U}$*

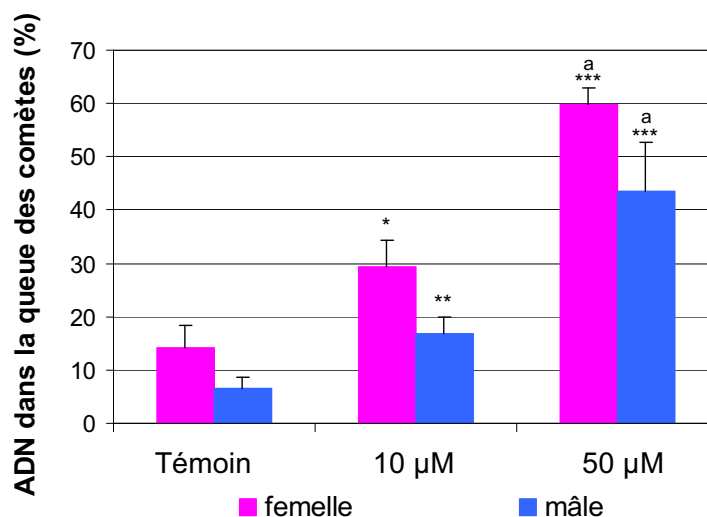
La Figure 56 représente les résultats de dommages à l'ADN dans les cellules d'embryon âgés de 24 et 48 hpf exposés à l'uranium pendant 20 et 44 heures.

Une augmentation significative des dommages à l'ADN dans les cellules d'embryon est mise en évidence avec l'augmentation de la concentration d'uranium appauvri pour les deux temps, à partir de 20  $\mu\text{g/L}$  uranium appauvri pour le temps 24h et à partir de 100  $\mu\text{g/L}$  d'uranium appauvri pour le temps 48h. On observe entre les deux temps une tendance à la diminution des dommages avec une différence significative à 100  $\mu\text{g/L}$  d'uranium appauvri.

Pour l'exposition à  $^{233}\text{U}$ , une augmentation significative des dommages à l'ADN dans les cellules d'embryons est également mise en évidence avec l'augmentation de la concentration d'exposition. Cependant on ne retrouve pas les différences entre les deux temps de mesures, les dommages à l'ADN ne diminuent pas à 48h. En effet, à concentration identique et à 24h, le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes est inférieur pour les cellules d'embryons exposés à  $^{233}\text{U}$ .



**Figure 57 :** Effet de l'irradiation  $\gamma$  externe (exposition *in vivo*) sur le pourcentage de dommages à l'ADN dans la queue des comètes de cellules d'embryon âgés de 24 et 48 hpf après respectivement 20 h et 44 heures d'exposition. Moyenne  $\pm$  ES, n = 3. ANOVA, (\*) différence significative par rapport au témoin avec  $p < 0,05$ .



**Figure 58 :** Effet du peroxyde d'hydrogène (exposition *in vitro*) sur le pourcentage de dommages à l'ADN dans les cellules germinales femelles et mâles. Moyenne  $\pm$  ES, n=3. ANOVA, (\*) (\*\*) (\*\*\*) différence significative par rapport au témoin respectivement avec  $p < 0,05$   $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  et (a) différence significative avec la concentration 10  $\mu$ M pour  $p < 0.05$ .

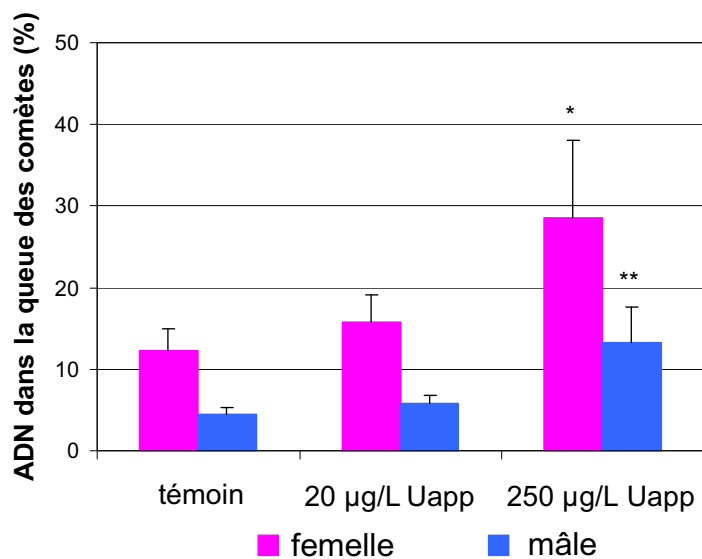
### 3.1.1.3 Exposition à l'irradiation $\gamma$ externe

La Figure 57 montre le pourcentage de dommages à l'ADN dans les cellules d'embryons exposés à la gamme d'irradiation  $\gamma$  externe à 24 et 48 hpf. On observe une augmentation significative des dommages quand les embryons sont exposés à une irradiation aux deux temps d'observation. Cependant il n'y a pas de corrélation entre le débit de dose de l'exposition et le pourcentage de dommages. A 48 hpf, une tendance à la diminution est observée pour toutes les conditions d'exposition.

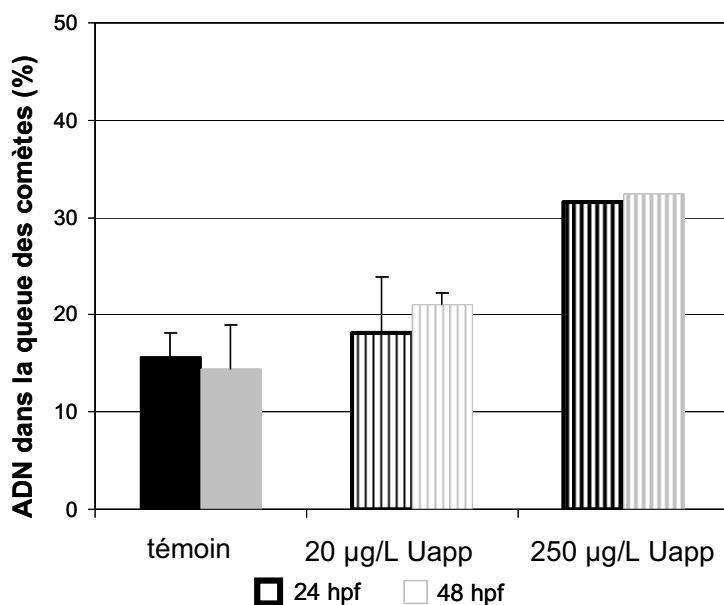
## 3.1.2 Génotoxicité dans les cellules germinales et embryonnaires après l'exposition des adultes

### 3.1.2.1 Chez les cellules germinales

La Figure 58 montre les résultats du test positif réalisé avec le peroxyde d'hydrogène sur les cellules isolées de gonades de mâles et femelles in vitro. Les résultats (Figure 58) révèlent une augmentation des dommages à l'ADN significatif avec la concentration d'exposition pour les deux types de cellules germinales. De plus pour les deux types de cellules le pourcentage à la concentration 50  $\mu\text{M}$  diffère significativement de celui à la concentration 10  $\mu\text{M}$ . Cette expérience permet de valider la sensibilité des deux types cellulaires à un agent génotoxique et la technique d'isolement cellulaire mécanique.



**Figure 59 :** Effet de l'uranium appauvri (exposition *in vivo*) sur le pourcentage de dommages à l'ADN dans les cellules germinales femelles et mâles de poissons exposés pendant 20 jours. Moyenne  $\pm$  ES, n=3. ANOVA, (\*) (\*\*) différence significative par rapport au témoin respectivement avec  $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ .



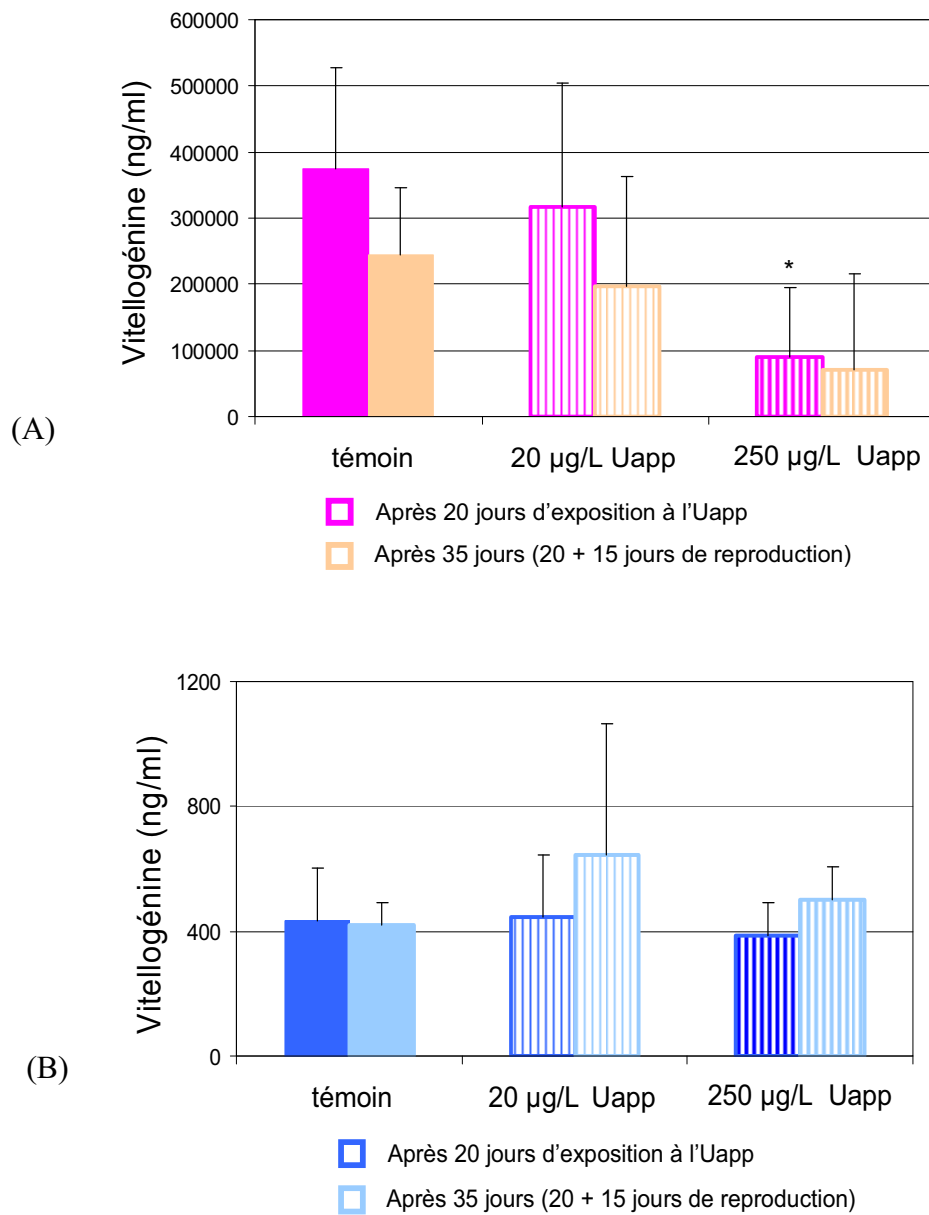
**Figure 60 :** Effet de l'uranium appauvri (exposition *in vivo*) sur le pourcentage de dommages à l'ADN dans les cellules d'embryons âgés de 24 et 48 hpf, issus de la 1<sup>ère</sup> pontes des adultes exposés pendant 20 jours. Moyenne  $\pm$  ES, n=3 excepté à 250 µg/L n=1.



La Figure 59 montre une augmentation significative des dommages à l'ADN dans les cellules germinales femelle et mâle lors de l'exposition croissante à l'uranium appauvri. Le pourcentage d'ADN à 250 µg/L est significativement différent du témoin pour les deux types cellulaires.

### 3.1.2.2 Chez les cellules embryonnaires

Cette mesure de génotoxicité a été réalisée sur des œufs issus de la première ponte des adultes exposés à chaque concentration (0 ; 20 et 250 µg/L) et les résultats sont présentés Figure 60. Les résultats montrent une tendance à l'augmentation des dommages à l'ADN dans les cellules d'embryons issus de la reproduction d'adultes exposés à l'uranium appauvri avec la concentration d'exposition. Les tests statistiques n'ont révélé cependant aucune différence significative. La condition 250 µg/L qui ne comporte qu'un seul réplicat semble présenter une augmentation des dommages.



**Figure 61** : Effet de l'uranium appauvri sur la concentration de vitellogénine dans les homogénats de corps entier de poisson femelle (A) et mâle (B) après exposition à l'Uranium appauvri pendant 20 jours et après la phase de 15 jours de reproduction. Moyenne  $\pm$  IC 95%, n= 10. ANOVA Kruskal Wallis, (\*) différence significative par rapport au témoin avec  $p < 0,05$ .

### 3.2 Marqueurs de perturbations endocriniennes : vitellogénine (Vtg)

Les dosages ont été réalisés sur des homogénats de corps entiers de femelles (Figure 61 (A)) et mâles (Figure 61 (B)) après 20 jours d'exposition à l'uranium appauvri et après les 15 jours de reproduction.

Les résultats chez les femelles montrent une diminution significative de la concentration de Vtg dans le corps entier des femelles avec la concentration d'exposition. Cependant une différence significative apparaît seulement à forte concentration après les 20 jours d'exposition à l'uranium appauvri.

Quant aux résultats pour les mâles, la concentration de Vtg pour les poissons exposés reste très proche de celle mesurée chez les témoins, il n'y a pas de variation.

### 3.3 Principales conclusions sur les perturbations moléculaires

#### 3.3.1 La génotoxicité

- **Le test des comètes version alcaline :**

La variabilité des mesures et en particulier celle observée chez les embryons témoins peut être expliquée par plusieurs hypothèses. Tout d'abord, des artéfacts techniques peuvent être à l'origine de cette variabilité. En effet, l'hétérogénéité du champ électrique dans la cuve électrophorétique ou la persistance de résidus de sels de tampon de lyse, malgré des rinçages peuvent affecter la migration de l'ADN et alors produire de la variabilité (Fairbain *et al.*, 1995). D'un autre côté il faut rappeler que l'on a travaillé sur un embryon entier ; la variabilité peut donc être naturellement due au fait que l'on est en présence de différents types cellulaires, exprimant différentes sensibilités. De plus il existe chez l'embryon, des cellules endommagées, dites apoptotiques intervenant naturellement dans le développement embryonnaire, qui peuvent être révélées par l'essai des comètes (Steinert *et al.*, 1996).

Parmi les nombreuses versions du test des comètes, la méthode alcaline semble être la plus adaptée, en terme de sensibilité, pour la détection de multiples dommages à l'ADN : cassures simple et double brin, ainsi que les sites alcali-labiles. Les cassures simple brin sont considérées comme des dommages précoces, pouvant être révélés par cette version du test. De nombreux travaux ont utilisé cette version dans des conditions *in vivo* pour évaluer le potentiel génotoxique dans différents compartiments environnementaux (Wilson *et al.*, 1998 ; Jarvis *et al.*, 2003 ; Jha *et al.*, 2005, Nagarajappa *et al.*, 2006 ; Barillet *et al.*, 2007 ; Jha , 2008).

- Sur l'**ADN des cellules embryonnaires** exposées par voie directe:

A notre connaissance, aucun travail ne fait état de l'effet génotoxique de l'uranium sur les cellules embryonnaires et particulièrement de poisson. Mais la capacité génotoxique de l'uranium a déjà été montrée pour d'autres types cellulaires, notamment hépatocytes, érythrocytes ou cellules germinales chez les mammifères (Lin *et al.*, 1993 ; Stearns *et al.*, 1995 ; Monleau *et al.*, 2006 ; Thiébault *et al.*, 2007) et chez le poisson zèbre (Barillet *et al.*, 2007).

Nos expériences ont permis de montrer que l'exposition directe à **l'uranium appauvri** induisait des **dommages significatifs sur l'ADN des cellules embryonnaires**. En effet les pourcentages de dommages à l'ADN sont **croissants avec la concentration d'exposition**

jusqu'à 100 µg/L à 20h d'exposition. Après 44 h d'exposition les pourcentages de dommages à l'ADN sont encore significatifs aux plus fortes concentrations (100 et 250 µg/l) par rapport au témoin, cependant on observe pour chaque concentration une *diminution de ce pourcentage entre les deux temps (20 et 44 hpf)* et qui est moins significative à 250 µg/L. Le fait que les dommages à l'ADN aient tendance à diminuer à 48 h, laisse supposer que ces dommages sont principalement des cassures simple brin, et que l'embryon possède des mécanismes capables de réparer ces cassures. Le mécanisme de réparation par excision et resynthèse des brins d'ADN est le mode de réparation le plus commun (Cajaraville *et al.*, 2003). Une faible proportion des dommages serait due à des cassures double brin, plus difficilement réparables et donc considérées comme des lésions délétères. Cette diminution de dommages entre 24 et 48 hpf peut s'expliquer également par un phénomène de dilution des cellules avec un ADN endommagé dans la totalité des cellules embryonnaires en division active.

Les résultats concernant l'exposition directe à *l'uranium 233* ont révélé *moins de dommages de l'ADN que l'uranium appauvri pour des concentrations massiques identique* à 24h. Cependant entre les deux temps de mesures (20 et 44 hpf), dans ce cas *aucune diminution du pourcentage de dommages à l'ADN* n'a été observé mais plutôt *une augmentation et notamment à 100µg/L*. L'uranium 233 possède une activité spécifique plus forte que l'uranium appauvri (provoquant un débit de dose largement supérieur), les dommages à l'ADN peuvent résulter d'effets indirects par la formation de radicaux libres mais aussi directs par l'excitation et l'ionisation des molécules. L'uranium 233 pourrait alors être à l'origine de dommages qui résultent d'un effet plutôt direct et qui, de plus, entraîne des dommages difficilement réparables comme des cassures double brin. Les travaux de Barillet (2007) ont montré que pour une même concentration massique d'uranium (dans le cas de faible concentration) l'activité radiologique pouvait amplifier les dommages à l'ADN.

La *diminution du pourcentage de dommages à l'ADN* entre les deux temps d'exposition laisse supposer comme pour l'uranium la mise en place des mécanismes de réparation. Toutefois, les dommages à l'ADN à 48 h persistent et laissent présumer de dommages non réparables. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'induction de la machinerie de réparation des dommages à l'ADN augmenterait l'activité métabolique des embryons et à court terme, elle aurait des répercussions sur les fonctions de l'organisme comme l'éclosion.

- L'ensemble des résultats déjà obtenus grâce à l'essai des comètes version alcaline

indique que c'est une technique sensible pour le domaine des expositions faibles doses (Singh *et al.*, 1995 ; Nacci *et al.*, 1996 ; Malyapa *et al.*, 1998 ; Jha *et al.*, 2000, 2005, 2006 ; Adam, 2006). En effet les résultats de l'exposition directe à la gamme *d'irradiation gamma* ont montré *une augmentation des dommages* à l'ADN dans les cellules dès 1 mGy/j. Les travaux de Jarvis et Knowles (2003), utilisant la même technique, ont mis en évidence également une augmentation significative des dommages à l'ADN sur des larves de poisson zèbre âgées de 2 jours post éclosion, qui ont été exposées pendant 24 heures, dès 28,8 mGy/j. Nous pouvons supposer que le stade embryon dans nos expériences serait alors plus sensible aux rayonnements ionisants que le stade larve. *Aucune relation dose/réponse* n'a été mise en évidence dans notre expérience. Alors que des expériences *in vitro* on pu montré une relation dose/effet sur des cellules germinales mâles exposées à une gamme de débit de dose (irradiation gamma) (Adam *et al.*, 2007). La relation entre la dose radiologique d'exposition et l'effet n'est pas claire. Certains auteurs ont émis l'hypothèse d'effet hormesis, avec aux faibles doses (1 à 50 cGy) des effets stimulateurs (Macklis et Beresford, 1991). Ces doses étaient relativement élevées par rapport à notre gamme testée.

