

Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II)

# Biocinétique et toxicologie de l'uranium chez le rat après inhalations aiguës et répétées

Thèse présentée et publiquement soutenue le 9 décembre 2005

Par **Marjorie MONLEAU**

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de la Méditerranée  
Spécialité : Sciences de l'Environnement et Santé

Thèse dirigée par le Professeur Gérard DUMENIL et la Docteure Valérie CHAZEL

## JURY

Mr M. BAILEY	Health Protection Agency, England	Rapporteur
Mr M. CARLES	Médecin, COGEMA, Pierrelatte	Examineur
Mme V. CHAZEL	Dr., IRSN, Pierrelatte	Codirectrice de thèse
Mr M. De MEO	MCF, Université de la Méditerranée	Examineur
Mr G. DUMENIL	Pr., Université de la Méditerranée	Directeur de thèse
Mme M. KIRSCH-VOLDERS	Pr., Université de Bruxelles	Rapporteur

Thèse réalisée au Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale (Pierrelatte) de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire avec l'appui financier de la COGEMA dans le cadre du PIC DOSINTER.

## Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement l'ensemble des membres du jury qui ont accepté d'examiner cette thèse :

Tout d'abord, Monsieur le Professeur **Gérard Duménil**, pour avoir accepté d'encadrer ce travail et de suivre sa progression au nom de l'Université de la Méditerranée, ainsi que pour son accueil toujours chaleureux au sein de son laboratoire.

Madame la Professeure **Micheline Kirsch-Volders**, pour l'intérêt porté à ce travail ainsi que pour son examen critique et pertinent.

Monsieur le Docteur **Mike Bailey**, qui m'a honorée de ses conseils éclairés dès le début de mon projet et qui a bien voulu participer à ce jury.

Monsieur le Docteur **Michel Carles**, médecin du Travail, représentant de la COGEMA, pour son expérience de terrain.

Monsieur le Maître de Conférence **Michel De Méo**, très chaleureusement, pour sa grande disponibilité et son implication tout au long de ce travail.

Madame la Docteure **Valérie Chazel**, co-tuteur IRSN, pour avoir initié ce travail, pour sa disponibilité, sa joie de vivre, sa spontanéité, son soutien et sa confiance et enfin pour avoir su me guider avec intelligence jusqu'au bout.

Je remercie également les personnes qui ont gravité autour de ce travail :

Mr **François Paquet**, pour son accueil au sein du LRTOX et son intérêt constant et actif.

L'ensemble des personnes impliquées dans le PIC DOSINTER, dont fait partie ce sujet de thèse : Mr Auriol, Mme Delaguerie, Mr Quesne, Mr De Carlan, Mr Franck, Mr Jourdain.

Dans ce cadre, je remercie particulièrement Mr **Bernard Auriol**, correspondant de la COGEMA pour ce sujet, pour le vif intérêt et les remarques de terrain apportées tout au long de ces années.

Mr **Henri Métivier**, pour avoir accepté de donner ponctuellement son opinion sur l'avancement de ce travail.

Mr **Roger Phan-Tan-Luu** de l'Université d'Aix-Marseille III. Ce spécialiste de la méthodologie de la recherche expérimentale a bien voulu accorder son attention, en début de thèse, à nos plans d'expérience.

Mr **François Gendarmes**, pour m'avoir éclairée sur quelques notions théoriques et techniques concernant les aérosols.

L'ensemble des personnes travaillant au 10<sup>ème</sup> étage de la faculté de Pharmacie pour leur accueil toujours sympathique et les pauses-café bienvenues ! En particulier, Mme Hélène Guiraud, Mme Michèle Laget, Céline, Laetitia ...

Mme **Marie Donnadieu-Claraz**, qui a accepté d'initier et de suivre ce sujet avec Valérie. On aurait pu craindre quelques crépages de chignons entre trois femmes de caractère telles que nous ! Mais non, rien de tel !

Je vous remercie beaucoup toutes les deux, en espérant que vous avez eu autant de plaisir à travailler avec moi que moi avec vous !

Mme Sandrine Frelon, Mme Pascale Houpert, Mr Philippe Lestaevel et Mr Fabrice Petitot pour l'analyse des résultats, les discussions scientifiques enrichissantes et leur aide, selon leurs compétences, pour l'ICP-MS et les tests de comportements.

Mme Olivia Delissen, Mme Bernadette Dhieux, Mme Anne-Marie Moreels et Mr Elie Tourlonias pour avoir toujours accepté, dans la bonne humeur, de me donner un coup de main lors des expositions et des euthanasies et sans lesquels j'y serais encore !! Un merci spécial à Elie pour son investissement dans la mesure des aérosols.

Mme Delphine Lurmin, sans qui nous serions tous chauves !! MERCI !!

Mr Thierry Loiseau et Mr Christophe Maubert qui s'occupent si bien de l'animalerie. Merci Christophe, car en plus, tu es un fin bricoleur ! Sans toi, je serais encore à me demander pourquoi mon générateur d'aérosols n'aspire plus, comment on le démonte, dans quel sens je visse (je sais, je sais, il paraît que c'est typiquement féminin) ?? Comment je dois remettre le joint ?? !!!!

Les personnes qui m'ont apporté une aide ponctuelle : David Roblot, Mathias Poyet et Christophe Gillier.

Toutes les personnes du LRTOX, localisées à Fontenay-aux-Roses, pour leur accueil toujours chaleureux et leurs conseils. Je profite d'être vers Fontenay-aux-Roses pour remercier également Christine et Olivier. Ces petits échanges entre Fontenay et Pierrelatte, assez réguliers finalement, nous ont permis de tirer des conclusions hautement scientifiques : à savoir que quand des gens du nord viennent dans le sud, il fait systématiquement mauvais ; mais aussi que quand des gens du sud vont dans le nord, il fait souvent beau ! Donc si les gens du nord vont définitivement dans le sud et les gens du sud définitivement dans le nord, peut-être que le nord deviendrait le sud et le sud deviendrait le nord, sans la Méditerranée, bien sûr, à moins que le réchauffement climatique ... ah oui, là ça devient d'un autre niveau !

Mr Eric Blanchardon, le second auteur, hautement méritant, de certains articles composant cette thèse. Il m'a aidée à voir plus clair dans tout ce qui se rapproche de près ou de loin des modèles mathématiques. Je ne vais pas m'étendre sur ses qualités professionnelles et humaines, je dirai juste que, si tous les collègues étaient tels que lui, les relations de travail atteindraient, à mon sens, un certain idéal !

Mr Cyrill Bussy, mon acolyte de bureau pendant trois ans, avec lequel je n'ai eu comme seul désaccord que des problèmes de température de la pièce que nous partagions ! Je suis heureuse d'avoir fait ce bout de chemin avec toi. J'espère que nous nous croiserons à nouveau. Enfin, dans la version thésard (e), une pensée pour Magali Taulan qui a longtemps illuminé le laboratoire.

**Je remercie aussi tous les autres : ma famille, belle ou non, et mes amis !  
- Chantal, Claude, Chris, Dan, Jeanne, Antoine et Laurent -**

Et oui, je ne fais pas dans l'originalité pour ce dernier paragraphe des remerciements !

Il est dédié du fond du cœur à ceux qui me permettent, même durement, de garder les pieds sur terre et de la trouver belle.

## Résumé

L'uranium est un métal lourd naturel et radioactif, largement utilisé dans l'industrie nucléaire sous différentes formes chimiques et isotopiques. Son utilisation dans le cycle du combustible crée un risque d'exposition radiologique pour les travailleurs, essentiellement par inhalation de particules d'uranium. Selon la configuration du poste de travail, les contaminations à l'uranium peuvent être aiguës ou répétées, impliquer diverses formes chimiques et différents niveaux d'enrichissement et concerner un seul ou plusieurs composés. Les concepts et les modèles dosimétriques disponibles pour la radioprotection des travailleurs ainsi que la majorité des études sur les effets biologiques correspondent à des situations d'exposition aiguë. De plus les processus aboutissant aux effets pathologiques sont mal connus *in vivo*. Dans ce cadre, la principale question est de savoir si des expositions par inhalation répétée chez le rat induisent des cinétiques et une toxicité de l'élément, qui seraient différentes de celles observées après une exposition aiguë.

Dans cette étude, la comparaison des biocinétiques expérimentales et théoriques d'un uranium insoluble inhalé de manière répétée pendant trois semaines montre qu'une contamination chronique est correctement modélisée, excepté pour la rétention osseuse, par la somme d'incorporations aiguës successives et indépendantes. Par ailleurs, la cinétique d'un uranium soluble inhalé de façon ponctuelle peut être modifiée par l'exposition répétée à un uranium insoluble réalisée au préalable. Dans certains cas, une exposition à l'uranium pourrait donc modifier sa biocinétique lors d'expositions ultérieures.

Au niveau toxicologique, l'étude montre que les particules d'uranium inhalées de manière répétée induisent des perturbations comportementales et des effets génotoxiques qui se traduisent par des dommages de l'ADN de différentes natures, dans plusieurs types cellulaires et dépendant certainement de la quantité inhalée. Des expositions impliquant plusieurs composés uranifères entraîneraient un effet synergique. De plus, la répétition des inhalations aggraverait les effets génotoxiques comparativement à une exposition aiguë.

Ce travail montre l'importance de ne pas négliger les effets de la répétition d'une exposition à l'uranium. Il donnera les bases à une amélioration du système de radioprotection qui permettra d'optimiser la surveillance des travailleurs du nucléaire. Dans un contexte plus large, ce travail participe à l'élargissement des connaissances sur la toxicité des particules.

*Mots clés : uranium, particule, inhalation, rat, radioprotection, toxicologie, biocinétique, génotoxicité, double exposition*

## Summary

Uranium is a natural, radioactive heavy metal, widely used in the nuclear industry in various chemical and isotopic forms. Its use in the fuel cycle involves the risk of radiological exposure for the workers, mainly via the inhalation of uranium particles. According to the workplace configuration, uranium contaminations can be acute or repeated, involve various chemical forms and different levels of enrichment, as well as involving one or several components. The dosimetric concepts and models available for workers' radiological protection, as well as most of the studies of the biological effects, correspond to acute exposure situations. Moreover the processes leading to pathological effects are little known *in vivo*. In this context, the main question is to know whether exposures due to repeated inhalation by rats induce the element's kinetics and toxicity, which may be different from those observed after an acute exposure.

In this study, comparison of the experimental and theoretical biokinetics of an insoluble uranium repeatedly inhaled over three weeks shows that a chronic contamination is correctly modelled, except for bone retention, by the sum of acute, successive and independent incorporations. Moreover, the kinetics of a soluble uranium inhaled irregularly can be modified by previous repeated exposure to an insoluble uranium. In certain cases therefore, exposure to uranium could modify its biokinetics during later exposures.

At a toxicological level, the study demonstrates that the uranium particles inhaled repeatedly induce behavioural disruptions and genotoxic effects resulting in various sorts of DNA damage, in several cell types and certainly depending on the quantity inhaled. Exposures involving several uraniferous components produce a synergy effect. Moreover, repeated inhalations worsen the genotoxic effects in comparison to an acute exposure.

This work demonstrates the importance of not ignoring the effects of the repetition of uranium exposure. It will provide the bases for an improvement of the radiological protection system allowing optimization of the monitoring of nuclear industry workers. In the wider context, this work helps to enlarge our knowledge of particle toxicity.

*Key words: uranium, particle, inhalation, rat, radiological protection, toxicology, biokinetics, genotoxicity, double exposure*

# Sommaire

Liste des figures	10
Liste des tableaux	12
Liste des annexes	13
Abréviations	14
Glossaire	15
Présentation du sujet - Subject presentation	19
Chapitre I - ETAT DE L'ART	25
Chapitre I.1 - L'uranium, applications et risques	27
I.1.1 - L'uranium	27
I.1.2 - L'exposition radiologique	29
I.1.3 - Le cycle du combustible	31
I.1.3.1 - L'extraction du minerai et la production du « yellow cake »	32
I.1.3.2 - La conversion en UF <sub>6</sub>	32
I.1.3.3 - L'enrichissement en <sup>235</sup> U	32
I.1.3.4 - La conversion en UO <sub>2</sub> enrichi et la fabrication du combustible	33
I.1.3.5 - Le retraitement et le stockage	34
I.1.3.6 - L'uranium appauvri	35
I.1.4 - Le risque d'exposition interne à l'uranium	36
I.1.5 - La Radioprotection	38
I.1.6 - L'uranium, applications et risques - Synthèse	41
Chapitre I.2 - Exposition Interne par Inhalation : Le suivi médical	43
I.2.1 - La surveillance médicale	43
I.2.2 - Les modèles biocinétiques	47
I.2.3 - Le suivi médical - Synthèse	51
Chapitre I.3 - Exposition Interne par Inhalation : Les effets biologiques	53
I.3.1 - Le devenir des particules d'uranium inhalées et leurs effets sur les organes	54
I.3.1.1 - Le poumon, porte d'entrée et cible	54
I.3.1.1a - Physiologie du système respiratoire	54
I.3.1.1b - Paramètres influençant le dépôt des particules	59
I.3.1.1c - L'épuration pulmonaire	60
I.3.1.1d - L'inflammation	61
I.3.1.1e - Les effets de l'uranium sur le système respiratoire	63
I.3.1.1f - Influence du type d'exposition	65
I.3.1.2 - Le comportement biocinétique de l'uranium et les effets sur les organes extra-pulmonaires	66
I.3.1.4a - Effets sur le compartiment sanguin	66
I.3.1.4b - Effets sur le rein	67
I.3.1.4c - Effets sur le tissu osseux	68
I.3.1.4d - Effets sur le foie	69
I.3.1.4e - Effets sur le système nerveux central	70
I.3.1.4f - Effets sur le système reproducteur	70
I.3.1.4g - Effets sur les autres organes	71

I.3.2 - Les effets cellulaires	72
I.3.3 - Les effets moléculaires	74
I.3.3.1 - Les effets sur les protéines	74
I.3.3.2 - Les effets sur l'ADN	74
I.3.4 - Les effets biologiques - Synthèse	82
Chapitre II - MATERIELS ET METHODES	83
Chapitre II.1 - Le modèle animal	85
Chapitre II.2 - Les composés uranifères et le système d'inhalation	89
Chapitre II.3 - Le dosage de l'uranium	95
II.3.1 - Dosage de l'uranium total : Kinetic Phosphorescence Analysis (KPA)	95
II.3.2 - Dosage de l'UO <sub>4</sub> dans les échantillons doublement contaminés : Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS)	97
Chapitre II.4 - Le test des comètes	99
II.4.1 - Le test des comètes, principe et applications	100
II.4.2 - Le test des comètes dans nos expériences	105
Chapitre II.5 - Les effets sur le comportement	109
Chapitre II.6 - Les groupes d'exposition	113
Chapitre III - RESULTATS	117
Chapitre III.1 - Test de l'hypothèse mathématique des modèles de la CIPR : Comparaison modèle / expérience	119
III.1.1 - Construction du modèle « Rat » et comparaison des biocinétiques expérimentales et théoriques	119
III.1.1.1 - Résumé de l'article 1	119
III.1.1.2 - Article 1 - The effect of repeated inhalation on the distribution of uranium in rats	122
III.1.1.3 - Compléments de l'article 1	149
III.1.2 - Implications pour le suivi des travailleurs du nucléaire	151
III.1.2.1 - Résumé de l'article 2	151
III.1.2.2 - Article 2 - Biokinetics models in rats exposed to repeated inhalation of uranium: implications for the monitoring of nuclear workers	153
Chapitre III.2 - Effets biologiques des particules d'uranium inhalées par des rats	169
III.2.1 - L'accumulation de l'uranium dans le cerveau et les effets comportementaux	169
III.2.1.1 - Résumé de l'article 3	169
III.2.1.2 - Article 3 - Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations	170
III.2.2 - Les effets génotoxiques et inflammatoires	183
III.2.2.1 - Résumé de l'article 4	183
III.2.2.2 - Article 4 - Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats	186
III.2.2.3 - Compléments de l'article 4	209
Chapitre III.3 - Effets biocinétiques et génotoxiques des doubles contaminations	211
III.3.1 - Résumé de l'article 5	211
III.3.2 - Article 5 - Distribution and genotoxic effects after successive exposure to different uranium oxide particles inhaled by rats	215
III.3.3 - Compléments de l'article 5	235



Chapitre III.4 - Synthèse des résultats / Summary of the results	237
III.4.1 - Résultats des études biocinétiques	237
III.4.2 - Résultats des études toxicologiques	237
Chapitre IV - Discussion et Perspectives	243
Chapitre IV.1 - Discussion des résultats de biocinétique	245
IV.1.1 - Aspects techniques	245
IV.1.2 - Test du modèle de la CIPR	247
IV.1.3 - Distribution de l'uranium dans le cerveau	251
Chapitre IV.2 - Discussion sur les résultats de Toxicologie	255
IV.2.1 - Les paramètres généraux de santé	255
IV.2.2 - Les dommages de l'ADN	256
IV.2.2.1 Protection contre les lésions de l'ADN	256
IV.2.2.2 Types cellulaires présentant des lésions de l'ADN	257
IV.2.2.3 Mécanismes d'induction des dommages de l'ADN	257
IV.2.2.4 Effets d'une exposition répétée vs exposition aiguë	260
IV.2.2.5 Toxicités chimique, radiologique et particulaire	262
IV.2.2.6 Effets des doubles expositions	265
Conclusion générale - General conclusion	271
REFERENCES	279
ANNEXES	299

## Liste des figures

Figure 1 : Le cycle du combustible	31
Figure 2 : Préparation des assemblages de combustibles	33
Figure 3 : Le devenir du combustible	34
Figure 4 : Les différentes régions anatomiques du modèle pulmonaire (CIPR)	48
Figure 5 : Modèle biocinétique de l'uranium et modèle digestif (CIPR)	49
Figure 6 : Le système respiratoire	54
Figure 7 : Coupe transversale d'une bronche et d'une bronchiole	56
Figure 8 : La muqueuse respiratoire et l'ultrastructure des cellules épithéliales	57
Figure 9 : Aspect ultrastructural des alvéoles	58
Figure 10 : Mécanismes au niveau pulmonaire induits par l'inhalation de particules (Oberdorster, 1994)	62
Figure 11 : Effets cellulaires de l'uranium (d'après Ribera, 1996)	73
Figure 12 : Mécanismes possibles d'induction de dommages de l'ADN par des particules toxiques radioactives	76
Figure 13 : Principaux dommages de l'ADN et leurs mécanismes de réparation (Hoeijmakers, 2001)	77
Figure 14 : Devenir d'une cellule lésée	78
Figure 15 : Conditions d'hébergement des animaux	87
Figure 16 : Le système d'exposition des animaux	91
Figure 17 : Le KPA	96
Figure 18 : L'ICP-MS	98
Figure 19 : Différents tests de génotoxicité (Sasaki Y.F.)	99
Figure 20 : Principe du test des comètes	101
Figure 21 : Différents niveaux de fragmentation de l'ADN observable par le test des comètes (Collins, 2004)	102
Figure 22 : Tissus humains dont les cellules peuvent être isolées pour le test des comètes en biomonitoring (Kassie, 2000)	104
Figure 23 : Test des protocoles du test des comètes, conditions alcaline et neutre	106
Figure 24 : Anatomie du système olfactif	110
Figure 25 : Structures cérébrales, prélevées pour le dosage de l'uranium, et leurs fonctions principales	111
Figure 26 : Les tests de comportements	112
Figure 27 : Les différents groupes de rats et les temps d'euthanasie	114
Article 1 - Figure 1 : General layout of the inhalation system	126
Article 1 - Figure 2 : Biokinetic model for uranium respiratory tract (derived from ICRP, 1994)	130
Article 1 - Figure 3 : Time-dependent absorption into blood from each compartment of the respiratory tract model (derived from ICRP, 1994), not including the skin compartment	130
Article 1 - Figure 4 : Biokinetic model for uranium (GI tract and systemic, derived from ICRP, 1979 and ICRP, 1995)	131
Article 1 - Figure 5 : Uranium content $\mu\text{g}$ / gram tissue (lung, femur, gastrointestinal tract, kidney) or urine and feces over 24-hr as a function of days post-exposure	135
Article 1 - Figure 6 : Uranium content $\mu\text{g}$ / gram (lung, gastrointestinal tract, kidney and femur) or in urine and feces over 24-hr as a function of days post-exposure for group RepUO2 n°1	138
Article 1 - Figure 7 : Uranium content $\mu\text{g}$ / gram (lung, gastrointestinal tract, kidney and femur) or in urine and feces over 24-hr as a function of days post-exposure for group RepUO2 n°2	140

Figure 28 : Concentrations d'uranium dans le sang et le foie	149
Figure 29 : Quantités d'uranium dans les excréta pendant l'exposition répétée	150
Article 2 - Figure 1 : Biokinetics of uranium dioxide in lungs ( $\mu\text{g/g}$ lungs), urine and faeces ( $\mu\text{g}$ ) as predicted by the rat inhalation model as a function of days	159
Article 3 - Figure 1 : Uranium concentration in rat brain areas as a function of days post-exposure	174
Article 3 - Figure 2 : Effects of uranium inhalation on spontaneous locomotion in rats	175
Article 3 - Figure 3 : Effects of uranium inhalation on spatial working memory in rats	176
Article 4 - Figure 1 : Comet assay under alkaline conditions in BAL cells	198
Article 4 - Figure 2 : Comet assay under neutral conditions in BAL cells	198
Article 4 - Figure 3 : Comet assay under alkaline conditions in kidney cells	199
Article 4 - Figure 4 : Relative mRNA expression of the cytokines TNF- $\alpha$ , MIP-2, IL-8 and IL-10 in lung tissues at 1, 3 and 14 days post-exposure for the groups Control (n=5), AcUO2-3 (n=3) and RepUO2 (n=3)	200
Article 4 - Figure 5 : Hydroperoxide levels in lung tissues at 1, 3 and 14 days post-exposure for the groups Control (n=5), AcUO2-3 (n=3) and RepUO2 (n=3)	201
Figure 30 : Test des comètes en condition alcaline sur les cellules épithéliales nasales	209
Figure 31 : Test des comètes en condition alcaline sur les cellules pulmonaires	210
Article 5 - Figure 1 : Comet assay under alkaline conditions in different cell types	225
Article 5 - Figure 2 : Comet assay under neutral conditions in BAL cells	226
Article 5 - Figure 3 : Biokinetics of $\text{UO}_4$ in the lungs, kidneys, gastro-intestinal tract and femurs as a function of days after $\text{UO}_4$ exposure	227
Article 5 - Figure 4 : Daily excretion of $\text{UO}_4$ as a function of days after $\text{UO}_4$ exposure	228
Article 5 - Figure 5 : K/K+Ur ratio in the different groups 1, 3 and 8 days after $\text{UO}_4$ exposure	229
Figure 32 : Concentrations d'uranium dans les poumons et les reins après les doubles expositions	235
Figure 33 : Biocinétique de l' $\text{UO}_4$ dans le foie et la rate en fonction des jours après exposition à l' $\text{UO}_4$	236
Figure 34 : Modèle d'entrée du nickel dans les cellules (Costa, 2005)	267
Figure 35 : Spécificité tissulaire et localisation cellulaire des transporteurs du Zinc chez les mammifères (d'après McMahon, 1998)	269

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition isotopique en masse et en activité de l'uranium naturel	28
Tableau 2 : Coefficients de dose et limites dérivées de concentration dans l'air	40
Tableau 3 : Effets génotoxiques et cancérigènes de l'uranium in vitro et in vivo sur des modèles de mammifères	81
Tableau 4 : Caractéristiques du rat mâle de laboratoire (souche Sprague Dawley)	86
Tableau 5 : Caractéristiques des composés uranifères	89
Tableau 6 : Caractéristiques des aérosols	92
Tableau 7 : Concentrations des aérosols	93
Tableau 8 : Distribution immédiate de l'uranium après inhalation	93
Tableau 9 : Les différentes expositions par inhalation	113
Article 1 - Table 1: Parameter values used in the biokinetic model for uranium in rats	132
Article 1 - Table 2 : Initial deposition pattern in the respiratory tract model	133
Article 1 - Table 3 : Reference organ weights for rats	133
Article 1 - Table 4 : Relative error between the values for the biokinetic model for rats and the experiment of group AcUO <sub>2</sub> against the number of days post-exposure	134
Article 1 - Table 5 : Relative error between the theoretical and experimental values for rat group RepUO <sub>2</sub> n°1 against the number of days post-exposure	137
Article 1 - Table 6 : Relative error between the theoretical and experimental values of rat group RepUO <sub>2</sub> n°2 against the number of days post-exposure	139
Article 2 - Table 1 : Test of two hypotheses for interpretation of routine monitoring of uranium in lungs and excreta	160
Article 2 - Table 2 : Test of two hypotheses for interpretation of routine monitoring of uranium in lungs	161
Article 2 - Table 3 : Test of two hypotheses for interpretation of routine monitoring of uranium in urine	163
Article 2 - Table 4 : Test of two hypotheses for interpretation of routine monitoring of uranium in lungs and urine	164
Article 4 - Table 1 : Experimental protocol for inhalation study	191
Article 4 - Table 2 : SYBR Green primer sequences used for RT-PCR reactions	195
Article 4 - Table 3 : General health parameters of different rat groups	196
Article 4 - Table 4 : Biochemical parameters in serum for the groups Control (n=4), AcUO <sub>4</sub> (n=3) and RepUO <sub>2</sub> (n=6)	197
Article 5 - Table 1 : Body weight, food and water intakes of different rat groups	223
Article 5 - Table 2 : Urinary volume (ml) excreted per day	223
Article 5 - Table 3 : Biochemical parameters in serum for the Control (n=4), AcUO <sub>4</sub> (n=3), AcUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub> (n=3) and RepUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub> (n=3) groups	224
Article 5 - Table 4 : Uranium concentrations in lungs in the three exposed groups, 4 hours after UO <sub>4</sub> exposure	226
Tableau 10 : Comparaison des incorporations après inhalation chez le rat	245
Tableau 11 : Distribution de métaux dans le cerveau après une exposition de type inhalation chez des rats	252
Tableau 12 : Exemples de fonctions de certains éléments trace essentiels	258
Tableau 13 : Modifications du transcriptome murin après exposition à du nitrate d'uranyle par analyse SAGE (thèse Magali Taulan, 2004)	261
Tableau 14 : Expériences d'inhalation de particules de TiO <sub>2</sub> chez le rat	264

## Liste des annexes

	Annexe p
Annexe 1 - Mécanismes moléculaires de réparation de l'ADN	3
Annexe 1.1 - L'excision de base	3
Annexe 1.2 - La recombinaison homologue et la religation non-homologue	5
Annexe 2 - Comparaison des techniques de dosage de l'uranium, cas des doubles expositions	9
Annexe 3 - Protocole du test des comètes réalisé in vivo sur les différents types cellulaires	25
Annexe 3.1 - Isolement des cellules épithéliales nasales	25
Annexe 3.2 - Isolement des cellules du lavage broncho-alvéolaire (BAL)	27
Annexe 3.3 - Isolement des cellules rénales	27
Annexe 3.4 - Test des comètes après exposition in vivo	28
Annexe 4 - Biocinétiques expérimentales de l'uranium	31
Annexe 5 - Test des comètes, Article 4, valeurs brutes des OTM	35
Annexe 6 - Test des comètes, Article 5, valeurs brutes des OTM	41
Annexe 7 - Communications	45

## Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AI	Région alvéolo-interstitielle
AMAD	Aerodynamic median activity diameter
APS	Aerodynamic particle sizer
BAL	Broncho-alveolar lavage
bb	Région bronchiolaire
BB	Région bronchiale
BO	Bulbe olfactif
Bq	Becquerel
CE	Cervelet
CIPR	Commission internationale de protection radiologique
CO	Cortex
DMT	Dose maximale tolérée
DO	Densité optique
DU	Depleted uranium
ET	Région extra-thoracique
h	Heure(s)
HI	Hippocampe
HOS	Lignée cellulaire ostéoblastique de sarcomes osseux humains
HPRT	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase
ICP-MS	Inductively coupled plasma-mass spectrometry
IFN	Interferon
IL	Interleukine
j	Jour(s)
KPA	Kinetic phosphorescence analysis
MALT	Tissu lymphoïde associé aux muqueuses
min	Minute(s)
MIP	Macrophage inflammatory protein
MMAD	Mass median aerodynamic diameter
NMAD	Number median aerodynamic diameter
OTM	Olive tail moment
RT-PCR	Reverse transcription - polymerase chain reaction
SED	Système endocrinien diffus
sem	Semaine(s)
SSPD	Small scale powder disperser
ST	Striatum
Sv	Sievert
t°	Température
TGI	Tractus gastro-intestinal
TM	Tail moment
TNF	Tumor necrosis factor alpha
U	Uranium

## Glossaire

**Aberration chromosomique** : changement de structure observable sur les deux bras du chromosome au même site.

**Activité** : nombre de désintégrations par unité de temps au sein d'un radionucléide ou d'un mélange de radionucléides. Elle est exprimée en becquerel (Bq).

**Adénocarcinome** : tumeur maligne d'un épithélium glandulaire.

**Aérosols** : suspension de particules solides ou liquides très fines dans un gaz.

**Alpha (rayonnements)** : les particules composant le rayonnement alpha sont des noyaux d'hélium 4, fortement ionisants, mais très peu pénétrants : une simple feuille de papier les arrête.

**Aneugène (effet)** : anomalie dans le nombre de chromosomes dans une cellule, en plus ou en moins.

**Antagonisme** : caractère, action antagoniste de deux organes, groupes d'organes, systèmes biologiques, substances organiques, agents thérapeutiques, etc., ayant des fonctions inverses, des propriétés contraires.

**Bêta (rayonnements)** : les particules composant le rayonnement Bêta sont des électrons de charge négative ou positive. Un écran de quelques mètres d'air ou une simple feuille d'aluminium suffit pour les arrêter.

**Becquerel Bq** : unité de l'activité, mesure l'intensité d'une source radioactive, 1 Bq = 1 désintégration par seconde.

**Cancérogène** : un agent physique ou chimique est dit cancérogène lorsqu'une exposition à cet agent entraîne une augmentation de l'incidence de cancers.

**Clastogène (effet)** : altération de la structure des chromosomes.

**Créatinine** : dérivé de la créatine, substance azotée présente dans les muscles, le cerveau et, en très faible quantité, dans le sang, et qui joue un grand rôle dans la contraction musculaire. Le taux dans le sang (normalement entre 10 et 18 mg.L<sup>-1</sup>) augmente en cas d'insuffisance rénale. Elle est témoin de la fonction rénale.

**Cytokine** : protéine sécrétée par une cellule et allant se fixer sur une autre cellule pour y déclencher divers phénomènes cellulaires. Il existe différentes cytokines en fonction des types cellulaires : les lymphokines, les interleukines, ...

**Cytotoxicité** : phénomène de destruction cellulaire.

**Diamètre Aérodynamique** : le diamètre aérodynamique d'une particule est le diamètre d'une sphère de densité égale à 1 ayant la même vitesse de dépôt dans l'air que la particule considérée.

**Débit de dose** : intensité d'irradiation (énergie absorbée par la matière par unité de masse et de temps). L'unité légale est le gray par seconde (Gy/s).

**Dose absorbée** : lorsqu'un rayonnement pénètre la matière, il interagit avec elle et lui transfère de l'énergie. La dose absorbée par la matière caractérise ce transfert d'énergie. Elle correspond donc à la quantité d'énergie absorbée en un point par unité de masse de matière (inerte ou vivante). Elle est directement mesurable et s'exprime en grays (Gy).

**Dose efficace** : dose prenant en compte le risque tardif résultant de l'exposition de plusieurs organes ou tissus de radiosensibilités différentes. C'est la somme des doses équivalentes délivrées aux différents organes et tissus d'un individu, pondérés par un facteur propre à chaque organe ou tissu. S'exprime en Sievert (Sv).

**Dose équivalente** : produit de la dose absorbée dans un tissu ou un organe par un facteur de pondération tenant compte de l'effet biologique lié à la nature et à l'énergie du rayonnement. S'exprime en Sievert (Sv).

**Fluorimétrie** : technique de dosage pondéral de l'uranium. L'uranium sous forme d'ion uranyle a la propriété de fluorescer lorsqu'il est excité par une lumière ultraviolette.

**Geometric standard deviation (gsd)** : dispersion relative du diamètre aérodynamique. Une valeur proche de 1 signifie que les particules sont monodispersées.

**Génotoxicité** : capacité d'induire des effets toxiques sur un système génétique incluant la mutagenèse, la clastogenèse et l'aneugenèse.

**Gray (Gy)** : unité de la dose absorbée, mesure la quantité de rayonnement absorbée par l'individu (ou l'objet) exposé, 1 gray correspond à une énergie absorbée de 1 joule par kilogramme de matière.

**HPRT, Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase** : enzyme impliquée dans l'utilisation des purines par les cellules.

**Hyperplasie** : développement excessif d'un tissu par multiplication de ses cellules avec conservation d'une architecture et d'une capacité fonctionnelles normales.

**Isotopes** : atomes ayant le même nombre d'électrons, donc le même nombre de protons dans leur noyau, mais un nombre de neutrons différents. Par exemple, les isotopes 235 et 238 de l'uranium possèdent le même nombre d'électrons et le même nombre de protons (92), mais 143 neutrons pour l'isotope 235 et 146 pour l'uranium 238.

**Leucocyte** : globule blanc.

**Lymphocyte** : leucocyte mononucléaire impliqué dans les réactions immunitaires spécifiques à médiation humorale et/ou cellulaire.

**Lysosome** : organite cellulaire sphérique à haute teneur en hydrolases. Particulièrement abondants dans les macrophages alvéolaires, les lysosomes participent au phénomène de phagocytose (ou internalisation) des substrats particuliers qui subiront une digestion cellulaire sous l'action des hydrolases lysosomales. Les lysosomes primaires sont les lysosomes natifs, tels qu'ils apparaissent après maturation au niveau de l'appareil de Golgi ; les lysosomes secondaires ou phagolysosomes sont représentatifs de différents cas de digestion cellulaire et résultent de la fusion de la vésicule de phagocytose avec des lysosomes primaires.



**Macrophage** : leucocyte spécialisé dans la capture, l'ingestion et la digestion de particules (phagocytose), intervenant dans les réactions inflammatoires et les mécanismes immunitaires.

**Micronoyau** : noyau surnuméraire séparé du noyau principal d'une cellule, produit pendant la télophase de la mitose ou de la méiose par perte de chromosomes ou de fragments de chromosomes.

**Mutagène** : agent (physique) ou substance (chimique) susceptible de produire des mutations.

**Mutagenèse** : processus par lequel l'information génétique d'un organisme est modifiée de manière stable et génétiquement héréditaire

**Mutation** : changement transmissible dans le matériel génétique, modification permanente du nombre ou de la structure du matériel génétique (ADN) dans un organisme, qui aboutit à une modification des caractéristiques phénotypiques de l'organisme. Les altérations peuvent impliquer la modification d'un gène unique (mutation génique) ou de la structure ou du nombre de chromosome aboutissant à l'altération de plusieurs gènes (mutation chromosomique).

**Néphron** : unité fonctionnelle du rein, constituée du glomérule, siège de la filtration sanguine, suivi du tube contourné proximal, de l'anse de Henlé puis du tube contourné distal.

**Radioactivité** : propriété que possèdent certains éléments naturels ou artificiels d'émettre spontanément des particules et/ou un rayonnement gamma. Est plus généralement désignée sous ce terme l'émission de rayonnements accompagnant la désintégration d'un élément instable ou la fission.

**Sievert (Sv)** : unité de dose équivalente et efficace, exprime l'effet biologique produit sur l'individu par le rayonnement absorbé.

**Somatiques** (cellules somatiques) : cellules autres que spermatozoïde ou ovule.

**Synergie** : *PHYSIO.* Action coordonnée de plusieurs systèmes, organes, éléments anatomiques ou biologiques d'où résulte l'accomplissement d'une fonction, l'exécution d'un mouvement. *CHIM., PHARMACO.* Addition d'effet ou potentialisation de l'action d'une ou plusieurs substances chimiques ou médicamenteuses par association de différents principes actifs.

**Transformation** : modification du patrimoine génétique d'une cellule.

**Uranium appauvri** : uranium dont la teneur en isotope 235, le seul fissile, est inférieure à son niveau naturel (0,72% en masse). Il est principalement obtenu, d'une part en tant que co-produit d'une opération d'enrichissement (autour de 0,3% de <sup>235</sup>U), d'autre part en tant que sous-produit (1% de <sup>235</sup>U) d'un traitement de combustible utilisé après passage en réacteur.

**Uranium enrichi** : uranium dont la teneur en isotope 235, le seul fissile, a été portée de son faible niveau naturel (0,72% en masse) à, par exemple, 3,5% pour un combustible destiné à un réacteur nucléaire.



Présentation du sujet -

Subject presentation



L'uranium, métal lourd naturellement radioactif, est utilisé dans l'industrie nucléaire, dans l'armement militaire et lors d'applications civiles spécifiques. Dans les installations du cycle du combustible, les risques d'exposition radiologique des travailleurs sont variables d'un poste à l'autre et sont évolutifs avec le temps. En effet, les composés uranifères, auxquels le personnel est exposé, présentent des compositions isotopiques et des formes physico-chimiques variées. De plus, il existe différentes situations d'exposition, les travailleurs pouvant être exposés de manière chronique ou accidentelle. Dans le cas d'une contamination interne, l'inhalation est la principale voie d'incorporation.

Suite à l'inhalation d'aérosols d'uranium présents dans l'atmosphère, le système respiratoire constitue un organe cible et est le siège de la première étape de la distribution dans l'organisme. Celle-ci dépend des caractéristiques physico-chimiques de l'aérosol, en particulier de sa taille, de sa densité et de sa solubilité. Si les composés sont insolubles, ils s'accumulent principalement dans les poumons et entraînent des effets toxiques tels que fibroses et cancers. En revanche, s'ils sont solubles, ils s'accumulent principalement dans les reins, où ils sont néphrotoxiques, et dans le squelette.

*In vivo*, la majorité des études, après contamination aiguë ou chronique d'uranium, a porté sur le comportement biocinétique du composé inhalé et sur ses effets macroscopiques. Les processus moléculaires conduisant aux effets pathologiques observés *in vivo* sont en revanche peu décrits et ont été principalement étudiés *in vitro*.

La Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) élabore, à partir des données de biocinétique de l'uranium, des modèles dosimétriques utilisés dans le cadre de la surveillance radiotoxicologique des travailleurs. Ils permettent, lorsqu'une contamination est détectée suite aux analyses effectuées lors des examens médicaux, de déduire la quantité d'uranium incorporée et d'estimer la dose reçue. Ces modèles linéaires supposent qu'une contamination chronique équivaut à la somme d'expositions aiguës.

L'objet de cette thèse est donc l'étude des conséquences biocinétiques et toxicologiques d'une exposition répétée d'aérosols d'oxydes d'uranium par inhalation chez le rat.

Dans une première partie, le modèle chronique de la CIPR a été testé afin d'évaluer expérimentalement le bien-fondé de l'utilisation itérative d'incorporations indépendantes pour rendre compte d'une exposition répétée. Cela revient aussi à vérifier qu'une exposition n'a pas d'effet sur la biocinétique de l'élément lors des

expositions ultérieures. Pour ce faire, deux approches ont été utilisées. La première a consisté à comparer le modèle avec les résultats expérimentaux d'une contamination répétée d' $\text{UO}_2$  ; la seconde à suivre la biocinétique d'un composé inhalé seul ( $\text{UO}_4$ ) ou après une exposition préalable à un autre composé ( $\text{UO}_2$ ).

La seconde partie aborde les conséquences biologiques d'expositions aiguës, d'une exposition répétée et de doubles expositions, impliquant différents composés uranifères. Les études ont, d'abord, été consacrées à l'organisme pris dans son ensemble à l'aide d'analyse des paramètres généraux de santé et des fonctions cognitives (études comportementales). La recherche s'est ensuite focalisée sur les cellules cibles, principalement les cellules épithéliales nasales, les cellules obtenues après lavage broncho-alvéolaire et les cellules rénales, avec l'analyse de la génotoxicité provoquée par les différentes expositions étudiées.

Le manuscrit aborde, dans un premier chapitre, l'état de l'art sur l'uranium et son utilisation dans l'industrie nucléaire, l'utilisation des modèles dosimétriques pour la radioprotection des travailleurs et les effets d'une contamination par inhalation à l'uranium. La suite du manuscrit regroupe cinq publications scientifiques avec les résultats obtenus au cours de cette étude. Chaque article est précédé par un résumé spécifique et suivi de résultats complémentaires le cas échéant. Enfin, le chapitre Discussion et Perspectives ouvre une discussion générale sur les résultats, l'ensemble des points de discussion abordés dans les articles n'ayant pas tous été nécessairement repris.

Uranium, a naturally radioactive heavy metal, is used in the nuclear industry, in weapons and for specific civilian applications. In the facilities of the fuel cycle, workers' radiological exposure risks vary from one workplace to another and evolve over time. Indeed, the uraniferous components to which the personnel are exposed, are found in various isotopic compositions and physico-chemical forms. Moreover, there exist different exposure situations, as workers can be exposed either in a chronic fashion or as the result of an accident. As far as internal contamination is concerned, inhalation is the main cause of incorporation.

Following inhalation of the uranium aerosols present in the atmosphere, the respiratory system constitutes a target organ and becomes the first site for propagation within the body. This depends on the physico-chemical characteristics of the aerosol, in particular its size, density and solubility. If the components are insoluble, they accumulate mainly in the lungs and lead to toxicological effects such as fibroses and cancers. On the other hand, if they are soluble, they accumulate mainly in the kidneys, where they are nephrotoxic, and in the skeleton.

*In vivo*, the majority of studies, after acute or chronic uranium contamination, have dealt with the biokinetic behaviour of the component inhaled and on its macroscopic effects. The molecular processes leading to the pathological effects observed *in vivo* have on the other hand been little described and have mainly been studied *in vitro*.

The International Commission for Radiological Protection (ICRP) formulates, from the uranium biokinetic data, dosimetric models used in the framework of the radiotoxicological monitoring of workers. When a contamination is detected following analyses effected during medical examinations, they allow the quantity of uranium incorporated to be deduced and the dose received to be estimated. These linear models suppose that a chronic contamination is equal to the sum of acute exposures.

The subject of this thesis is thus the study of the biokinetic and toxicological consequences of repeated exposure to uranium oxide aerosols by inhalation by rats.

In the first part, the ICRP chronic model was tested in order to evaluate experimentally the sound nature of the iterative use of independent incorporations to report on repeated exposure. This also means checking that an exposure has no effect on the biokinetics of the element during later exposures. To do this, two approaches were used. The first consisted of comparing the model with the experimental results of a repeated  $\text{UO}_2$  contamination; the second was to follow the biokinetics of a component inhaled singly ( $\text{UO}_4$ ) or after prior exposure to another component ( $\text{UO}_2$ ).

The second part tackles the biological consequences of acute exposures, of a repeated exposure and of double exposures, involving different uraniferous components. The studies were first devoted to the organism as a whole using analysis of general health and cognitive function parameters (behavioural studies). The research then focussed on target cells, mainly epithelial nasal cells, the cells obtained after broncho-alveolar lavage and kidney cells, with analysis of the genotoxicity caused by the different exposures studied.

The manuscript includes, in its first chapter, the state of the art on Uranium and its use in the nuclear industry, the use of dosimetric models for the radiological protection of workers and the effects of contamination by inhalation of uranium. The remainder of the manuscript collates five scientific publications with the results obtained during this study. Each article is preceded by a specific summary and followed by complementary results, if need be. Finally, the chapter Discussion and Perspectives opens up a general discussion on the results - not all the topics treated in the articles are necessarily taken up.



# Chapitre I - ETAT DE L'ART



## Chapitre I.1 - L'uranium, applications et risques

### I.1.1 - L'uranium

L'uranium naturel est un métal lourd de numéro atomique  $Z = 92$  et de forte densité  $19,05 \text{ g.cm}^{-3}$ , qui fait partie de la famille des actinides. Il est présent naturellement dans les roches, les sols et l'eau. Il a été découvert en 1789 par le chimiste allemand H. Klaproth dans le minerai de pechblende.

Un atome est composé d'un noyau central, assemblage de protons et de neutrons, et d'un nuage périphérique composé d'électrons. Des atomes d'un élément chimique comportant un noyau avec le même nombre de protons et un nombre différent de neutrons sont des isotopes de cet élément. Or les propriétés chimiques d'un atome dépendent du nombre et de la disposition des électrons dans son nuage. Ainsi tous les isotopes d'un même élément chimique ont les mêmes propriétés chimiques. Certains atomes ont des noyaux instables, ce qui est dû soit à un excès de protons ou de neutrons, soit à un excès des deux. Ils sont dits radioactifs et sont appelés radioisotopes ou radionucléides. Les noyaux d'atomes radioactifs se transforment spontanément en d'autres noyaux d'atomes radioactifs ou non. Cette transformation, qui s'accompagne d'une émission de rayonnements, est appelée désintégration. Ce phénomène de désintégration est nommé radioactivité. La radioactivité, et plus précisément celle de l'uranium, a été découverte en 1896 par le physicien Henri Becquerel.

Un échantillon radioactif se caractérise par son activité qui est le nombre de désintégrations de noyaux radioactifs par seconde. L'unité d'activité est le becquerel, de symbole Bq avec  $1 \text{ Bq} = 1$  désintégration par seconde. L'activité d'un échantillon radioactif diminue donc avec le temps du fait de la disparition progressive des noyaux instables qu'il contient : on parle de période radioactive ou de demi-vie, c'est à dire le temps au bout duquel la moitié des atomes radioactifs initialement présents a disparu par transformation spontanée.

L'atome d'uranium possède 6 électrons périphériques qui sont facilement extractibles. Il peut se présenter aux valences III, IV, V et VI. En solution aqueuse, l'uranium est préférentiellement à la valence VI sous forme d'ion uranyle  $\text{UO}_2^{2+}$ . Les

composés sous forme U(V) et la plupart des composés U(IV) sont insolubles. L'uranium métal est fortement électropositif et très réactif avec l'oxygène.

L'uranium est naturellement radioactif, ses isotopes naturels sont les isotopes de masse 234, 235 et 238 mais l'isotope  $^{238}\text{U}$  est largement majoritaire (Tableau 1) et tend à se transformer en une forme stable, le plomb 206. La période de  $^{238}\text{U}$  est de 4,5 milliards d'années. Les 3 isotopes, instables, se désintègrent principalement par émission de rayonnements  $\alpha$  (EDP Sciences, 2001).

*Tableau 1 : Composition isotopique en masse et en activité de l'uranium naturel*

	Masse (%)	Activité (%)	Activité (Bq) Pour 1g d'uranium
$^{238}\text{U}$	99,275	48,2	12 400
$^{235}\text{U}$	0,720	2,3	580
$^{234}\text{U}$	0,005	49,5	12 474

Bombardés par des neutrons, les noyaux d'uranium  $^{234}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  et  $^{238}\text{U}$  peuvent participer à des réactions de fission (cassures du noyau) ou de capture de neutrons. Seul le noyau d' $^{235}\text{U}$  peut être le siège de la réaction de fission. La fission dégage de l'énergie (énergie nucléaire) qui est finalement transformée en chaleur. L'isotope  $^{235}\text{U}$  participe aussi à une réaction de fission spontanée en chaîne pour des quantités de matière supérieures à une valeur seuil, appelée masse critique. D'autres isotopes artificiels de l'uranium existent allant de  $^{227}\text{U}$  à  $^{240}\text{U}$  tel que  $^{232}\text{U}$ ,  $^{233}\text{U}$ ,  $^{236}\text{U}$ ,  $^{237}\text{U}$  et  $^{239}\text{U}$ , tous radioactifs (EDP Sciences, 2001).

L'uranium, métal lourd radioactif, participe à la radioexposition de l'Homme.

### I.1.2 - L'exposition radiologique

L'Homme est exposé quotidiennement à la radioactivité. La majorité de cette exposition est d'origine naturelle, elle est due en France en moyenne et par an à :

- 37,2 % au radon,
- 13,2 % aux rayonnements telluriques,
- 11,2 % aux rayonnements cosmiques,
- 6,6 % aux radionucléides de l'organisme.

L'autre partie est artificielle et est due à :

- 31,5 % aux applications médicales,
- 0,3 % aux rejets de l'industrie, aux retombées atmosphériques ...

Lorsqu'un rayonnement pénètre la matière, il interagit avec elle et lui transfère de l'énergie. La dose absorbée par la matière caractérise ce transfert d'énergie. Le sievert (Sv) est l'unité de dose qui exprime l'effet des rayonnements sur l'Homme. L'exposition totale moyenne annuelle en France, détaillée précédemment, est d'environ 3,6 mSv.

L'uranium participe à cette exposition radiologique en particulier à celle d'origine tellurique, du fait de sa présence dans l'écorce terrestre. Il est également à l'origine de l'exposition due au radon. Le radon est un gaz radioactif inerte, inodore et sans saveur, produit par désintégration des radio-isotopes du radium qui provient lui-même de l'uranium et du thorium.

Tout rayonnement, selon sa nature et son énergie interagit avec la matière qu'il traverse (air, organisme vivant,...). Les rayonnements les plus énergétiques peuvent arracher des électrons des atomes constituant la matière, et ainsi l'ioniser : on parle de rayonnement ionisant. Les rayonnements des éléments radioactifs sont de quatre sortes :

- les rayons  $\alpha$  qui parcourent quelques centimètres dans l'air et sont arrêtés par un écran en papier,
- les rayons  $\beta$  qui parcourent quelques mètres dans l'air et sont arrêtés par un écran en aluminium,
- les rayons  $\gamma$  qui parcourent quelques kilomètres dans l'air et sont arrêtés par un écran en plomb ou béton,
- les neutrons qui parcourent quelques kilomètres dans l'air et sont arrêtés par un écran de bore ou d'eau.

L'exposition d'une personne aux rayonnements peut être soit une exposition externe lorsque la source est à l'extérieur de l'organisme, soit une exposition interne (ou contamination interne) lorsque la source est absorbée à l'intérieur de l'organisme.