- Sur l'*ADN des cellules gonadiques* d'adultes exposés par la voie directe:

Les résultats montrent *un effet génotoxique* de l'uranium sur les cellules germinales mâles significatif *à partir de 250 µg/L après 20 jours d'exposition*. Les travaux de Barillet (2007) sur la génotoxicité de l'uranium sur les cellules gonadiques mâles montraient des effets significatifs dès 20 µg/L. De plus, pour une même concentration massique (dans le cas de la faible concentration 20 µg/L), une activité radiologique amplifierait les dommages à l'ADN, alors qu'à plus forte concentration massique (100 µg/L), une activité radiologique supplémentaire n'entraîne pas plus de dommages à l'ADN. Aucune enzyme de réparation de l'ADN n'a été mise en évidence dans le noyau de spermatozoïdes (Martoriarti, 1999 ; Dietsrich *et al.*, 2005). Cette inaptitude à la réparation rend alors le sperme très fragile vis-à-vis des agressions externes et accroît d'autant plus la nécessité de systèmes annexes de protection tels que la protection mécanique comme la surcondensation du matériel génétique. De plus, on a pu voir dans des travaux que les stades de maturation primaires (spermatogonies) étaient les plus sensibles lors d'irradiation  $\gamma$  externe (Hyodo-Taguchi et Etoh, 1986). Les résultats ont également montré *une sensibilité des cellules germinales des femelles exposées*, puisqu'une augmentation des dommages à l'ADN apparaît dès 20 µg/L et est *significativement plus élevée à 250 µg/L*. A notre connaissance il n'y a pas de travaux qui aient utilisé le test des comètes sur les cellules germinales femelles. La forte variabilité

pourrait être expliquée par les différences entre les deux types cellulaires. En effet les cellules germinales mâles sont de taille inférieure et globalement plus homogènes au cours de la gamétogenèse. Les variations de taille chez les ovocytes de femelles lors de la maturation et le manque de protection du noyau comparé aux spermatozoïdes dont l'ADN est super condensé, pourraient expliquer le plus fort pourcentage de dommages à l'ADN chez les témoins femelles. Cependant, ces résultats peuvent annoncer des ovocytes de mauvaise qualité.

- Sur l'*ADN des cellules d'embryons issus de la reproduction d'adultes contaminés*:

Les résultats ont montré *une légère tendance à l'augmentation des dommages à l'ADN* avec la concentration d'exposition mais sans différence significative. Ces pourcentages sont également inférieurs à ceux mesurés lors de l'exposition directe par le milieu. Ces dommages à l'ADN pourraient être d'une part *transmis par les cellules germinales adultes* puisque nous avons vu ci dessus des dommages dans les tissus gonadiques, et d'une autre part *dus à la présence d'uranium* encore présent à 48hpf qui a pu être mesuré *dans l'embryon*. La deuxième hypothèse semble la plus probable dans la mesure où des auteurs ont démontré qu'une réparation des dommages présents au niveau de l'ADN des spermatozoïdes peut avoir lieu au niveau de l'ovocyte lors de la fécondation (Ciereszko *et al.*, 2005 ; Dietrich *et al.*, 2005). Par contre si ces dommages ne sont pas réparables (il n'y a pas de différence avec le temps 48 hpf), nous pouvons imaginer qu'ils seront à l'origine des effets sur ces premiers et dans notre cas, de la forte mortalité observée. On pouvait s'attendre à mesurer plus de dommages à l'ADN dans ces œufs issus de géniteurs contaminés que chez les œufs exposés directement à l'uranium appauvri, puisque les concentrations en uranium issus du transfert parental, mesurés dans les œufs sont supérieurs. Cependant, ce n'est pas le cas. L'uranium mesuré étant l'uranium total, une partie de l'uranium transféré par les géniteurs pourrait alors être sous une forme chimique ne provoquant pas les mêmes types de dommages.

### 3.3.2 La vitellogénine (Vtg):

La concentration de cette glycolipophosphoprotéine a été mesurée chez les mâles et chez les femelles. Le taux de Vtg *chez les mâles n'a pas montré d'augmentation* après les 20 jours d'exposition. Nous pouvons donc écarter l'hypothèse que l'uranium puisse être un œstrogène mimétique. Chez les femelles témoins, ce taux est très élevé et atteint plusieurs mg /L, témoin de la maturité sexuelle et de la formation d'ovocytes.

En effet elle est synthétisée durant la phase de vitellogénèse et est transportée par les voies sanguines jusqu'aux ovaires pour y être incorporée dans les ovocytes en croissance.

Par contre, chez *les femelles exposées*, nous avons pu observer *une diminution de la concentration de Vtg avec la concentration d'exposition au temps 20 jours et également au temps 35 jours* avec des valeurs légèrement plus basses. L'inhibition de cette protéine peut être expliquée par plusieurs hypothèses.

La première repose sur le fait que l'organe synthétisant cette protéine est le foie et que l'hépatotoxicité de l'uranium a déjà été montré chez les poissons (Cooley *et al.*, 2000 ; Barillet *et al.*, 2007), il est donc probable que la synthèse de Vtg ait pu être inhibée. La seconde pourrait être une origine hormonale. En effet, l'expression du gène de la Vtg est sous contrôle hormonal (Arukwe *et al.*, 2003). Une perturbation de la régulation hormonale et notamment du 17- $\beta$  oestradiol inhiberait l'expression de la Vtg. La Vtg constitue donc le précurseur majeur des réserves nutritives incorporées dans l'œuf pour le développement du futur embryon. Si sa concentration plasmatique est faible, les ovocytes ne vont probablement pas recevoir assez de Vtg pour fabriquer des réserves de bonne qualité pour les futurs embryons et entraîner la mort prématurée des organismes pendant la période de consommation normale des réserves vitellines si celles-ci ne sont pas suffisantes ou de mauvaise qualité.

D'autre part il a été suggéré que cette protéine pouvait être à l'origine du transport des métaux comme le cadmium vers les tissus gonadiques (Ghosh et Thomas, 1995). Il est reconnu que l'uranium peut se retrouver dans le compartiment sanguin sous forme d'ion libre (Hengé-Napoli *et al.*, 2001) et complexé avec des protéines, notamment les protéines de transport du fer, l'albumine ou encore de lipoprotéines situés en surface des globules rouges (Vidaud *et al.*, 2005, 2007). L'hypothèse de fixation de l'uranium à la vitellogénine dans le compartiment sanguin est donc envisageable. En effet des travaux très récents menés au laboratoire (Michon *et al.*, en cours) ont pu montrer que la vitellogénine se complexait avec l'uranium lors de tests *in vitro* visant à mesurer ces constantes de complexation protéine/uranium.



## *Partie 3*



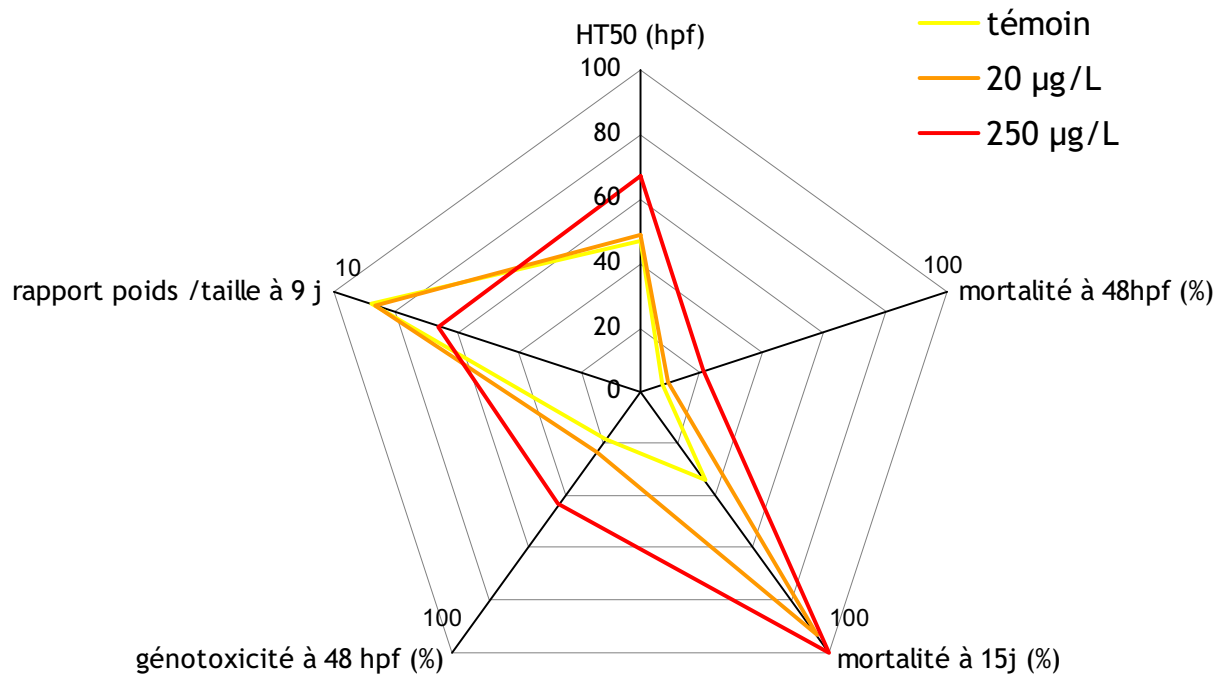
*Les résultats de la partie précédente ont été volontairement présentés par critères d'effets étudiés, des traits d'histoire de vie aux effets moléculaires avec à chaque partie un point de discussion sur le critère en question. Cette 3<sup>ème</sup> partie a pour objectif de faire le lien entre les résultats obtenus pour apporter des éléments de réponses aux questions de ce travail quant aux effets biologiques de l'uranium sur le cycle de vie du poisson *Danio rerio* : (i) quels sont les effets de l'uranium et les mécanismes sous jacents à différents niveaux d'intégration biologique, (ii) quels sont les stades de vie sensibles qui pourraient alors avoir un effet potentiel sur la dynamique de la population et enfin (iii) quelle est la part de toxicité liée à la chimiotoxicité et la part liée à la radiotoxicité de l'uranium.*



## Chapitre. Synthèse et perspectives

### *Plan détaillé*

1. Sensibilité des stades de vie précoces à une exposition directe à l'uranium
  - 1.1 Effets biologiques de l'uranium chez les stades de vie précoces embryon et larve
  - 1.2 Chimiotoxicité vs radiotoxicité de l'uranium
  - 1.3 Perspectives de recherches
2. Reprotoxicité de l'uranium chez les géniteurs
  - 2.1 Liens entre les effets à différents niveaux d'intégrations biologiques
  - 2.2 Perspectives de recherches



**Figure 62 :** Représentation graphique de l'intensité des effets pour chaque critère étudié aux deux stades de vie précoces : embryons et larve et aux deux concentrations d'expositions d'uranium appauvri par voie directe: 20 et 250 µg/L.

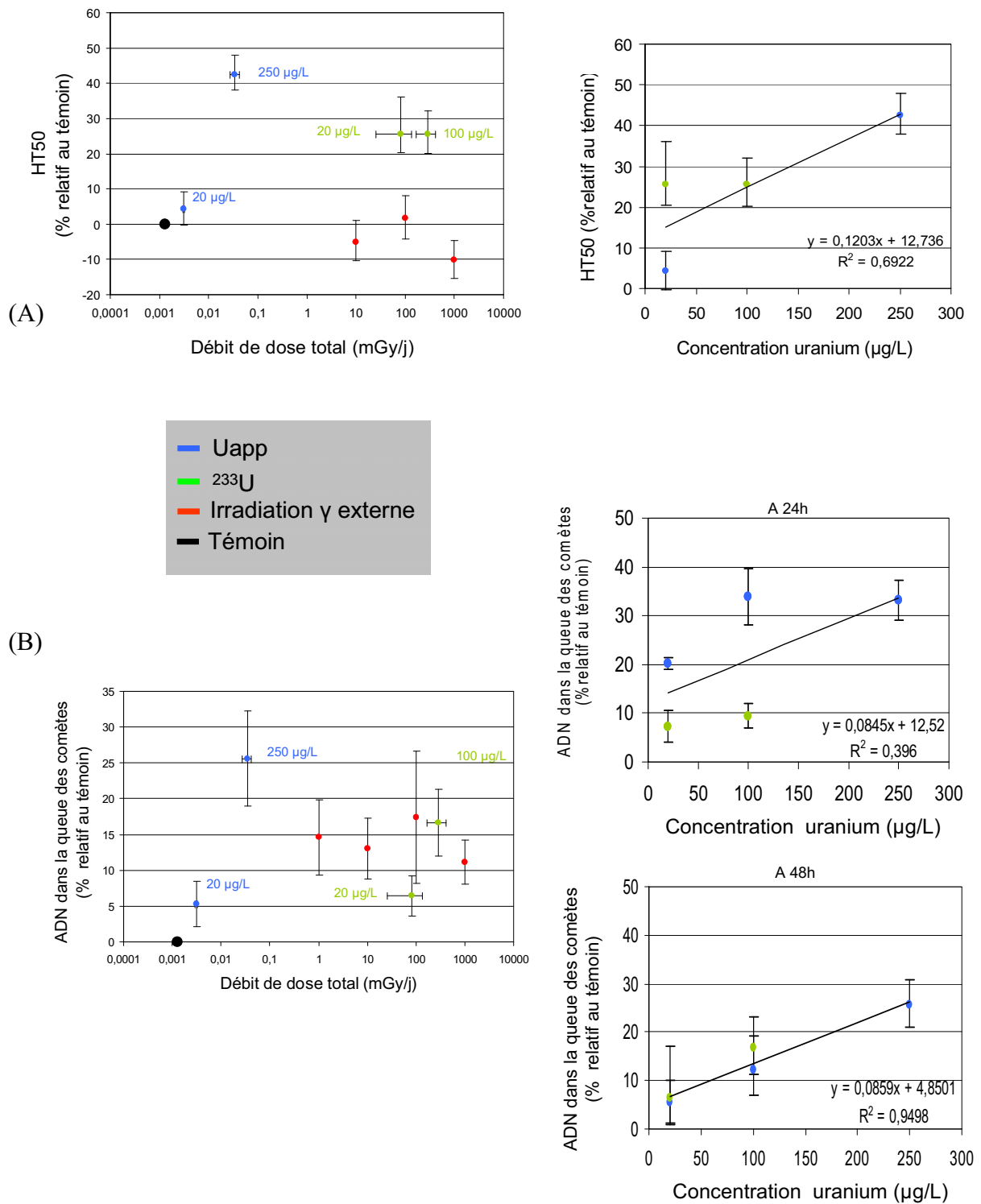
La démarche scientifique adoptée lors de ce travail de thèse a consisté à mettre en lien des critères d'effets à différents niveaux d'intégration biologique afin de mieux appréhender les effets biologiques de l'uranium sur le cycle de vie du poisson zèbre. Des liens entre les critères d'effets macroscopiques sur les traits d'histoire de vie majeurs du poisson et des effets sublétaux potentiellement précoces à l'échelle moléculaire ou subcellulaire ont été recherchés tout en prenant en compte la double toxicité de l'uranium.

## **1. Sensibilité des stades de vie précoces à une exposition directe à l'uranium**

### **1.1 Effets biologiques de l'uranium chez les stades de vie précoces**

Nous avons montré dans ces travaux que le  $HT_{50}$  (temps moyen pour que 50% des organismes aient éclos) est un critère d'effet précoce et indicateur de la contamination à l'uranium au stade œuf. Indépendamment de l'interprétation écologique des effets sur les temps d'éclosion (l'augmentation du temps passé sous la forme embryon pourrait exposer les œufs à une prédation plus forte), on retiendra que l'augmentation de la durée du stade œuf permet de protéger l'embryon pendant son développement lors de la présence d'uranium (**Gonzalez-Doncel *et al.*, 2003 ; Dave et Xiu, 1991 ; Fraysse *et al.*, 2006**). L'augmentation du temps passé au stade œuf pourrait également avoir un effet indirect sur la survie, dans la mesure où l'organisme commence déjà à utiliser ses réserves alors qu'il n'est pas éclos, ce qui conduirait à moins de réserve disponible pendant le stade larvaire.

Cependant les résultats expérimentaux ont montré que le test embryon n'était pas suffisant pour révéler la réelle toxicité de l'uranium. En effet au stade œuf, aucune conclusion n'a pu être tirée concernant des effets macroscopiques à faible concentration. La figure 62 résume l'intensité des effets mesurés chez les stades de vie précoces. Le retard d'éclosion peut être considéré comme un critère subléthal qui doit impérativement être associé à d'autres critères d'effets observés plus tardivement (la croissance larvaire, mortalité ou encore les dommages à l'ADN). En effet, le stade larve a montré une sensibilité plus importante pour le critère mortalité car il n'y a plus de barrière biologique (chorion) permettant la protection de l'organisme contre l'uranium. Pendant le stade larve, la croissance est alors le critère subléthal le plus sensible, bien que la mortalité soit clairement le critère le plus approprié pour mettre



**Figure 63 :** Représentation graphique des résultats de (A) HT50 (% moyen relatif au témoin de chaque expérience (IC95%) en fonction du débit de dose et en fonction de la concentration massique ; (B) pourcentage d'ADN dans la queue des comètes de cellules embryonnaires de 48h (% moyen relatif au témoin de chaque expérience ± ES) en fonction du débit de dose et en fonction de la concentration massique. Le débit de dose calculé (moyenne ± ES) intègre le bruit de fond mesuré et les données des critères d'effets sont issues des expériences embryon/larves.



en évidence la toxicité de l'uranium puisque à la plus faible concentration testée (20 µg/L) une mortalité quasi-totale des organismes de 15 jours a été observée.

Les stades de vie précoces montrent donc une importante sensibilité à l'exposition à l'uranium, comme cela a déjà été montré pour de nombreux métaux (**Jeziarka et al., 2008**).

De plus nos résultats confirment également les effets génotoxiques de l'uranium. En effet en parallèle des effets observés, nous avons pu mesurer les effets génotoxiques (augmentation de dommages à l'ADN) de l'uranium sur le stade embryonnaire à 24 et 48 hpf pouvant être à l'origine des effets au stade larve si ces dommages sont persistants. Une telle corrélation entre les effets génotoxiques et les effets chez les stades de vie précoces a déjà été révélée en terme de développement et de survie (**Jha et al., 2000, 2008 ; Hagger et al., 2005**).

## 1.2 Chimiotoxicité vs radiotoxicité de l'uranium

Seuls les stades de vie précoces (embryons et larves) ont été testés dans les trois types d'exposition (uranium appauvri, uranium 233 et irradiation  $\gamma$  externe). Les critères d'effets étudiés, communs aux trois types d'expérimentations, étaient le HT<sub>50</sub> et le pourcentage de dommages à l'ADN des cellules embryonnaires de 24 hpf et 48 hpf. Les données de bioaccumulation de l'uranium (appauvri et 233) dans les œufs acquises lors de l'expérience embryon/larve, ont permis de calculer le débit de dose (mGy/j) associé à chaque organisme pour chaque condition expérimentale après 48 h d'exposition. Pour rappel, les débits de dose n'ont pas été calculés dans les gonades, dans la mesure où la géométrie des organes ne pouvait pas être assimilée à des formes simples comme les œufs à une sphère, nécessaire au fonctionnement du logiciel EDEN. Ainsi pour les deux critères d'effets HT<sub>50</sub> et génotoxicité, il a été possible d'exprimer les résultats d'une condition en fonction du débit de dose. Afin de comparer les différentes expositions, les résultats ont été ramenés en relatif au témoin pour chaque expérience. La figure 63 représente en (A) les valeurs des HT<sub>50</sub> relatifs au témoin en fonction du débit de dose calculé (ou mesuré dans le cas de l'irradiation  $\gamma$  externe) et en fonction de la concentration massique d'uranium et en (B) les dommages à l'ADN relatifs au témoin en fonction du débit de dose puis en fonction de la concentration massique (à 24 et à 48 hpf).

▪ Dans le cas des deux critères d'effets en fonction du débit de dose, l'uranium appauvri et 233 se distinguent aisément ( $1,48 \cdot 10^{-3}$  et  $3,32 \cdot 10^{-2}$  mGy/j pour l'uranium appauvri et entre 80 et 290 mGy/j pour l'uranium 233). Ceci s'explique par la différence d'activité spécifique

entre les deux formes d'uranium, qui est 14 000 fois supérieure pour l'uranium 233. On retiendra également qu'à la concentration 20 µg/L d'uranium appauvri, le débit de dose calculé pour l'uranium appauvri ( $1,48 \cdot 10^{-3}$  mGy/j) est très proche du débit de dose naturel chez les témoins ( $1,30 \cdot 10^{-3}$  mGy/j) et de la gamme de bruit de fond naturel selon **Gómez-Ros et al.** (2004) qui varie de  $2,4 \cdot 10^{-4}$  à 0,144 mGy/j selon les écosystèmes et les espèces exposées.