L'exposition externe peut se produire :

- à partir d'une source de rayonnements externe et distante (rayonnement cosmique, radiothérapie ...),
- par la présence de substances radioactives sur la peau (contamination externe).

L'exposition interne peut se produire :

- par inhalation de substances radioactives (gaz, particules),
- par ingestion de produits contaminés,
- par pénétration transcutanée d'une contamination externe,
- lors d'un examen médical (exemple : radiothérapie par injection de composés radioactifs).

L'exposition interne persiste tant que la substance demeure dans le corps, elle diminue avec le temps en fonction de la décroissance radioactive des radioéléments.

Les effets dépendent du type de rayonnement. Les rayonnements, qui parcourent de grande distance et qui sont difficilement arrêtés, sont particulièrement dangereux dans le cas d'une exposition externe. Par contre, les rayonnements  $\alpha$  sont dangereux dans le cas d'une exposition interne. En effet, ils parcourent environ 40  $\mu\text{m}$  dans l'eau ou les tissus biologiques mais présentent une forte énergie (4 à 5 MeV).

Une exposition prolongée dans le temps et/ou à forte dose peut avoir des conséquences pour l'Homme. Les effets nocifs des rayonnements ionisants sont schématiquement sous deux formes :

- des effets déterministes, qui apparaissent systématiquement lorsque la dose radiologique reçue dépasse un certain seuil,
- des effets stochastiques, observés à des doses radiologiques plus faibles que précédemment, qui apparaissent de manière aléatoire et différée chez les individus exposés (cancers, anomalies héréditaires).

### I.1.3 - Le cycle du combustible

Les utilisations de l'uranium se sont d'abord limitées à celui de pigment jaune, orange ou vert pour la céramique, la cristallerie, la faïence et la bijouterie. Puis ses propriétés nucléaires et mécaniques en ont fait un candidat de choix pour l'industrie métallurgique et le combustible des réacteurs nucléaires.

Le principe d'un réacteur nucléaire est de récupérer l'énergie libérée par la fission nucléaire sous forme de chaleur pour la transformer en électricité. Les principaux atomes fissiles sont l'uranium 233, l'uranium 235, le plutonium 239 et le plutonium 241. Seul l'uranium 235 se trouve à l'état naturel. D'un point de vue économique, il est donc préférentiellement utilisé comme combustible dans les centrales nucléaires. Le combustible nucléaire après son utilisation dans le réacteur peut être retraité pour extraire les matières énergétiques recyclables. C'est pourquoi on parle de cycle du combustible nucléaire. Ce cycle met en jeu des formes chimiques variées ainsi que diverses compositions isotopiques d'uranium que l'on retrouve au cours des différentes étapes de ce cycle (EDP Sciences, 2001)(Figure 1).

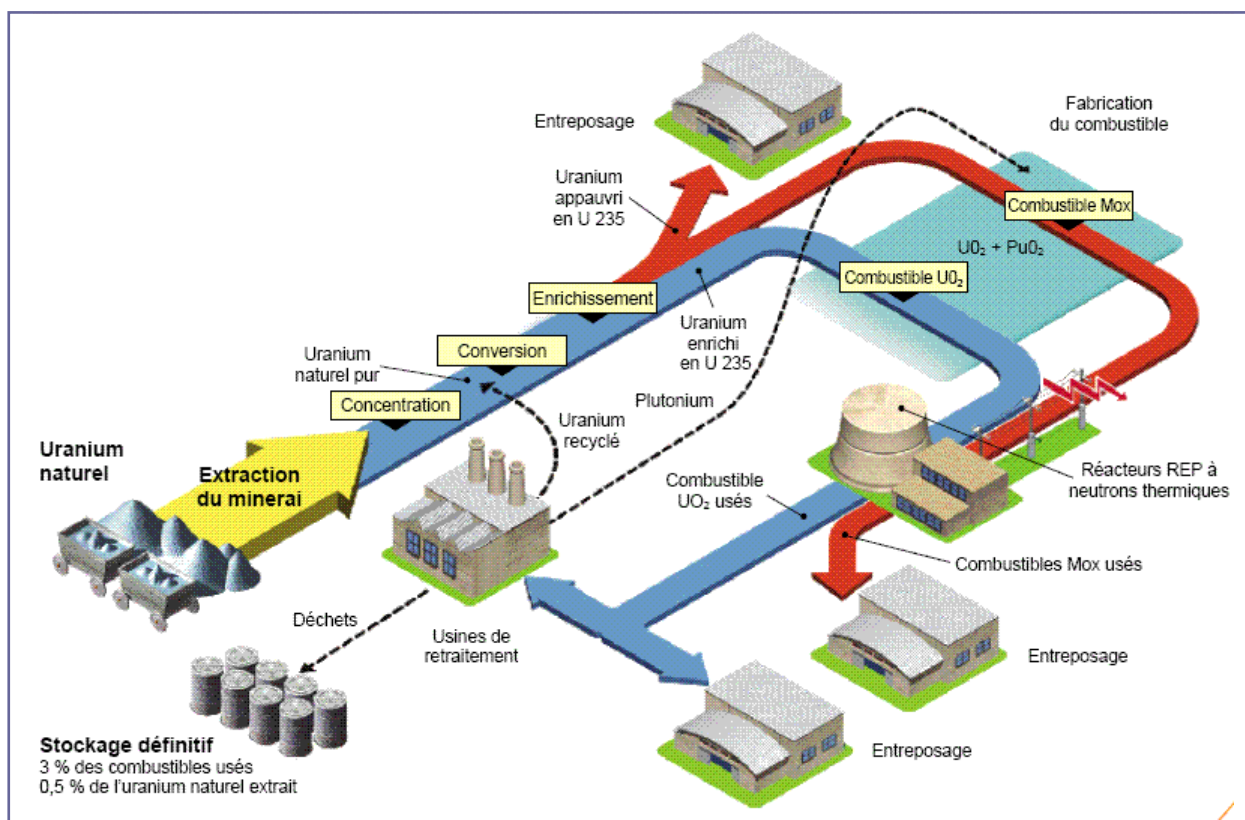


Figure 1 : Le cycle du combustible

### I.1.3.1 - L'extraction du minerai et la production du « yellow cake »

Les roches les plus riches en uranium sont les minerais uranifères, comme par exemple l'uraninite et la pechblende. Le cycle du combustible nucléaire commence donc par l'extraction du minerai uranifère dans des mines à ciel ouvert ou en galeries souterraines. Les principaux gisements connus se trouvent en Australie, aux États-Unis, au Canada, en Afrique du Sud, en Russie et au Niger.

La teneur du minerai en uranium est en général assez faible (1 à 3% de la roche extraite). Il est donc indispensable de concentrer l'uranium de ces minerais, ce qui se fait le plus souvent sur place. Les roches sont d'abord concassées et finement broyées et l'uranium est extrait par diverses opérations chimiques. Le concentré fabriqué a l'aspect d'une pâte jaune appelée "yellow cake". Il contient environ 75 % d'oxyde d'uranium. Le "yellow cake" est alors dirigé vers les usines de raffinage et de conversion.

### I.1.3.2 - La conversion en $UF_6$

Le "yellow cake" est purifié et transformé en  $UF_6$ , composé nécessaire pour l'étape suivante. Les opérations de conversion comprennent plusieurs étapes. Le "yellow cake" est transformé successivement en nitrate d'uranyle, en uranate d'ammonium puis en oxyde d'uranium,  $UO_3$  puis  $UO_2$ . L'oxyde d'uranium, très pur, est ensuite converti en tétrafluorure d'uranium ( $UF_4$ ). Enfin, la combustion de l' $UF_4$  en présence de fluor conduit à la formation d'hexafluorure d'uranium,  $UF_6$ .

### I.1.3.3 - L'enrichissement en $^{235}U$

Pour le fonctionnement de la majorité des réacteurs, le combustible doit contenir une proportion d'uranium 235 se situant entre 3 % et 5 % car seul cet isotope peut subir la fission nucléaire qui libère de l'énergie. L'opération consistant à augmenter la proportion d'uranium 235 dans la masse d'uranium naturel est appelée enrichissement. Il est possible de différencier les isotopes de l'uranium grâce à leur légère différence de masse, l'uranium 235 est plus léger que l'uranium 238. C'est pourquoi l'enrichissement de l'uranium est basé actuellement sur la différence de mobilité due à cette faible différence de masse. Il existe différentes techniques d'enrichissement : l'ultracentrifugation, la diffusion gazeuse et l'enrichissement par laser. Un  $UF_6$  enrichi en isotope  $^{235}U$  est obtenu. De l'uranium très enrichi sous forme métallique peut également être produit pour des applications militaires.



#### I.1.3.4 - La conversion en $UO_2$ enrichi et la fabrication du combustible

Après l'enrichissement, l' $UF_6$  enrichi est converti par plusieurs étapes en oxyde d'uranium  $UO_2$  enrichi sous la forme d'une poudre noire compactée en petits cylindres appelés "pastilles". Chaque pastille (7 grammes) peut libérer autant d'énergie qu'une tonne de charbon. Les pastilles sont enfilées dans de longs tubes métalliques bouchés de manière étanche pour constituer les "crayons" de combustible (Figure 2). Pour une centrale, plus de 40 000 crayons sont préparés pour être rassemblés en "fagots" de section carrée, appelés assemblages de combustible. Le chargement d'un réacteur nucléaire de 900 mégawatts nécessite 157 assemblages contenant en tout 11 millions de pastilles.

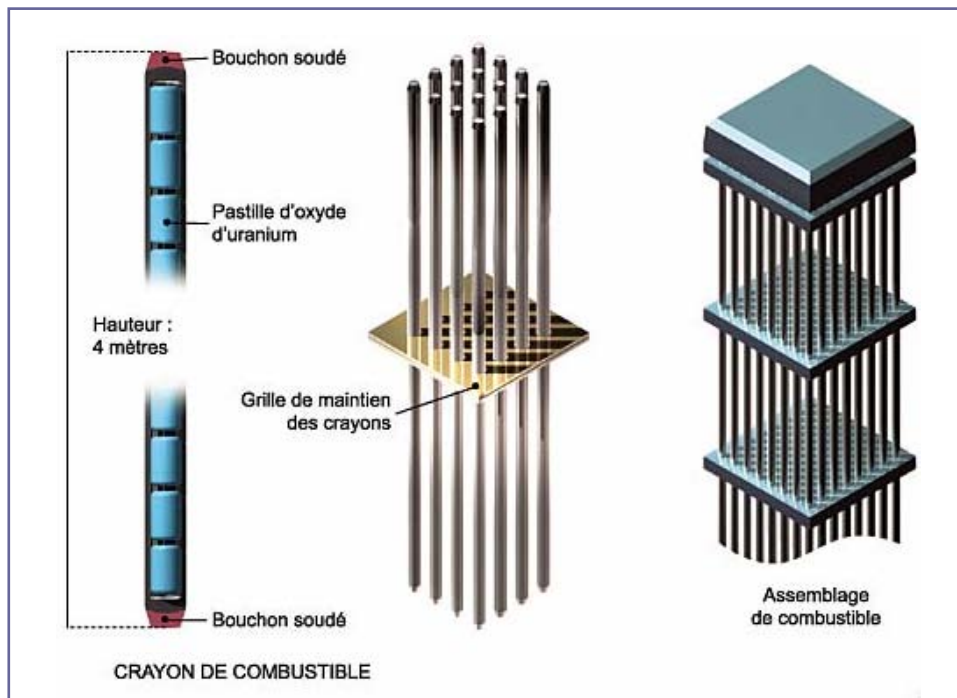


Figure 2 : Préparation des assemblages de combustibles

Les assemblages du combustible forment le cœur du réacteur. La fission de l'uranium 235 va fournir la chaleur nécessaire à la production de vapeur puis d'électricité. Seul l' $^{235}U$  est fissile ; cependant certains noyaux d' $^{238}U$  capturent un neutron et se transforment en plutonium 239 qui lui aussi est fissile.

### I.1.3.5 - Le retraitement et le stockage

Au fil du temps, le combustible va subir certaines transformations qui le rendent moins performant (Figure 3) : il y a une consommation progressive d'uranium 235 qui entraîne l'apparition de produits de fission. Au bout d'un certain temps, le combustible doit donc être retiré du réacteur. Après son utilisation, le combustible utilisé est stocké dans une piscine de refroidissement près du réacteur pendant trois ans pour laisser diminuer son activité. Il est ensuite retraité.

Le retraitement consiste (Figure 3) :

- à récupérer la matière encore utilisable, le plutonium et l'uranium, pour produire à nouveau du combustible nucléaire. C'est le recyclage des matières énergétiques contenues dans les combustibles usés,
- à trier les déchets radioactifs non récupérables (produits de fission radioactifs).

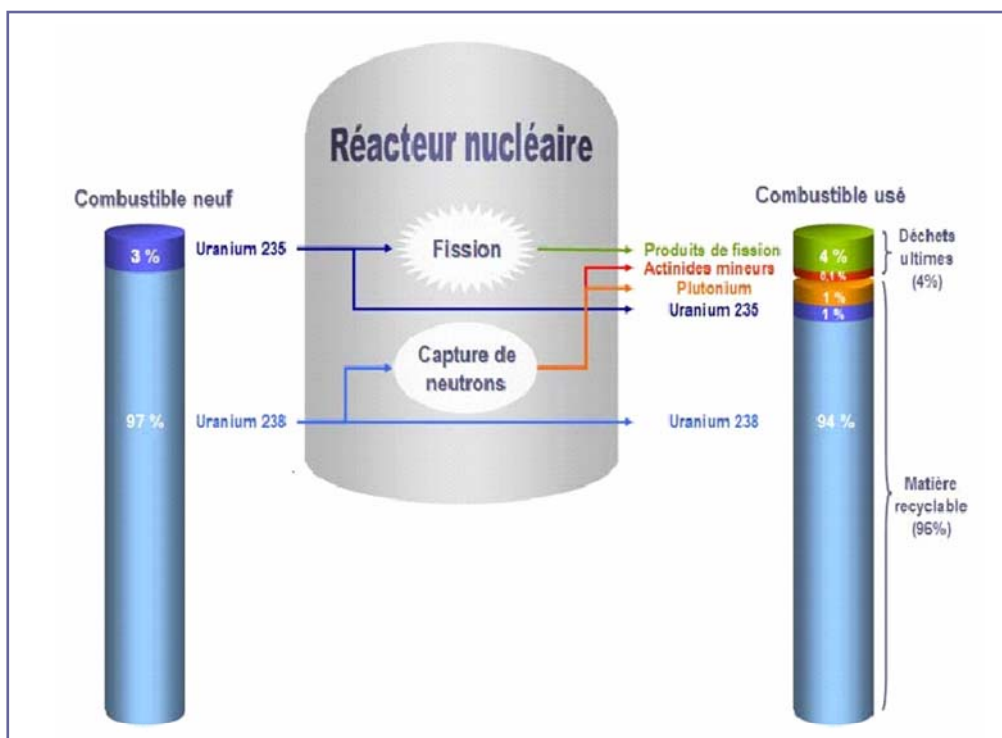


Figure 3 : Le devenir du combustible

Des traitements chimiques successifs sur le combustible en solution permettent de séparer le plutonium et l'uranium des produits de fission.

L'uranium et le plutonium, qui représentent 97 % de l'ensemble, sont ensuite séparés. L'uranium récupéré sous forme de nitrate d'uranyle est encore légèrement plus

riche que l'uranium naturel (environ 1% d'uranium 235). Il pourra être à nouveau enrichi à plus de 3 % et suivre une voie analogue à celle d'un combustible ordinaire.

Le plutonium possède un important potentiel énergétique et est utilisé pour fabriquer du combustible MOX. Le MOX est un combustible mixte, mélange d'oxydes d'uranium appauvri et de plutonium, dont la fabrication s'apparente à celle des combustibles à oxyde d'uranium.

Les produits de fission sont intégrés dans des verres spéciaux par le procédé de vitrification et stockés comme déchets nucléaires. Tous les déchets radioactifs n'étant pas identiques, ils sont classés selon deux critères en vue de leur stockage : leur niveau d'activité, qui conditionne l'importance des protections à utiliser contre la radioactivité, et leur période radioactive, qui permet de définir la durée du stockage. Les déchets à vie courte de faible et moyenne activité représentent 90 % des déchets radioactifs produits en France. Leur période radioactive n'excède pas 30 ans. Ils sont stockés dans des fûts en acier ou en béton déposés au niveau de centre de stockage de surface. Les déchets à vie longue et/ou de haute activité (10 % du volume total) sont coulés dans du bitume ou du verre et entreposés en surface en attendant une autre solution.

Les différentes étapes du cycle du combustible nécessitent donc la manipulation de différents composés et isotopes de l'uranium.

#### I.1.3.6 - L'uranium appauvri

La production d'uranium enrichi entraîne la production d'uranium appauvri contenant moins d' $^{235}\text{U}$  (0,2 à 0,3 %) et aussi moins d' $^{234}\text{U}$ . L'uranium appauvri peut aussi être issu de la filière de retraitement et, dans ce cas, composé d'isotopes non naturels de l'uranium en particulier  $^{236}\text{U}$  et  $^{232}\text{U}$ . L'uranium appauvri possède les mêmes caractéristiques chimiques que l'uranium naturel, il est cependant moins radioactif (40% moins radioactif).

Du fait de ces propriétés mécaniques, notamment sa résistance et sa densité élevée et de son prix compétitif, l'uranium appauvri a été utilisé dans d'autres domaines comme la fabrication d'ailes et de gouvernails d'avions, de pièces de bateaux et dans le secteur militaire pour la fabrication d'obus et de plaques de blindages (Craft *et al.*, 2004, The royal society, 2001, 2002).

### I.1.4 - Le risque d'exposition interne à l'uranium

A chaque étape du cycle du combustible correspondent différents composés uranifères pouvant présenter un risque radiologique pour les travailleurs exposés (Chazel *et al.*, 2000).

Dans la mine, le minerai d'uranium est peu radioactif. Le risque d'exposition interne est dû aux produits de filiation tels que le radium et le radon. Lors de la fabrication, du raffinage du yellow cake et de la conversion en  $UF_6$ , l'uranium est toujours sous forme naturelle. Les opérations occasionnant le plus grand risque sont le prélèvement du yellow cake, l'enlèvement des cendres après purification et la maintenance. Lors de l'enrichissement, une contamination à tous les taux d'enrichissement est théoriquement possible. Les postes les plus exposés sont le chargement et le déchargement des cylindres et les activités de maintenance. Lors de la conversion en  $UO_2$ , les travailleurs risquent d'être exposés à  $UF_6$  et  $UO_2F_2$  et à tous les niveaux d'enrichissement. Lors de la fabrication du combustible, le risque est d'être exposé à des poudres, principalement d' $UO_2$  et l' $U_3O_8$ . Les travailleurs affectés au conditionnement, à la manipulation des poudres, à la production des pastilles de combustible et aux activités de maintenance sont les plus exposés.

Ces expositions peuvent être uniques dans le cas par exemple d'exposition aiguë, lors d'un accident, ou répétées à bas niveau. Dans ce dernier cas, un risque d'exposition chronique existe. En effet, au cours de la manipulation de l'uranium dans les industries du nucléaire, une exposition interne constitue le risque majeur encouru par les travailleurs. Les voies de pénétration de l'uranium donnant lieu à une contamination interne sont : la voie respiratoire par inhalation d'aérosols, la voie digestive par ingestion, la voie transcutanée par blessure et la voie oculaire par projection de liquide. La plus commune pour les travailleurs est la voie respiratoire.

Dans le cadre de cette thèse, l'étude de la contamination interne à l'uranium par inhalation sera privilégiée.

Une autre catégorie de personnes peut être exposée à de l'uranium par inhalation. Les armes à l'uranium appauvri ont été utilisées pour la première fois dans la guerre du Golfe de 1991. Au moment de l'impact sur une cible, des aérosols, contenant des produits de combustion de l'uranium tels que les oxydes d'uranium, sont générés (Chazel *et al.*, 2003, Guilmette *et al.*, 2004, Mitchel et Sunder, 2004, Parkhurst *et al.*, 2004a, Parkhurst *et al.*, 2004b). Une contamination des soldats est donc possible

au moment de l'explosion principalement par inhalation des aérosols produits et par blessure avec des fragments métalliques contenant de l'uranium appauvri. Les concentrations mesurées ou calculées pendant et après les impacts sont comprises entre 5 et 1700 mg.m<sup>-3</sup> (The royal society, 2001). La contamination des sols ou de l'eau peut, à plus long terme, induire une contamination des soldats et des civils par inhalation ou ingestion, à des doses plus faibles. Les militaires constituent ainsi la seconde population spécifiquement exposée au risque d'inhalation de particules d'uranium.

Ce risque d'exposition interne à l'uranium des travailleurs du nucléaire a conduit à mettre en place un dispositif de surveillance afin de contrôler et limiter ce risque.

### I.1.5 - La Radioprotection

La sécurité nucléaire fait appel à plusieurs disciplines telles que la sûreté nucléaire, la radioprotection, la protection physique contre les actes de malveillance, la sécurité civile en cas d'accident et la gestion des transports de matières dangereuses (dont les matières radioactives), ainsi qu'à tout ce qui a trait à l'hygiène et à la sécurité du travail. Du fait du risque radiologique existant sur les installations nucléaires, il convient de prendre des dispositions visant d'une part à prévenir les accidents et en limiter les conséquences - c'est le domaine de la sûreté nucléaire - et d'autre part à mesurer et limiter les doses reçues par les travailleurs et la population - c'est le domaine de la radioprotection. La radioprotection vise à protéger l'homme de l'ensemble des dangers que l'exposition aux rayonnements ionisants ou à une contamination par des produits radioactifs est susceptible d'entraîner. Elle concerne donc la protection de la santé des travailleurs et du public, que ce soit en situation normale ou accidentelle.

Depuis 1928, la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) rassemble des médecins, des physiciens, des biologistes ..., de tous pays. C'est une organisation internationale non gouvernementale autonome. A partir de données scientifiques, elle émet des recommandations en matière de radioprotection, souvent reprises par les réglementations propres à chaque État. Les principes fondamentaux des recommandations de la CIPR sont : la justification des pratiques utilisant les rayonnements ionisants, l'optimisation de la radioprotection et la limitation des expositions individuelles. L'Union Européenne a repris les avis de la CIPR dans ses propres normes ou directives. Celles-ci ont été transposées dans la réglementation française relative à la protection contre les rayonnements ionisants. En France, les normes légales de radioprotection prescrivent des limites de dose, hors radioactivité naturelle et applications médicales et correspondant à un risque supposé acceptable. Elles sont (décrets n°2003-296 et n°2001-215)(ICRP, 1990) :

- une limite de dose efficace de 1 mSv / an pour le public et de 20 mSv / an pour les personnes directement affectées aux travaux sous rayonnements ionisants (industrie nucléaire, radiologie médicale). Cette limite prend en compte le risque tardif résultant de l'exposition de plusieurs organes ou tissus de radiosensibilités différentes,
- des limites de dose équivalente à l'organe de 150 mSv pour le cristallin et 500 mSv pour la peau (1 cm<sup>2</sup>) et les mains en ce qui concerne les travailleurs exposés, et de

15 mSv pour le cristallin, 50 mSv pour la peau et les mains chez les personnes du public.

Pour les travailleurs utilisant des rayonnements ionisants, la réglementation prévoit (décret n°2003-296)(ICRP, 1997a) :

- une formation adaptée sur la nature des risques et les précautions à prendre,
- des moyens de radioprotection collective ou individuelle adaptés au risque et au poste de travail,
- des limites pour l'exposition professionnelle,
- un suivi et un contrôle dosimétrique,
- une surveillance médicale.

Dans le cadre d'une exposition interne par inhalation, des valeurs maxis de concentration en aérosols (limites dérivées de concentration dans l'air, LDCA, en  $\text{Bq}\cdot\text{m}^{-3}$ ) peuvent être calculées à partir des coefficients de dose donnés par la CIPR (Dose par unité d'incorporation, DPUI ou  $e_{\text{inh}}$  en  $\text{Sv}\cdot\text{Bq}^{-1}$ ) pour les travailleurs. Ces valeurs sont indiquées dans le Tableau 2 pour les conditions par défaut suivantes : particules d'uranium de diamètre aérodynamique médian en activité (DAMA)  $5\ \mu\text{m}$ , 2000h de travail/an (ou 40h/sem), débit respiratoire de  $1,2\ \text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$  (ICRP, 1994a).

Tableau 2 : Coefficients de dose et limites dérivées de concentration dans l'air

	Solubilité	DPUI (Sv.Bq <sup>-1</sup> )	LDCA (Bq.m <sup>-3</sup> )
<sup>234</sup> U	F	6,50E-07	1,28E+01
	M	2,10E-06	3,97E+00
	S	6,80E-06	1,23E+00
<sup>235</sup> U	F	6,00E-07	1,39E+01
	M	1,80E-06	4,63E+00
	S	6,10E-06	1,37E+00
<sup>236</sup> U	F	6,10E-07	1,37E+01
	M	1,90E-06	4,39E+00
	S	6,30E-06	1,32E+00
<sup>238</sup> U	F	5,80E-07	1,44E+01
	M	1,70E-06	4,90E+00
	S	5,70E-06	1,46E+00
U appauvri (à 0.2% d' <sup>235</sup> U)	F	5,80E-07	1,44E+01
	M	1,70E-06	4,90E+00
	S	5,70E-06	1,46E+00
U naturel	F	5,76E-07	1,45E+01
	M	1,69E-06	4,93E+00
	S	5,66E-06	1,47E+00
U enrichi (à 3% d' <sup>235</sup> U)	F	5,81E-07	1,44E+01
	M	1,70E-06	4,89E+00
	S	5,71E-06	1,46E+00
U retraitement (0.39 d' <sup>235</sup> U et 0.06 d' <sup>236</sup> U)	F	5,80E-07	1,44E+01
	M	1,70E-06	4,90E+00
	S	5,70E-06	1,46E+00

Solubilité du plus soluble au moins soluble : type F (fast), M (moderate), S (slow)

LDCA = LAI / (débit respiratoire x nombre d'heures travaillées par an)

LAI = limite de dose annuelle / coefficient de dose

Ces valeurs sont utilisées par les personnes responsables de la radioprotection.



### I.1.6 - L'uranium, applications et risques - Synthèse

L'uranium est un métal lourd naturellement radioactif possédant plusieurs isotopes tous radioactifs. Ses propriétés physiques et chimiques en ont fait un candidat de choix pour le combustible des réacteurs nucléaires.

Un réacteur nucléaire récupère l'énergie libérée par la fission nucléaire sous forme de chaleur pour la transformer en électricité. L'uranium 235, fissile, se trouve à l'état naturel. Le principe du cycle du combustible est donc, à partir d'un minerai d'uranium naturel, d'obtenir un uranium enrichi en  $^{235}\text{U}$  afin de produire le combustible nucléaire. Après son utilisation, le combustible usé est retraité. Les étapes de retraitement créent des isotopes artificiels de l'uranium.

Les différentes étapes du cycle du combustible nécessitent donc la manipulation de différents composés et isotopes de l'uranium, créant un risque d'exposition des travailleurs. Plus particulièrement, il existe un risque d'exposition interne à l'uranium qui peut survenir suite à l'inhalation d'aérosols, l'ingestion, la blessure et la projection de liquide. L'exposition par inhalation de composés uranifères est étudiée dans le cadre de cette thèse.

Le risque d'exposition interne à l'uranium nécessite la mise en place d'un système de surveillance qui est le domaine de la Radioprotection. La Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR), l'organisation internationale qui rassemble les données scientifiques afin de créer des modèles dosimétriques et d'émettre des recommandations en matière de radioprotection, a été créée pour cela.

Le chapitre suivant décrit la façon dont s'applique la radioprotection des travailleurs exposés au risque d'inhalation d'uranium.



## Chapitre I.2 - Exposition Interne par Inhalation : Le suivi médical

### I.2.1 - La surveillance médicale

Les médecins du travail en charge de la surveillance radiologique des travailleurs sont confrontés à la problématique suivante :

- ils doivent assurer la surveillance du personnel exposé que ce soit de façon chronique en l'absence de confinement ou de façon accidentelle dans les installations confinées,
- ils doivent pouvoir évaluer l'incorporation en cas d'exposition avérée ou suspectée.

La dosimétrie des travailleurs exposés au risque de contamination interne (ICRP, 1997a, b) repose sur la mise en place de différentes surveillances : surveillance du poste de travail et surveillance radiotoxicologique.

Chaque poste à risque est étudié afin de minimiser le danger. Des études des postes de travail permettent de connaître l'environnement professionnel du travailleur. Des prélèvements d'air sont effectués afin d'analyser les caractéristiques des aérosols présents au poste de travail. La concentration volumique ( $\text{Bq}\cdot\text{m}^{-3}$ ) est ainsi déterminée et comparée aux LDCA réglementaires afin d'évaluer le risque d'inhalation. La détermination de la distribution granulométrique permet le calcul du diamètre aérodynamique médian en activité (DAMA, en  $\mu\text{m}$ ). Ce diamètre ainsi que la densité des particules donnent des indications sur la dispersion dans le système respiratoire. Enfin, l'analyse des phases en présence et la mesure de la surface spécifique ( $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ) renseignent sur le type de solubilité des composés. C'est l'ensemble de ces paramètres qui permet le calcul des coefficients de dose spécifiques (DPUI, en  $\text{Sv}\cdot\text{Bq}^{-1}$ ) d'un poste de travail.

Différentes études de poste ont montré, par exemple, des concentrations moyennes dans divers ateliers du cycle du combustible de 0,1 à 3  $\text{Bq}\cdot\text{m}^{-3}$  (Chazel et Ansoborlo, 1999, Chazel *et al.*, 1997, 1999, Chazel et Turlonias, 2004). Ces valeurs peuvent, bien sûr, être plus élevées lors d'un dysfonctionnement. Ces mêmes études ont également permis de classer certains composés uranifères décrits comme insolubles par la CIPR dans un type F de solubilité du fait de leur surface spécifique et de leur

composition (Chazel *et al.*, 2000). Ceci a des implications importantes dans la surveillance médicale.

Ces études de poste permettent en effet au médecin du travail d'ajuster la surveillance médicale des travailleurs par une connaissance plus approfondie de l'environnement de travail, résumé sur des fiches spécifiques de chaque atelier comprenant toutes les données expérimentales précédemment décrites.

Quant à la surveillance radiotoxicologique individuelle, elle est basée sur les mesures effectuées lors des examens médicaux. Les travailleurs sont classés en deux catégories en fonction de leur fiche de poste et de nuisances (décret n°2003-296) :

- Catégorie A : le travailleur est susceptible de recevoir une dose efficace supérieure à 6 mSv par an dans les conditions habituelles de travail,
- Catégorie B : le travailleur est exposé aux rayonnements ionisants ne relevant pas de la catégorie A.

Les travailleurs classés en catégorie A ou B bénéficient d'un examen médical au moins une fois par an. Les visites peuvent être plus fréquentes lors de manipulations à risque et un travailleur peut demander des analyses à tout moment.

Ainsi, la visite chez le médecin du travail permet de contrôler la présence d'une contamination interne (Aigueperse *et al.*, 2001). Elle s'effectue de manière systématique et après incident. La surveillance de l'inhalation d'uranium peut se faire, premièrement, par des mesures *in vivo* associées à des modèles métaboliques prenant en compte la rétention pulmonaire. Ces mesures se font par anthropogammamétrie pulmonaire, en particulier si une contamination par des oxydes est suspectée. Ces examens reposent sur l'analyse des rayonnements X et gamma émis par l'<sup>235</sup>U retenu au niveau pulmonaire et la quantification de l'activité correspondante. Les systèmes actuels permettent des limites de détection en uranium appauvri de l'ordre de 100 à 200 Bq dans les poumons. Cette technique est d'autant moins efficace que la contamination est ancienne et que les composés sont solubles. La surveillance s'effectue également par des analyses radiotoxicologiques associées à des modèles d'excrétion par les voies naturelles : l'uranium est généralement mesuré dans les urines et les selles. Le dosage de l'activité recueillie par mouchage peut aussi être réalisé et est utile au dépistage d'une exposition par inhalation. Il existe trois méthodes d'analyse de l'uranium dans les excréta :

- La mesure pondérale  
Elle donne la concentration massique en uranium total dans les urines et est exprimée en microgrammes par litre. Elle permet d'obtenir une réponse rapide (quelques heures) de la contamination mais ne renseigne pas sur la composition isotopique. Il y a deux techniques principales de mesure pondérale. Le KPA (Kinetic Phosphorescence Analyser) et la fluorimétrie permettent d'atteindre des limites de détection respectivement de 0,01 et 4  $\mu\text{g.L}^{-1}$  en uranium total.
- L'analyse isotopique  
Elle permet de déterminer l'activité volumique de l'uranium et est exprimée en becquerels par litre, pour chaque isotope détecté. Cette analyse nécessite une purification chimique puis une mesure par spectrométrie alpha. Sa mise en œuvre est plus lourde et plus longue (5 jours). Les limites de détection sont de l'ordre de 1  $\text{Bq.L}^{-1}$  pour chaque isotope.
- La spectrométrie de masse par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)  
Elle conjugue les 2 analyses précédentes et est utilisable après simple dilution de l'urine. Elle permet d'atteindre des limites de détection 10 fois plus basses par rapport à la spectrométrie alpha et est extrêmement rapide (de 10 minutes à 1 jour selon la sensibilité recherchée). C'est certainement la technique la plus utilisée.

Quand les analyses sont positives, indiquant qu'une substance radioactive a été incorporée, l'évaluation de la dose reçue par l'individu exposé est alors nécessaire pour être comparée aux limites réglementaires. Cette évaluation est réalisée par les services de dosimétrie compétents et par les médecins habilités à l'aide de modèle de transfert biocinétique. L'interprétation se fait sur la base des modèles biocinétiques et dosimétriques de la CIPR qui permettent d'estimer l'activité incorporée puis la dose qui en résulte pendant la vie de l'individu. Les mesures de la contamination interne utilisées pour le calcul de dose sont souvent difficiles à interpréter en raison :

- des limites de détection des isotopes de l'uranium,
- de la variabilité intra- et inter-individuelle du métabolisme.

A ceci s'ajoute le fait qu'un travailleur peut être exposé à des produits de composition isotopique et de forme physico-chimique variables au cours du temps ; les mesures faites à un moment donné peuvent donc être le résultat de l'intégration de contaminations différentes pendant plusieurs mois ou plusieurs années.

En général, suite à une contamination interne, deux attitudes médicales peuvent être envisagées. La première, basée sur des considérations liées à l'urgence de la situation, consiste à effectuer au plus tôt une administration unique d'un traitement, sans se préoccuper de quantifier la contamination. La seconde consiste à attendre les résultats des mesures pour déterminer si un traitement est justifié ou non et pour éviter une administration inutile. Dans tous les cas, le traitement administré a pour but de réduire le dépôt sur les organes cibles.

Cependant, à la suite d'une contamination par inhalation d'uranium, il n'existe aujourd'hui aucune molécule non toxique et réellement efficace.

Les investigations en cours dans ce domaine suivent deux approches :

- déterminer l'efficacité de molécules connues et améliorer les protocoles de traitement,
- chercher de nouvelles molécules grâce à la modélisation prenant en compte l'ensemble des paramètres : toxicité, affinité avec les tissus biologiques...

Les recherches portent sur des traitements par des agents chélateurs, basées sur le fait que l'uranium se complexe dans le sang avec des ligands et différentes protéines. L'augmentation artificielle de la concentration d'un ligand va permettre la capture de l'uranium et puis son excrétion. Différents chélateurs sont étudiés : le bicarbonate de sodium, les acides polyacétiques et les polyamides. Pour une incorporation massive d'uranium enrichi, certains praticiens effectuent un lavage pulmonaire. L'objectif de ce traitement est d'éliminer les macrophages alvéolaires, qui captent très rapidement les particules inhalées, et de limiter la diffusion.

La partie suivante décrit les modèles biocinétiques et la façon dont ils sont utilisés afin d'estimer l'activité incorporée.

## I.2.2 - Les modèles biocinétiques

Ces modèles décrivent mathématiquement le cheminement du radionucléide incorporé dans l'organisme. L'organisme est représenté comme un ensemble de compartiments reliés entre eux par des transferts suivant des cinétiques du premier ordre à coefficients constants. Les compartiments sont rattachés à un ou plusieurs organes mais n'ont pas nécessairement de signification anatomique. Ils représentent des éléments fonctionnels. Les transferts sont caractérisés par des paramètres cinétiques dépendant de la répartition de l'élément dans l'organisme et de son temps moyen de résidence dans chaque organe. On peut en déduire la période biologique ( $T_b$ ), temps nécessaire à la disparition de la moitié de la quantité de substance présente dans le corps en un temps déterminé, et la période efficace ( $T_e$ ) qui combine la période biologique et la période de désintégration radioactive ( $T_p$ ) d'un élément ( $1/T_e = 1/T_b + 1/T_p$ ).

Ainsi il est possible de calculer à chaque instant et suivant le modèle, la rétention d'un contaminant dans un organe et dans le corps entier. En intégrant sur la période d'engagement pour calculer le nombre total de désintégrations radioactives puis en prenant en compte les intensités énergétiques des rayonnements émis à chaque désintégration et la morphologie du corps, la dose reçue par l'organisme peut être alors déterminée.

Dans le cas d'une contamination par inhalation d'uranium, le modèle humain des voies respiratoires et le modèle systémique de l'uranium décrits par la CIPR sont utilisés pour interpréter les mesures radiotoxicologiques (Bailey *et al.*, 2003). Ces modèles tiennent compte, d'une part, des caractéristiques anatomophysiologiques générales (modèle respiratoire) et, d'autre part, des métabolismes propres aux composés. Ils sont élaborés à partir d'études expérimentales d'inhalation aiguë chez l'animal et du suivi d'incidents chez l'homme. Le modèle respiratoire tient compte de la granulométrie des aérosols dans le calcul de la répartition du dépôt initial et des différences d'absorption des composés en fonction de leur solubilité.

Le modèle humain des voies respiratoires (ICRP, 1994b) les divise en quatre régions distinctes (Figure 4) : la région extra-thoracique (ET), la région bronchiale (BB), la région bronchiolaire (bb) et la région alvéolo-interstitielle (AI). Chacune contient plusieurs compartiments.

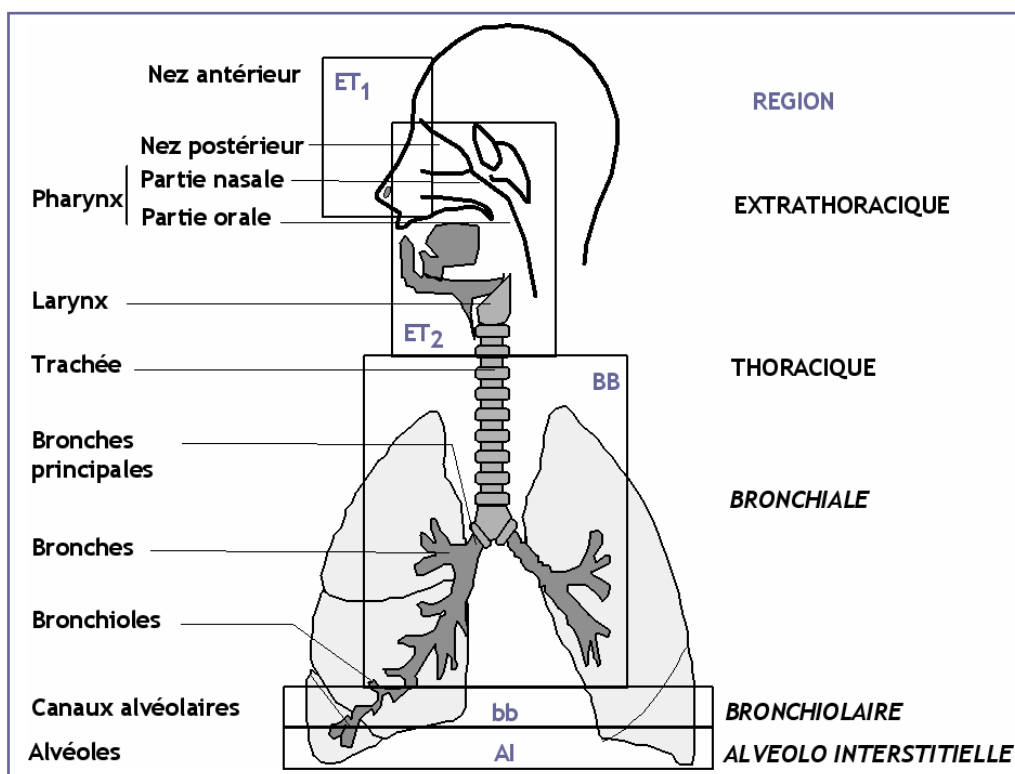


Figure 4 : Les différentes régions anatomiques du modèle pulmonaire (CIPR)

Une fraction de l'uranium inhalé est déposée dans chaque région selon sa taille et sa densité. Le composé ainsi déposé est épuré par trois voies principales : vers le sang après absorption, vers le tractus gastro-intestinal via l'épuration mucociliaire et le pharynx, et par les macrophages vers les ganglions lymphatiques, via les canaux lymphatiques. Les composés inhalés sont classifiés selon leur solubilité qui conditionne leur absorption vers le sang. Trois types d'absorption sont ainsi référencés : Type F (fast), M (moderate), S (slow). Les vitesses d'épuration par transport mécanique des particules et par absorption sont indépendantes.

Les sorties du modèle respiratoire sont dirigées vers le tractus gastro-intestinal et la circulation sanguine permettant la répartition dans le reste de l'organisme (Figure 5). Le modèle digestif (ICRP, 1979) se compose de quatre compartiments qui représentent dans l'ordre de transfert de l'activité, l'estomac, l'intestin grêle, le colon proximal et le colon distal. Il est commun à tous les radioéléments et les vitesses de transfert sont les mêmes quel que soit le radionucléide. Néanmoins, la valeur du coefficient d'absorption intestinal, qui est la fraction  $f_1$  de l'activité ingérée passant dans le sang, varie selon le radionucléide et selon sa forme physico-chimique. L'absorption sanguine a lieu au niveau de l'intestin grêle et conduit au transfert d'une



partie de l'activité vers le reste de l'organisme. Ce modèle permet d'estimer l'activité retenue dans le tractus gastro-intestinal et la dose qui en découle, l'activité transférée au circuit systémique et enfin de prévoir l'excrétion fécale. Le modèle du transport systémique (ICRP, 1995a, b) de l'uranium décrit le devenir du composé après son entrée dans le flux sanguin et contient 17 compartiments incluant le recyclage des organes ou des tissus vers le sang.

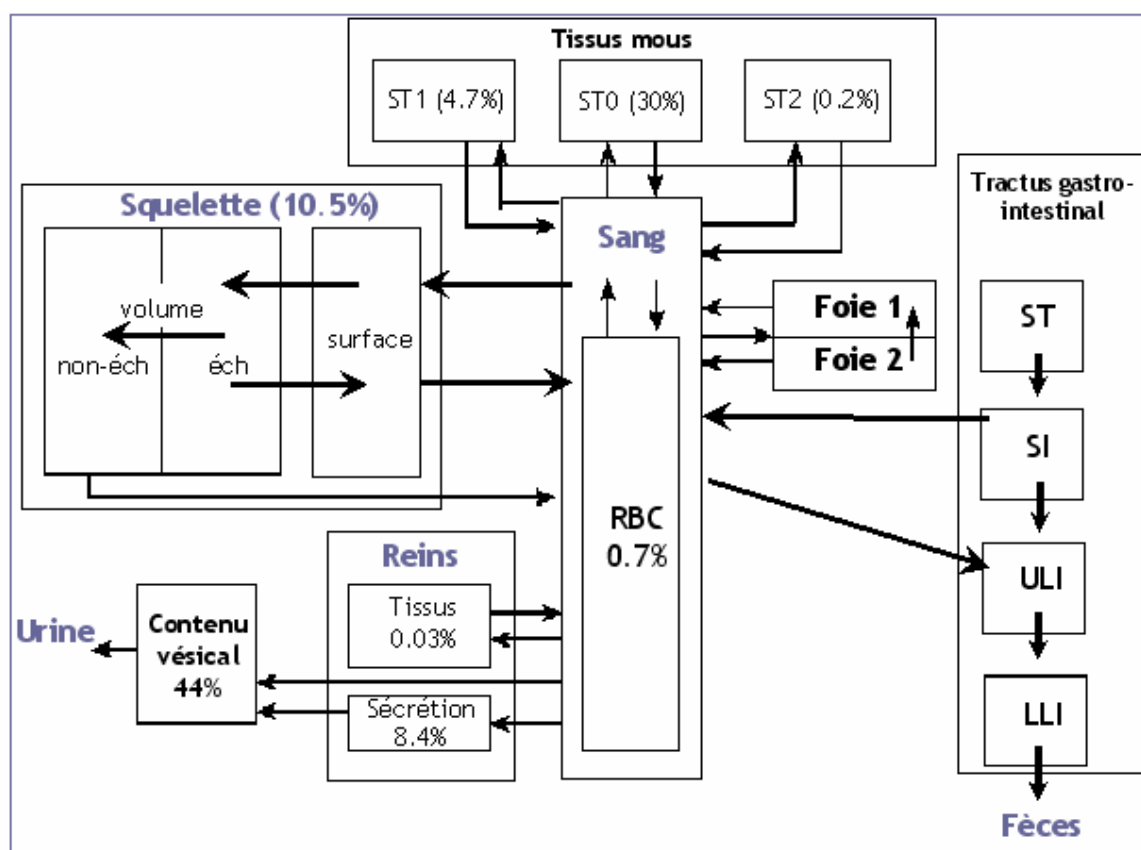


Figure 5 : Modèle biocinétique de l'uranium et modèle digestif (CIPR)

ST0, transfert rapide; ST1, transfert intermédiaire; ST2, transfert lent; RBC, hématies; ST, estomac; SI, intestin grêle; ULI, partie supérieure du gros intestin; LLI, partie inférieure du gros intestin; éch., compartiment osseux échangeable; non-éch., compartiment osseux non-échangeable.

Des logiciels élaborés à partir de ces modèles ont été développés, tels que LUDEP et Cyclomod. Le logiciel LUDEP (Lung Dose Evaluation Programme, HPA/RP - UK), développé spécialement sur la base du modèle de l'arbre respiratoire de la CIPR, permet d'évaluer les doses délivrées au poumon et aux autres organes. Le logiciel Cyclomod (IRSN) (Malarbet, 1998) prédit chez l'Homme, après une incorporation donnée, les excrétions urinaires et fécales de l'élément et les rétentions dans les compartiments du modèle de la CIPR. Il est basé sur les modèles biocinétiques de la

CIPR décrits ci-dessus (ICRP, 1979, 1994b, 1995a) et sur l'algorithme décrit par Birchall (Birchall et James, 1987).

Ces logiciels permettent, par un modèle descendant, de calculer les coefficients de dose et les fonctions de rétention et d'excrétion.

Dans le cadre de la surveillance médicale des travailleurs, ces logiciels permettent, par un modèle ascendant, d'estimer la dose reçue en remontant de la mesure des radionucléides retenus dans un organe (poumon) ou excrétés (urines, selles) à l'activité incorporée correspondante. Les logiciels utilisent les activités mesurées chez le travailleur (rétention ou excrétion) et la fonction mathématique  $f(t)$  exprimant l'activité théorique au temps  $t$  (excrétion journalière ou rétention) après une incorporation de 1 Bq. La linéarité du modèle permet d'en déduire la quantité de radionucléides incorporée par le travailleur : la mesure est proportionnelle à la réponse pour 1 Bq ; c'est-à-dire que la réponse pour une incorporation de  $x$  Bq est égale au produit de la réponse pour 1 Bq par  $x$ .

Différents paramètres, correspondant à la situation du travailleur, sont nécessaires pour calculer la fonction de référence pour une incorporation de 1 Bq, en particulier :

- le radionucléide : élément, isotope et forme physico-chimique,
- le temps  $t$  depuis l'incorporation,
- le type de contamination : inhalation, ingestion, injection / aiguë ou chronique.

L'estimation du risque liée à l'activité incorporée dépend donc de multiples hypothèses, en particulier sur la date d'incorporation, présumée ou avérée, et sur la forme physico-chimique du contaminant. Lorsque certains paramètres ne sont pas connus, des valeurs par défaut préconisées par la CIPR sont utilisées.

Quand la date de contamination n'est pas connue, deux hypothèses sont possibles pour estimer l'activité incorporée. La première, l'hypothèse chronique, suppose que la contamination a eu lieu quotidiennement pendant l'intervalle de temps entre les deux contrôles médicaux. Dans ce cas, le modèle suppose qu'une contamination chronique correspond à la somme d'inhalations aiguës (ICRP, 1979). Plus précisément, la rétention ou l'excrétion prévue après contamination chronique est la convolution de la rétention ou de l'excrétion théorique après une incorporation aiguë unitaire avec la fonction d'activité incorporée en fonction du temps. La deuxième, l'hypothèse  $T/2$ , suppose que la contamination est unique et qu'elle a eu lieu au milieu de l'intervalle de temps entre les deux contrôles médicaux.

### I.2.3 - Le suivi médical - Synthèse

La radioprotection des travailleurs exposés au risque d'inhalation d'uranium est basée sur la mise en place de différentes surveillances : celle du poste de travail et celle de la surveillance radiotoxicologique.

La surveillance radiotoxicologique repose sur des mesures *in vivo* associées à des modèles prenant en compte la rétention pulmonaire et sur des analyses de l'uranium dans les excréta associées à des modèles d'excrétion.

Les modèles décrivent le cheminement du radionucléide incorporé dans l'organisme et sont spécifiques du radionucléide et de la voie d'exposition. Des logiciels permettent, à partir des mesures radiotoxicologiques, d'estimer la dose reçue. Cette estimation dépend de multiples hypothèses, en particulier la date, présumée ou avérée, d'incorporation et la forme physico-chimique du contaminant.

Le chapitre suivant décrit les effets de l'uranium sur l'organisme après inhalation.