▪ Concernant le critère d'éclosion  $HT_{50}$ , à faible concentration massique (20 µg/L), on observe une différence entre l'effet de l'uranium appauvri et celui de l'uranium 233. En effet ce dernier provoque un retard d'éclosion très important, qui peut être associé à une radiotoxicité plus importante. Pour ce critère, on peut donc conclure qu'à faible chimiotoxicité (20 µg/L), la différence d'effet entre les deux compositions d'uranium est due à la radiotoxicité supplémentaire dans le cas d'uranium 233 et qu'à forte chimiotoxicité (100 µg/L), la radiotoxicité ne provoque pas d'effet supplémentaire. En revanche, l'augmentation de radiotoxicité peut conduire à un effet opposé, comme dans le cas de l'irradiation  $\gamma$  externe où une accélération d'éclosion a été observée. Les effets de l'uranium 233 se situent entre ceux provoqués par l'uranium appauvri et ceux de l'irradiation  $\gamma$  externe, ce qui tend à confirmer un mélange d'effets chimiotoxiques et radiotoxique de l'uranium 233 sur ce critère d'effet. De plus, l'observation d'effet sur un critère de développement (décollement de la queue) semble également liée uniquement à l'uranium 233.

▪ Pour le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes des cellules embryonnaires, on observe des tendances différentes à chaque temps d'exposition. En effet à 24h, pour la concentration 20 µg/L, l'exposition à l'uranium appauvri provoque plus de dommages à l'ADN que l'uranium 233. De plus il n'y a pas de relation concentration effet significative à ce temps. A 48 h, à concentration massique similaire pour les deux compositions d'uranium, les pourcentages de dommages à l'ADN sont très proches, les dommages observés dans les embryons exposés à l'uranium appauvri s'étant réduits. Ainsi à ce temps, une relation concentration/effet claire est établie indépendamment des formes d'uranium.

Etant donné l'efficacité des systèmes de réparations de l'ADN chez l'embryon, on peut supposer que les dommages qui ne sont pas réparés à 48 hpf sont ceux qui ne sont pas réparables. Ainsi dans le cas de l'uranium appauvri, les mécanismes de réparations mis en place entre 24 et 48h expliquent la diminution des dommages. Alors que dans le cas de l'uranium 233, les pourcentages de dommages ne varient quasiment pas, on peut donc supposer une plus grande présence de lésions non réparables du type cassure double brin. On retiendra que plusieurs temps d'exposition et de mesures sont donc nécessaires pour discuter

ces effets. Cependant à ce stade de développement, il est important de noter que d'une part, le fort taux de division cellulaire peut amener une dilution des cellules endommagées, et que d'autre part les phénomènes d'apoptose cellulaires peuvent conduire à la disparition des cellules endommagées.

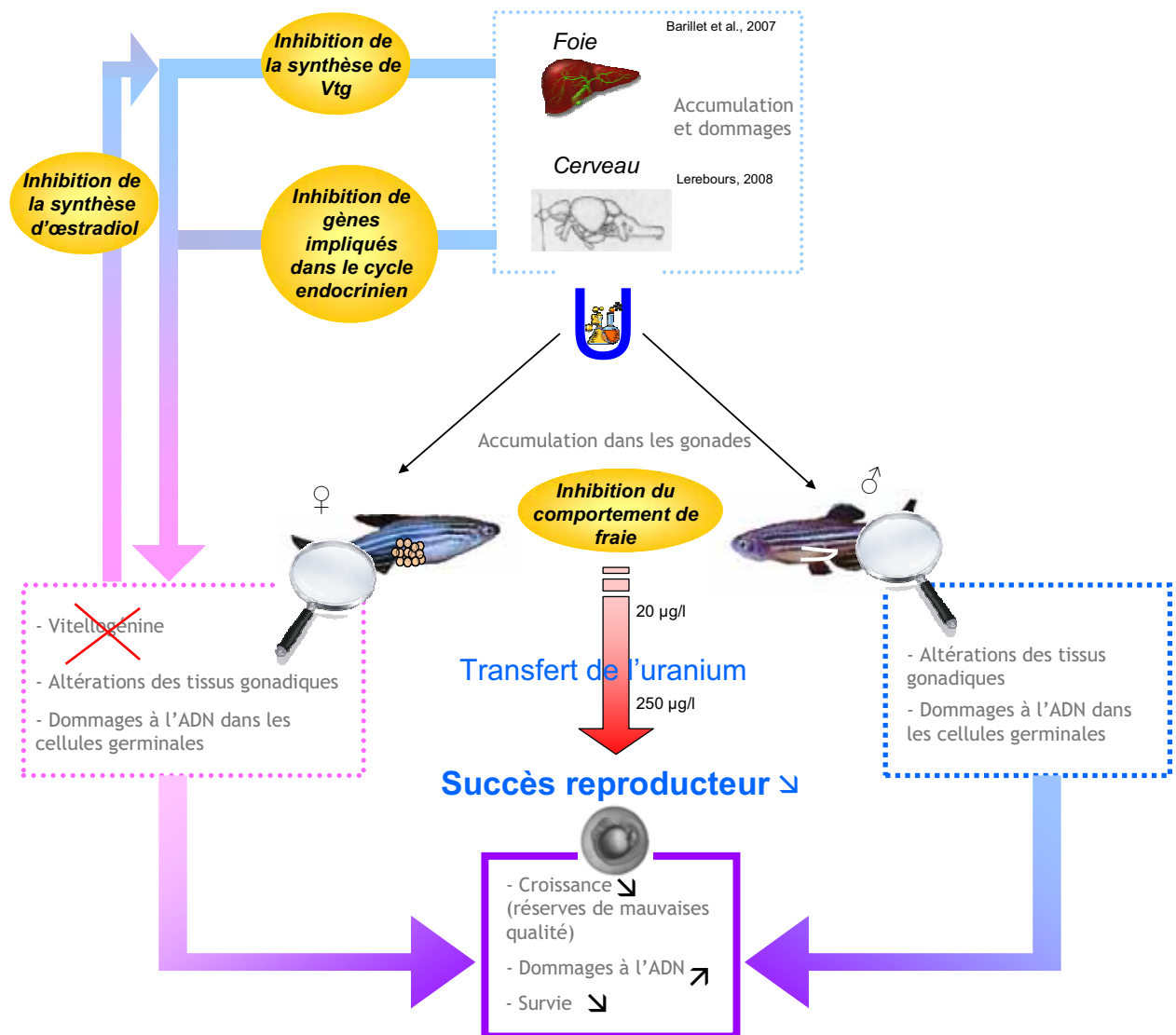
- Pour les deux critères d'effets, à 20  $\mu\text{g/L}$  d'uranium appauvri, on peut donc considérer qu'il n'y a pas de radiotoxicité et que les effets mis en évidence peuvent être reliés la chimiotoxicité. On note une augmentation du débit de dose avec la concentration 250  $\mu\text{g/L}$  d'uranium appauvri ; des effets radiotoxiques pourraient alors se joindre aux effets chimiotoxiques à forte concentration.

Dans le cas de l'irradiation  $\gamma$  externe, aucune relation dose/effet n'a pu être mise en évidence quel que soit le critère d'effet pour cette gamme de dose testée. Une relation dose/effet pour le critère de génotoxicité a cependant déjà été observée au laboratoire dans le cadre d'exposition *in vitro* de cellules germinales mâles (Adam *et al.*, 2007).

### 1.3 Perspectives de recherches

- Concernant le critère sur l'éclosion ( $\text{HT}_{50}$ ), nous avons pu voir qu'il pouvait permettre de mettre en évidence les différents types d'exposition (uranium ou irradiation  $\gamma$  externe) par des effets opposés (retard et accélération d'éclosion). Ces résultats ont cependant besoin d'être complétés pour pouvoir entreprendre une comparaison stricte entre les deux compositions d'uranium. Il serait intéressant de pouvoir tester d'avantage de concentrations massiques identiques aux deux formes d'uranium avec des activités radiologiques différentes. De plus, d'autres compositions isotopiques de l'uranium pourraient être testée et permettraient de conforter les hypothèses sur ce critère. En parallèle, l'étude du développement et de la mise en place d'organes clefs (foie, reins, cerveau et organe sensoriel comme la ligne latérale ou encore le développement de la vessie natatoire...) pourrait apporter des informations supplémentaires. Les possibilités d'exposition *in vivo* étant relativement limitée de part les fortes activités radiologiques induites par les grands volumes d'eau expérimentaux, l'exposition *in vitro* pourrait être un compromis dans un premier temps.

- Les différences de sensibilité entre les stades embryonnaire et larvaire pourraient être approfondies et notamment par la mise en place de test où l'exposition débiterait à des temps de développement différents.



**Figure 64 :** Schéma résumé des effets et mécanismes de toxicité envisagés lors d'une contamination à l'uranium appauvri des géniteurs.

▪ Les résultats concernant le critère de génotoxicité et les différences entre les effets dus à la chimiotoxicité et à la radiotoxicité de l'uranium, nous ont permis d'émettre des hypothèses notamment sur l'existence de lésions réparables ou non. Ces hypothèses pourraient être confirmées par l'étude plus particulière des mécanismes de réparation des dommages double brin. Une des techniques actuellement de plus en plus utilisées est une technique d'immunofluorescence permettant de détecter la protéine  $\gamma$ -H2AX qui intervient dans la réparation de ces cassures. Cette technique a d'ailleurs été appliquée récemment sur le Medaka par **Kinner *et al.* (2008)**.

## **2. Reprotoxicité de l'uranium chez les géniteurs**

### 2.1 Liens entre les effets à différents niveaux d'intégrations biologiques

Les effets reprotoxiques de l'uranium et les mécanismes suggérés sont résumés dans la figure 64. Tout d'abord nous avons observé que l'uranium s'accumulait dans les gonades mâles et femelles, tout en restant à des niveaux inférieurs aux organes cibles tels que les branchies ou le foie, confirmant ainsi les observations d'autres auteurs (**Barillet *et al.*, 2007 ; Cooley et Klaverkamp, 2000**). Cependant la reproduction en eau propre de ces adultes contaminés nous a permis de mettre en évidence que l'uranium pouvait être transféré de la gonade vers les individus F1. Le transfert de contaminant par le mécanisme de la reproduction a pu être mis en évidence dans le cas d'expositions au mercure (**Johnston *et al.*, 2001**) ou encore au sélénium (**Holm *et al.*, 2005**). L'uranium se comporte dans ce cas comme ces autres substances, mais cependant avec un taux de transfert moindre que dans le cas du mercure (au maximum 0,05% de la teneur totale en uranium retrouvé dans l'œuf vs jusqu'à 2% pour le mercure) (**Johnston *et al.*, 2001**).

Des dommages à l'ADN ont pu être mesurés par le test des comètes dans les cellules germinales mâles et femelles. La mise en évidence d'une relation entre les effets génotoxiques sur les cellules germinales et l'effet sur le succès reproducteur est un résultat admis de nos jours en écotoxicologie. Ces biomarqueurs de génotoxicité ont été suggérés comme de bons biomarqueurs précoces des effets à l'échelle de la population (**Anderson *et al.*, 1994 ; Jha, 2008**). Dans notre étude, la mesure de dommages à l'ADN chez les cellules embryonnaires (24 et 48 hpf) des organismes issus de la reproduction des géniteurs contaminés, a en effet montré une augmentation de ces dommages. Ces dommages peuvent alors résulter de la

présence de l'uranium issu du transfert parental mais pourrait également résulter des dommages persistants présents dans les noyaux des gamètes à l'origine de l'individu. Si ces dommages n'ont pas été réparés (les gamètes ne présentant pas de mécanismes de réparation comme les cellules somatiques), nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il y a eu un transfert de dommages irréversibles, d'autant qu'à 48 hpf, les résultats n'ont pas montré de diminution des pourcentages de dommages dans les cellules embryonnaires, témoin que ces dommages ne sont pas réparés ou réversibles. De plus, il a déjà été montré que des mutations pouvaient être héritées des descendants mâles dont les spermatozoïdes avaient été irradiés (**Kubota et al., 1995**). Cependant, il est considéré généralement que d'une part les embryons ont des capacités de réparation des dommages importants et qu'au moment de la fusion des gamètes lors de la fécondation des dommages peuvent être réparés. Les hypothèses liées à la présence de ces dommages chez les embryons restent donc à vérifier. En effet, on pouvait s'attendre à mesurer plus de dommages à l'ADN dans ces œufs issus de géniteurs contaminés que chez les œufs exposés directement à l'uranium appauvri, puisque les concentrations en uranium issues du transfert parental, mesurés dans les œufs sont supérieures. Cependant, ce n'est pas le cas. Une partie de l'uranium transférée par les géniteurs pourrait d'une part, être sous une forme chimique différente qui ne provoquerait pas les mêmes types de dommages et d'autre part être microlocalisé différemment dans l'embryon.

Nous pouvons également relier à ces effets, une forte mortalité des individus de la génération F1 au stade embryon et surtout larve. Les effets génotoxiques et les lésions histologiques observés sur les cellules germinales ont pu conduire à cette mortalité. Cette mortalité des F1 présente également un lien avec la présence d'uranium dans les gonades puisqu'en parallèle de leur dépuración, on observe une diminution de la mortalité jusqu'à retrouver des valeurs proches des témoins.

Cette mortalité embryo-larvaire pourrait également s'expliquer par d'autres effets comme une diminution de la qualité des réserves vitellogéniques de l'embryon. En effet nous avons pu mesurer une diminution de la concentration plasmatique de la vitellogénine chez les femelles exposées à l'uranium appauvri. La vitellogénine est une protéine incorporée dans l'ovocyte en phase de vitellogénèse et à l'origine des futures réserves nutritives de l'embryon. Sa diminution pourrait laisser envisager des réserves de mauvaises qualités et entraîner une probable mortalité de l'organisme en défaillance énergétique. De telles relations entre les effets ont également été suggérées dans les travaux de **Drevnick et al. (2003)**.

Une diminution de la concentration plasmatique de la vitellogénine chez les femelles exposées à l'uranium appauvri pourrait s'expliquer par une inhibition ou une perturbation de

sa synthèse. La synthèse de cette protéine a lieu dans le foie, organe qui a aussi été montré comme une cible de la toxicité de l'uranium (**Barillet *et al.*, 2007 ; Cooley et Klaverkamp, 2000**). En effet ces travaux ont montré qu'il accumulait fortement l'uranium et que de nombreux dommages oxydatifs (dès les faibles concentrations d'exposition 20 µg/L après 20 jours d'exposition), ainsi que des lésions histologiques pouvaient apparaître. Nous pouvons imaginer que l'organe responsable de la synthèse de la vitellogénine étant endommagé, celle-ci peut également subir les répercussions.

On pouvait émettre l'hypothèse que si moins de vitellogénine circulait dans l'organisme, moins de vitellogénine pouvait être incorporée dans les ovocytes. L'analyse histologique n'a cependant pas permis de révéler une diminution du nombre d'ovocyte au stade vitellogénique. En revanche, l'analyse histologique permet de faire l'hypothèse d'une potentielle perturbation hormonale à l'origine de la reprotoxicité de l'uranium. En effet l'analyse des membranes des ovocytes matures a montré des altérations des couches cellulaires dont certaines sont impliquées dans la synthèse d'œstradiol. L'œstradiol est responsable également de la stimulation de la synthèse de vitellogénine par le foie. Si en amont, une perturbation de la synthèse d'œstradiol existe, cet effet conduirait également à la perturbation de la synthèse de vitellogénine. L'observation de la diminution de comportement de fraie, voire d'absence à forte concentration, contribue de la même façon à conforter l'hypothèse de perturbation hormonale ou tout du moins laisse imaginer que les individus n'émettent pas ou ne reçoivent pas correctement les signaux hormonaux pour déclencher l'événement de ponte.

## 2.2 Perspectives de recherches

- Les expériences sur le stade adulte laissent suggérer plusieurs pistes de recherches. Tout d'abord, l'aspect perturbation endocrinienne doit être creusé. En effet des dosages hormonaux dans un premier temps permettraient d'étayer les hypothèses concernant l'absence de stimulation par l'œstradiol chez les femelles par exemple. D'autres études concernant l'activation ou l'inhibition de gènes impliqués dans les mécanismes de la reproduction pourraient dans un second temps compléter cet aspect comme cela a pu être étudié pour le cadmium (**Le Guével *et al.*, 2000 ; Vetillard et Bailhache, 2005**). Une étude plus poussée sur les effets sur les tissus gonadiques, par exemple par la quantification des différents stades de maturation ovocytaires de la gonade femelle, permettraient de vérifier si les stades en phase de vitellogénèse sont moins importants.

▪ Il est également apparu dans ces travaux que le lien avec les effets comportementaux pourrait être approfondi par des expériences sur les mouvements et les temps de fraie. Dans le cadre de la reproduction des adultes, il apparaît également nécessaire de procéder à des expériences de contaminations croisées afin d'identifier les effets liés ou non à l'un des deux sexes. Une étude de la génotoxicité sur les cellules embryonnaires issues de ces différents croisements pourrait être complémentaire de nos résultats.

▪ 20 µg/L est une concentration à laquelle des effets létaux sur la génération F1 ont pu être mesurés rapidement après l'exposition (15 jours), il conviendrait donc de faire de nouvelles expériences à des concentrations plus faibles, se rapprochant des normes de qualité environnementale proposée (0,3 µg/L + bruit de fond géochimique). Ces expériences à faible concentration pourraient également faire l'objet de recherche plus approfondies sur les critères du développement embryonnaire (mis en place des organes) et de la croissance des juvéniles. En termes d'évaluation du risque écologique, il apparaît clairement la nécessité d'intégrer toutes les étapes du cycle de vie des organismes dans les études toxicologiques, notamment les plus sensibles pour pouvoir établir des valeurs guides environnementales. Les tests standardisés d'utilité courante pour l'évaluation de la toxicité des polluants comme le test embryon, sont certes plus simples à mettre en place et moins coûteux, mais ne permettent pas dans le cas de l'uranium de conclure quant à l'évaluation du risque de ce radioélément.

▪ Il apparaît donc essentiel de poursuivre ces travaux sur les effets sur un cycle de vie complet pour confirmer les hypothèses de simulation mais aussi apporter de nouvelles informations. En effet les simulations ont pu montrer qu'une contamination parentale suivie d'une contamination directe engendrait une diminution du recrutement des organismes. Les effets sur la dynamique de population permettant d'appréhender les effets à l'échelle d'un écosystème sont de plus en plus abordés dans les études écotoxicologiques pour l'évaluation du risque environnemental (**Barnthouse et al., 1990 ; Woodhead, 2003 ; Lopes et al., 2005 ; Meng et al., 2006** ).

Dans cette démarche, des informations supplémentaires sur des paramètres écologiques comme par exemple la pression de prédation au stade œuf pourraient être intéressantes car nous avons pu voir que le temps passé au stade œuf était prolongé par le fait qu'il y ait des retards dans le processus d'éclosion. Or ce stade fait partie des stades relativement sensibles à la prédation, notamment par leurs propres géniteurs. De ce fait, une pression de prédation plus forte pourrait entraîner une diminution du recrutement. D'autre part, des informations sur le développement des organes sexuels chez les juvéniles lors d'expositions chroniques à l'uranium, permettrait de connaître l'âge d'atteinte de la maturité sexuelle et alors d'apporter



des données capitales pour l'étude de la dynamique de population. Des effets sur ces paramètres pourraient alors entraîner un effet drastique sur la population et sa dynamique.

Enfin, il apparaît également intéressant de tester la mise en place de mécanismes de résistance, transmis aux nouvelles générations issues de géniteurs contaminés à l'uranium appauvri en mettant en place des expérimentations avec des expositions continues à l'uranium sur tout le cycle de vie. En effet il a été montré dans le cas du cadmium que les organismes issus de géniteurs exposés étaient résistants au cadmium (**Wu et Lin, 2008**).

Ce type d'effet sur des expositions à l'uranium pourrait alors amener des nouvelles pistes de recherches par exemple dans la direction des phénomènes adaptatifs lors de pollution.



# **Conclusion**



L'objectif principal de cette thèse était d'évaluer les effets biologiques de l'uranium sur le cycle de vie du poisson zèbre. La démarche expérimentale mise en œuvre pour répondre à cet objectif consistait à étudier les stades de vie critiques du cycle biologique.