## Chapitre I.3 - Exposition Interne par Inhalation : Les effets biologiques

L'exposition d'un organisme à des rayonnements provoque des effets que l'on peut constater à différentes échelles. Un organisme est constitué de milliards de cellules, unités de base de quelques microns, agencées de façon à constituer les organes. Chaque cellule contient la molécule d'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) qui se présente sous la forme d'une double hélice de polymères. L'ADN est le support de l'information génétique.

Il est important de noter dès à présent que la toxicité d'une contamination par inhalation de particules d'uranium peut être la combinaison de toxicités particulaire, chimique et radiologique. Ainsi, la toxicité des particules d'uranium peut être appréhendée par l'étude de la toxicité d'autres particules, d'autres métaux et enfin des rayonnements ionisants. Il est cependant considéré qu'en présence d'uranium naturel, et surtout d'uranium appauvri, l'effet des radiations ionisantes est négligeable par rapport à l'effet chimique et particulaire (Aigueperse *et al.*, 2001). En effet, la radioactivité spécifique de l'uranium appauvri est faible : moins d'une particule alpha est émise chaque minute dans 1 µg d'uranium appauvri. Il n'est pourtant pas exclu qu'un effet radiologique apparaisse en particulier au niveau des tissus fixant l'uranium pendant de longues périodes (Aigueperse *et al.*, 2001, Craft *et al.*, 2004).

Le but de cette partie est de décrire, de manière non exhaustive, la distribution des particules d'uranium inhalées, les paramètres qui, à chaque étape, peuvent influencer cette distribution et les principaux effets toxiques de l'uranium au niveau des différents organes. Tout cela se réalise grâce aux études sur des modèles animaux et aux études épidémiologiques. Ensuite, les effets aux niveaux cellulaires et moléculaires sont abordés (Craft *et al.*, 2004, EDP Sciences, 2001, Fulco *et al.*, 2000, Sztajnkrzyer et Otten, 2004, Taylor et Taylor, 1997).

### I.3.1 - Le devenir des particules d'uranium inhalées et leurs effets sur les organes

#### I.3.1.1 - Le poumon, porte d'entrée et cible

##### I.3.1.1a - Physiologie du système respiratoire

Le système respiratoire (Figure 6) est la première cible du composé inhalé. L'appareil respiratoire a un rôle essentiel dans l'hématose (ensemble des mécanismes qui assurent le maintien de la composition normale des liquides de l'organisme comme sang, lymphe, liquide interstitiel) : il apporte l'oxygène au sang qui le distribue dans tout l'organisme et rejette le gaz carbonique. L'appareil respiratoire remplit deux autres fonctions essentielles. Il participe à la défense de l'organisme en appartenant au Tissu Lymphoïde Associé aux Muqueuses (MALT). Et il contient des cellules endocrines sécrétant des amines et des polypeptides ayant une activité hormonale ou de neurotransmetteur en faisant partie du Système Endocrinien Diffus (SED).

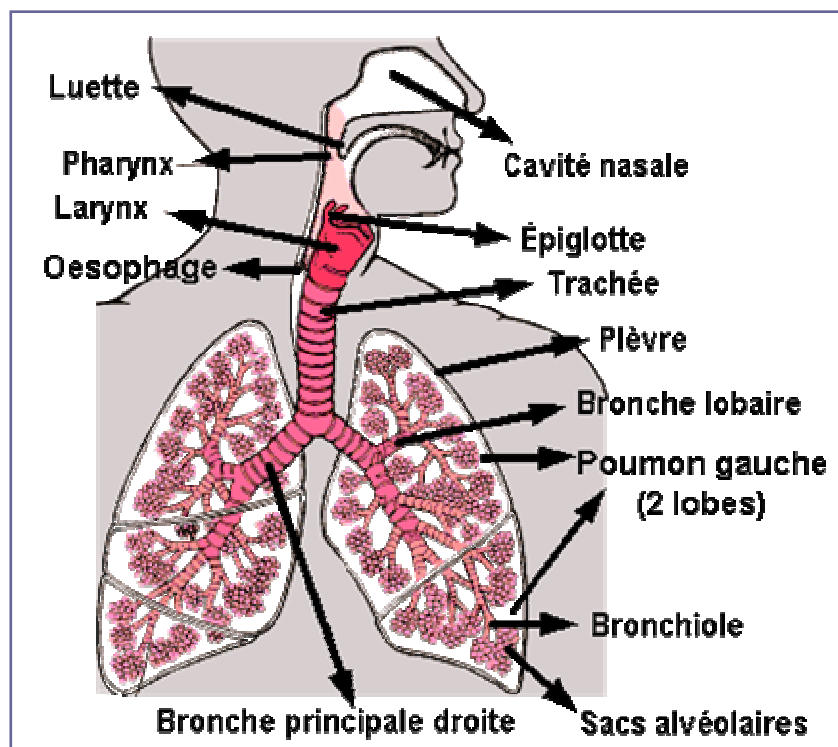


Figure 6 : Le système respiratoire

Le poumon est un organe dissymétrique, divisé en lobes et segments. Il est enveloppé dans la plèvre pariétale et la plèvre viscérale. L'air arrive par la trachée et pénètre dans le poumon par des « conduits » de plus en plus fins permettant une augmentation de la surface d'échange et une diminution de la vitesse de l'air. On distingue les bronches, les bronchioles et les alvéoles (Figure 6). Les cellules épithéliales pulmonaires sont les principales cellules composant l'épithélium semi stratifié formant le tissu qui borde le tractus respiratoire du nez jusqu'aux bronchioles. Les surfaces latérales sont en contact avec d'autres cellules épithéliales afin de former un épithélium continu. Les cellules épithéliales sont des cellules polarisées avec une surface apicale en contact avec la lumière de la cavité et une surface basale en contact avec le tissu conjonctif.

Les bronches (Figures 7 et 8) sont composées :

- de la muqueuse bronchique, comportant des cellules ciliées, des cellules à mucus, des cellules neuro-sécrétoires et des cellules basales, permettant le renouvellement des cellules spécialisées,
- des glandes bronchiques dans la sous-muqueuse, comportant des cellules à mucus, des cellules séreuses, le canal collecteur et le canal cilié s'ouvrant dans la lumière bronchique,
- du tissu de soutien, comportant des pièces cartilagineuses, un réseau élastique et des muscles lisses, assurant la rigidité des voies aériennes et la tonicité bronchique.

Dans la zone intermédiaire, les bronchioles ne comportent plus de glande bronchique, ni de cellule à mucus et le tissu de soutien ne contient plus de cartilage (Figure 7). Les cellules ciliées et les cellules de Clara ont ici un rôle important en assurant, respectivement, l'épuration des particules et la fonction métabolique de détoxification.

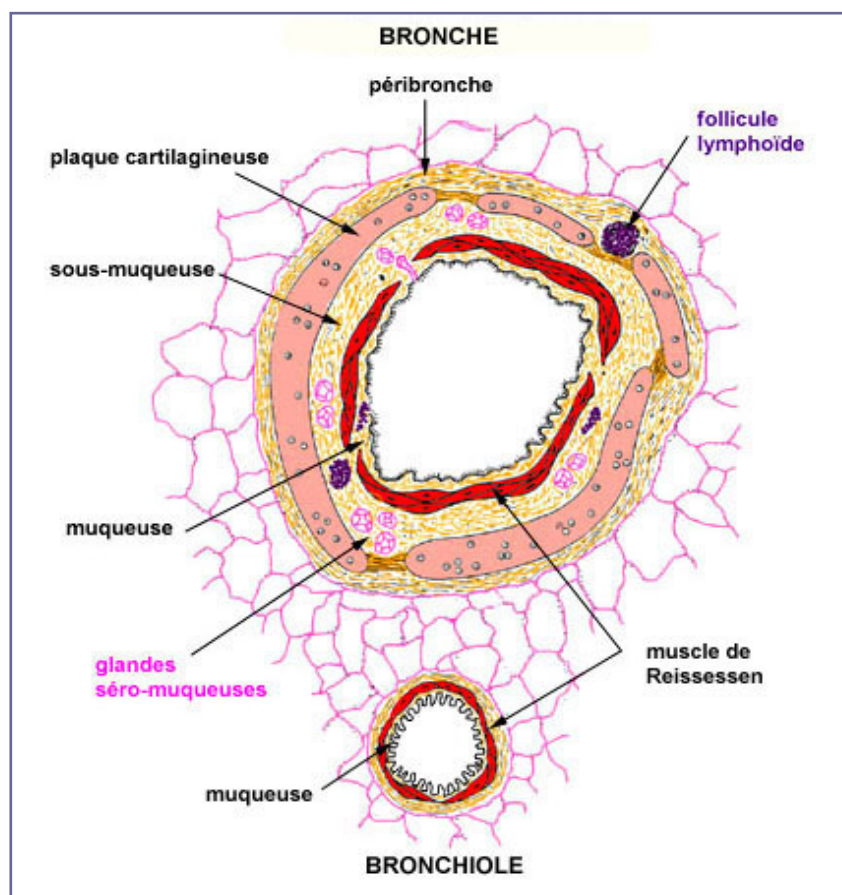
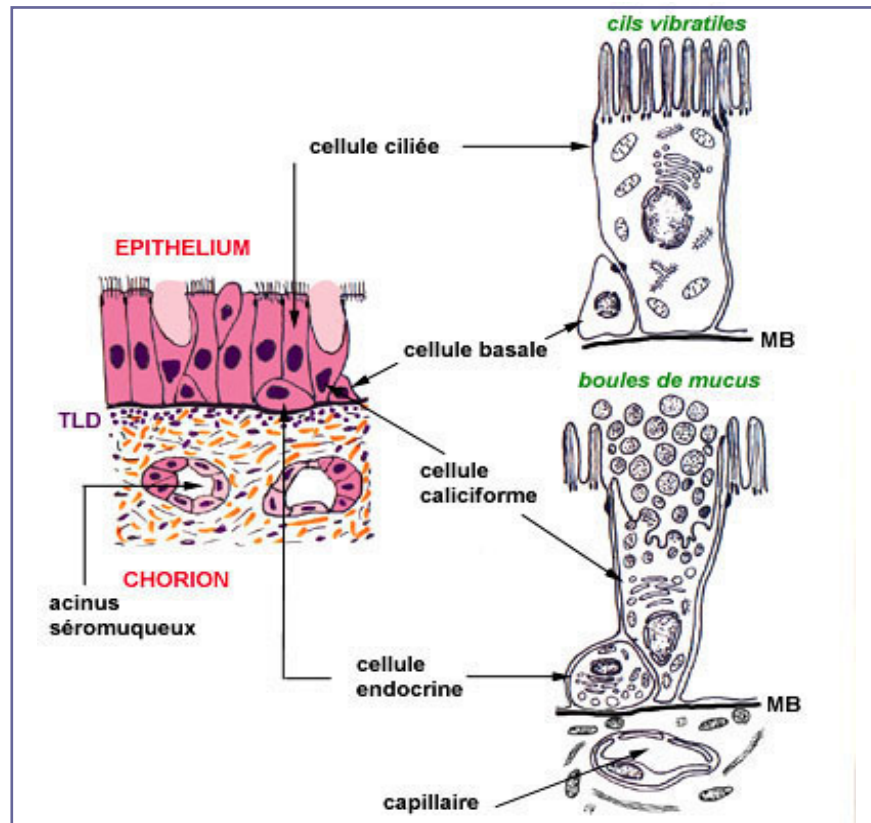


Figure 7 : Coupe transversale d'une bronche et d'une bronchiole





*Figure 8 : La muqueuse respiratoire et l'ultrastructure des cellules épithéliales*  
Tissu lymphoïde diffus (TLD), membrane basale (MB)

L'acinus pulmonaire est l'unité morpho-fonctionnelle du parenchyme respiratoire ; il est centré sur une bronchiole respiratoire qui se divise en quelques canaux alvéolaires ; chaque canal alvéolaire se poursuit par 2 ou 3 sacs alvéolaires dans lesquels s'ouvrent de multiples alvéoles. Chaque bronchiole terminale draine environ 10 000 alvéoles, soit environ 300 000 000 alvéoles dans un poumon humain. La surface alvéolaire totale d'un adulte est d'environ 195 m<sup>2</sup>. Dans une alvéole (Figure 9) se trouvent :

- des pneumocytes de type I (90% de la surface de l'alvéole) qui ne se divisent pas,
- des pneumocytes de type II, capables de se diviser, qui interviennent dans la réparation des pneumocytes I.

L'alvéole est aussi composée de capillaires, de tissus de soutien et de surfactant, qui est un complexe macromoléculaire de lipides et de protéines permettant la béance alvéolaire. Le poumon est irrigué par deux grands types de vaisseaux sanguins assurant la circulation artérielle :

- les artères pulmonaires, qui viennent du ventricule droit, constituent le réseau capillaire dans la paroi alvéolaire,

- les artères bronchiques, qui naissent de l'aorte ou des artères intercostales, constituent la circulation nutritive de l'arbre bronchique.

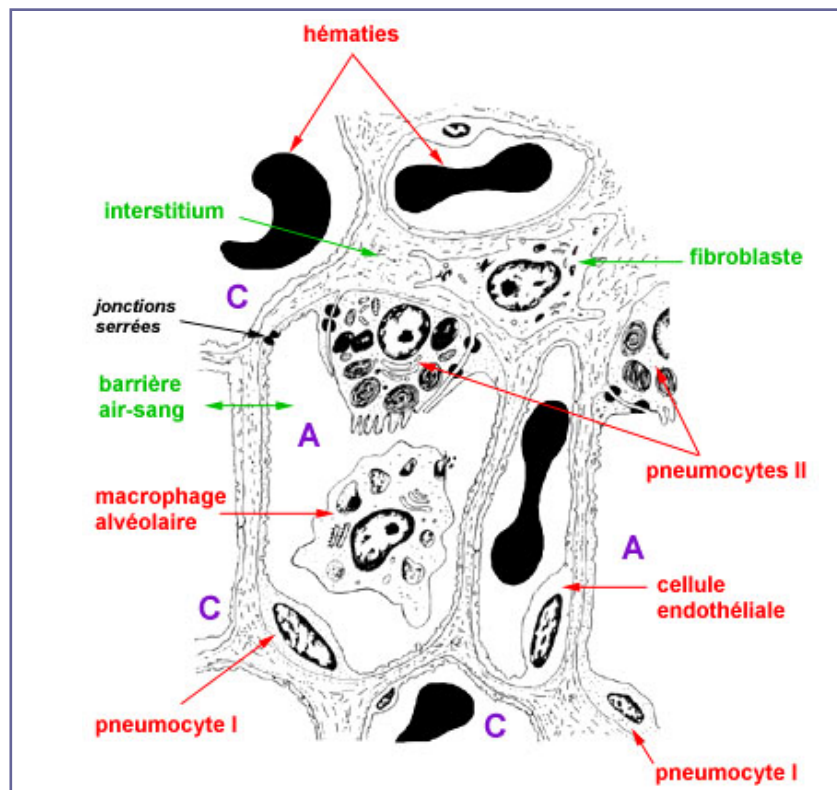


Figure 9 : Aspect ultrastructural des alvéoles

Deux alvéoles (A) cernés par 6 capillaires (C), le septum interalvéolaire (interstitium) avec un fibroblaste, les cellules endothéliales et les pneumocytes I et II, un macrophage libre dans l'alvéole; on repère les corps lamellaires des pneumocytes II, les jonctions serrées (zonula occludens) entre les pneumocytes, et les lysosomes, phagolysosomes et corps résiduels du macrophage.

Le drainage des capillaires alvéolaires et péribronchiolaires se fait vers les veines pulmonaires. Les vaisseaux lymphatiques composent deux réseaux, un sous la plèvre viscérale et un intra-parenchymateux et drainent les ganglions (intertrachéo-bronchiques, inter-bronchiques et latéro-trachéaux). Le système nerveux est aussi présent au niveau pulmonaire afin d'assurer le tonus musculaire, la bronchodilatation et la diffusion de nombreux médiateurs.

Le système immunitaire dans le poumon est, quant à lui, composé principalement par :

- le tissu lymphoïde bronchique, comprenant des lymphocytes, des ganglions lymphatiques, des amas lymphoïdes bronchiolaires,
- des plasmocytes, produisant des immunoglobulines (IgA principalement et IgE),

- des mastocytes situés surtout dans la paroi bronchique entre l'épithélium et la membrane basale, capables de libérer des médiateurs de l'inflammation après stimulation,
- des cellules phagocytaires tels que les macrophages alvéolaires et des polynucléaires neutrophiles qui migrent à partir des réseaux sanguins vers les lumières alvéolaires et bronchiques.

Les macrophages alvéolaires font partie des phagocytes mononucléaires. Un précurseur médullaire (CFU-GM) de la moelle osseuse est commun aux monocytes, aux macrophages et aux neutrophiles. Les macrophages alvéolaires proviennent donc des monocytes circulants. C'est lors de la traversée de l'endothélium vasculaire que ces cellules subissent d'importantes modifications morphologiques, métaboliques et fonctionnelles. Cependant il existe aussi un renouvellement des macrophages tissulaires grâce à une prolifération locale. Dans le poumon, la durée de vie du macrophage est d'environ 3 mois. Chez le rat, la durée de demi-vie des macrophages serait de l'ordre de 2 semaines, la migration des monocytes et la prolifération locale du macrophage ayant une part équivalente pour assurer le renouvellement de la population (Fritsch et Masse, 1992). On distingue deux populations de macrophages alvéolaires : une population résidente et une population recrutée, attirée dans l'alvéole pulmonaire en réponse à une agression.

#### I.3.1.1b - Paramètres influençant le dépôt des particules

La pénétration de particules dans l'arbre respiratoire peut se faire par voie nasale ou par voie buccale.

Le dépôt des particules dépend de la zone pulmonaire et ses mécanismes sont la sédimentation, l'impaction, la diffusion et l'interception (ICRP, 2002). Les principaux paramètres influençant le dépôt sont :

- la taille, la forme et la densité des particules,
- l'hygroscopie des particules qui augmente leur taille,
- le taux de ventilation, qui peut accroître le dépôt trachéo-bronchique,
- l'espèce considérée, le dépôt alvéolaire chez la souris étant plus important que chez le rat, le lapin ou l'Homme. Le taux de dépôt des particules est supérieur chez l'Homme comparé à celui observé chez les rongeurs.

Les particules ayant un Diamètre Aérodynamique Médian en Activité (DAMA) de 5  $\mu\text{m}$  (représentant la valeur par défaut de la CIPR) sont inhalées et se déposent

principalement dans les régions extrathoracique (74 %), bronchiolaire (3 %) et alvéolaire (5 %), le reste étant exhalé (ICRP, 2002, Snipes *et al.*, 1988).

#### I.3.1.1c - L'épuration pulmonaire

L'organisme possède des moyens naturels d'élimination des particules déposées, on parle ainsi d'épuration ou de clairance pulmonaire (Lippmann *et al.*, 1980). Cette épuration dépend de la nature du composé en particulier de sa solubilité (Eidson, 1994). Elle met en jeu trois processus :

- L'épuration mécanique : la toux et la remontée mucociliaire

La remontée mucociliaire est la remontée des particules le long de l'arbre respiratoire grâce aux cellules ciliées. Les particules sont piégées dans le mucus et remontées depuis les zones profondes de l'appareil respiratoire vers le carrefour aéro-digestif du pharynx. A ce niveau, les particules sont dégluties, parvenant ainsi dans les voies digestives. L'élimination se fait alors par les fèces. Ce mécanisme ne concerne que les particules qui restent un certain temps dans le poumon, c'est-à-dire des particules peu ou moyennement solubles. Cette épuration est rapide lorsqu'elle concerne des particules déposées au niveau trachéo-bronchique et lente pour des particules déposées au niveau alvéolaire.

- La dissolution chimique

Les particules peuvent être simplement dissoutes et passer dans la circulation sanguine. Cette dissolution dépend de la composition chimique, de l'état de valence, de la taille des particules, de la surface spécifique et du degré d'hydratation des particules.

- L'action des cellules phagocytaires

Ces cellules, particulièrement les macrophages alvéolaires, ont la capacité d'ingérer les particules (mécanisme de phagocytose). Suite à la phagocytose, les particules peuvent être fragmentées et solubilisées. Ce mécanisme protège l'environnement alvéolaire de la toxicité chimique de l'uranium et limite son transfert. Les macrophages alvéolaires, ayant piégé les particules, peuvent soit emprunter la voie mucociliaire et être éliminés par le tractus gastro-intestinal, soit gagner les ganglions lymphatiques qui représentent un des lieux de stockage de longue durée des particules et de l'uranium en particulier.

### I.3.1.1d - L'inflammation

La réaction inflammatoire est un processus généralement local et temporaire qui implique aussi bien des cellules somatiques (cellules endothéliales, épithéliales, fibroblastes) que des cellules du système immunitaire. L'inflammation crée un environnement dans lequel des cellules sont activées (cellules épithéliales, endothéliales), avec une modification de leur expression génique, et recrutées (polynucléaires, nouveaux macrophages) sur le site de l'infection. Le macrophage alvéolaire est une des cellules initiatrices de la réponse inflammatoire au niveau pulmonaire. Les fibroblastes jouent aussi un rôle mais plutôt dans la phase terminale du processus inflammatoire en participant à la reconstruction du tissu lésé.

Les macrophages alvéolaires sont des cellules du système immunitaire jouant un rôle essentiel dans la défense du poumon profond, comme nous venons de le voir. Une première action consiste à phagocyter la particule ou le micro-organisme (antigène) afin de le détruire, de l'éliminer ou d'en présenter un épitope afin d'activer les cellules spécifiques du système immunitaire (Bowden, 1987). Une seconde action consiste à exprimer et présenter ou excréter des molécules bio-actives. Ces molécules sont impliquées dans diverses fonctions principalement liées à la réaction immunologique et au remodelage des tissus. Les molécules produites sont des enzymes, des protéines participant à la défense et l'inflammation, des facteurs de croissance, des cytokines promotrices de l'inflammation, des cytokines inhibitrices de l'inflammation, des facteurs de la réparation tissulaire ... (Driscoll, 2000, Driscoll *et al.*, 1997) ainsi que des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (Figure 10).

*In vitro*, l'uranium est capable d'induire la sécrétion de la cytokine TNF- $\alpha$  par les macrophages (Gazin *et al.*, 2004, Zhou *et al.*, 1998). Les cellules épithéliales peuvent aussi jouer un rôle actif dans la toxicité des particules (Knaapen *et al.*, 2002) ; ces cellules ont en effet des fonctions immuno-inflammatoires (Schins et Borm, 1999). Diverses molécules secrétées typiquement par les cellules du système immunitaire, comme les cytokines et les espèces radicalaires dérivées de l'oxygène, sont aussi exprimées et secrétées par les cellules épithéliales pulmonaires (Driscoll *et al.*, 1996, Levine, 1995, Svanborg *et al.*, 1993). Une étude a observé une augmentation du taux de fibronectine et de la cytokine TNF- $\alpha$  dans le lavage broncho-alvéolaire issu de mineurs d'uranium (Popp *et al.*, 2000).

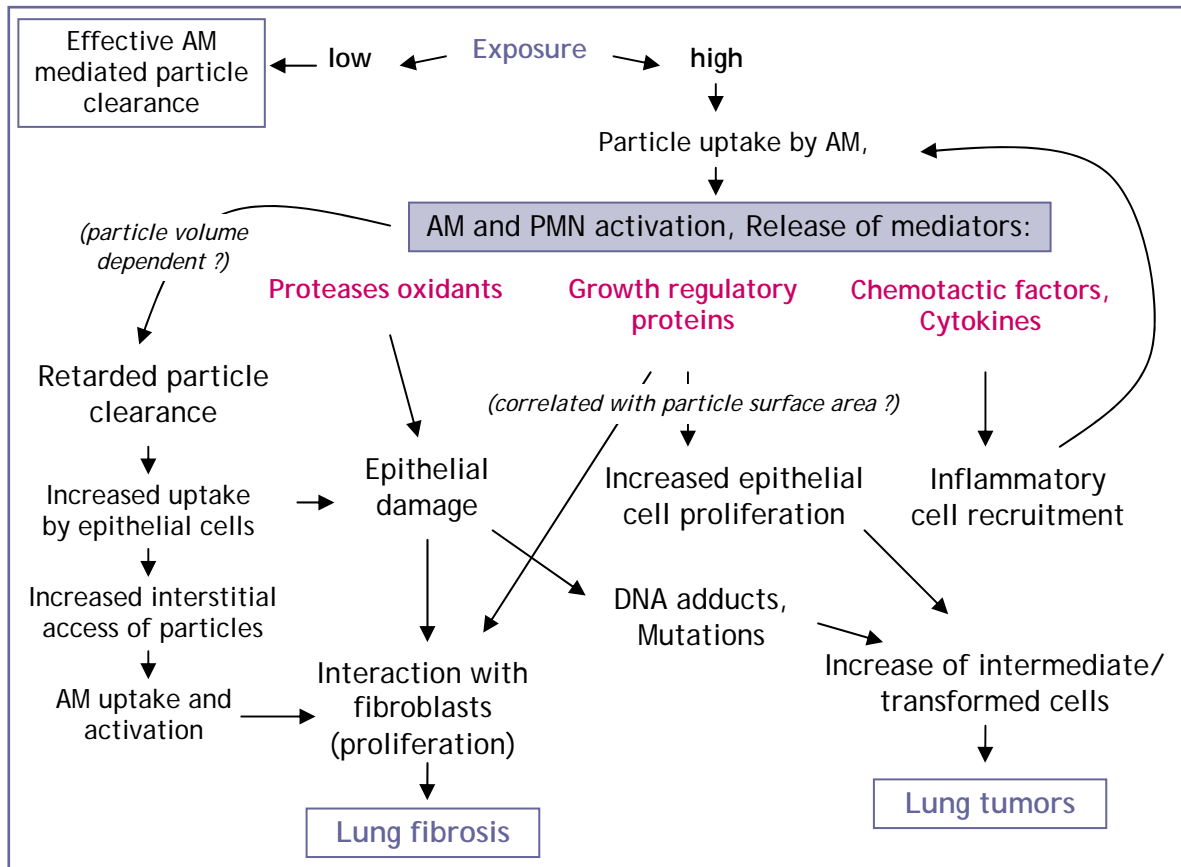


Figure 10 : Mécanismes au niveau pulmonaire induits par l'inhalation de particules (Oberdorster, 1994)

AM : alveolar macrophages ; PMN: neutrophils

La réponse inflammatoire est donc un composant majeur de la défense de l'organisme contre des agressions extérieures mais lorsqu'elle devient excessive et/ou persistante, elle contribue aux développements de pathologie (Figure 10) (Oberdorster, 1995, Oberdorster *et al.*, 1994b, Warheit *et al.*, 1997). Par exemple, certains cancers surviennent dans un contexte inflammatoire chronique (Shacter et Weitzman, 2002). Différents médiateurs de l'inflammation, comme les espèces radicalaires de l'oxygène, les cytokines ou les facteurs de croissance, peuvent avoir des effets direct ou indirect sur l'ADN, engendrer des mutations et participer au processus de cancérisation (Albrecht *et al.*, 2004, Lang *et al.*, 2002, Martin *et al.*, 1997, Ohshima *et al.*, 2003). Une relation entre inflammation et cancérogenèse a été montrée pour des particules peu solubles (Driscoll *et al.*, 1996). De plus, différents mécanismes impliqués dans le développement d'une fibrose, comme la croissance cellulaire, la différenciation, les interactions avec la matrice extracellulaire, sont orchestrés par les cytokines de l'inflammation et les facteurs de croissance (Lasky et Brody, 2000).

### I.3.1.1e - Les effets de l'uranium sur le système respiratoire

Les particules d'uranium s'accumulent dans les poumons et les ganglions lymphatiques (Leach *et al.*, 1970, Leach *et al.*, 1973, Morrow *et al.*, 1966), surtout s'il s'agit d'un uranium insoluble. Dans ce cas, le poumon pourrait être non seulement confronté à la toxicité chimique et particulaire, mais aussi à la toxicité radiologique qui pourrait devenir non négligeable à long terme. L'effet de la solubilité du composé inhalé a été montré pour d'autres métaux. Par exemple, chez le rat, une exposition chronique par inhalation d'oxyde de nickel, insoluble, augmente l'incidence de cancer du poumon contrairement à une exposition à du sulfate de nickel, soluble (Dunnick *et al.*, 1995).

Plus précisément, les particules atteignent principalement deux cibles cellulaires, les macrophages et les cellules épithéliales (Schins et Borm, 1999). Les cellules épithéliales peuvent interagir directement avec les particules déposées et ceci peut entraîner des dommages réversibles ou non réversibles de l'épithélium (Schins et Borm, 1999).

Les macrophages sont impliqués dans l'épuration des particules d'uranium et dans leur rétention dans le compartiment alvéolaire (Tasat et De Rey, 1987). Les particules d'uranium sont phagocytées par les macrophages et se concentrent au niveau des lysosomes où elles peuvent être transformées (Berry *et al.*, 1997, Morris *et al.*, 1989). Il a été observé, au sein des lysosomes des macrophages exposés à l'uranium ( $\text{UO}_2$ ,  $\text{U}_3\text{O}_8$ ,  $\text{UO}_4$ ), la présence d'aiguilles de 30 nm de diamètre et 60 nm de long, constituées de phosphate et d'uranium (Henge-Napoli *et al.*, 1996, Henge-Napoli *et al.*, 1998). Les particules transformées peuvent être sécrétées et éventuellement à nouveau phagocytées. Les membranes des lysosomes peuvent aussi être endommagées ce qui entraînent la libération des particules dans le cytoplasme (Muller *et al.*, 1989). Les macrophages induisent une redistribution de l'uranium dans le poumon et la formation de zones d'accumulation (Batchelor *et al.*, 1982, Morris *et al.*, 1992).

Sur des modèles animaux, des expositions aiguës à de fortes quantités d'uranium induisent principalement une inflammation interstitielle de l'épithélium alvéolaire conduisant éventuellement à une fibrose pulmonaire (ATSDR, 1999, Coggle *et al.*, 1986, Cooper *et al.*, 1982). Des oxydes d'uranium enrichi administrés par intubation ou inhalation peuvent être carcinogènes (Batchelor *et al.*, 1980). Des expositions chroniques d'hexafluorure d'uranium à raison de 6 heures par jour pendant 30 jours à  $13 \text{ mg U.m}^{-3}$ , chez différentes espèces animales, peuvent induire des œdèmes

pulmonaires, une inflammation des bronches et des alvéoles ainsi que des emphysèmes (ATSDR, 1999). Des expositions chroniques de longue durée à des oxydes d'uranium ou des poussières de minerai d'uranium induisent une prolifération cellulaire (carcinomes et adénomes) et des zones de fibrose et/ou de nécrose (Leach *et al.*, 1970, Leach *et al.*, 1973, Mitchel *et al.*, 1999).

L'uranium inhalé peut donc être carcinogène et induire également des fibroses. Les mécanismes de cancérisation sont complexes, multifactoriels et encore mal connus et se décomposent en trois étapes majeures : l'étape d'initiation amenant des cellules à proliférer de manière anormale, l'étape de promotion avec l'expansion de la population cellulaire pré-néoplasique et l'étape du processus de cancérisation où les cellules progressent vers un état malin. La fibrose, quant à elle, est un phénomène de cicatrisation anormal lié à une augmentation de la prolifération des fibroblastes et à une production excessive de composants de la matrice extracellulaire (Nemery, 1990).

Chez l'Homme, des études épidémiologiques peuvent être conduites sur des individus exposés spécifiquement à des substances. Pour avoir des données sur des populations exposées plus particulièrement à l'uranium, elles s'effectuent donc plutôt sur des cohortes de travailleurs de l'industrie nucléaire : mineurs d'uranium et travailleurs du cycle du combustible (Tirmarche *et al.*, 2004). Les études internationales sur les mineurs d'uranium ont montré une augmentation des fibroses pulmonaires et du risque de cancer du poumon avec une relation linéaire entre le risque de cancer du poumon et la radioexposition due au radon (Archer *et al.*, 1998, Baysson *et al.*, 2004, Hornung, 2001). Les effets cancérogènes observés sont expliqués plutôt par l'irradiation de l'épithélium bronchique. Dans le cas des études sur les travailleurs exposés à l'uranium du cycle du combustible, les résultats montrent une mortalité par cancer relativement hétérogène. La plupart des cohortes suivies sont exposées à des radiations externes, peu de travaux suivent des travailleurs exposés par contamination interne ; de plus, les différents types d'exposition sont souvent concomitants. Certaines recherches sur des travailleurs exposés à l'uranium, prenant en compte la contamination interne, observent des excès de cancers du poumon (Checkoway *et al.*, 1988, Ritz, 1999). Une étude spécifie que la contamination des travailleurs provient de l'inhalation de composés uranifères et montre une augmentation de la mortalité par cancers du larynx, par des maladies respiratoires et par pneumonies (Dupree *et al.*, 1987). Mais dans la plupart des études épidémiologiques, aucun effet aggravant n'est trouvé par rapport à la population non exposée : le contraire est même observé et est appelé « l'effet du



travailleur sain » (healthy worker effect) (McGeoghegan et Binks, 2000, Rogel *et al.*, 2005, Tirmarche *et al.*, 2004, Tokarskaya *et al.*, 1997).

#### I.3.1.1f - Influence du type d'exposition

Un paramètre pouvant influencer la toxicité d'un composé inhalé est le « type » d'exposition. Les conséquences d'une inhalation aiguë ou chronique pourraient être différentes.

Chez la souris et le rat, selon le type d'exposition, l'incidence des adénomes pulmonaires et des carcinomes, induits par le chlorure de vinyle, est différente, avec la même concentration de particules cumulées (Hehir *et al.*, 1981). Une autre étude montre, qu'après une exposition chronique par inhalation à du dioxyde d'uranium, la clairance pulmonaire est différente de celle observée après une exposition aiguë avec la même concentration de particules (Morrow *et al.*, 1966). La réaction de l'organisme à une exposition pourrait donc dépendre du type d'exposition.

Si les expositions impliquent des composés de natures différentes, on parlera de double exposition. Chez le rat, la clairance des particules de dioxyde de titane  $\text{TiO}_2$  inhalées après une inhalation répétée de  $\text{SO}_2$  est affectée et ceci de manière dépendante de la concentration de  $\text{SO}_2$ . Une inhalation répétée avec de faibles concentrations de  $\text{SO}_2$  ne modifie pas et même augmente la clairance de  $\text{TiO}_2$ , en revanche une inhalation répétée avec de fortes concentrations la diminue (Ferin et Leach, 1973). La solubilité des composés influence aussi les effets des doubles expositions : la clairance du  $^{63}\text{NiO}$  insoluble est diminuée suite à une inhalation répétée de  $\text{NiO}$  insoluble et non pas suite à une inhalation répétée de  $\text{NiSO}_4$  soluble (Benson *et al.*, 1995, Benson *et al.*, 1992).

### I.3.1.2 - Le comportement biocinétique de l'uranium et les effets sur les organes extra-pulmonaires

La biopersistance des particules dans le poumon dépend de leur taille, de leur forme, de leur chimie de surface, de leur solubilité et de leur surface spécifique. Le transport dans l'organisme se fait par le sang, et pour l'uranium, sous forme d'ion uranyle  $UO_2^{2+}$ . Les hypothèses des modèles sont que le taux d'absorption de l'uranium vers le sang est constant pendant la période d'exposition (Leggett, 1994). Les composés solubles passent rapidement dans le sang alors que les composés insolubles restent en grande partie dans le poumon. La solubilité du composé inhalé conditionne donc la cible de la toxicité de l'uranium, les formes solubles induisant plutôt une toxicité systémique. 60% de l'uranyle présent dans le sang forment des complexes filtrables au niveau du glomérule rénal avec des ligands de faible poids moléculaire, tels que les citrates et les bicarbonates, et 40% se complexent à des protéines, en particulier la transferrine et les lipoprotéines des globules rouges.

#### I.3.1.4a - Effets sur le compartiment sanguin

La plupart des expériences animales basées sur l'inhalation de composés uranifères ne relèvent aucun effet. Deux études montrent cependant des perturbations de certains paramètres hématologiques. L'exposition de rats à des poussières de diuranate d'ammonium, à raison de 6 heures par jour pendant 30 jours à  $6,8 \text{ mg U.m}^{-3}$ , induit une diminution du nombre de cellules du sang et une perte de 4 g d'hémoglobine / 100 mL de sang (Dygert, 1949). Des rats exposés à du nitrate d'uranyle hexahydraté ( $9,5 \text{ mg U.m}^{-3}$ , 8 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 30 jours) montrent une diminution du nombre d'érythrocytes et d'hémoglobine (Roberts, 1949).

Chez l'Homme, une augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques dans les lymphocytes du sang est observée dans certaines études portant sur les zones géographiques avec une radioactivité naturellement élevée (Cheriyen *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 1990). Néanmoins, les particularités de ces populations rendent l'extrapolation des résultats à d'autres populations difficile. Chez les mineurs d'uranium, aucune relation entre le risque de leucémies et une exposition prolongée dans les mines n'a pu être démontrée. Pourtant des études montrent un lien entre une exposition à l'uranium ou au radon et l'augmentation des aberrations chromosomiques dans les cellules du sang (Brandom *et al.*, 1972, Martin *et al.*, 1991,

Meszaros *et al.*, 2004, Popp *et al.*, 2000). De plus, une relation dose-réponse a été observée pour des cancers hématopoïétiques et lymphopoïétiques chez des travailleurs du nucléaire exposés de manière chronique à des radionucléides, principalement uranium et produits de fission (Ritz *et al.*, 2000). Des dommages de l'ADN et des aberrations chromosomiques sont trouvés dans les cellules sanguines de travailleurs exposés à des composés uranifères et, de manière chronique, à de faibles doses de radiations ionisantes (Garaj-Vrhovac et Kopjar, 2003, Prabhavathi *et al.*, 1995, Prabhavathi *et al.*, 2000, Touil *et al.*, 2002).

La disparition de l'uranium du compartiment sanguin est le résultat combiné du passage vers les liquides extracellulaires, de la filtration au niveau du glomérule rénal et du dépôt dans le squelette. L'uranium solubilisé dans le sang est ensuite excrété très rapidement par les urines (40 à 60 % en 24 heures) et fixé sur les organes cibles. Les reins et le squelette sont considérés comme les principaux sites d'accumulation de l'uranium (Ballou *et al.*, 1986, Kathren *et al.*, 1989, Kathren et Moore, 1986, Kurttio *et al.*, 2002, Morrow *et al.*, 1982, Singh *et al.*, 1987).

#### I.3.1.4b - Effets sur le rein

Le rein a un rôle dans le maintien du volume et de la composition ionique des fluides de l'organisme. Il est la principale voie d'excrétion des déchets métaboliques et des produits chimiques exogènes et participe aussi à certains métabolismes et aux fonctions endocrines. Le rein comporte deux régions distinctes : le cortex où se trouve les glomérules et la médullaire qui se projette dans la cavité excrétrice. Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein et est composé d'un glomérule et d'un tubule. Le rein est l'organe principal d'excrétion de l'uranium, une majorité de l'uranium du sang est excrétée dans les urines, le reste (20 à 30 % de la quantité initiale dans le sang) se fixe sur les cellules tubulaires rénales, au niveau cortical et au niveau de la région juxtamédullaire. La rétention rénale de l'uranium varie en fonction inverse de l'excrétion urinaire.

Le rein est considéré comme peu radiosensible mais constitue l'organe le plus touché par l'effet chimiotoxique de l'uranium (Diamond *et al.*, 1989, Leggett, 1989, Taulan, 2004). En effet, l'uranium, comme les autres métaux lourds (cadmium, plomb, mercure ...), est néphrotoxique. Chez diverses espèces animales, tels que le chien, le lapin, le rat, l'inhalation de composés uranifères relativement solubles induit une néphrotoxicité se traduisant par une nécrose de l'épithélium tubulaire, une protéinurie,

une glucosurie ... (ATSDR, 1999, Morrow *et al.*, 1982). Les lésions rénales sont dépendantes de la dose et conduisent à des nécroses, principalement de l'épithélium du tubule proximal. L'action toxique de l'uranium est aussi liée à une diminution de l'efficacité de la résorption des néphrons. L'atteinte rénale due à l'uranium se caractérise à la fois par des effets glomérulaires, en particulier des défauts de perfusion, de filtration et des anomalies morphologiques, et des effets tubulaires, principalement des défauts de perméabilité et de transport. Ces lésions entraînent une augmentation des concentrations de la créatinine et de l'urée plasmatique, mais aussi des anomalies fonctionnelles telles qu'une polyurie, une protéinurie et une glucosurie. Une intoxication à l'uranium à fortes doses provoque tous les symptômes de l'insuffisance rénale pouvant être létale. La sévérité et la réversibilité des lésions dépendent de la concentration en uranium dans les reins. L'épithélium endommagé est régénéré de manière atypique entraînant une résistance à l'uranium lors d'une nouvelle intoxication. L'inhalation d'un uranium insoluble a majoritairement, comme nous l'avons vu, des effets au niveau pulmonaire, en revanche l'inhalation d'un composé soluble exerce sa toxicité essentiellement au niveau rénal. Chez le rat, la limite de toxicité rénale serait de  $1,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (Diamond *et al.*, 1989).

Après contamination par inhalations aiguës ou chroniques, certaines études chez les mineurs d'uranium ont montré un effet sur le rein (dysfonction des tubules rénaux, une protéinurie et une aminoacidurie) (ATSDR, 1999, Thun *et al.*, 1985, Zhao et Zhao, 1990). De plus, l'uranium peut induire une néphrotoxicité même à faible dose d'uranium ingérée ( $28 \mu\text{gU}\cdot\text{L}^{-1}$  dans l'eau de boisson) (Kurttio *et al.*, 2002). La CIPR a adopté une concentration maximale admissible en uranium dans les reins chez l'Homme de  $3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de rein.

#### I.3.1.4c - Effets sur le tissu osseux

Le tissu osseux est l'organe majeur de fixation à long terme (Ballou *et al.*, 1986, Leggett, 1994, Morrow *et al.*, 1972). En effet 15 à 30 % de la quantité initiale dans le sang se retrouve dans les os au niveau desquels l'uranium peut exercer un effet radiologique. La distribution précoce de l'uranium dans le squelette semble suivre le mouvement du calcium (Leggett, 1994). L'uranium se distribue de manière non homogène sur toutes les surfaces osseuses et particulièrement à proximité des zones vascularisées et dans les zones de croissance. L'ion uranyle ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) serait échangé avec les ions calcium à la surface de l'os mais ne participerait pas à sa formation (Leggett, 1994). Puis graduellement, l'uranium est redistribué dans l'os. Les tissus cibles se

situent au niveau de l'os trabéculaire, qui contient les cellules hématopoïétiques de la moelle, et au niveau du tissu calcifié, contenant les ostéoblastes et leurs précurseurs, les cellules bordant les surfaces osseuses et les fibroblastes. L'élimination de l'uranium stocké dans l'os s'effectue, dans le modèle de la CIPR, en deux temps avec une période biologique de 50 jours et de 350 jours. Une fraction de l'uranium reste piégée dans l'os pendant plusieurs dizaines d'années.

Il a été montré que l'uranium induisait une toxicité osseuse. Mais il n'y a pas de données après contamination par inhalation d'uranium. *In vitro*, l'uranium est capable de transformer les ostéoblastes qui sont des cellules jouant un rôle important dans la résorption de l'os (Miller *et al.*, 2001). *In vivo*, des contaminations aiguës par injection de nitrate d'uranyle (Guglielmotti *et al.*, 1984, Ubios *et al.*, 1991) ou chroniques (Diaz Sylvester *et al.*, 2002, Ubios *et al.*, 1991), par injection de nitrate d'uranyle ou implantation sous-cutanée de poudre de dioxyde d'uranium, induisent une diminution du taux de formation de l'os et une augmentation du taux de résorption chez des rats. Chez l'homme, une augmentation du turnover de l'os, particulièrement une augmentation de la résorption de l'os, a été associée à l'exposition à de l'uranium naturel via l'eau de boisson (Kurttio *et al.*, 2005).

#### I.3.1.4d - Effets sur le foie

L'uranium se fixe plus faiblement dans le foie, à raison de 1 à 2% de la quantité présente dans le sang. Peu de données sont disponibles sur la toxicité de l'uranium sur le foie.

Une exposition chronique par inhalation au tétrafluorure d'uranium (0,4 mgU.m<sup>-3</sup> pendant 30 jours) peut donner quelques zones de nécrose dans le foie (Dygert, 1949). L'inhalation de dioxyde d'uranium induit, au niveau hépatique, une modification de l'activité enzymatique de certains Cytochromes P-450 (CYP) (Pasanen *et al.*, 1995). D'autre part l'expression de certains gènes des CYP (impliquées dans le métabolisme des drogues, des produits chimiques) sont aussi perturbés chez des rats après 9 mois d'ingestion d'uranium appauvri dans le foie (Souidi *et al.*, 2005).

Des cancers du foie ont été également rapportés chez les mineurs d'uranium (Hornung *et al.*, 1995, Laurier *et al.*, 2001).

#### I.3.1.4e - Effets sur le système nerveux central

Le cerveau peut également accumuler l'uranium. Mais aucune donnée d'accumulation de l'uranium n'existe dans le cas d'une contamination par inhalation. Après une exposition chronique à des fragments d'uranium appauvri ou après une injection, l'uranium s'accumule, de manière hétérogène, dans le cerveau (Barber *et al.*, 2005, Pellmar *et al.*, 1999a). Sa distribution est dose-dépendante (Pellmar *et al.*, 1999a). Des modifications électrophysiologiques ont été reportées dans des coupes d'hippocampe issues de rats implantés avec des fragments d'uranium appauvri (Pellmar *et al.*, 1999b). Après inhalation d'uranium, des troubles neurologiques, tels que faiblesse musculaire, instabilité de la démarche et anorexie, ont été trouvés chez des chats et des chiens (Dygert, 1949, Fulco *et al.*, 2000, Roberts, 1949). D'autre part l'expression de certains gènes des CYP sont aussi perturbés chez des rats après 9 mois d'ingestion d'uranium appauvri dans le cerveau (Souidi *et al.*, 2005).

Il n'est pas démontré clairement que l'uranium affecte le système nerveux central chez l'Homme. Certaines études, toutefois, ont relevé des perturbations comportementales chez des travailleurs exposés à de fortes concentrations d'uranium inhalé, comme des états de dépression ou d'agitation (Howland, 1949) et des effets neurologiques, comme des troubles cognitifs (Kathren et Moore, 1986) et des tumeurs du cerveau (ATSDR, 1999). Une autre étude sur des travailleurs exposés à de l'uranium, prenant en compte la contamination interne, observe des excès de mortalité par cancers du cerveau et du système nerveux central (Checkoway *et al.*, 1988). Plusieurs études ont également été réalisées sur les soldats exposés à l'uranium appauvri à partir de blessures avec des fragments d'obus (McDiarmid *et al.*, 2004). Des études neuropsychiatriques sur les soldats ont démontré une relation statistiquement significative entre un taux d'uranium élevé dans l'excrétion urinaire et une diminution des performances à une batterie de tests informatisés (McDiarmid *et al.*, 2000). Cependant cette relation n'est pas restée significative sur une période d'étude plus longue (McDiarmid *et al.*, 2004, McDiarmid *et al.*, 2005).

#### I.3.1.4f - Effets sur le système reproducteur

Il n'y a pas de données, utilisant un modèle animal, sur les effets de l'uranium après inhalation sur le système reproducteur ou sur le développement. Cependant des taux significatifs d'uranium ont été retrouvés dans les testicules de rats implantés avec des fragments d'uranium appauvri (Pellmar *et al.*, 1999a). Une toxicité de l'uranium sur

le développement et la reproduction a été observée suite à d'autres types d'exposition, comme l'ingestion ou l'injection, (Arfsten *et al.*, 2001, Domingo, 2001) principalement chez la souris : diminution de la fertilité, toxicité foétale et embryonnaire, baisses significatives du poids des fœtus (Bosque *et al.*, 1993). L'induction d'aberrations chromosomiques dans les cellules germinales a été observée chez des souris mâles exposées par injection, au niveau des testicules, de fluorure d'uranyle contenant de l'uranium enrichi (Hu et Zhu, 1990b). Chez le personnel féminin du nucléaire, une augmentation de fausses couches a été observée sans relation possible avec le niveau de contamination à l'uranium (Doyle *et al.*, 2000). Un effet tératogène de l'uranium naturel mais aussi appauvri n'est donc pas exclu (Hindin *et al.*, 2005).

#### I.3.1.4g - Effets sur les autres organes

Les effets sur les systèmes, tels que les systèmes gastro-intestinal, oculaire, cardiovasculaire ..., sont inexistantes ou moins bien documentés car les organes impliqués ne sont pas les cibles principales de la toxicité de l'uranium.

Il est décrit que l'uranium se fixe dans les tissus mous (rate, muscles ...) à raison de 5 à 7% de la quantité dissoute dans le sang. Il a été montré que l'uranium appauvri, implanté sous forme de fragments chez des rats, induisait des sarcomes dans les muscles (Hahn *et al.*, 2002).

Une relation dose-réponse a été observée pour des cancers des voies aérodigestives supérieures chez des travailleurs du nucléaire exposés de manière chronique à des radionucléides, principalement l'uranium et les produits de fission (Ritz *et al.*, 2000). Une augmentation de mortalité, chez les mineurs d'uranium, a pu être observée pour des cancers tel que les cancers de l'estomac, du rectum ... (Hornung *et al.*, 1995, Laurier *et al.*, 2001). Divers types de cancers sont augmentés après exposition à de faibles doses de radiations ionisantes (Cardis *et al.*, 2005). Un excès de mélanome et de cancer du sein a été relevé chez des travailleur(e)s du nucléaire (Telle-Lamberton *et al.*, 2004).

### I.3.2 - Les effets cellulaires

Les atteintes visibles aux niveaux des organes sont le résultat d'un nombre suffisant de dommages cellulaires. Comme nous l'avons vu, ces effets s'expriment différemment selon l'organisation du tissu touché et sa cinétique. Les cellules les plus sensibles sont des cellules peu différenciées et qui se divisent beaucoup. C'est pourquoi, les tissus les plus radiosensibles sont les gonades, les tissus hématopoïétiques et les épithéliums.