L'approche pluridisciplinaire de cette étude a donc permis de mettre en évidence des effets biologiques à faible concentration sur chaque stade de développement associé à un trait d'histoire de vie essentiel au bon déroulement du cycle de vie. En effet, l'ensemble des travaux a permis de mettre en évidence des effets de l'uranium sur les différents stades de vie testés et notamment sur les stades de vie précoces de par une toxicité directe par le milieu d'exposition et indirecte par des effets reprotoxiques sur les géniteurs. Des effets sublétaux sur la survie des stades de vie précoces, suivis d'un effet léthal à faible concentration, et sur le succès reproducteur des adultes ainsi que la survie de leur progéniture, ont été observés. Associés à ces effets macroscopiques, des effets génotoxiques sur les cellules germinales et sur les cellules embryonnaires, mais aussi des perturbations de protéines comme la vitellogénine impliquée dans la maturation ovocytaire, ont été notés.

L'ensemble des résultats acquis à partir des expérimentations mises en place a permis d'apporter des éléments de réponses à nos questions. Ainsi, ces résultats montrent clairement que les stades de vie précoces sont des stades très sensibles à l'uranium appauvri, et en particulier le stade suivant l'éclosion des œufs, le stade larve ; que l'exposition à l'uranium soit directe par le milieu ou indirecte via le transfert parental. En effet ce stade comporte de nombreuses phases critiques pour l'organisme, notamment l'acquisition de la nutrition autonome, qui conditionne la croissance de l'organisme. De plus, il est apparu essentiel d'étudier en parallèle de ces traits d'histoire de vie, des critères d'effets à différents niveaux d'intégration biologique, comme la génotoxicité, afin de mettre en évidence des effets précoces et également de mieux appréhender les effets à une échelle supérieure comme la population. En effet les données acquises sur la reproduction, le recrutement et la croissance sont des données écologiquement pertinentes pour discuter un effet sur la population et son intégrité génétique. Cependant ce travail de thèse en conditions de laboratoire contrôlées a été restreint à l'étude des effets sur des étapes fondamentales du cycle prises une à une. Des expériences sur le cycle de vie entier seraient révélatrices des conséquences des effets à un stade sur le stade suivant.

Une partie des résultats a également confirmé que les effets de l'uranium étaient principalement liés à sa chimiotoxicité. Ce type de résultat va dans le sens d'une mise en place de réglementation dans le domaine de l'évaluation du risque environnemental des radionucléides, qui ne serait pas uniquement basé sur les propriétés radiologiques des

éléments mais aussi sur leurs propriétés chimiques. Récemment une norme de qualité environnementale provisoire pour l'uranium, exprimée en concentration, a été proposée par le ministère de la recherche et du développement durable (NQEp U = 0,3 µg/L). Nos résultats confirment que la plus faible concentration toxique testée (20 µg/L) induisait un débit de dose ( $1,48 \cdot 10^{-3}$  mGy/j) proche du bruit de fond naturel et inférieur au débit de dose limite guide de 10 mGy/j préconisé par l'AIEA (AIEA 1992) et encore en dessous de la valeur 10 µGy/j proposé plus récemment. On retiendra également que le calcul de débit de dose supporte de nombreuses hypothèses (descendant, géométrie...) éloignant probablement les résultats de la réalité environnementale.

Ces travaux pourraient donc faire l'objet de recherches approfondies pour l'application au domaine de l'évaluation du risque environnemental pour la mise en place de valeurs guides pour l'uranium. Cependant il est nécessaire de prendre des précautions pour l'utilisation de ces résultats. En effet, il faut garder en mémoire que d'une part certaines des méthodologies ne sont pas mises au point dans le cas de recherche « *in situ* » mais « *in vivo* », voire « *in vitro* », les domaines d'applications étant très différents. L'exploitation des résultats ne peut donc pas être la même. De plus deux concentrations ont été testées sur l'ensemble des stades de vie (20 µg/L et 250 µg/L). Même si ce sont des concentrations représentatives de celles qu'on peut retrouver dans l'environnement, cela reste insuffisant pour déterminer une PNEC robuste, dans le cadre de l'évaluation du risque. D'autre part, dans nos conditions de laboratoire contrôlées, nous avons privilégié la voie d'exposition directe par le milieu d'exposition pour tous les stades, or ce type de conditions ne peut pas être le reflet de la complexité des processus d'exposition et des transferts des polluants dans le milieu aquatique (voie trophique, contexte de multipollution...).

Ces résultats contribuent donc à l'avancée des connaissances sur les conséquences écologiques de radionucléides sur les systèmes aquatiques d'eau douce mais permettent surtout d'ouvrir de nombreuses pistes de recherche. L'application de telles démarches d'analyse pluridisciplinaires et le développement de techniques propres aux analyses de terrain notamment, permettraient d'aborder des écosystèmes naturels, pour évaluer leur potentielle contamination par de l'uranium (e.g. à proximité d'anciens sites miniers) ou encore lors d'accident, (e.g. incident sur le site de Socatri en 2008). La confrontation de nos résultats en conditions contrôlées de laboratoire, face à des expérimentations identiques mais avec des prélèvements de terrain (e.g. tester l'eau de rivière en comparaison avec notre eau synthétique ou encore ajouter un compartiment au système par du sédiment prélevé) pourrait

être une première alternative qui permettrait de décrire de façon plus précise les conséquences d'une pollution à l'uranium dans l'environnement.

Une partie des travaux présentés dans ce mémoire fait l'objet de publications ou de communications :

*Publications:*

Bourrachot S., Simon O., Gilbin R. (2008) The effects of waterborne uranium on the hatching success, development and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 90, p. 29–36.

Bourrachot S., et al. Effects of DU in zebrafish (*Danio rerio*): on adult reproductive success, F1 generation survival and linked with biomarkers of exposure and effects. (à soumettre en Mai 2009).

*Congrès:*

Bourrachot S., Simon O., Garnier-Laplace J. (2007) Effects induced by external and internal irradiation in early life stage of *Danio rerio*. 17<sup>th</sup> annual meeting of SETAC-Europe, Porto (Portugal), 20-24 may 2007. (Poster).

Bourrachot S., Aubergat L., Gilbin R. (2008) Effects of uranium on reproduction on Zebrafish: relation ship between biomarkers of exposure and toxicity. 18<sup>th</sup> annual meeting of SETAC-Europe, Warsaw (Poland), 25-29 may 2008. (Poster).

Bourrachot S., Floriani M., Hinfrey N., Palluel O., Adam C., Porcher J.M., Brion F., Gilbin R. (2009) Effects of low level uranium exposure on critical life stages of zebrafish (*Danio rerio*). 19<sup>th</sup> annual meeting of SETAC-Europe, Goteborg (Sueden), 31 may -04 june 2009. (Communication orale).





## Références

### A

---

- AIEA (1992)** Effects of ionizing radiation on plants and animals at levels implied by current protection standard.
- Adam C., Larno V., Giraud M., et al. (2007)** Génotoxicité des radionucléides chez les organismes aquatiques : état de l'art et résultats préliminaires. *ARET-Actualités. Association pour la Recherche en Toxicologie*. Numéro spécial « Effets des toxiques chimiques / radioactifs sur le vivant ». p 75-84
- Adam C., Cavalié I., Camilleri V., et al. (2002)** *Analyse de l'uranium et des cations majeurs par spectrométrie d'émission atomique à couplage inductif (ICP-AES). Application à des échantillons biologiques*. IRSN/ DPRE-SERLAB-02-44.
- Adam C., Floriani M., Barillet S. (2008)** Uranium-induced ultrastructured changes in target tissues of the zebrafish: chemical and radiological aspects. Poster, 6<sup>th</sup> Congress SEBatMarseille, 6- 10 july.
- Anderson S.L., Wild G.C. (1994)** Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, 102, p. 9-12.
- Aizawa K., Mitani H., Kogure N., et al. (2004)** Identification of radiation-sensitive mutants in the Medaka, *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development*, 121(7-8), p. 895.
- Alonzo F., Hertel-Aas T., Gilek M., et al. (2008)** Modelling the propagation of effects of chronic exposure to ionising radiation from individuals to populations. *Journal of Environmental Radioactivity*, 99, p.1464-1473.
- Amatruda J. F., Shepard J. L., Stern H. M. et al. (2002)** "Zebrafish as a cancer model system." *Cancer Cell*, 1(3), p. 229.
- ANZECC & ARMCANZ (2001)** Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water quality. National water quality management strategy paper n°4, Australian and New Zealand and Conservation council et Agriculture and Resource management council of Australia and New Zealand, Canberra.
- Antunes S.C., Pereira R., Gonçalves F. (2007)** Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 53 (2), p. 207.
- Arfsten D.P., Still K.R., Ritchie G.D. (2001)** A review of the effects of uranium and depleted uranium exposure on reproduction and fetal development. *Toxicology and Industrial Health*, 17 (5-10), p. 180-191.
- Arfsten D.P., Schaeffer D. J., Johnson E.W., et al. (2006)** Evaluation of the effect of implanted depleted uranium on male reproductive success, sperm concentration, and sperm velocity. *Environmental Research*, 100, p. 205–215
- Arnault E., Doussau M., Pesty A., et al. (2008)** Natural uranium disturbs mouse folliculogenesis in vivo and oocyte meiosis in vitro. *Toxicology*, 247 (2-3), p. 80-87.
- Aruke A., Goksoyr A. (2003)** Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative hepatology*, 2.
- Au W.W., McConnell M.A., Wilkinson G.S., et al. (1998)** Population monitoring: experience with residents exposed to uranium mining/milling waste. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 405(2), p. 237-245.

### B

---

- Bagatto B., Pelster B., Burggren W. W. (2001)** Growth and metabolism of larval zebrafish: Effects of swim training. *Journal of Experimental Biology*, 204, p. 4335-4343.
- Barillet S (2007)** Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Thèse IRSN/Université Paul Verlaine, Metz
- Barillet S., Buet A., Adam C., et al. (2005)** Does uranium exposure induce genotoxicity in the Teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection Supplement 1*, 40, p. S175-S180.
- Barillet S., Adam C., Palluel O., et al. (2007)** Bioaccumulation, oxidative stress and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, p. 497-505.

- Barman R.P. (1991)** A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio*. *Record of the Zoological survey of India occasional paper*, 137, p. 1-91.
- Barnthouse L. W., Suter G. W., Rosen A. E. (1990)** Risks of toxic contaminants to exploited fish populations: Influence of life history, data uncertainty and exploitation intensity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9, p. 297-311.
- Beaugelin-Seiller K., Garnier-Laplace J. (2007)** Méthode d'évaluation du risque environnemental associé aux rejets de substances radioactives - Adaptation au cas des sites miniers de Haute Vienne. IRSN - DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT ET DE L'INTERVENTION - Service d'Étude sur le Comportement des Radionucléides dans les Ecosystèmes. Rapport DEI/SECRE n° 07-035.
- Beaugelin-Seiller K., Jasserand F., Garnier-Laplace J. et al. (2006)** Modeling radiological dose in non-human species: principles, computerization, and application. *Health Physics*, 90 (5), p. 485-493.
- Beaugelin-Seiller K., Jasserand F., Garnier-Laplace J. et al. (2004)** EDEN: Software to calculate the dose rate of energy for the non-human biota, due to the presence of radionuclides in the environment. *Environmental Studies Proceedings*, p. 87-96.
- Belfiore N. M., Anderson S. L. (2001)** Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research*, 489, p. 97-122.
- Bleise A., Danesi P.R., Burkart W. (2003)** Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2003, 64, p. 93-112.
- Bonin B., Blanc P.L. (2001)** L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine. *L'uranium de l'environnement à l'Homme* / ed. Collection IPSN: Les Ulis, p. 7-42.
- Bosque M.A., Domingo J.L., Lloblet J.M., et al. (1993)** Embryotoxicity and teratogenicity of uranium in mice following subcutaneous administration of uranyl acetate. *Biological Trace Element Research*, 36 (2), p. 109-118.
- Boudreau L., Guay I. (2002)** Effets de l'uranium sur la vie aquatique et détermination de critères de qualité de surface. Québec, Québec, Ministère de l'environnement.
- Brinkman S. F., Hansen D. L. (2007)** Toxicity of cadmium to early life stages of brown trout (*Salmo trutta*) at multiple water hardnesses. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, p. 1666-1671.
- Brion F., Nilsen B.M., Eiden J.K., et al. (2002)** Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and chemistry*, 28(8), p. 1699-1708.
- Brion F., Tyler C. R., Palazzi X., et al. (2004)** Impacts of 17[beta]-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 68(3), p. 193-217.
- Buet A., Barillet S., Camilleri V., et al. (2005)** Alterations of oxidative stress parameters in fish as response to direct uranium exposure, *Radioprotection*, 40 (suppl. 1), p. S151-S155.
- Bywater F., Banaczowski R., Bailey M. (1991)** Sensitivity to uranium of six species of tropical freshwater fishes and four species of cladocerans from northern Australia. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, p. 1449-1458.

## C

---

- Cajaraville M.P., Hauser L., et al. (2003)** Genetic damage and the molecular/cellular response to pollution. Effects of pollution on fish, molecular effects and population responses, Blackwell Sciences, p.14-82.
- Calmet D., Flury-Herard A., Jimonet C., et al. (2003)** Toxicologie radiologique et chimique, Clefs CEA.
- Chassard-Bouchaud C. (1983)** Cellular and subcellular localization of uranium in the crab *Carcinus maenas*: A microanalytical study. *Marine Pollution Bulletin*, 14 (4), p. 133-136.
- Cieresko A., Wolfe T.D., Dabroski K. (2005)** Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir. *Aquatic Toxicology*, 73 (2), p. 128-138.
- Clulow F.V., Dave N.K., Lim T.P. et al. (1998)** Radionuclides (lead-210, polonium-210, thorium-230, and -232) and thorium and uranium in water, sediments, and fish from lakes near the city of Elliot Lake, Ontario, Canada. *Environmental Pollution*, 99 (2), p. 199-213.

- Colle C., Garnier-Laplace J., Roussel-Debet S., et al. (2001)** Comportement de l'uranium dans l'environnement. *L'uranium de l'environnement à l'Homme* / ed. Collection IPSN: Les Ulis, p. 187-212.
- Cooley H.M., Klaverkamp J. F. (2000)** Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology*, 48 (4), p. 477-494.
- Cooley H.M., Evans R.E., Klaverkamp J. F. (2000)** Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology*, 48 (4), p. 495-515.

## D

---

- Davies P.H. (1980)** Acute toxicity to brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Salmo Gairdneri*) in soft water. Water pollution studies project F-33-R, Federal Aid in Fish and Wildlife Restoration, Fort Collins, CO, Colorado Division of Wildlife.
- Dave G., Xiu R. (1991)** Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 21, p. 126-134.
- De Gaspar I., BLANQUEZ M. J., FRAILE B., et al. (1999)** The hatching gland cells of trout embryos: Characterisation of N- and O-linked oligosaccharides. *Journal of Anatomy*, 194, p. 109-118.
- Denison F. (2004)** Uranium (VI) speciation: modelling, uncertainty and relevance to bioavailability models - Application to uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve, Thèse de l'Université de Provence Aix - Marseille I, 338 p.
- Dethloff G. M., Naddy R. B., Gorsuch J. W. (2007)** Effects of sodium chloride on chronic silver toxicity to early life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, p. 1717-1725.
- Diamond G.L., (1989)** Biological consequences of exposure to soluble forms of natural uranium. *Radiation Protection Dosimetry*, 26 (1-4), p. 23-33.
- Dietrich G.J., Szyrka A., Wojtczak M. et al.(2005)** Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*, 64 (8), p. 1809-1822.
- DIN 38 415-T6 (2001)** DIN (Deutsche Industrienorm, German Industrial Standard) (2001) DIN 38 415-T6, German standard methods for the examination of water, waste water and sludge—Subanimal testing (group T)—Part 6: Determination of the non-acute-poisonous effect of waste water to fish eggs by dilution limits. German Standardisation Organisation, Beuth Vertrieb GmbH, Berlin, Germany
- Domingo J.L. (2001)** Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a Review. *Reproductive Toxicology*, 15 (6), p. 603-609.
- Domingo J.L., Ortega A., Paternain J.L. et al. (1989a)** Evaluation of the perinatal and postnatal effects of uranium in mice upon oral administration. *Archives of Environmental Health*, 44 (6), p. 395-398.
- Domingo J.L., Paternain J.L., Llobet J.M. et al. (1989b)** The developmental toxicity of uranium in mice. *Toxicology*, 55 (1-2), p. 143-152.
- Drevnick P.E., Sandheinrich M.B. (2003)** Effects of dietary methylmercury on reproductive endocrinology of fathead minnows. *Environmental Science and Technology*, 37(19), p. 4390.
- Drevnick P.E., Sandheinrich M.B., Oris J.T. (2006)** Increased ovarian follicular apoptosis in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to dietary methylmercury. *Aquatic Toxicology*, 79(1), p. 49.

## E

---

- Eaton J. G., McKim J. M., Holcombe G. W. (1978)** Metal toxicity to embryos and larvae of seven freshwater fish species. I. Cadmium. *Environmental Contamination and Toxicology*, 19, p. 95-103.
- Eaton R.C., Farley R.D. (1974)** Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the laboratory. *Copeia*, p. 195-204.
- Egami N., Hama-Furukawa A. (1981)** Response to continuous  $\gamma$ -irradiation of germ cells in embryos and fry of the fish, *Oryzias latipes*. *International Journal of Radiation Biology*, 40(5), p. 563-568.

**Environnement Canada (2003)** Rejets de radionucléides des installations nucléaires (effets sur les espèces autres que l'être humain). Loi du Gouvernement du Canada sur la protection de l'environnement (1999), liste des substances d'intérêt prioritaire – Rapport d'évaluation.

**Environnement Canada (2008)** Canadian water quality guidelines for uranium: Scientific supporting document (draft).

**Ercal N., Gurer-Orhan H., Aykin-Burns N. (2001)** Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1 (6), p. 529-539.

**ERICA (2006)** Derivation of Predicted-No-Effect-Dose-Rate Values for Ecosystems (and their Sub-Organisational Levels) Exposed to Radioactive Substances. Deliverable 5. ERICA, European Commission, Sixth Framework, Contract FI6R-CT-2004-508847, 88 pp. Available from: <<http://www.ERICA-project.org/>>.

**Etoh H., Hyodo-Taguchi Y. (1983)** Effects of tritiated water on germ cells in Medaka embryos. *Radiation research*, 93, p. 332-339.

## F

---

**Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neill K.L. (1995)** The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339(1), p. 37-59.

**FASSET (2003)** Radiation Effects on Plants and Animals. FASSET Project Contract FIGE-CT-2000-00102. Woodhead, D., Zinger, I. /Eds., Deliverable 4, p. 196. Available from: <<http://www.ERICA-project.org/>>.

**Fernandez M., L'Haridon J., Gauthier L., et al. (1993)** Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. *Mutation Research*, 292, p. 83-99.

**Feugier A., Frelon S., Gourmelon P., et al. (2008)** Alteration of mouse oocyte quality after a subchronic exposure to depleted Uranium. *Reproductive Toxicology*, 26(3-4), p. 273-277

**Foran C.M., Peterson B.N., Benson W.H. (2002)** Influence of parental and developmental cadmium exposure on endocrine and reproductive function in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(3), p. 345.

**Fortin C., Dutel L., Garnier-Laplace J. (2004)** Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, p. 974-981.

**Fortin C., Denison F., Garnier-Laplace J. (2007)** Metal-phytoplankton interactions: Modelling the effect of competing ions (H<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Mg<sup>2+</sup>) on uranium uptake. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, p. 242-248.

**Frankenberg-Schwager, M. (1989)** Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiotherapy and Oncology*, 14, 307-320.

**Frayse B., Mons R., Garric J. (2006)** Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63, p. 253.

## G

---

**Garnier-Laplace J., Paquet F. (2001)** Bioaccumulation de radionucléides dans des situations d'exposition chronique des écosystèmes et des personnes du public. Rapport IPSN - DPRE 00-01/ DPHD 00-03. 60 p

**Garnier-Laplace J., Della Vedova C., Gilbin R., et al. (2006)** First Derivation of Predicted-No-Effect Values for Freshwater and Terrestrial Ecosystems Exposed to Radioactive Substances. *Environmental Science & Technology*, 40(20), p. 6498-6505.

**Gatesoupe F. J., Zambonino-Infante J. L., Cahu C., et al. (2001)** Ontogeny, development and digestive physiology of fish larvae. *Nutrition and feeding of fish and crustaceans*, Guillaume J. /Ed., Springer Praxis, Chichester, p. 199-212.