Les effets cellulaires de l'uranium, qu'il soit naturel ou appauvri, sont étudiés en majorité par des systèmes *in vitro*. Les principaux effets toxiques démontrés se manifestent, selon le type cellulaire, par :

- La mortalité cellulaire

L'uranium a des effets cytotoxiques. Les différentes études, utilisant de multiples conditions expérimentales, suggèrent une différence de sensibilité vis-à-vis de l'uranium entre les types cellulaires. La concentration induisant 50% de mortalité cellulaire (CL50) est ainsi de l'ordre de 100 à 250  $\mu\text{M}$  pour les macrophages (Kalinich *et al.*, 2002, Lizon et Fritsch, 1999) et de 750 à 900  $\mu\text{M}$  pour les cellules épithéliales rénales (Mirto *et al.*, 1999a, Mirto *et al.*, 1999b). Les particules d'uranium ont un effet sur la viabilité des macrophages et cette mortalité se fait en partie par apoptose (Kalinich *et al.*, 2002, Lizon et Fritsch, 1999, Tasat et De Rey, 1987). Tasat et Kalinich suggèrent que la mortalité cellulaire dépend de la quantité d'uranium ayant pénétré dans le compartiment intracellulaire. Le nitrate d'uranyle induit, *in vitro*, une baisse de la viabilité cellulaire et le ralentissement du cycle cellulaire des cellules d'ovaires de hamsters chinois (Lin *et al.*, 1993).

- La transformation cellulaire

L'uranium appauvri a montré un pouvoir transformant sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (Yang *et al.*, 2002) et sur une lignée d'ostéoblastes humains (HOS) (Miller *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent que, *in vitro*, l'uranium appauvri peut être un carcinogène.

- L'induction de la sécrétion de molécules diffusibles

Les macrophages exposés *in vitro* à de l'uranium sont capables de produire et de sécréter la cytokine TNF- $\alpha$  qui joue un rôle majeur dans l'inflammation (Gazin *et al.*, 2004).



Les effets sur les différents compartiments cellulaires sont résumés dans la Figure 11 (Ribera *et al.*, 1996).

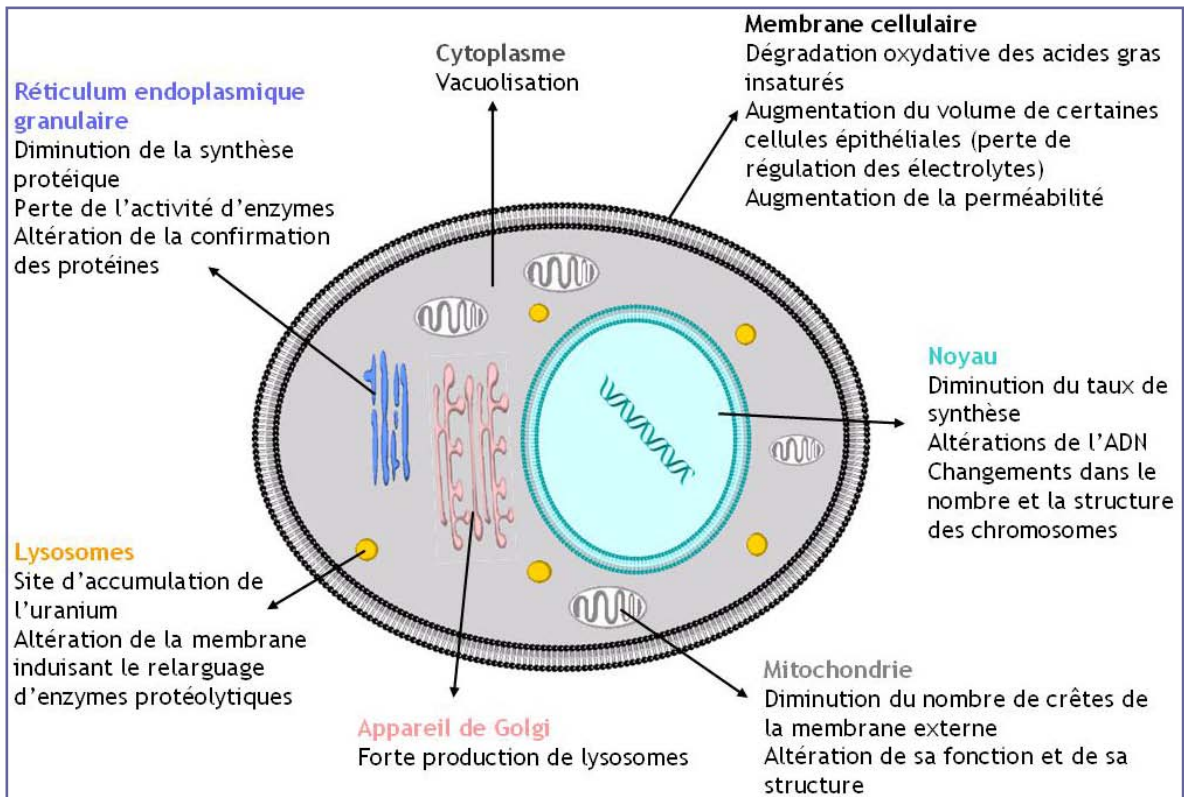


Figure 11 : Effets cellulaires de l'uranium (d'après Ribera, 1996)

### I.3.3 - Les effets moléculaires

L'uranium peut induire, *in vitro*, des oxydations, des hydroxylations, des désaminations, des réductions, des ruptures de chaînes carbonatées et des réactions de polymérisation (Ribera *et al.*, 1996). Les principales macro-molécules atteintes sont les protéines et l'ADN. L'uranium est capable d'induire des perturbations en réagissant avec des molécules, des cascades de signalisation et de modifier l'expression de certains gènes aboutissant aux effets décrits précédemment. Il a été montré qu'une contamination chronique par ingestion de l'uranium appauvri chez la souris induisait une modification du profil d'expression génique au niveau rénal (Taulan *et al.*, 2004).

#### I.3.3.1 - Les effets sur les protéines

L'uranium est capable de se fixer *in vitro* à différentes protéines sériques (Vidaud *et al.*, 2005). L'ion uranyle  $UO_2^{2+}$ , est capable de diminuer l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique et de l'ATP (McQueney et Markham, 1995), dans la signalisation cellulaire (Nathanson et Bloom, 1976). L'inhalation de dioxyde d'uranium induit une modification de l'activité enzymatique de certains Cytochromes P-450 au niveau pulmonaire mais aussi hépatique (Pasanen *et al.*, 1995).

#### I.3.3.2 - Les effets sur l'ADN

A l'échelle moléculaire, l'ADN est à la fois une cible des effets des rayonnements ionisants et des toxiques inhalés provoquant des dommages cellulaires. La génotoxicité peut être définie comme la capacité d'induire des effets toxiques sur un système génétique. Ce terme aurait été utilisé pour la première fois par Hermann Druckrey à une conférence internationale sur les carcinogènes environnementaux : « Pour décrire la résultante d'une interaction chimique avec le matériel génétique, le terme de génotoxicité est proposé comme l'expression générale des effets toxiques, létaux et héréditaires du matériel génétique dans les cellules germinales ou somatiques » (Schins, 2002). Les rayonnements ionisants, les métaux et les espèces particulières induisent des anomalies au niveau de l'ADN par deux mécanismes principaux (Evans *et al.*, 2004, Hartwig, 1995, Knaapen *et al.*, 2002, Schins, 2002) (Figure 12).

- Un effet direct sur les molécules d'ADN

Dans le cas des rayonnements, c'est le transfert direct de l'énergie du rayonnement qui permet l'ionisation d'un atome constituant la molécule d'ADN et ainsi la modification de la structure chimique de l'ADN (Fig 12-a). La fraction solubilisée des particules peut être elle-même réactive. D'autre part, l'effet sur l'ADN dépend des propriétés du composé, en particulier de sa taille, de sa solubilité, de son activité de surface ... (Fig 12-b).

- Un effet indirect

Dans le cas des rayonnements, l'ionisation des molécules d'eau et d'oxygène crée des radicaux libres (Fig 12-c) qui entraînent eux-mêmes des modifications structurelles des molécules d'ADN. Après internalisation de particules par les macrophages ou les cellules épithéliales, la formation de l'ion superoxyde est augmentée, catalysée par le complexe enzymatique de la NADPH oxydase (Fig 12-d) permettant la production de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) endogène. L' $H_2O_2$  endogène peut aussi être généré via la réduction de l'oxygène intracellulaire par les radicaux de surface des particules (Fig 12-e). L'expression et la sécrétion de diverses molécules dont les cytokines sont augmentées et produisent un état inflammatoire favorisant lui-même la production d'espèces réactives de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), anions superoxydes ( $O_2^{2-}$ ) et de l'azote qui participent à la génération de radicaux comme les hydroxyles ( $OH\cdot$ ) et de péroxynitrite ( $ONOO\cdot$ ) (Fig 12-f).

Le stress oxydatif induit, comme nous venons de le voir, des dommages sur l'ADN mais aussi sur les membranes cellulaires par des processus de peroxydation lipidique et l'oxydation de protéines (Schins et Borm, 1999). La formation excessive et persistante des ROS est considérée comme une caractéristique de l'effet génotoxique indirect des toxiques inhalés après une exposition à des concentrations relativement élevées de poudres faiblement solubles (Schins, 2002). Le stress oxydatif joue également un rôle dans les mécanismes de cancérogenèse induits par les métaux (Galaris et Evangelou, 2002, Kawanishi *et al.*, 2002, Klein *et al.*, 1991) et les effets tardifs induits par les radiations (Robbins et Zhao, 2004).

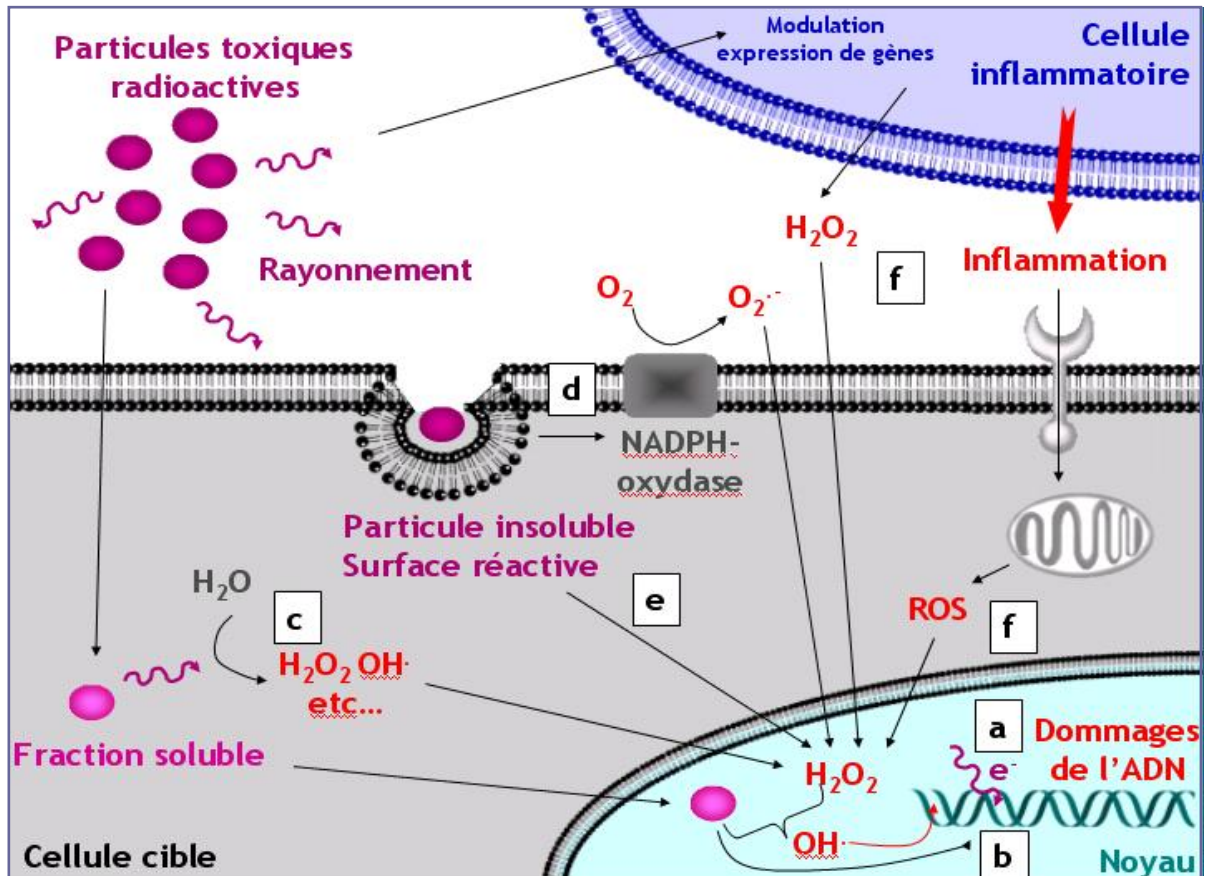


Figure 12 : Mécanismes possibles d'induction de dommages de l'ADN par des particules toxiques radioactives

Diverses causes peuvent donc induire plusieurs types de modifications de la structure de l'ADN (Figure 13) (Hoeijmakers, 2001). Dans le cas des effets induits suite à l'inhalation de particules, deux grands types de lésions de l'ADN apparaissent. Des perturbations du métabolisme cellulaire (Figure 13A) entraînent des altérations chimiques des bases et des cassures sur un seul brin de l'ADN induites par la formation d'espèces réactives de l'oxygène et les radiations ionisantes. Les radiations ionisantes, des radicaux libres, certains composés chimiques induisent aussi des cassures doubles brins et des interactions stables (« crosslink ») entre les deux brins d'ADN (Figure 13B). Dans ce dernier cas les deux brins de l'ADN sont impliqués.

Des lésions dans l'ADN induisent un arrêt du cycle cellulaire afin de permettre aux systèmes de réparation de la cellule d'agir. Ces mécanismes permettent de conserver l'intégrité du génome malgré les agressions quotidiennes subies par l'ADN. La perturbation des mécanismes de réparation de l'ADN est donc un autre moyen d'induire des dommages sur l'ADN. Ce phénomène a été décrit pour différents métaux comme le

plomb, le cadmium et le nickel (Hartwig *et al.*, 2002a, Hartwig *et al.*, 2002b, Hartwig et Schwerdtle, 2002).

Les lésions d'origine endogène touchant un brin de l'ADN sont principalement réparées par le système d'excision des bases (base-excision repair, BER). Ce système est un processus multi-enzymatique qui prend en charge les modifications de bases comme la méthylation, l'oxydation, la réduction ou la fragmentation de bases. Les cassures simple brin se réparent rapidement ( $T_{1/2} = 6$  min) mais, dans un contexte inflammatoire, des cassures apparaissent en permanence. Les cassures doubles brins sont rectifiées par recombinaison homologue (homologous recombinaison, HR) et par religation non homologue (end joining, EJ), mécanisme de réparation peu fidèle. La recombinaison homologue aurait plutôt lieu en phase S et G2 du cycle cellulaire lorsque l'ADN est répliqué. Les cassures de l'ADN sur les deux brins sont particulièrement difficiles à réparer et leur réparation prend plus de temps ( $T_{1/2} = 60$  à 110 min). Les mécanismes moléculaires qui seraient impliqués dans les systèmes sont présentés dans l'annexe 1 (Averbeck, 2000, Hoeijmakers, 2001).

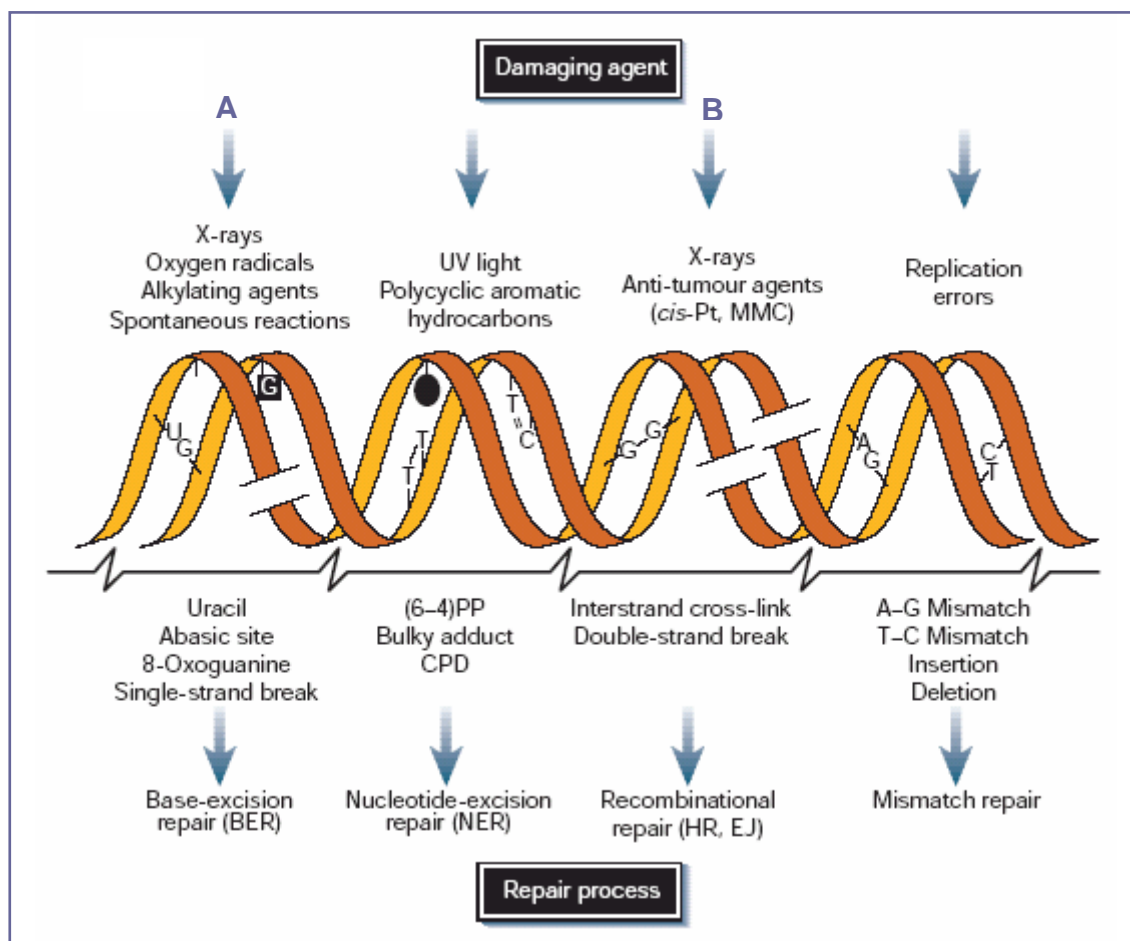


Figure 13 : Principaux dommages de l'ADN et leurs mécanismes de réparation (Hoeijmakers, 2001)

*Cis-Pt*, cisplatine ; MMC, mitomycine C ; (6-4)PP, 6-4 photoproduct ; CPD, cyclobutane pyrimidine dimer ; BER, base excision repair ; NER, nucleotide excision repair ; HR, homologous recombinaison ; EJ, end joining.

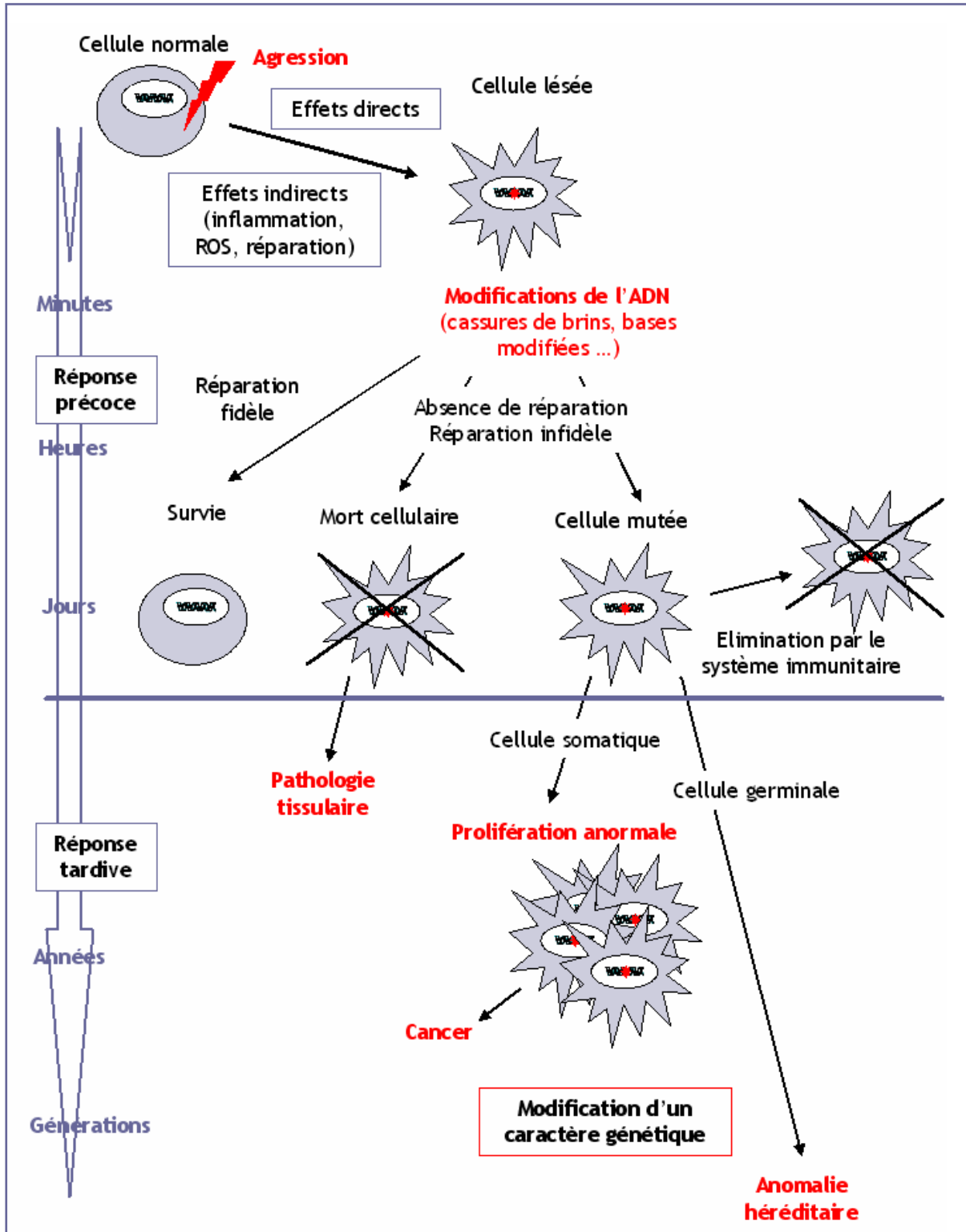


Figure 14 : Devenir d'une cellule lésée

Lorsque les modifications de l'ADN peuvent être réparées, l'effet biologique se limite alors à l'échelle moléculaire et la cellule reste intacte. Lorsque la cellule ne peut pas réparer son ADN lésé, les modifications de l'ADN sont à l'origine d'arrêts prolongés

dans le cycle cellulaire, d'inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN, de la ségrégation des chromosomes. Ces perturbations peuvent être à l'origine d'apparition de mutations et d'aberrations chromosomiques et induire la mort cellulaire (Figure 14).

Les mutations sont définies comme un changement transmissible dans le matériel génétique. Des mutations au niveau de cellules somatiques favorisent l'apparition de cancers et des mutations au niveau des cellules reproductrices peuvent entraîner des anomalies héréditaires (Figure 14).

Dans le cas de l'uranium, des modifications des bases de l'ADN (hydroxylations et dimérisation), des altérations des sucres, la formation de ponts covalents entre les deux chaînes d'ADN et des cassures de chaînes ont été reportées (Ribera *et al.*, 1996). L'uranium pourrait aussi induire la production de radicaux libres en agissant comme catalyseur de la réaction de Fenton selon la réaction suivante :  $U^{IV} + H_2O_2 \rightarrow U^{VI} + HO\cdot + OH\cdot$ . L'uranium, prédominant à l'état d'oxydation +VI dans les milieux physiologiques, pourrait passer à l'état +IV en présence d'un milieu intracellulaire réducteur. La catalyse de cette réaction a été mise en évidence dans des conditions acellulaires (Hamilton *et al.*, 1997). Il a aussi été montré qu'une altération de l'ADN par la formation de thymine glycol et de 8-hydroxy-deoxyguanosine (spécifiques d'un stress oxydatif) peut être induite en présence d'uranium appauvri (nitrate d'uranyle), de peroxyde d'hydrogène et d'ascorbate (Miller *et al.*, 2002a). Les auteurs suggèrent que l'uranium pourrait agir directement par fixation sur le phosphate de l'ADN et catalyser une réaction d'hydrolyse de la liaison sucre-phosphate. Par ailleurs, le cation d'uranyle provoque des cassures simple brin de l'ADN en présence d'ascorbate mais sans peroxyde d'hydrogène (Yazzie *et al.*, 2003).