**Gerhard G.S., Kauffman E. J., Wang X., et al. (2002)** Life span and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Experimental gerontology*, 37, p. 1055-1068.

**Ghosh, P., Thomas P. (1995)** Binding of metals to red drum vitellogenin and incorporation into oocytes. *Marine Environmental Research*, 39(1-4), p. 165.

- Gilbin R., Alonzo F., Garnier-Laplace J. (2008)** Effects of chronic gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *Journal of environmental radioactivity*, 99, p. 134-145.
- Gilles A., Lecointre G., Miquelias A., et al. (2001)** Partial combination applied to phylogeny of European cyprinids using the mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(1), p. 22-33.
- Giraud M. (2006)** Développement et optimisation du test des comètes sur cellules primaires isolées de poisson zèbre (*Danio rerio*) : Application à l'étude des effets de l'uranium - Stage de recherche - Master 2, Université de Provence Aix - Marseille I, 30 p.
- Gomez-Ros J.M., Pröhl G., Taranenko V. (2004)** Estimation of internal and external exposures of terrestrial reference organisms to natural radionuclides in the environment. *Journal of Radiological Protection*, 24(4 A).
- Gonzalez-Doncel M., Larrea M., Sanchez-Fortun S., et al. (2003)** Influence of water hardening of the chorion on cadmium accumulation in medaka (*Oryzias latipes*) eggs. *Chemosphere*, 52, p. 75-83.
- Goolish E. M., Okutake K., Lesure S. (1999)** Growth and survivorship of larval zebrafish *Danio rerio* on processed diets. *Journal of Aquaculture*, 61, p. 189-198.

## H

---

- Hagger J. A., Atienzar F. A., Jha A. N. (2005)**. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 74, p. 205-217.
- Hallare A., Kosmehl V., Schulze T., et al. (2005)** Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish *Danio rerio* embryos. *Science of the total environment*, 347(1-3), p. 254.
- Hammerschmidt C.R., Sandheinrich M. B., Wiener J. G. et al. (2002)** Effects of dietary methylmercury on reproduction of fathead minnows. *Environmental Science and Technology*, 36(5), p. 877.
- Hart D.R., McKee P.M., Burt A.J., et al. (1986)** Benthic community and sediment quality assessment of Port Hope Harbour, Lake Ontario. *Journal of Great Lakes Research*, 12, p. 206-220.
- Hengé-Napoli M.H., L'azou B., Bérard P., et al. (2001)** Toxicité de l'uranium (Chapitre 8). *L'uranium de l'environnement à l'Homme*, ed/ Collection IPSN: Les Ulis, p. 239-260.
- Hamilton E.I. (1971)** The concentration and distribution of uranium in human skeletal tissues. *Calcified tissue research*, 7 (2), p. 150-162.
- Hamilton M.M., Ejnik J.W., Carmichael A.J. (1997)** Uranium reactions with hydrogen peroxide studied by EPR-spin trapping with DMPO. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 2(12), p. 2491-2494.
- Hamilton S.J., 1995**, Hazard assessment of inorganics to three endangered fish in the Green River, Utah, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30(2), p. 134-142.
- Hahn F.F., Guilmette R.A., Hoover M.D. (2002)** Implanted depleted uranium fragments cause soft tissue sarcomas in the muscles of rats. *Environmental Health Perspectives*, 110 (1), p. 51-59.
- Hodge H.C. (1973)** A history of uranium poisoning (1824-1942). *H. C. Hodge, J. N. Stannard, and J. B. Hursh Handbook of experimental pharmacology* /eds., New Series XXXVI, Uranium, Plutonium, Transplutonic elements: New-York, Springer-Verlag, p. 5-69.
- Hill A.J., Heideman W., Peterson R. E., et al. (2005)** Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1), p. 6.
- Holdway D.A. (1992)** Uranium toxicity to two species of Australian tropical fish. *The Science of The Total Environment*, 125, p. 137-158.
- Holm S. (1979)** A simple sequentially rejective Bonferroni test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6, p. 65-70.
- Holm, J., Palace V., Siwik P., et al. (2005)** Developmental effects of bioaccumulated selenium in eggs and larvae of two salmonid species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(9), p. 2373.

**Hu Q., Zhu S. (1990)** Induction of chromosomal aberrations in male mouse germ cells by uranyl fluoride containing enriched uranium. *Mutation Research*, 244 (3), p. 209-214.

**Hyodo-Taguchi Y., Aoki K., Matsudaira H. (1982)** Use of Medaka as a tool in studies of radiation effects and chemical carcinogenesis. *Radiation research*, 41, p. 135-155.

**Hyodo-Taguchi Y., Etoh H. (1986)** Effects of triated water on germ cells in Medaka. II. Diminished reproductive capacity following embryonic exposure. *Radiation research*, 106, p. 321-330.

## I

---

**ISO (International Organization for Standardization) (1996a)** Norme ISO 7346-1 relative à la qualité de l'eau : Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téléostei, Cyprinidae)] - Partie 1 : Méthode statique.

**ISO (International Organization for Standardization) (1996b)** Norme ISO 7346-2 relative à la qualité de l'eau : Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téléostei, Cyprinidae)] - Partie 2 : Méthode semi-statique.

**ISO (International Organization for Standardization) (1996c)** Norme ISO 7346-3 relative à la qualité de l'eau : Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téléostei, Cyprinidae)] - Partie 3 : Méthode avec renouvellement continu.

**ISO (International Standard Organization) (2003)** Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité vis à vis des embryons et larves de poissons d'eau douce - Méthode semi statique. ISO 12890, Geneva, Switzerland.

## J

---

**Jackson, S.P. (2002)** Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23, p. 687-696.

**Jarvis R.B., Knowles, J.F. (2003)** DNA damage in zebrafish larvae induced by exposure to low-dose rate [gamma]-radiation: detection by the alkaline comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 541, p. 63-69.

**Janz D.M. (2000)** Endocrine system. *The Handbook of experimental animals, The laboratory fish* /ed. Gary K. Ostrander, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, p. 189-217.

**Jha A. N., Cheung V. V., Foulkes M. E., et al. (2000)** Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutation Research*, 464(2), p. 213-228.

**Jha A. N., Dogra Y., Turner A., et al. (2005)** Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: Genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutation Research*, 586(1), p. 47-57.

**Jha A. N., Dogra Y., Turner A., et al. (2006)** Are low doses of tritium genotoxic to *Mytilus edulis*? *Marine Environmental Research, Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 13)*, 62(Supplement 1), p. S297-S300.

**Jha A. N. (2008)** Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23 (3), p. 207-221.

**Jeziarska B., Ugowska K., Witeska M. (2008)** The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiology and Biochemistry*, p. 1-16.

**Johnston T.A., Bodaly R.A., Latif M.A., et al. (2001)** Intra and interpopulation variability in maternal transfer of mercury to eggs of walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquatic Toxicology*, 52, p. 73-85

## K

---

**Kaipia A., Hsueh A.J.W. (1997)** Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual Review of Physiology*, p. 349-363.

**Keller E.T., Murtha J.M. (2004)** The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *Comparative biochemistry and physiology – C Toxicology and pharmacology*, 138 (3), p. 335.

**Kehrer J.P. (1993)** Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, 23 (1): 21-48.

- Kim D.-H., Sun Y., Seok Y., et al. (2005)** Investigating chorion softening of zebrafish embryos with a microrobotic force sensing system. *Journal of Biomechanics*, 38, p. 1359-1363.
- Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., et al. (1995)** Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), p. 253.
- Kimmel C. B., Miller C. T., Moens C. B. (2001)** Specification and Morphogenesis of the Zebrafish Larval Head Skeleton. *Developmental Biology*, 233(2), p. 239.
- Kinner A., Wu W., Staudt C., et al. (2008)** Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic acids research*, 36(17), p. 5678-5694.
- Knowles, J. (1999)** Long-term irradiation of a marine fish, the plaice *Pleuronectes platessa*: an assessment of the effects on size and composition of the testes and of possible genotoxic changes in peripheral erythrocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 75, p. 773-782.
- Kosmehl T., Hallare A., Reifferscheid G., et al. (2006)** A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, p. 2097-2106.
- Kovalsky V.V., Vorotnitskaya I.E., Lekarev V.S. (1967)** Biogeochemical food chains of uranium in aquatic and terraneous organisms: Radioecological Concentration Processes. *Proceedings of an International Symposium*, p. 329-332.
- Kubota Y., Shimada A., A Shima. (1992)** Detection of  $\gamma$ -ray-induced DNA damages in malformed dominant lethal embryos of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using AP-PCR fingerprinting. *Mutation Research - Mutation Research Letters*, 283(4), p. 263.
- Kundt M., Ubios A.M., Cabrini R.L. (2000)** Effects of uranium poisoning on cultured preimplantation embryos. *Biological Trace Element Research*, 75 (1-3), p. 235-244.
- Kurelec B. (1993)** Genotoxic disease syndrome. *Marine Environmental Research*, 35, p. 341-348.
- Kurttio P., Auvinen A., Salonen L., et al. (2002)** Renal effects of uranium in drinking water. *Environmental Health Perspectives*, 110 (4), p. 337-342.

## L

---

- Laale H. W. (1977)**. The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *Journal of Fish Biology*, 10, p. 121-173.
- Labrot F., Narbonne J.F., Ville P., et al. (1999)** Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36 (2), p. 167-178.
- Lawrence C. (2007)** The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquaculture*, 269, p. 1-20.
- Le Guevel R., Petit F.G., Le Goff P., et al. (2000)** Inhibition of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor activity by cadmium. *Biology of reproduction*, 63, p. 259-266
- Lenhart J.J., Cabaniss S.E., MacCarthy P., et al. (2000)** Uranium(VI) complexation with citric, humic and fulvic acids. *Radiochimica Acta*, 88, p. 345-353.
- Lerebours A., Gonzalez P., Adam C., et al. (2008)** Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles and gills of the zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant waterborne uranium concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, In press.
- Linares V., Albina M.L., Belleis M., et al. (2005)** Combined action of uranium and stress in the rat: II. Effects on male reproduction. *Toxicology Letters*, 158(3), p. 186.
- Lingenfelter S. F., Dallas C. E., Jagoe C. H., et al. (1997a)**. Variation in DNA content of blood cells in largemouth bass from contaminated and uncontaminated waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(10), p. 2136-2143.
- Lingenfelter S. F., Dallas C. E., Jagoe C. H., et al. (1997b)**. Variation in blood cell DNA in *Carassius carassius* from ponds near Chernobyl, Ukraine. *Ecotoxicology*, 6, p. 187-203.
- Lin R.H., Wu L.J., Lee C.H. et al. (1993)** Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, 319 (3), p. 197-203.

**Llobet J.M., Sirvent J.J., Ortega A., et al. (1991)** Influence of chronic exposure to uranium on male reproduction in mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 16 (4), p. 821-829.

**Lottermoser B., Ashley P., Costelloe M. (2005)** Contaminant dispersion at the rehabilitated Mary Kathleen uranium mine, Australia. *Environmental Geology*, 48, p.748-761.

## M

---

**Macklis R.M., Beresford B. (1991)** Radiation hormesis. *Journal of Nuclear Medicine*, 32(2), p. 350.

**Madic C., Genet M. (2001)** Propriétés physiques et chimiques de l'uranium. L'uranium de l'environnement à l'Homme / ed. Collection IPSN: Les Ulis, p. 43-82.

**Malyapa R. S., Bi C., Ahern E. W., et al. (1998)**. Detection of DNA damage by the alkaline comet assay after exposure to low-dose gamma radiation. *Radiation Research*, 149(4), p. 396-400.

**Markich S.J., Brown P., Jeffree R. (1996)** The use of geochemical speciation modeling to predict the impact of uranium to freshwater biota. *Radiochimica Acta*, 74, p. 321-326.

**Markich S.J., Brown P., Jeffree R. et al. (2000)** Valve movement responses of *Velesunio angasi* (Bivalvia: Hyriidae) to manganese and uranium: An exception to the free ion activity model. *Aquatic Toxicology*, 51, p. 155-175.

**Marques S.M., Antunes S.C., Pissarra H., et al. (2009)** Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in Iberian green frogs (*Rana perezi Seoane*) from a uranium mine pond. *Aquatic Toxicology*, 91(2), p. 187-195.

**Martoriarti A. (1999)** Organisation nucléaire des spermatozoïdes et méthodes d'évaluation des altérations du noyau. Rapport de stage de DEA « Biologie et productions animales, option biologie aquacole » de l'université de Rennes I.

**Massarin S. (2007)** Mise en place du test des comètes sur embryon de *Danio rerio* et étude des effets génotoxiques après l'irradiation externe  $\gamma$ . Rapport de stage de master 2 Recherche « Sciences et Technologies » Mention « Systèmes écologiques aquatiques » de l'université de Bordeaux 1.

**Maynard E.A., Downs W.L., Hodge H.C. (1953)** Oral toxicity of uranium compounds. C. Voegtlin, and H. C. Hodge/ eds., *Pharmacology and toxicology of uranium compounds: New-York, McGraw-Hill Book Co.*, p. 1121-1369

**McKim, J.M., 1985.** Early life stage toxicity tests. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Rand, G.M., Petrocelli S.R. /Eds., Hemisphere, New York, p. 58-95.

**McAleer M. F., Davidson C., Davidson W. R., et al. (2005)** Novel use of zebrafish as a vertebrate model to screen radiation protectors and sensitizers. *International Journal of Radiation, Oncology, Biology, Physics*, 61, p. 10-13.

**Meng Y., Lin B., Tominaga M., et al. (2006)** Simulation of the population-level effects of 4-nonylphenol on wild Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecological modelling*, 197, p. 350-360

**Michibata H. (1981)** Uptake and distribution of cadmium in the egg of the teleost, *Oryzias latipes*. *Journal of Fish Biology*, 19, p. 691-696.

**Michon J., Frelon S. Garnier C., et al. (2009)** Uranium (VI) Complexing Capacities of two Functional Proteins (Acetylcholinesterase and Vitellogenin) obtained by Fluorescence Quenching. *En cours de finalisation*.

**Miller A.C., Fuciarelli A.F., Jackson W.E. et al. (1998)** Urinary and serum mutagenicity studies with rats implanted with depleted uranium or tantalum pellets, *Mutagenesis*, 13 (6), p. 643-648.

**Miller A.C., Stewart M., Brooks K. et al. (2002a)** Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91 (1), p. 246-252.

**Miller A.C., Xu J., Stewart M., et al. (2002b)** Potential late health effects of depleted uranium and tungsten used in armor-piercing munitions: Comparison of neoplastic transformation and genotoxicity with the known carcinogen nickel. *Military Medicine*, 167 (2 supplement), p. 120-122.

**Miller A.C., Brooks K., Stewart M., et al. (2003)** Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation. *Journal of Environmental Radioactivity*, 64 (2-3), p. 247-259.

**Miyachi Y., Kanao T., Okamoto T. (2003)** Marked depression of time interval between fertilization period and hatching period following exposure to low-dose X-rays in zebrafish. *Environmental Research*, 93(2), p. 216.



**MOEE (1994)** Water management – Policies, guidelines, Provincial water quality objectives of the ministry of the environment. Queen printer for Ontario. PIB 3303E.

**Monleau M., De Méo M., Paquet F., et al. (2006)** Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicological Sciences*, 89 (1), p. 287-295.

**Morel F.M.M. (1983)** Principles of aquatic chemistry, New York, Wiley-Intersciences, 301p.

**Morello M., Cavalié I., Grasset G., et al. (2001)** Uranium : Propriétés des isotopes et méthodes de dosage susceptibles d'être mises en œuvre au Laboratoire de Radioécologie Expérimentale. IRSN - DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT ET DE L'INTERVENTION - Service d'Étude sur le Comportement des Radionucléides dans les Écosystèmes. Rapport DPRE-SERLAB-01-45.

## N

---

**Nacci D.E., Cayula S., Jackim E. (1996)** Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology*, 35, 197-210.

**Nagarajappa, Ganguly A. et Goswami U., 2006**, DNA damage in male gonad cells of Green mussel (*Perna viridis*) upon exposure to tobacco products, *Ecotoxicology*, 15, 365-369.

**Nagel, R.(2002)** DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*-a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX : Alternativen zu Tierexperimenten*, 19 (Supplement 1), p. 38-48.

**Nagel R. (1994)** Complete life-cycle tests with zebrafish - a critical assessment of the results. *Müller, r., Lloyd, R. /Ed. , Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Blackwell Science, Oxford, UK, pp188-195.

**Nieboer E., Richardson D.H.S. (1980)** The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, 1 (1), p. 3-26.

## O

---

**OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2004a)** OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. *Test 203 : Fish, acute toxicity test, OECD/ed.*, p. 9.

**OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2004b)** OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. *Test 204 : Fish, prolonged toxicity test : 14 day study, OECD/ed.*, p. 9.

**OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2004c)** OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. *Test 210 : Fish, early-life stage toxicity test, OECD/ed.*, p. 18.

**OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2004d)** OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. *Test 212 : Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages, OECD/ed.*, p. 18.

**OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2004e)** OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. *Test 215 : Fish, juvenile growth test, OECD/ed.*, p. 17.

**ORJOLLET D. (2008)** Protocole d'utilisation de la Chromatographie Liquide Ionique. Rapport IRSN/DEI/SECRE/LRE n° 08-018.

## P

---

**Paquin P.R., Gorsuch J.W., Apte S., et al. (2002)** The biotic ligand model: a historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 133 (1-2), p. 3-35.

**Parkhurst B.R., Elder R.G., Meyer J.S. (1984)** An environmental hazard evaluation of uranium in a Rocky Mountain stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3 (1), p. 113-124.

**Paternain J. L., Domingo J. L., Ortega A., et al. (1989)** The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 17(3), p. 291.

- Pellmar T., Fuciarelli A., Ejnik J., et al. (1999)** Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicological Sciences*, 49 (1), p. 29-39.
- Phillips, J.W., Morgan, W.F. (1993)** DNA double-strand breaks in mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 22, p. 214-217.
- Poston T.M. (1982)** Observations on the bioaccumulation potential of thorium and uranium in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 28, p. 682-690.
- Poston T.M., Hanf Jr R.W., Simmons M.A. (1984)** Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 22, p. 289-298.
- Pyle G.G., Swanson S.M., Lehmkuhl D.M. (2002)** Toxicity of uranium mine receiving waters to early life stage fathead minnows (*Pimephales promelas*) in the laboratory. *Environmental Pollution*, 116, p. 243-255.

## R

---

- Rackham, B. D., Woodhead D. S. (1984)** Effects of chronic gamma-irradiation on the gonads of adult *Ameioba splendens* (Osteichthyes: Teleostei). *International Journal of Radiation Biology*, 45(6), p. 645-56.
- Ragnarsdottir K.V., Charlet L. (2000)** Uranium behaviour in natural environments. *Environmental mineralogy: Microbial interactions, anthropogenic influences, Contaminated land and waste management* / ed. Mineral society of Great Britain & Ireland, 9, p. 333-377.
- Raymond-Whish S, Mayer LP, O'Neal T, et al. (2007)** Drinking water with uranium below the u.s. epa water standard causes estrogen receptor-dependent responses in female mice. *Environmental Health Perspectives*, 115(12), p 1711.
- Ribera D., Labrot F., Tisnerat G., et al. (1996)** Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects. *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology*, 146, p. 53-89.
- Roex E. W. M., de Vries E., van Gestel C. A. M. (2002)** Sensitivity of the zebrafish (*Danio rerio*) early life stage test for compounds with different modes of action. *Environmental Pollution*, 120, p. 355-362.

## S

---

- SASKATCHEWAN ENVIRONNEMENT (2006)** Surface water quality objectives: interim edition. EPB 356.
- Sandheinrich M.B., Miller K.M. (2006)** Effects of dietary methylmercury on reproductive behavior of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(11), p. 3053.
- Scott G.R., Sloman K.A. (2004)** The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, 68(4), p. 369.
- Sellin M.K., Kolok A.S. (2006)** Cd exposures in fathead minnows: Effects on adult spawning success and reproductive physiology. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(4), p. 594.
- Sellin M.K., Eidem T.M., Kolok A.S. (2007)** Cadmium exposures in fathead minnows: Are there sex-specific differences in mortality, reproductive success, and Cd accumulation? *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52(4), p. 535.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., et al. (1988)** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175 (1), p. 184-191.
- Simon O., Garnier-Laplace J. (2004)** Kinetic analysis of uranium accumulation in the bivalve *Corbicula fluminea*: effect of pH and direct exposure levels. *Aquatic Toxicology*, 68, p. 95-108.
- Simon O., Garnier-Laplace J. (2005)** Laboratory and field assessment of uranium trophic transfer efficiency in the crayfish *Orconectes limosus* fed the bivalve *C. fluminea*. *Aquatic Toxicology*, 74, p. 372-383.
- Shazili N. A. M., Pascoe D. (1986)** Variable sensitivity of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and alevins to heavy metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 36, p. 468-474.
- Sheppard S.C., Sheppard M.I., Gallerand M.O., et al. (2005)** Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity*, 79 (1), p. 55-83.

- Shimada A., Eguchi H., Yoshinaga S., et al. (2005)** Dose-Rate Effect on Transgenerational Mutation Frequencies in Spermatogonial Stem Cells of the Medaka Fish. *Radiation Research*, 163, 112–114.
- Souidi M., Gueguen Y., Linard C., et al. (2005)** In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology*, 214 (1-2), p. 113-122.
- Spence R., Gerlach G., Lawrence C., et al. (2008)** The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews*, 83 (1), p. 13.
- Spence R., Fatema M.K., Reichard M., et al. (2006)** The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of fish biology*, 69(5), p. 1435.
- Spence R., Smith C. (2006)** Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance. *Behavioral ecology*, 17 (5), p. 779.
- Spitsbergen J.M., Kent M.L. (2003)** The state of the art of the Zebrafish Model for toxicology and toxicologic pathology research - advantages and current limitations. *Toxicologic Pathology*, 31, p. 62-87.
- Stearns D.M., Yazzie M., Bradley A.S., et al. (2005)** Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis*, 20 (6), p. 417-423.
- Steinert S.A. (1996)** Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. *Marine Environmental Research*, 42, p. 253–259.
- Swanson S.M. (1982)** Levels and effects of radionuclides in aquatic fauna of the Beaverlodge Area. (Saskatchewan)/ed. S. Publication, No. C-806-5-E-82, Saskatoon, Saskatchewan Research Council, 187 p.
- Swanson S.M. (1983)** Levels of <sup>226</sup>Ra, <sup>210</sup>Pb and total U in fish near a Saskatchewan uranium mine and mill. *Health Physics*, 45 (1), p. 67-80.
- Swanson S.M. (1985)** Food-chain transfer of U-series radionuclides in a northern Saskatchewan aquatic system. *Health Physics*, 49 (5), p. 747-770.

## T

---

- Tarzwell C.M., Henderson C. (1960)** Toxicity of less common metals to fish, *Industrial Wastes*, 5, p. 52-67.
- Tilton S.C., C.M. Foran, Benson W.H. (2003)** Effects of cadmium on the reproductive axis of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 136(3), p. 265.
- Theodorakis C. W., Blaylock B. G., Shugart L. R. (1997)** Genetic ecotoxicology I: DNA integrity and reproduction in mosquitofish exposed in situ to radionuclides. *Ecotoxicology*, 6, p. 205-218.
- Theodorakis C. W., Shugart L. R. (1997)** Genetic ecotoxicology II: population genetic structure in mosquitofish exposed in situ to radionuclides. *Ecotoxicology*, 6, p. 335-354.
- Theodorakis C. W., Shugart L. R. (1998)** Genetic ecotoxicology III: the relationship between DNA strand breaks and genotype in mosquito fish exposed to radiation. *Ecotoxicology*, 7, p. 227-236.
- Theodorakis C. W., Elbl T., Shugart, L. R. (1999)** Genetic ecotoxicology IV: survival and DNA strand breakage is dependent on genotype in radionuclide-exposed mosquitofish. *Aquatic Toxicology*, 45, p. 279-291.
- Theodorakis C. W. (2001)** Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. *Ecotoxicology*, 10, p. 245-256.
- Thiébault C., Carrière M., Milgram S., et al. (2007)** Uranium Induces Apoptosis and Is Genotoxic to Normal Rat Kidney (NRK-52E) Proximal Cells. *Toxicological sciences*, 98(2), p. 479–487
- Tran D., Massabuau J.C., Garnier-Laplace J. (2004)** Effect of Carbon dioxide on uranium bioaccumulation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, p. 739-747.
- Tsyusko O, Yi Y. , Coughlin D., et al. (2007)** Radiation-induced untargeted germline mutations in Japanese medaka. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 145, p. 03–110.

## U

---

- UNSCEAR (2000)** Sources and effects of ionizing radiation: Annex H (Combined effects of radiation and other agents): 179-271.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (2002)** Fish life-cycle test guideline – Draft detailed review paper on a fish two-generation toxicity test, U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T), 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460, p.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (2003)** Revised draft detailed review paper on fish screening assays for endocrine disruption, U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T), 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460, p. 142.

## V

---

- Van Der Ven L.T.M, Werster P.W, Vos J.G. (2003)** Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (4), p. 908-913.
- Van Der Hurk R., Lambert J.G.D. (1983)** Ovarian steroid glucuronides function as sex pheromones for male zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Canadian journal of zoology*, 61, p. 2381-2387.
- Vetillard A., Bailhache T. (2005)** Cadmium: An endocrine disrupter that affects gene expression in the liver and brain of juvenile rainbow trout. *Biology of Reproduction*, 72(1), p. 119.
- Vidaud C., Dedieu A., Basset C. et al. (2005)** Screening of human serum proteins for uranium binding. *Chemical Research in Toxicology*, 18 (6): 946-953.
- Vidaud C., Gourion-Arsiquaud S., Ro F., et al. (2007)** Structural Consequences of Binding of UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> to Apotransferrin: Can This Protein Account for Entry of Uranium into Human Cells? *Biochemistry*, 46, p. 2215—2226
- Vindimian E. (2003)** Macro REGTOX [online]. Available at: [http://eric.vindimian.9online.fr/DOC\\_fr\\_web/doc\\_fr\\_2.html](http://eric.vindimian.9online.fr/DOC_fr_web/doc_fr_2.html).
- von Westernhagen H. (1988)** Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. Hoar, W.S., Randall, D.J. /Eds, Fish Physiology, vol. XIA. Academic press, San Diego, p. 253-346.

## W

---

- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION (2001)** Depleted uranium: Sources, exposure and health effects. WHO/SDE/PHE/01.1, Geneva, Switzerland.
- Waite D.T., Joshi S.R., Sommerstad H. (1988)** The effect of uranium mine tailings on radionuclide concentrations in Langley Bay, Saskatchewan, Canada, Archives of environmental. *Contamination and Toxicology*, 17 (3), p. 373-380.
- Waite D.T., Joshi S.R., Sommerstad H., et al. (1990)** A toxicological examination of whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and northern pike (*Esox lucius*) exposed to uranium mine tailings. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19 (4), p. 578-582.
- Weber L.P., Hill R.L., Janz D.M. (2003)** Development estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. *Aquatic toxicology*, 63, p. 431-446.
- Westerfield M. (1995)** The zebrafish book , a guide for the laboratory use of zebrafish (*brachydanio rerio*). University of Oregon press, Eugene, OR.
- Wirgin I.I., Theodorakis C.W. (2002)** Molecular biomarkers in aquatic organisms : DNA damage and RNA expression. *S.M. Adams/ eds.*, Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. Pages 43-110
- Wilson J.T., Pascoe P.L. et al. (1997)** Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis*. *Mutation Research*, 399, p. 87 – 95.
- Woodhead D. S. (2003)** A possible approach for the assessment of radiation effects on populations of wild organisms in radionuclide-contaminated environments? *Journal of Environmental Radioactivity*, 66(1-2), p. 181-213.

**Wu S.M., Lin H.C., Yang W.L. (2008)**The effects of maternal Cd on the metallothionein expression in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae. *Aquatic Toxicology*, 87(4), p. 296-302.

## **Y**

---

**Yazzie M., Gamble S.L., Civitello E.R. et al. (2003)** Uranyl acetate causes DNA single strand breaks *in vitro* in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chemical Research in Toxicology*, 16 (4), p. 524-530.

## **Z**

---

**Zeman F. A., Gilbin R., Alonzo F. et al. (2008)**. Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* , 86(3), p. 370.

**Zhu S.P., Hu Q.Y., Lun M.Y. (1994)** Studies on reproductive toxicity induced by enriched uranium., *Zhonghua yu fang yi xue za zhi (Chinese journal of preventive medicine)* 28(4), p. 219.



# **Annexe:** Article: Effet de l'uranium sur le succès d'éclosion, le développement et la survie des stades de vie précoces de poisson zèbre (*Danio rerio*).

Aquatic Toxicology 90 (2008) 29–36



Contents lists available at ScienceDirect

**Aquatic Toxicology**

Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aquatox](http://www.elsevier.com/locate/aquatox)



## The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*)

Stéphanie Bourrachot\*, Olivier Simon, Rodolphe Gilbin

Laboratoire de Radioécologie et Ecotoxicologie, IRSN, Cadarache, 13115 Saint-Paul-lez-Durance, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 April 2008

Received in revised form 28 July 2008

Accepted 30 July 2008

#### Keywords:

*Danio rerio*

Early life stage

Uranium

Chemical toxicity and radiotoxicity

### ABSTRACT

In this study, we investigated the effects of the radioactive metal uranium (U) on the embryonic development, hatching success, growth rate, and survival of juvenile zebrafish (*Danio rerio*). We studied the effects of depleted uranium (20–500  $\mu\text{g L}^{-1}$  of DU), inducing mainly chemical toxicity due to its low specific activity, and the combined effects of chemical and radiological toxicity by using a higher specific activity uranium isotope (20 and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  of  $^{233}\text{U}$ ). Results showed that early life stages are significantly affected by uranium exposure through both chemical and combined (chemical and radiological) toxicity. Experiments showed significant effects of U on hatching success starting at the concentration of 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  of DU, causing a 42% delay in median hatching times relative to control. Furthermore, a reduction of growth (decrease in body length and weight) was observed followed by a high mortality of pro-larvae stage (up to 100% at DU concentrations of 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  upon a 15 day exposure). Bioaccumulation measurements highlighted that U was mainly localised in the chorion but penetrated in the embryo inside eggs at a higher concentration. The effects differed depending on the isotopic composition of the uranium: sublethal defects in the tail detachment process were more pronounced for  $^{233}\text{U}$  than DU exposure, while the presence of  $^{233}\text{U}$  specifically affected embryo development and led to higher mortality rates of the prolarvae. The results from this study showed that the early life stages of zebrafish seems to be more sensitive to uranium contamination than more mature stages, and underline the importance of including pro-larval stages into toxicity tests in order to improve the relevancy for environmental risk assessments.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Uranium (U) is naturally present in the environment as a mixture of three alpha-emitting radioisotopes (0.005%  $^{234}\text{U}$ , 0.720%  $^{235}\text{U}$ , and 99.274%  $^{238}\text{U}$ ) (Madic and Genet, 2001) and is dispersed throughout the biosphere in soil, water, air, plants, and animals through natural biogeochemical processes (Bleise et al., 2003). These processes distribute U in surface waters at concentrations ranging from a few  $\text{ng L}^{-1}$  to  $6 \mu\text{g L}^{-1}$  (Bonin and Blanc, 2001; World Health Organization, 2001) and up to  $1 \text{ mg L}^{-1}$  at the vicinity of uraniumiferous sites. Industrial activities linked to nuclear fuel production cause the remobilization of U, leading to elevated concentrations of up to a few  $\text{mg L}^{-1}$  in certain environments (Betcher et al., 1988; Schmidt, 2004). The past and present uses of depleted

uranium (DU), the byproduct of nuclear enrichment of uranium, position the element U as a main issue for environmental protection and human health (World Health Organization, 2001; Brand and Schnug, 2005).

The toxic action of uranium in organisms potentially originates from both its chemical and radiological properties, dependent on the specific activity of considered isotopes (e.g. from  $1.24 \times 10^4$  to  $3.57 \times 10^8 \text{ Bq g}^{-1}$ , respectively for  $^{238}\text{U}$  and  $^{233}\text{U}$ ). Indeed, it belongs to the class A metals like Ca (Nieboer and Richardson, 1980) and thus it has high and stable affinity to oxygenated bonds (hydroxylic, carboxylic, phosphate... ). Moreover, being mainly an alpha emitting radionuclide, it induces internal radiation hazard through the direct ionizing of molecules and oxidative damages. Data concerning the ecotoxicological effects of U on aquatic vertebrates such as fish are rare. The radioecotoxicology literature is dominated by data concerning the effects of gamma irradiation on non-human biota (Real et al., 2004) while few studies have been conducted on the assessment of internal alpha radiation effects. Chronic low level exposure to ionizing contaminants on fish is much less studied (Garnier-Laplace et al., 2004). Furthermore, for radioactive elements with low specific activity, such as DU, the relationship

\* Corresponding author at: Laboratoire de Radioécologie et Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Cadarache, Bat 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance cedex, France. Tel.: +33 4 92 42 19 96 82; fax: +33 4 92 42 19 91 51.

E-mail address: [stephanie.bourrachot@irsn.fr](mailto:stephanie.bourrachot@irsn.fr) (S. Bourrachot).



between chemotoxicity and radiotoxicity in the effects observed in organisms remains poorly understood.

The few extant studies describing the effects of U in fish have primarily focused on bioaccumulation and acute toxicity from exposure to waterborne uranium (Poston, 1982; Bywater et al., 1991; Holdway, 1992; Labrot et al., 1999; Roex et al., 2002) at exposure concentrations far higher than environmentally relevant levels. Effects have been reported on oxidative damages such as lipid peroxidation (Labrot et al., 1999) and on enzymatic activities linked to anti-oxidant defense mechanisms such as catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity (Barillet et al., 2007).

Such studies, as most of the toxicological and ecotoxicological studies, have focused on mature or adult organisms, though a number of researchers have targeted the early life stages of fish to have the most relevant endpoints in bioassays for assessing the ecological risk posed by substances in aquatic environments (Eaton et al., 1978; McKim, 1985; Shazili and Pascoe, 1986; von Westernhagen, 1988; Bresch, 1991; Oberemm, 2000). Indeed, the effects of contaminants on various life stages of aquatic organisms in ecotoxicological studies are of considerable interest in analysing the wider effects on populations (Barnhouse et al., 1990; Woodhead, 2003).

We conducted two rounds of experiments to investigate the effects of U on the early life stages of the zebrafish (*Danio rerio*). This species is commonly used as a biological model in ecotoxicology (Nagel, 2002; Hill et al., 2005; McAleer et al., 2005) and in studies concerning molecular genetics and neurology (Amatruda et al., 2002). Its embryonic development is also easily observable. The first objective was to study the effects of U at low concentration levels (ranging from 20 to 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) on the early life stages (from eggs to prolarvae) on mortality, embryonic development, hatching success, and growth (body length and dry weight). The toxicological endpoints were chosen to represent the main periods of early development, as summarized by Frayse et al. (2006) based on Kimmel's work (1995). The second objective was to distinguish between the contributions of U chemotoxicity and radiotoxicity by using two isotopic compositions: a low-specific activity isotopic composition close to that of DU, and the high-specific activity  $^{235}\text{U}$  isotope.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Zebrafish maintenance and egg production

Adult zebrafish (obtained from Aquasyva, Pertuis, France) were maintained in 40 L of water in an aerated holding tank (60 fish/tank). Water was manually renewed by changing 50% of the total volume each week and by refilling the evaporated water each day. The tank was kept in a room with a 12/12 h light/dark photoperiod and a temperature of  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Adult fish (aged 4–12 months) were fed twice daily with commercial flake food (Tetramin, France), supplemented with live neonates of *Daphnia magna* twice a week.

The water composition (in  $\text{mg L}^{-1}$ :  $\text{K}^+ = 5.94$ ;  $\text{Na}^+ = 7.46$ ;  $\text{Mg}^{2+} = 4.73$ ;  $\text{Ca}^{2+} = 11.58$ ;  $\text{Cl}^- = 32.57$ ;  $\text{NO}_3^- = 19.53$ ;  $\text{SO}_4^{2-} = 9.56$ ;  $\text{pH} = 6.5 \pm 0.2$ ) results in a compromise between the conditions necessary for healthy fish physiology and the optimal U bioavailability (Denison and Garnier-Laplace, 2005). Adult fish were gradually acclimatized to this water composition. Ten groups of adults (sex ratio: 1:2) were placed separately in small spawning aquaria to keep the fish from eating any newly spawned eggs. Spawning was induced by light. Egg viability was confirmed when the blastula stage was reached at 3 hpf (hours post fertilization) without visible anomalies, otherwise they were discarded. The brood was considered to be of good quality for the experiment when a viability of at least 80% was attained.

### 2.2. Experimental

#### 2.2.1. Experiment I: Embryo test

The following range of DU concentrations ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , specific activity ( $S_A$ ) =  $1.23 \cdot 10^4 \text{ Bq g}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, France) was tested during a period of 120 hpf: 0, 20, 50, 100, 150, 250 and 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Fifty eggs were randomly distributed individually onto polystyrene plates (square Petri dishes) after being rinsed in fresh test medium (same composition of water maintenance and reproduction of adults). Synthetic water containing U was renewed daily (temperature:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; and 12/12 h photoperiod). The stages of embryo development were observed daily under a binocular microscope by observing the following specific endpoints noted by Kimmel et al. (1995): blastula (3 hpf), gastrula (5 hpf), segmentation (10–24 hpf), and pharyngeal (24–48 hpf). At 48 hpf the embryos started to hatch, and the number of hatched eggs was recorded until 120 hpf. Eggs were considered hatched when the entire body (from tail to head) had completely exited the chorion. The hatching rate was determined as a percentage of hatched eggs from live eggs at a given time. The mean hatching time ( $\text{HT}_{50}$ ), which represents the time necessary for 50% of the eggs to hatch, was then calculated. In addition, the rate of mortality was determined every 24 h until 120 hpf.

#### 2.2.2. Experiment II: Embryo larval test

Eggs were exposed to 20 and 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  of DU according to the results obtained in experiment I. These concentrations were selected so as to represent the highest no-effect concentration on embryonic stage and the lowest effect concentration on hatching rate, respectively. A second isotopic composition, consisting of  $^{233}\text{U}$  (uranyl nitrate,  $S_A = 3.57 \times 10^8 \text{ Bq g}^{-1}$ , IRMM, Belgium), was used at concentrations of 20 and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Since the specific activity of  $^{233}\text{U}$  is 29,000 times higher than that of DU, we expected that the effects of the former would constitute a combination of chemotoxicity and radiotoxicity.

For each exposure condition (control, DU, and  $^{233}\text{U}$ ), we used three 500 ml polycarbonate bottles that contained 50 eggs each ( $n = 750$ ). The exposure medium was renewed every day by transferring the eggs into fresh test medium. The bottles were placed in an incubator (at a temperature of  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , and a 12/12 h photoperiod) during the 15 days of exposure. The larvae were fed with NobilFluid (JBL, Germany) starting on day 9.

**2.2.2.1. Embryo development, hatching rate and mortality.** The main stages of embryo development and the hatching and mortality rates were determined daily (see experiment I).

**2.2.2.2. Larval growth: Length and dry weight.** Days 9 and 15 were chosen as significant points for the measurement of growth, according to the pro-larval stage development. Additionally, a sample of eggs was weighed on day 2, at which time they were manually dechorionated with two sharpened dissection needles for determining embryo and chorion weight.

Eggs and larvae were euthanized with 0.05% (w/v) MS-222 (Sigma-Aldrich). Photographs for anterior–posterior length measurement (beginning of the mouth to end of the most posterior somite) were acquired using a binocular microscope with a connected camera (DS Camera Control Unit DS-U1, Nikon). After image analysis and egg dissection, the samples (larvae, chorion, embryo) were rinsed with control water in three baths for over 10 min. Each sample was placed in an aluminium pan and dried for 48 h at  $50^\circ\text{C}$ . After cooling, the samples were weighed with an SE2 ultra-microbalance (precision of 0.1  $\mu\text{g}$ , Sartorius, Goettingen, Germany).



### 2.3. Sample analyses

#### 2.3.1. Uranium quantification in water

The exposure conditions were controlled by daily measurements of DU in water before and after renewal. Samples were acidified with HNO<sub>3</sub> (2%, v/v) prior U quantification by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES Optima 4300DV, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA; detection limit: 10 µg L<sup>-1</sup>). The <sup>233</sup>U concentration in water was measured directly by mixing 1 ml of sample with 19 ml of a liquid scintillation cocktail (Instagel, Packard Instruments, France) and detection through liquid scintillation analysis (Quantulus 1220, Wallac Oy, Finland; detection limit: 30 mBq).

#### 2.3.2. Uranium quantification in organisms (Experiment II)

For each sampling time, 30 eggs per experimental condition were measured for growth and U content. Prior to the hatching stage (day 2), DU and <sup>233</sup>U accumulation was determined in both the embryo and the chorion after they had been manually dechorionated. After the hatching stage (on days 9 and 15), the amount of accumulation inside the bodies of larvae was determined. For DU exposure, samples were digested in 1 ml of 15.3 M HNO<sub>3</sub> and 1 ml of 1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Samples were then dried on a sand bath (180 min, 90 °C), and dissolved in 10 ml of acidified ultra pure water (2%, v/v, HNO<sub>3</sub>) before analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS VARIAN 810-MS; detection limit: 10 ng L<sup>-1</sup>). The samples exposed to <sup>233</sup>U were digested by the same method as the DU samples, dissolved in 1 ml of 1 M HNO<sub>3</sub> and analysed as described above for water samples.

#### 2.4. Statistical analyses

Median hatching time (HT<sub>50</sub>) was estimated by fitting logistic model with the Excel™ macro RegTox (Vindimian, 2003). The associated 95% confidence intervals (95%CI) were estimated by the RegTox tool using a bootstrap technique (Efron, 1981; Isnard et al., 2001). Other data were expressed as the mean ± the standard error of the mean.

For each observation time (24, 48, 52, 72, 78, 96, and 102 hpf) control hatching rates were pairwise compared using pairwise chi-square tests. In order to keep a global alpha risk at a 5% level for each observation time, *p*-values of the pairwise Chi-square tests were adjusted according to the Holm-method (Holm, 1979). The same procedure was applied on mortality rate data at time 3, 4, 9 and 15 days.

For each observation time (days 9 and 15) body length mean values of each condition (control, 20 µg L<sup>-1</sup> DU, 20 µg L<sup>-1</sup> <sup>233</sup>U, 100 µg L<sup>-1</sup> <sup>233</sup>U, 250 µg L<sup>-1</sup> DU) were compared to each others using separately nested ANOVA (replicate factor nested in condition factor) and Tukey HSD post hoc tests. Normality assumption was visually checked, using a QQplot of standardized residuals vs. normal quantiles. Variance homogeneity assumption was checked on residuals using a residuals vs. fitted plot (Faraway, 2002). When residual normality or/and variance homogeneity assumptions were not satisfied, the Box-Cox transformation was applied. When transformation failed to improve residual normality and variance homogeneity, Kruskal-Wallis test was used, followed by pairwise Wilcoxon tests with Holm correction of the *p*-values. The same procedure was applied on dry weight and bioaccumulation data.

All analyses were performed using the R language and environment for statistical computing (R Development Core and Team, 2004) with the stat package.

**Table 1**

Nominal and daily measured concentrations of uranium in the water throughout the course of the experiments

Experimental conditions		Nominal (µg/L)	Measured (µg/L)
Experiment I	Control	0	n.d.
	DU	20	17.7 (0.6)
		50	52.9 (2.1)
		100	103.8 (3.8)
		150	138.2 (4.3)
		250	215.2 (6.6)
500	428.7 (12.6)		
Experiment II	Control	0	n.d.
	DU	20	16.8 (1.5)
		250	212 (3.6)
		20	16.8 (0.2)
	<sup>233</sup> U	100	87 (1.5)

Results are given as 24 h average mean values from measurements before and after water renewal (± standard deviation; *n* = 3).

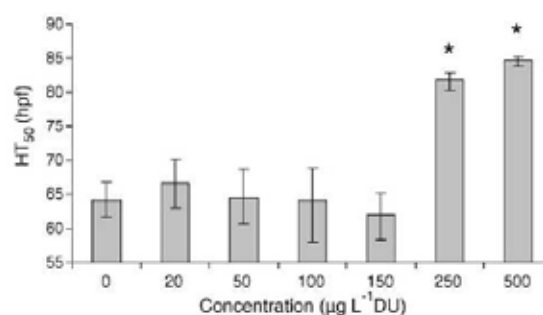
### 3. Results

U concentration measured in water was close to nominal concentrations for both experiments (Table 1). The daily loss of U adsorption was lower than 25% of nominal concentration.

#### 3.1. Experiment I: Embryo test

In the first experiment, the mortality rate did not exceed 20% prior to hatching under any of the experimental conditions. In addition, no disruption of the main embryo development stages was observed. Under control conditions, 100% of the embryos hatched by 96 hpf, and the time between the first and the last hatching was 48 h. The hatching process was not synchronous and estimated median hatching time (HT<sub>50</sub> (95% CI)) for the control group was 64.2 (61.7–66.8) hpf, that was consistent with the data from the literature (Frayse et al., 2006). In contrast, exposure to U led to a delay in hatching (Fig. 1). The HT<sub>50</sub> values increased significantly for DU concentrations higher than 150 µg L<sup>-1</sup>; HT<sub>50</sub> estimated from the condition 250 and 500 µg L<sup>-1</sup> (no overlap of their 95% CI with the control) demonstrated respectively a 27 and 32% delay in median hatching time relative to control.

Based on these results, investigations were further conducted by using (i) a DU concentration that induced no effect on hatching (20 µg L<sup>-1</sup>), and (ii) the lowest DU concentration that caused a significant delay in hatching (250 µg L<sup>-1</sup>). Additionally, in order to determine whether an isotope with a higher specific activity than DU reveals a radiotoxicity on hatching, we tested 20 and 100 µg L<sup>-1</sup> of <sup>233</sup>U conditions.



**Fig. 1.** Effect of uranium on hatching time (HT<sub>50</sub> (IC95%)): time necessary for 50% of the eggs to hatch in each experimental condition. (\*) Significantly different from the control (based on 95% CI overlap).

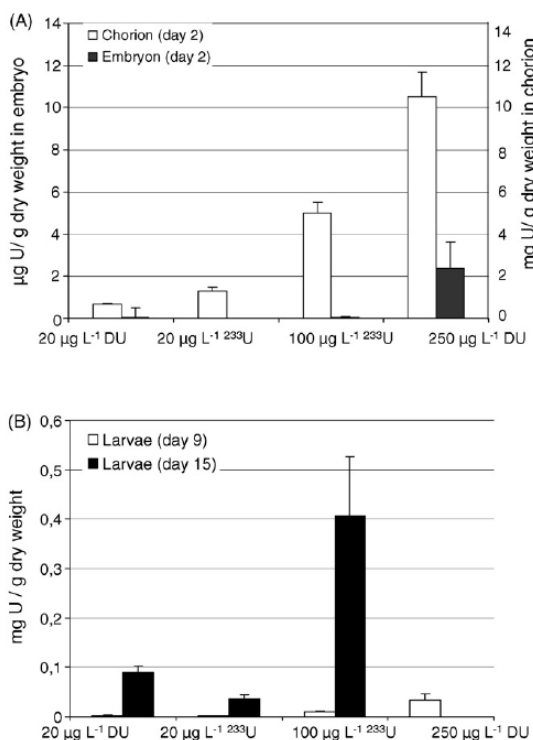


Fig. 2. Uranium concentrations in the embryo and chorion stages (A) and in the prolarva stage (B) of zebrafish exposed to the two forms of uranium (DU and  $^{233}\text{U}$ ). Data ( $\text{mg U/g dry weight}$ ) are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean ( $n = 30$  at 2, 9 days and at 15 days: 30 for control, 8 for 20  $\mu\text{g L}^{-1}$   $^{233}\text{U}$ , 4 for 100  $\mu\text{g L}^{-1}$   $^{233}\text{U}$ , and 6 for 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU).

### 3.2. Embryo-larval test

#### 3.2.1. Uranium accumulation in organisms

The results of bioaccumulation measurements of the whole embryo and of the chorion, made two days before hatching, are presented in Fig. 2A; while those of the entire larval body, made on days 9 and 15, are shown in Fig. 2B. The mean values of controls were close to the limits of detection of measurement apparatus.

An accumulation of U was detected in the chorion for each condition exposed to U. However, the accumulation in embryos themselves was only observed for the highest concentration (250  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU) and represented only 0.002% of the total amount of U measured in the egg. The accumulation in chorion was statistically different for each exposure condition (Kruskal–Wallis;  $p = 2.9 \times 10^{-11}$ , pairwise Wilcoxon tests significant for each condition,  $p < 0.05$ ). We observed that U measured in the chorion was proportional to U concentration in the medium:  $^{233}\text{U}$  in chorion was around four times higher at 100  $\mu\text{g L}^{-1}$   $^{233}\text{U}$  than at 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ . In the same manner, the ratio between the quantity of DU in chorion from the 20 and 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  solutions (16.8) was close to the ratio between the two concentrations in the water (12.5). These results seem to indicate that U accumulation in the chorion is mainly a passive process (ie. adsorption) or rapidly at equilibrium with the U concentration in the water, independently from the isotopic nature of uranium.

Fig. 2B shows the accumulation in prolarvae after hatching on days 9 and 15 post-fertilization. No measurement for the 250  $\mu\text{g L}^{-1}$

Experimental condition	Time observation 24 hpf	Frequency of event for tail detachment endpoint.
Control		96 %
DU	20 $\mu\text{g L}^{-1}$	100 %
	250 $\mu\text{g L}^{-1}$	100 %
$^{233}\text{U}$	20 $\mu\text{g L}^{-1}$	8 %
	100 $\mu\text{g L}^{-1}$	0 %

Fig. 3. Photographs of the tail development of zebrafish embryos at 24 hpf in control group and the populations exposed to uranium (DU and  $^{233}\text{U}$ ), and the event frequency for the tail detachment endpoint. Scale bar: 1 mm.

condition was possible after 9 days due to the death of all prolarvae. There was an increase of U accumulated between days 9 and 15 for the three conditions (about  $\times 30$ ,  $\times 8$  and  $\times 40$ , for 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU, 20  $\mu\text{g L}^{-1}$   $^{233}\text{U}$  and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$   $^{233}\text{U}$  respectively). This accumulation was also statistically different for each exposure condition at day 9 (Kruskal–Wallis;  $p = 1.07 \times 10^{-10}$ , pairwise Wilcoxon tests significant for each condition,  $p < 0.05$ ) and at day 15 (Kruskal–Wallis;  $p = 0.0012$ , pairwise Wilcoxon tests significant for each condition,  $p < 0.05$ ).

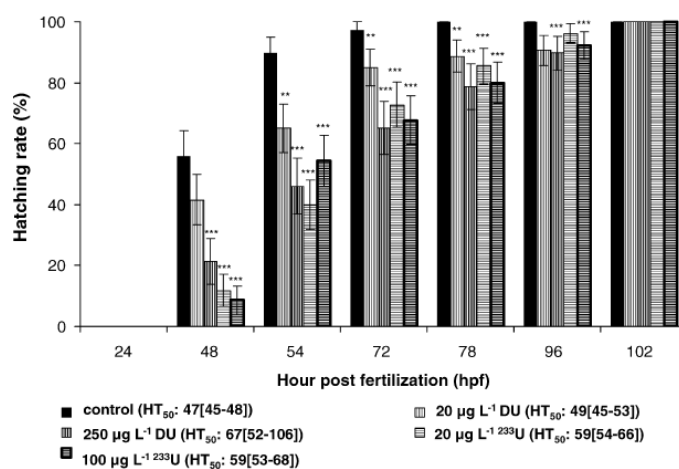
#### 3.2.2. Embryonic development

Fig. 3 shows photographs of 24 hpf embryos at each condition. Effects on tail detachment were observed: almost 100% of the control group, as well as eggs exposed to DU, showed normal development leading to the detachment of the tail from the yolk sac. On the contrary, with  $^{233}\text{U}$ , only 8% of the eggs exposed to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ , and none of the eggs exposed to 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , underwent a proper tail detachment by 24 hpf.

#### 3.2.3. Hatching

Hatching was monitored every 24 h with three additional observation times at 52, 78 and 102 hpf. The proportion of eggs hatched at each observation time is presented in Fig. 4. In the control group, eggs began to hatch at 48 h (56%) and finished at 78 hpf, that was slightly faster than in experiment I but always in agreement with the fact that hatching is not synchronous process and wide differences can appear (Frayssé et al., 2006).

For the exposed conditions, some hatching began at 48 hpf also but finished later at 102 hpf. Hatching rates observed with 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  of DU condition were statistically different from the control group at 54, 72 and 78 hpf (Chi-square tests,  $p < 0.01$  for all times). Moreover, statistical analyses revealed that hatching rates with 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU were also different at 48, 54, 72 hpf from those to 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU; at 48, 54 hpf from those to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$   $^{233}\text{U}$  and at 48, 72 hpf from those to 100  $\mu\text{g L}^{-1}$   $^{233}\text{U}$  (Chi-square tests,  $p < 0.01$  for all times). Hatching rates of 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  DU showed statistical differences from the control at all observation times excepted at 102 hpf (Chi-square



**Fig. 4.** Hatching rate (%) of zebrafish exposed to uranium (U and  $^{233}\text{U}$ ). The proportion of zebrafish hatched at each period is calculated as the number hatched at each time divided by the number of zebrafish alive at that time. Results are shown as the mean proportion of 3 replicates of zebrafish hatched. Bars represent  $\pm$  standard error of the mean. Statistical differences relative to the control group: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ . Median  $\text{HT}_{50}$  with CI 95% are noted in legend.

**Table 2**  
Effects of uranium (DU and  $^{233}\text{U}$ ) on the total body length of zebrafish larvae (*Danio rerio*) at 9 and 15 days of exposure

Experimental condition	Nominal concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	Total length (mm)	
		9 days	15 days
Control	0	Mean (S.E.M.; $n = 30$ )	Mean (S.E.M.)
DU	20	4.37 (0.04)	4.75 (0.02; $n = 30$ )
	250	4.00 (0.05)***	4.49 (0.07; $n = 6$ )***
	250	3.75 (0.07)*** a	–
$^{233}\text{U}$	20	3.89 (0.02)***	4.37 (0.04; $n = 8$ )***
	100	3.80 (0.03)*** a	4.36 (0.13; $n = 4$ )***

\*\*\*  $p < 0.001$  statistical difference relative to the control group; a statistical difference under the  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  U conditions.

tests,  $p < 0.001$  for all times). For the two  $^{233}\text{U}$  conditions (20 and  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  of  $^{233}\text{U}$ ), statistical differences from the control group appeared at 48, 54 and 72 hpf; 96 hpf in more for  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (Chi-square tests,  $p < 0.001$  for all times).

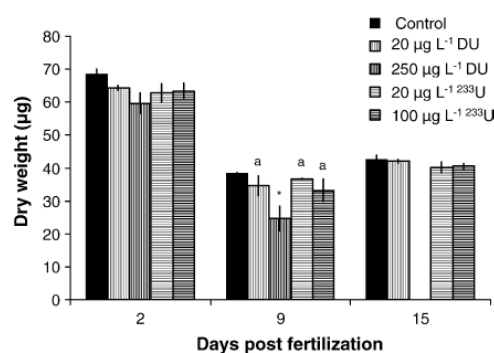
In accordance with the results of experiment I, the condition  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  DU presented the smallest delay compared to the control group, i.e. 4% delay relative to control.  $\text{HT}_{50}$  estimated from the condition  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  of DU and both conditions of  $^{233}\text{U}$  were statistically different from the control as their 95% CI didn't overlap. Eggs exposed to  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  demonstrated a 42% delay in median hatching time relative to control and 25% delay in median hatching time for and both conditions of  $^{233}\text{U}$ . This second experiment showed moreover a statistical difference between  $\text{HT}_{50}$  of the two concentrations  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (no overlap of their 95% CI). We also noted that  $\text{HT}_{50}$  of  $100 \mu\text{g L}^{-1}$   $^{233}\text{U}$  is statistically different from the control whereas no difference was showed with  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  DU in experiment I.

### 3.2.4. Larval growth

**3.2.4.1. Body length.** The body length of zebrafish prolarvae decreased with increasing concentration of U and  $^{233}\text{U}$  (Table 2). On day 9, the mean values of body length of exposed larvae were significantly lower than those of the control (Nested ANOVA:  $p = 2 \times 10^{-16}$ , Tukey HSD tests:  $p < 1.10^{-7}$  for all). Mean body lengths of larvae exposed to the highest DU concentration ( $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ) were significantly lower than those exposed to the lowest concentrations ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ; Tukey HSD test:  $p < 0.001$ ). At the end of the experiment (15 day), similar effects were observed with DU

and  $^{233}\text{U}$  and mean body length were statistically different from the control group (Kruskal–Wallis test:  $p = 3.9.10^{-6}$ , Wilcoxon tests:  $p < 0.05$  for all). However, it is necessary to keep in mind that the number of samples was smaller on day 15 because of high mortality.

**3.2.4.2. Dry weight.** Fig. 5 shows the dry weights of the prolarvae on days 2, 9, and 15 of exposure. The data for day 2 represent the



**Fig. 5.** Effects of uranium (DU and  $^{233}\text{U}$ ) on the dry weight of zebrafish at 2 (dechorionated embryo), 9, and 15 days (prolarvae). Results are given as mean values of 3 replicates of 10 prolarvae for each exposure condition at 2, 9 days and at 15 days;  $n = 30$  for control, 8 for  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ , and 4 for  $100 \mu\text{g L}^{-1}$   $^{233}\text{U}$ ; 6 for  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  DU. Bars represent  $\pm$  standard error of the mean. (\*) Statistical difference relative to the control group and (a) statistical difference under the  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  DU conditions.



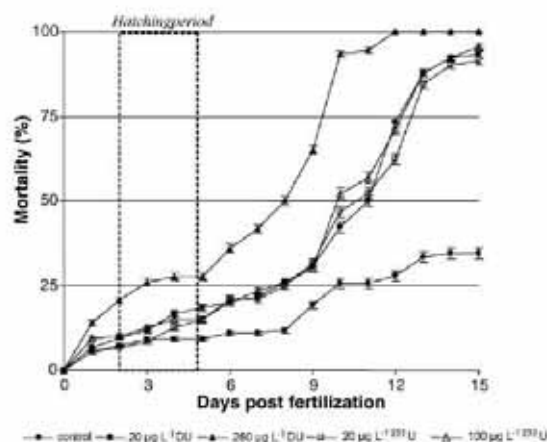


Fig. 6. Effects of the two isotopic compositions of uranium on the mortality of zebrafish embryos (*Danio rerio*) during 15 days. Results are shown as the mean of 3 replicates  $\pm$  standard error of the mean.

dry weights of the embryos without the chorion. For the control group, the mean of the dry weight decreased by 43% between days 2 and 9 ( $68.57 \pm 1.55 \mu\text{g}$  dry weight (DW) and  $38.48 \pm 0.22 \mu\text{g}$  DW, respectively) due to consumption of the yolk sac and increased by 11% ( $42.63 \pm 6.12 \mu\text{g}$  DW) on day 15. On day 9, the different exposures to U affected significantly the mean weight of larvae. Moreover, the  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  DU condition was significantly lower than that of other exposure conditions (Nested ANOVA;  $p = 2.2 \cdot 10^{-16}$ , Tukey HSD tests:  $p < 1.10^{-7}$  for all) and decreased in dry weight between days 2 and 9 for this concentration was higher than that in the control group (58% vs. 43%).

### 3.2.5. Mortality

Mortality did not exceed 20% throughout the first 2 days, though it increased with time for all exposure conditions, especially after hatching (Fig. 6). Mortality in the control group increased mainly from day 9, and reached 34% on day 15. This period corresponds to the time at which the prolarvae began feeding on exogenous food, which is apparently a sensitive stage. Mortality rates of larvae exposed to  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  DU were significantly different from those of the control group, for all the main observation times tested (3, 4, 9 and 15 days) (Chi-square tests,  $p < 0.01$  for all). Moreover, mortality rates for this condition were also statistically different from the 3 other conditions at 9 days (Chi-square test,  $p < 0.01$ ). At the final observation time (day 15), mortality rates of all exposure conditions were statistically different from the control group (Chi-square tests,  $p < 0.01$  for all) and almost 95% of the prolarvae had died, whereas only 34% mortality occurred in the control group.

## 4. Discussion

To our knowledge, there have been only few studies on the effects of U toxicity on such early life stages in fish (Holdway, 1992; Pyle et al., 2002) and the results have been conflicting. Holdway (1992) demonstrated that older larvae were significantly more tolerant to U exposure, being roughly two times less sensitive than were freshly hatched larvae, while Pyle et al. (2002) found no correlation between U exposure and toxicological endpoints (such as egg hatchability, hatching time, larval growth, or mortality). However, studies of U exposure on mammalian species (mice and rats) revealed the toxicity of U to embryo/fetal stages, which include teratogenicity and postnatal disturbances involving a reduction in

growth of the offspring (Domingo, 2001). Such results are consistent with the effects observed in our work on a freshwater fish species.

The results of the present work demonstrate that exposure to U induces significant effects on all the developmental endpoints studied. Our results from embryo-larval tests emphasize that mortality began after hatching process and attained 100% of prolarvae exposed to  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  DU, and 95% of the prolarvae exposed to the three other U concentrations. In terms of mortality, the prolarval stage seems to be more sensitive than the embryo stage, as described by Gatesoupe et al. (2001). The results of Holdway (1992) also revealed that freshly hatched gudgeons (*Mogurnda mogurnda*) larvae were more sensitive to U exposure than were individuals at older stages. In general, data from life cycle toxicity experiments indicate that embryo-larval stages may be more sensitive to toxicants than are the later stages (McKim, 1985; Shazili and Pascoe, 1986). For example, some studies have reported that larvae are more susceptible to metals such as cadmium than are embryos (Shazili and Pascoe, 1986; Eaton et al., 1978). However in contrast, a study of Brinkman and Hansen (2007) reports that the egg stage of salmonids is generally more tolerant to metal exposure than is the young swimming stage. In the present study, U exposure also affected hatching time, which seems to be a sensitive early endpoint. As with the mortality endpoint, hatching time was most affected at the highest concentration ( $250 \mu\text{g L}^{-1}$  of U), showing a maximum delay of 42% relative to control. Hatching delay is an effect already observed in various freshwater fish species when exposed to metals, such as cadmium, copper, nickel, and lead (Eaton et al., 1978; Michibata, 1981; Shazili and Pascoe, 1986; Dave and Xiu, 1991; Pyle et al., 2002; Frayssse et al., 2006). However, the hatching delays were not always followed by a strong mortality at the larval stage for all of these metals. This is the case for copper, which is supposed to have a specific effect on the hatching process, but which is not correlated with a high larval mortality rate, unlike mercury (Dave and Xiu, 1991). Dethloff et al. (2007) observed that chronic silver exposure to the early life stage of rainbow trout induced significant increase in larval mortality without affecting hatching time. In accordance with Roex et al. (2002), we suggest that the sensitivity of early life stages depends on the mode of action of the compounds to which the eggs or larvae are exposed.

Combining the observation of hatching delays and the bioaccumulation of U within the eggs, we suggest that it is the high adsorption of U on the chorion surface and not the low absorption observed at the embryo level which disturbs the hatching process. Prior to hatching, a process of chorion softening occurs, during which the chorion becomes more permeable due to proteolytic activities (Kim et al., 2005), and which could lead to low U uptake. The low accumulation could be sufficient to affect also the hatching process without inducing mortality at that stage. The post hatching period is known to be a highly sensitive and critical stage due to the onset of exogenous nutrition of the free prolarvae (Shazili and Pascoe, 1986; Goolish et al., 1999; Gatesoupe et al., 2001). We observed a significant reduction in growth in exposed prolarvae relative to controls. Dry weight of all exposed populations was reduced throughout the first 9 days compared to the control group (mostly for  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  DU exposure condition). We attribute the marked weight loss observed in the high exposure conditions to a faster consumption of the yolk sac reserves (relative to control groups) in response to chemical and radiological stress induced by uranium exposure. In addition, the total length of the prolarvae was affected by U, as the exposed larvae were smaller than those of the control group at days 9 and 15. However, it can be noted that the growth observed in the control population in the present study differed slightly from that reported in previous studies (Goolish et al., 1999; Bagatto et al., 2001). These differences are probably related to

differences in temperature and to the quality of the feeding regime used in these studies.

It appears that the hatching endpoint would therefore be the earliest indicator of U contamination of an embryo. Regardless of the ecological interpretation of delayed hatching, it can be seen as a response for protecting the embryonic development in the presence of pollutants (Gonzalez-Doncel et al., 2003; Dave and Xiu, 1991; Frayse et al., 2006; Brinkman and Hansen, 2007). The post-hatching prolarval stage is more sensitive than that of embryo, the former not having any means of protection from contaminants. During the prolarval stage, growth seems to be a very sensitive endpoint, though mortality is certainly the most relevant factor concerning U toxicity. It is widely believed that the early life stages are sensitive simply because of the many critical events that take place in a very short time, and that environmental stress can disrupt the timing of these developmental events, thus reducing the organism's chance of survival. Our results emphasize the importance of considering growth during the prolarval stage. In our experiments on the egg stage no conclusion could be drawn regarding effects of low U concentrations on the early life stages. Delayed hatching may therefore be considered as a sublethal endpoint that must be associated with other endpoints observed after 96 hpf.

Delays in hatching and embryonic development were more pronounced with the  $^{233}\text{U}$  (high-specific activity) isotope than the DU isotopic composition (low-specific activity) though no differences were observed between the two treatments in terms of mortality. The delay in tail detachment observed in connection with exposure to  $^{233}\text{U}$  suggests that this is a response to radiotoxicity, as no such delay occurred with DU. Although this effect is minor compared to those that affected the mean stages of embryonic development (Kimmel et al., 1995), this developmental delay could be associated with the delay in hatching. Indeed, differences in the effects on hatching time between  $^{233}\text{U}$  and DU experiments were observed and were most visible at the lowest concentrations considered ( $20\ \mu\text{g L}^{-1}$ ). The hatching process is a combination of biochemical and physical mechanisms, which may be differently affected by radiological and chemical stress. The biochemical process involves the digestion of the egg envelope (chorion) through choriolytic enzymatic reactions (De Gaspar et al., 1999). These choriolytic enzymes belong to a family of Zn metalloproteases, and their function could be disrupted by a chemical stress. The enzyme reactions are followed by a behavioural process in which the physical movement of the embryo destroys the chorion (von Westernhagen, 1988). In the present study, we observed that this physical process may be disrupted by radiological stress in terms of delay in tail detachment. These results might be linked with uranium neurotoxicity, already suggested by Barillet et al. (2007) through the observation of acetylcholine esterase activity in zebrafish exposed to  $100\ \mu\text{g L}^{-1}$  U. Future investigations are necessary to improve understanding of the biochemical mechanisms involved in delaying the hatching process, and their influence on subsequent growth and the part of the effects of chemo- and radiotoxicity in terms of dose rate.

The majority of extant data on U toxicity and freshwater fish species relate mainly to acute exposures in adult fish. There is important variability in the results reported. For example, in a review by Sheppard et al. (2005),  $\text{LC}_{50}$  values for various freshwater fish species range over two orders of magnitude (from 0.7 to  $135\ \text{mg L}^{-1}$  U) depending on experimental conditions. In toxicity tests done specifically on adult zebrafish, an  $\text{LC}_{50}$  value of  $3\ \text{mg L}^{-1}$  was noted at 96 h (Labrot et al., 1999). In our tests larval mortality was observed at much lower concentrations ( $20\ \mu\text{g L}^{-1}$  after 15 days of exposure), which is close to environmental U concentrations (Bonin and Blanc, 2001), underlining the sensitivity of early life stages, particularly the prolarval stage to U exposure. To our knowledge, this is the first study that considers the effects of both

the radiological and the chemical toxicity of U on the early life stages of fish, though a previous study considered both types of stress in adult zebrafish (Barillet et al., 2007). As it is increasingly recognized that population-level effects of stressors are more relevant in terms of ecological risk assessments, it is crucial to include all life stages of organisms in toxicological studies, especially the sensitive early stages.

#### Acknowledgments

This work is the part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN). We especially thank Sandrine Massarin for her help with the experiments, Claire Della Vedova and Frederic Coppin for data analysis, and Virginie Camilleri and Marcel Morello for technical assistance with the ICP-AES/MS and scintillation liquid alpha measurements. The authors thank Christelle Adam and the two anonymous reviewers for their helpful remarks in improving the manuscript. We thank Teresa Matthews for the improvement of English language.

#### References

- Amatruda, J.F., Shepard, J.L., Stern, H.M., Zon, L.I., 2002. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell* 1, 229–231.
- Bagatto, B., Pelster, B., Burggren, W.W., 2001. Growth and metabolism of larval zebrafish: effects of swim training. *J. Exp. Biol.* 204, 4335–4343.
- Barillet, S., Adam, C., Palluel, O., Devaux, A., 2007. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 497–505.
- Barnthouse, L.W., Suter, II, G.W., Rosen, A.E., 1990. Risks of toxic contaminants to exploited fish populations: influence of life history, data uncertainty and exploitation intensity. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 297–311.
- Betcher, R.N., Gascoyne, M., Brown, D., 1988. Uranium in groundwaters of southeastern Manitoba, Canada. *Can. J. Earth Sci.* 25, 2089–2103.
- Bleise, A., Danesi, P.R., Burkart, W., 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): A general overview. *J. Environ. Radioact.* 64, 93–112.
- Brand, R.A., Schnug, E., 2005. Depleted uranium: A new environmental radiotoxicological pollutant. *Landbauforsch. Volk.* 55, 211–218.
- Bresch, H., 1991. Early life-stage test in zebrafish versus a growth test in rainbow trout to evaluate toxic effects. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 641–648.
- Brinkman, S.F., Hansen, D.L., 2007. Toxicity of cadmium to early life stages of brown trout (*Salmo trutta*) at multiple water hardnesses. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1666–1671.
- Bonin, B., Blanc, P.L., 2001. L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine. In: Métivier, H. (Ed.), *L'uranium de l'environnement à l'homme*. EDP Sciences, Les Ulis, pp. 7–41.
- Bywater, J.F., Banaczowski, R., Bailey, M., 1991. Sensitivity to uranium of six species of tropical freshwater fishes and four species of cladocerans from Northern Australia. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1449–1458.
- Efron, B., 1981. Non parametric estimates of standard error: The jackknife, the bootstrap and other methods. *Biometrika* 68, 589–599.
- Dave, G., Xiu, R., 1991. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 126–134.
- De Gaspar, I., Blaquez, M.J., Fraile, B., Paniagua, R., Arenas, M.I., 1999. The hatching gland cells of trout embryos: Characterisation of N- and O-linked oligosaccharides. *J. Anat.* 194, 109–118.
- Denison, F.H., Garnier-Laplace, J., 2005. The effects of database parameter uncertainty on uranium(VI) equilibrium calculations. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 2183–2191.
- Dethloff, G.M., Naddy, R.B., Gorsuch, J.W., 2007. Effects of sodium chloride on chronic silver toxicity to early life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1717–1725.
- Domingo, J.L., 2001. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium. A review. *Reprod. Toxicol.* 15, 603–609.
- Eaton, J.G., McKim, J.M., Holcombe, G.W., 1978. Metal toxicity to embryos and larvae of seven freshwater fish species I. Cadmium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 95–103.
- Faraway, J., 2002. Practical Regression and Anova using R [online]. Available at: <http://cran.r-project.org/doc/contrib/Faraway-PRA.pdf>. [Accessed 02 June 2008].
- Frayse, B., Mons, R., Garric, J., 2006. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 253.
- Garnier-Laplace, J., Gilek, M., Sundell-Bergman, S., Larsson, C.M., 2004. Assessing ecological effects of radionuclides: Data gaps and extrapolation issues. *J. Radiol. Prot.* 24, 4A.



- Gatesoupe, F.J., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Bergot, P., 2001. Ontogeny, development and digestive physiology of fish larvae. In: Guillaume, J. (Ed.), *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans*. Springer Praxis, Chichester, pp. 199–212.
- Gonzalez-Doncel, M., Larrea, M., Sanchez-Fortun, S., Hinton, D.E., 2003. Influence of water hardening of the chorion on cadmium accumulation in medaka (*Oryzias latipes*) eggs. *Chemosphere* 52, 75–83.
- Goolish, E.M., Okutake, K., Lesure, S., 1999. Growth and survivorship of larval zebrafish *Danio rerio* on processed diets. *N. Am. J. Aquacult.* 61, 189–198.
- Hill, A.J., Heideman, W., Peterson, R.E., Teraoka, H., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.* 86, 6–19.
- Holdway, D.A., 1992. Uranium toxicity to two species of Australian tropical fish. *Sci. Total Environ.* 125, 137–158.
- Holm, S., 1979. A simple sequentially rejective Bonferroni test procedure. *Scand. J. Stat.* 6, 65–70.
- Isnard, P., Flammarion, P., Roman, G., Babut, M., Bastien, P., Bintein, S., Essermeant, L., Ferard, J.F., Gallotti-Schmitt, S., Saouter, E., Saroli, M., Thiebaud, H., Tomasone, R., Vindimian, E., 2001. Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere* 45, 659–669.
- Kim, D.-H., Sun, Y., Seok, Y., Ho Lee, S., Kim, B., 2005. Investigating chorion softening of zebrafish embryos with a microbotic force sensing system. *J. Biomech.* 38, 1359–1363.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.
- Labrot, F., Narbonne, J.F., Saint Denis, M., Ville, P., Ribera, D., 1999. Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: Comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 167–178.
- Madic, C., Genet, M., 2001. Propriétés physiques et chimiques de l'uranium. In: Métivier, H. (Ed.), *L'uranium de l'environnement à l'homme*. EDP Sciences, Les Ulis, pp. 43–81.
- McAleer, M.F., Davidson, C., Davidson, W.R., Yentzer, B., Farber, S.A., Rodeck, U., Dicker, A.P., 2005. Novel use of zebrafish as a vertebrate model to screen radiation protectors and sensitizers. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 61, 10–13.
- McKim, J.M., 1985. Early life stage toxicity tests. In: Rand, G.M., Petrocellli, S.R. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere, New York, pp. 58–95.
- Michibata, H., 1981. Uptake and distribution of cadmium in the egg of the teleost *Oryzias latipes*. *J. Fish Biol.* 19, 691–696.
- Nagel, R., 2002. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*—a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex: Altern. Tierexp.* 19, 38–48.
- Nieboer, E., Richardson, D.H.S., 1980. The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut.* 1, 3–26.
- Oberemm, A., 2000. The use of a refined zebrafish embryo bioassay for the assessment of aquatic toxicity. *Lab. Anim.* 29, 32–40.
- Poston, T.M., 1982. Observations on the bioaccumulation potential of thorium and uranium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 682–690.
- Pyle, G.G., Swanson, S.M., Lehmkühl, D.M., 2002. Toxicity of uranium mine receiving waters to early life stage fathead minnows (*Pimephales promelas*) in the laboratory. *Environ. Pollut.* 116, 243–255.
- R Development Core Team, 2004. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (R and stat package could be free downloaded on line: <http://cran.r-project.org/>).
- Real, A., Sundell-Bergman, S., Knowles, J.F., Woodhead, D.S., Zinger, I., 2004. Effects of ionising radiation exposure on plants, fish and mammals: Relevant data for environmental radiation protection. *J. Radiol. Prot.* 24, 123–137.
- Roex, E.W.M., de Vries, E., van Gestel, C.A.M., 2002. Sensitivity of the zebrafish (*Danio rerio*) early life stage test for compounds with different modes of action. *Environ. Pollut.* 120, 355–362.
- Schmidt, S., 2004. Investigation of dissolved uranium content in the watershed of Seine River (France). *J. Environ. Radioact.* 78, 1–10.
- Shazili, N.A.M., Pascoe, D., 1986. Variable sensitivity of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and alevins to heavy metals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 468–474.
- Sheppard, S.C., Sheppard, M.J., Sanipelli, B., Gallerand, M.-O., 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *J. Environ. Radioact.* 79, 55–83.
- Vindimian, E., 2003. Macro REGTOX [online]. Available at: [http://eric.vindimian.9online.fr/DOC\\_fr.web/doc\\_fr\\_2.html](http://eric.vindimian.9online.fr/DOC_fr.web/doc_fr_2.html). [Accessed 28 May 2008].
- World Health Organization, 2001. Depleted uranium: sources, exposure and health effects. WHO/SDE/PHE/01.1. Geneva, Switzerland.
- von Westernhagen, H., 1988. Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, vol. XIA. Academic press, San Diego, pp. 253–346.
- Woodhead, D.S., 2003. A possible approach for the assessment of radiation effects on populations of wild organisms in radionuclide-contaminated environments? *J. Environ. Radioact.* 66, 181–213.

## Résumé

Ce travail s'intègre dans le cadre général du programme ENVIRHOM lancé à l'IRSN en 2000 et vise à évaluer les effets biologiques de l'uranium sur le cycle de vie du poisson zèbre, poisson d'eau douce employé couramment pour les tests standards en écotoxicologie. Il s'agissait d'identifier les stades les plus sensibles du cycle de vie en y associant les critères d'effets les plus pertinents (des biomarqueurs aux traits d'histoire de vie) et de caractériser les effets liés à la chimiotoxicité et à la radiotoxicité de l'uranium. Des expériences ont été menées avec des œufs, des larves et des adultes matures exposés à l'uranium à des concentrations proches de celles détectées à proximité d'anciens sites miniers français (gamme de 20 à 500 µg/L) afin d'étudier la survie, l'éclosion des œufs, la croissance des larves et la reproduction des géniteurs. Parallèlement, des biomarqueurs de l'exposition (bioaccumulation d'uranium dans les œufs, gonades) et biomarqueurs d'effets au niveau moléculaire (génotoxicité, reprotoxicité) ont été également mesurés. Les résultats obtenus ont montré l'intérêt d'étudier les différents stades de vie ; en effet les stades de vie précoces sont apparus comme étant les plus sensibles à l'uranium (dès 20 µg/L), que ce soit suite à une exposition directe des œufs, ou à une exposition indirecte, via un transfert parental. Ces résultats soulignent la pertinence d'inclure les étapes pro-larvaires dans des tests de toxicité pour l'évaluation du risque environnemental. De surcroît, l'étude de différentes étapes du cycle de vie permet, à l'aide de modèle de simulation du recrutement des populations, d'extrapoler les données obtenues à des niveaux d'organisation biologiques supérieurs. A ce titre, les effets drastiques de l'uranium sur le succès reproducteur et les dommages d'ADN dans les cellules germinales indiquent la probabilité d'un fort impact sur la population pour des concentrations très faibles (20 µg/L). Il apparaît, à travers l'étude comparative des effets radiologiques induits, soit par un autre isotope de l'uranium de plus forte activité spécifique ( $^{233}\text{U}$ ) soit par une irradiation externe ( $^{137}\text{Cs}$ ), que les effets de l'uranium sont globalement dus à sa chimiotoxicité.

Mots clefs : uranium, poisson zèbre, traits d'histoire de vie, sensibilité, biomarqueurs d'effets.

## Abstract

This work is part of an ongoing project (ENVIRHOM) started at IRSN in 2000, which consists in studying the environmental effects of radioactive substances at chronic low level of exposure. In this general frame, our aim was two fold: (i) to identify sensitivity of different critical life stages of zebrafish (fish of fresh water frequently used for tests standards in ecotoxicology) to uranium exposure and (ii) to evaluate underlying mechanisms. Experiments were conducted with eggs, larvae and genitors exposed to uranium at environmentally relevant concentrations (from 20 to 500 µg/L) in order to study survival, hatching of eggs, growth of larvae and reproduction of genitors. Biomarkers of exposure (ie. U bioaccumulation) and biomarkers of effects at molecular level (ie. genotoxic effects, reprotoxicity) were also measured. Sensitivity of fish to uranium was dependent of the life stage of development with the early life stage being the most sensitive to U either directly or maternally exposed. It underlines the relevance of including pro-larval stages for toxicity assessments in fish. Moreover drastic effects of uranium on reproductive success and DNA damages in the germ cells foretell a strong impact on the population for low concentration of exposure (20 µg/L). As it is increasingly recognized that population-level effects of toxic substances are more relevant in terms of ecological risk assessment, this study points out the need to include different life stages of organisms in ecotoxicological studies, especially the sensitive early stages. Moreover, it appears, through the comparative study of the radiological effects or by another isotope of the uranium of stronger radioactivity ( $^{233}\text{U}$  or by an irradiation with  $^{137}\text{Cs}$ ), that the effects of the uranium are due to its chemotoxicity.

Key words : uranium, zebrafish, life history traits, sensitivity, biomarkers of effects