Des effets génotoxiques de l'uranium (Tableau 3) ont également été observés sur des modèles cellulaires. Le nitrate d'uranyle entraîne, sur des cellules d'ovaires de hamsters chinois, une augmentation du nombre de micronoyaux, des aberrations chromosomiques, et des échanges de chromatides sœurs (Lin *et al.*, 1993). Dans cette étude, une relation dose-effet a été mise en évidence pour des concentrations allant de 0,01 à 0,3 mmol.L<sup>-1</sup>. Les effets génotoxiques observés seraient attribuables à la liaison de l'uranium aux groupements phosphate de l'ADN. Des cassures d'ADN, mesurées par le test des comètes, ont également été mises en évidence dans des cellules d'ovaires de hamsters chinois exposés à de l'uranium appauvri sous forme d'acétate d'uranyle ; les auteurs montrent aussi la capacité de l'uranium à former des adduits avec l'ADN et à



induire des mutations (Stearns *et al.*, 2005). Sur la lignée d'ostéoblastes humains (HOS), une augmentation de la fréquence des chromosomes dicentriques est observée après exposition au chlorure d'uranyle appauvri mais pas après exposition à d'autres métaux lourds comme le nickel et le tungstène, suggérant ainsi un effet des radiations dans la toxicité de l'uranium appauvri *in vitro* (Miller *et al.*, 2002b). De plus, une instabilité génomique induite par l'uranium appauvri se manifeste par la formation de micronoyaux (Miller *et al.*, 2003).

Sur des modèles *in vivo*, les cellules germinales de souris mâles exposées à de l'uranium enrichi, sous forme de fluorure d'uranyle, présentent des aberrations chromosomiques (Hu et Zhu, 1990a). Dans cette étude, la radioactivité du composé utilisé semble pouvoir être mise en cause. Récemment, une augmentation de l'expression du gène de la NO synthétase (iNOS) a été observée dans les testicules de rats, exposés par instillation intra-trachéale, à des particules d'uranium appauvri (Li *et al.*, 2005). La NO synthétase intervient dans la réaction qui transforme la L-arginine en oxyde nitrique (NO) qui est un messager biologique mais aussi une espèce réactive.

Dans les études sur l'Homme, des effets génotoxiques ont été observés principalement sur les cellules du sang (voir paragraphe I.3.1.4a). Une augmentation de la fréquence des micronoyaux a récemment été rapportée dans les lymphocytes du sang de personnes vivant dans des zones contaminées à l'uranium appauvri comparativement à des personnes vivant dans des zones voisines non contaminées de Bosnie et Herzégovine (Krunic *et al.*, 2005).

Ces études, principalement *in vitro*, suggèrent que l'uranium est capable d'induire des altérations de l'ADN et ceci probablement par différents mécanismes.



*Tableau 3 : Effets génotoxiques et cancérigènes de l'uranium in vitro et in vivo sur des modèles de mammifères*

Composé, type d'étude	Type cellulaire	Effets	Référence
Nitrate d'uranyle, <i>in vitro</i>	Cellules d'ovaires de hamsters chinois	Augmentation du nombre de micronoyaux, des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs	(Lin <i>et al.</i> , 1993)
Acétate d'uranyle appauvri, <i>in vitro</i>	Cellules d'ovaires de hamsters chinois	Cassures de l'ADN (test des comètes), formation d'adduits avec l'ADN et induction de mutations	(Stearns <i>et al.</i> , 2005)
Chlorure d'uranyle appauvri, <i>in vitro</i>	Cellules HOS	Génotoxicité (échange de chromatides sœurs, micronoyaux), instabilité génomique (cassures chromosomiques), mutagenèse (mutation HPRT), pouvoir transformant	(Miller, 2002, Miller <i>et al.</i> , 1998, Miller <i>et al.</i> , 2003, Miller <i>et al.</i> , 2002b)
Fluorure d'uranyle enrichi (i.p.), <i>in vivo</i>	Cellules germinales de souris mâles	Aberrations chromosomiques	(Hu et Zhu, 1990a)
Fragments d'uranium appauvri, <i>in vivo</i>	Rats	Sarcomes dans les muscles	(Hahn <i>et al.</i> , 2002)
Particules uranium naturel (inhalation), <i>in vivo</i>	Rats	Cancers pulmonaires	(Mitchel <i>et al.</i> , 1999)

### I.3.4 - Les effets biologiques - Synthèse

Suite à l'inhalation de particules d'uranium, le système respiratoire est le premier atteint. La pénétration de particules dans l'arbre respiratoire dépend principalement de la taille et peut se faire par voie nasale ou par voie buccale. Le dépôt des particules, quant à lui, dépend de la zone pulmonaire, de l'hygroscopie des particules, du taux de ventilation et de l'espèce considérée. Dans le poumon, deux cibles cellulaires principales sont atteintes : les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires. Sur des modèles animaux, des expositions aiguës d'uranium induisent principalement une inflammation interstitielle de l'épithélium alvéolaire conduisant éventuellement à une fibrose pulmonaire, tandis que des expositions chroniques peuvent induire, en plus, une prolifération cellulaire et l'apparition de cancers. Certaines études épidémiologiques montreraient aussi un effet cancérigène mais les facteurs environnementaux rendent difficile l'attribution des effets à l'uranium seul.

Les principaux paramètres influençant la disparition des particules du poumon sont : leur taille, le site de dépôt, la solubilité du composé mais aussi le type d'exposition. Une fois l'uranium transféré au compartiment sanguin, il peut se fixer sur d'autres organes où des effets variés sont observés, les reins et le squelette sont considérés comme les principaux sites d'accumulation.

Les effets observés au niveau des organes sont le reflet d'actions de l'uranium aux niveaux cellulaires et moléculaires. Principalement par des études *in vitro*, il a été montré que l'uranium serait capable d'induire la mort et la transformation de cellules, d'interagir avec des protéines, d'induire des dommages de l'ADN et de moduler l'expression de gènes.

# Chapitre II - MATERIELS ET METHODES



Ce chapitre a pour principal objectif de développer certains aspects des matériels et méthodes peu décrits dans les articles.

## Chapitre II.1 - Le modèle animal

Le principal avantage de l'expérimentation animale est de reproduire les interactions complexes qui ont lieu dans un organisme vivant. En particulier, dans le domaine de la santé humaine, l'observation des réactions, suite à l'application d'un protocole ou à l'inhalation d'un produit, n'est possible qu'avec un être vivant complet. En France, depuis 1983 un Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé a été créé. La Commission nationale de l'Expérimentation Animale, prévue par le décret d'octobre 1987 et mise en place le 5 Juillet 1989, conseille les pouvoirs publics en matière d'expérimentation animale, veille à l'amélioration des conditions d'élevage des animaux de laboratoire, étudie les méthodes pouvant se substituer à l'utilisation d'animaux vivants dans certaines recherches. Des comités éthiques sont maintenant présents dans les centres de recherche et contrôlent les manipulations prévues par les laboratoires. Ainsi à l'IRSN, un comité éthique évalue les protocoles. Le protocole d'expérimentation animale nécessaire à cette thèse a donc été présenté et approuvé par ce comité.

Les tests de toxicité *in vivo* subaiguë et chroniques renseignent les chercheurs sur le pouvoir cancérogène, les doses mortelles, les mécanismes d'action, les organes cibles .... L'espèce de rongeur la plus fréquemment utilisée pour des expositions par ingestion ou inhalation est le rat.

Le terme « animal de laboratoire » recouvre les espèces élevées et sélectionnées par des professionnels de l'élevage, dans le but d'être soumis à expérimentation dans le domaine de la biologie. L'animal dans l'expérimentation, est une variable dont la valeur dépend non seulement de facteurs héréditaires, mais aussi de facteurs du milieu. La majorité des animaux de laboratoires, comme les rongeurs, sont sains c'est à dire exempts de tout germe pathogène susceptible d'interférer avec l'expérimentation.

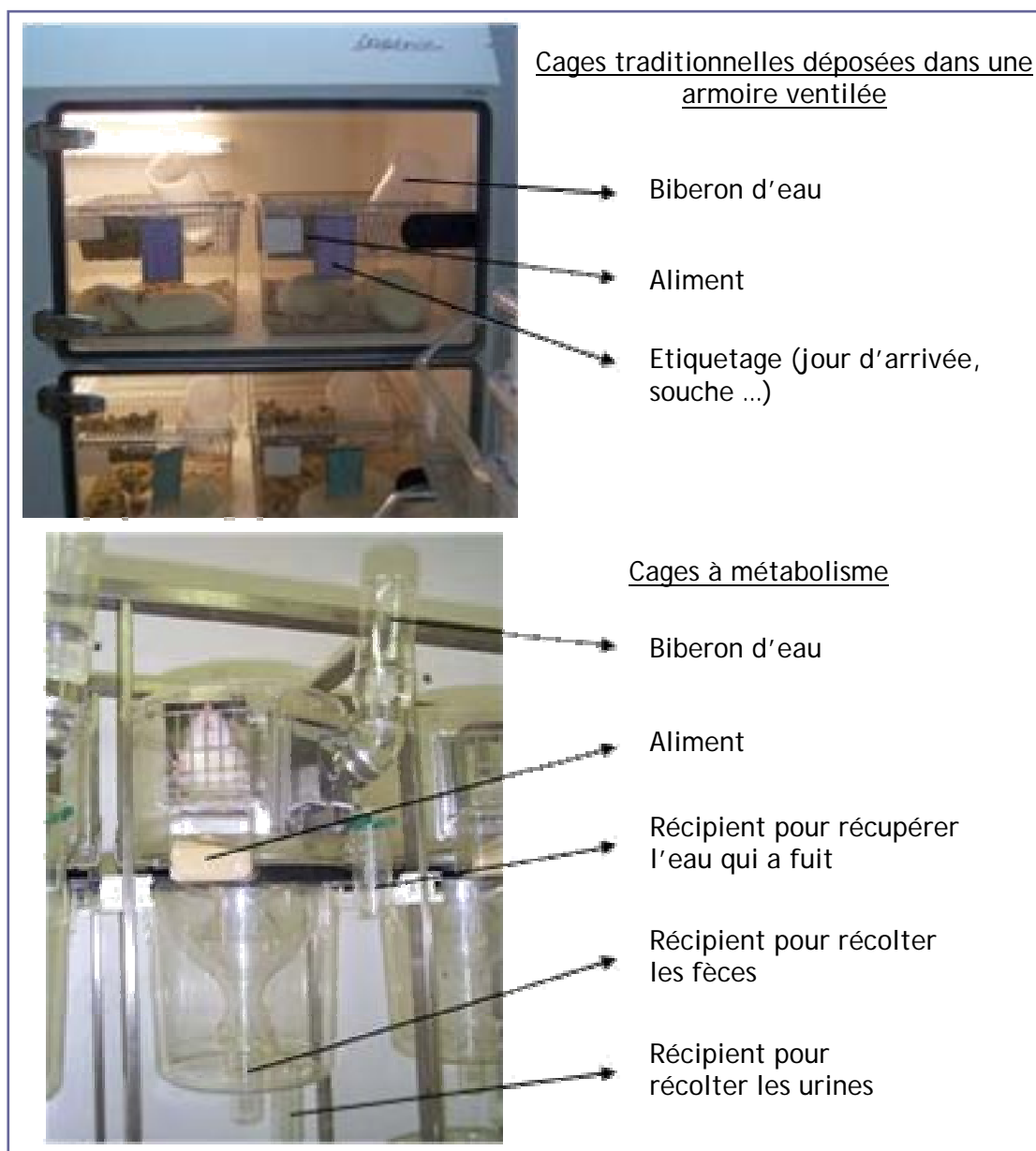
Dans notre cas, le modèle animal choisi est le rat blanc de laboratoire, espèce *norvegicus*, souche OFA Sprague Dawley des laboratoires Charles River. Les expériences sont toutes réalisées sur des rats mâles adultes afin de limiter les facteurs de l'âge, du sexe, des variations hormonales et du stade physiologique (grossesse, maladie ...). Les

principales caractéristiques de cet animal sont récapitulées dans le Tableau 4 (Derelanko et Hollinger, 2002, Iffa-Credo, 1997).

*Tableau 4 : Caractéristiques du rat mâle de laboratoire (souche Sprague Dawley)*

Poids adulte	360-700 g
Longévité	2 - 3 ans
Température corporelle	37,5 - 38,5 °C
Volume urinaire	15 - 30 ml / jour
Consommation de nourriture	20 - 25 g / jour
Consommation de boisson	30 ml / jour
Sevrage	21 jours
Maturité sexuelle	6 - 7 semaines
Nombre de chromosome	2n = 42
Paramètres biochimiques sanguins (rat adulte)	ALAT (U/L) : 40 ±15 ASAT (U/L) : 141 ± 50 CREAT (mg/L) : 6 ±1,7 UREE (g/L) : 0,35 ± 0,06
Rythme respiratoire Ventilation	80 - 150 respiration / min 6 l / h
Trachée	Longueur = 3,2 cm Diamètre interne = 3 mm
Poumon	Volume pulmonaire = 11 ml Surface pulmonaire = 0,7 m <sup>3</sup> Diamètre alvéolaire = 70 µm
Clairance mucociliaire	Vélocité : 5 mm / min
Cytologie dans le lavage broncho- alvéolaire (% du nombre total de cellules)	Macrophages = 95 % Neutrophiles < 1 % Eosinophiles < 1 % Lymphocytes < 1 %

Les animaux commandés ont un âge de 16-17 semaines pour les expositions répétées et de 20 semaines pour les expositions aiguës, afin que les animaux aient le même âge à la fin de l'exposition. Ils sont mis en cages traditionnelles deux par deux, avec nourriture (croquettes) et eau à volonté. Les animaux sont pesés en moyenne une fois par semaine ainsi que la nourriture et la boisson consommées. L'ensemble des animaux est acclimaté pendant au minimum 2 semaines aux conditions d'hébergement, à la contention en tubes (nécessaire pour l'exposition par inhalation) et, uniquement pour les animaux destinés aux études de biocinétique, aux cages à métabolisme qui permettent de séparer les urines des fèces (Figure 15). Une cage à métabolisme contient un seul animal qui repose sur une grille, la nourriture est sous forme de poudre. L'hébergement en cage à métabolisme est la principale origine de stress pour l'animal.



*Figure 15 : Conditions d'hébergement des animaux*





## Chapitre II.2 - Les composés uranifères et le système d'inhalation

Les composés uranifères choisis sont couramment retrouvés sur les sites du cycle du combustible et sont potentiellement inhalables. Le composé choisi pour réaliser les inhalations répétées et aiguës est le dioxyde d'uranium  $UO_2$ . Il est présent à de nombreuses étapes du cycle du combustible et sous différentes compositions isotopiques. L' $UO_2$  utilisé est un échantillon appauvri de l'atelier TU2 de la COGEMA entrant dans la composition du MOX.

Pour pouvoir réaliser les études de double contamination qui impliquent l'utilisation de deux composés uranifères, il faut être capable, techniquement, de différencier ces deux composés dans un même échantillon biologique. Ceci est possible en utilisant un deuxième composé uranifère n'ayant pas les mêmes isotopes que l' $UO_2$  (Tableau 5). Un autre paramètre intéressant à étudier est la solubilité du composé. Nous avons donc choisi comme second composé le tétraoxyde d'uranium  $UO_4$  (Ansoborlo *et al.*, 1998, Houpert *et al.*, 1999). L' $UO_4$  est présent dans le cycle du combustible enrichi et est formé au niveau des étapes de traitement et de recyclage des déchets. Il est obtenu suite à l'oxydation et à l'acidification de l' $UO_2$  et des rejets de  $U_3O_8$  et précipitation par  $H_2O_2$ . L' $UO_4$  utilisé est un échantillon appauvri de retraitement de l'atelier TU5 de la COGEMA et correspond à un produit intermédiaire dans la fabrication de l' $U_3O_8$ .

Tableau 5 : Caractéristiques des composés uranifères

	$UO_2$	$UO_4$
Composition	$UO_2$	$UO_4, 2H_2O$
Isotopie	$^{238}U = 99,755 \%$ , $^{235}U = 0,244 \%$ , $^{234}U = 0,001 \%$ , $^{236}U < 0,0003 \%$ , $^{232}U < 0,00001 \%$	$^{238}U = 99,544 \%$ , $^{235}U = 0,39 \%$ , $^{234}U = 0,0047 \%$ , $^{236}U = 0,061 \%$ , $^{232}U < 0,00001 \%$
Solubilité	insoluble	soluble
Densité	$11,44 \text{ g.cm}^{-3}$	$4,57 \text{ g.cm}^{-3}$

Composition analysée par diffraction X et isotopies (% en masse) réalisées par spectrométrie alpha et ICP-MS

L'objectif de la phase de contamination est d'exposer des rats par inhalation d' $UO_2$  de manière répétée ou aiguë et/ou d' $UO_4$  de manière aiguë. Il existe différemment modes d'exposition des animaux par inhalation (Derelanko et Hollinger, 2002, Phalen *et al.*, 1984). Deux principaux systèmes d'exposition pour rongeurs existent : les systèmes corps entier et « nose-only ». Le système d'inhalation « nose-only » a été choisi afin de gérer une quantité de matière ( $UO_2$  et  $UO_4$ ) raisonnable. Ce système permet une meilleure précision de la quantité inhalée mais aussi de limiter la contamination des poils des animaux. En effet les animaux sont placés dans des tubes de contention de façon à ce que seul leur nez soit en contact avec les aérosols. D'autre part, le nez des animaux a été systématiquement nettoyé après les inhalations. L'inconvénient majeur de ce système d'inhalation est la contention des animaux en tube qui peut engendrer un état de stress. Afin de limiter ce stress, une acclimatation au tube a été réalisée en augmentant progressivement et régulièrement le temps de séjour des animaux dans les tubes jusqu'à obtenir une période de contention équivalente au temps nécessaire aux expositions.

Le générateur de particules utilisé est le Small Scale Powder Dispenser (SSPD, Modèle TSI 3433) qui disperse de petites quantités de poudre dans un flux d'air. Ce générateur comporte une platine rotative, sur laquelle est déposée la poudre. Celle-ci est aspirée par un système venturi. Les particules sont remises en suspension par une trompe à air dans la chambre d'inhalation.

Le flux d'aérosols formés est dilué en présence d'air comprimé de façon à obtenir les concentrations d'aérosols souhaitées. Le flux total introduit dans la chambre d'inhalation est de  $41,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Le système d'exposition est contenu dans une boîte à gants, construit par la société YSEBAERT (Frépillon, France) d'un volume de 33 litres (Figure 16).

Cette installation est composée de 3 parties. La première contient le générateur d'aérosols. Ces aérosols sont générés dans la chambre d'inhalation correspondante à la seconde partie. La troisième partie permet le positionnement des animaux (Figure 16). Après avoir placé les rats dans les tubes de contention, les tubes sont insérés dans un panneau en contact avec la chambre d'inhalation de façon à ce que les rats inhalent, par le nez, les aérosols produits. La chambre d'inhalation contient seize emplacements pour la fixation des tubes de contention.

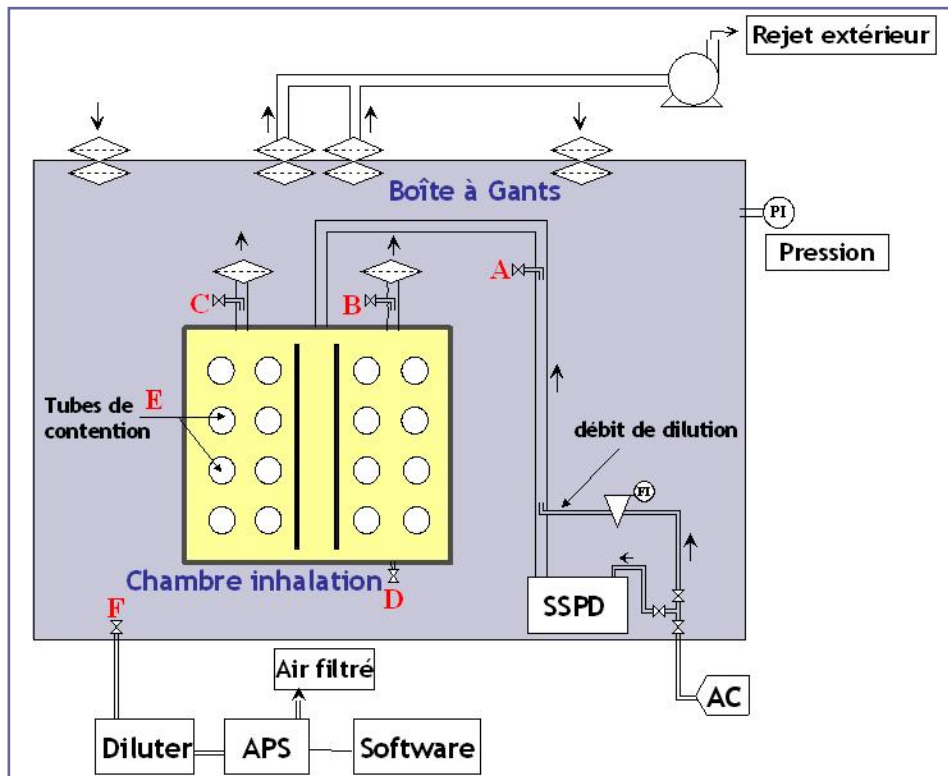


Figure 16 : Le système d'exposition des animaux

La mise au point du système d'exposition des animaux (construction des cannes de prélèvement, étalonnage du générateur, variation de la concentration en fonction du débit de dilution, cartographie de la chambre d'inhalation ...) a été réalisée pendant un stage d'ingénieur de 3<sup>e</sup> année (Poyet, 2002). La taille et la concentration des particules utilisées ont été mesurées à l'aide de l'Aerodynamic Particle Sizer (APS, modèle TSI 3310A qui associe un jet d'accélération des particules avec un vélocimètre laser Doppler).

Une vérification de ces mesures a été faite à l'aide d'un impacteur en cascade Andersen. L'analyse des filtres permet d'obtenir la distribution granulométrique et de calculer le diamètre aérodynamique médian en activité (DAMA, en  $\mu\text{m}$ ). L'APS renseigne sur le diamètre aérodynamique médian en masse et en nombre (DAMM et DAMN). Le Tableau 6 donne les caractéristiques des aérosols produits à partir de l' $\text{UO}_2$  et de l' $\text{UO}_4$ .

*Tableau 6 : Caractéristiques des aérosols*

	$\text{UO}_2$	$\text{UO}_4$
% de particules entre 0,4 et 9	68%	84%
DAMA	2,53 $\mu\text{m}$ , gsd = 1,93	2,34 $\mu\text{m}$ , gsd = 2,01
DAMM	1,8 $\mu\text{m}$ , gsd = 1,66	1,31 $\mu\text{m}$ , gsd = 1,70
DAMN	0,91 $\mu\text{m}$ , gsd = 1,48	0,74 $\mu\text{m}$ , gsd = 1,38

gsd, geometric standard deviation

De plus, l'APS étant un appareil plutôt dédié à la mesure de la taille des particules, il peut sous-estimer leur concentration (Peters et Leith, 2003). Cette concentration a donc été vérifiée par prélèvement sur des filtres à membrane (taille des pores : 0,8  $\mu\text{m}$ , diamètre : 25 mm, en cellulose acétate, Millipore). Pour chaque condition d'exposition, trois échantillonnages de particules ont été faits pour évaluer la variation inter-prélèvement. Les filtres de prélèvement ont été placés à quatre emplacements de tubes différents pour évaluer la variation inter-position. Pour l' $\text{UO}_2$ , deux concentrations différentes ont été utilisées, à savoir la concentration la plus basse utilisée pour l'exposition répétée et la plus haute pour les expositions aiguës. Le contrôle des concentrations d'aérosols générées a montré que l'APS sous-estimait ces valeurs. Seules les mesures réalisées avec les filtres à membrane ont donc été retenues (Tableau 7) (communication personnelle de F. Gendarmes, IRSN/DSU/SERAC/Laboratoire de physique et de métrologie des aérosols).

*Tableau 7 : Concentrations des aérosols*

	UO <sub>2</sub>		UO <sub>4</sub>
Concentration moyenne	190 mg.m <sup>-3</sup>	375 mg.m <sup>-3</sup>	116 mg.m <sup>-3</sup>
Variation inter-position	64 mg.m <sup>-3</sup>	70 mg.m <sup>-3</sup>	60 mg.m <sup>-3</sup>
Variation inter-prélèvement	41 mg.m <sup>-3</sup>	150 mg.m <sup>-3</sup>	45 mg.m <sup>-3</sup>

Pour estimer la charge pulmonaire après chaque condition d'exposition, des inhalations aiguës ont été réalisées en utilisant 5 rats par condition testée. Les animaux ont été euthanasiés dès la fin de l'exposition et la quantité d'uranium a été déterminée dans les poumons, le tractus gastro-intestinal (TGI) et le reste du corps par dosage KPA (Tableau 8).

*Tableau 8 : Distribution immédiate de l'uranium après inhalation*

<i>n</i> = 5	Inhalation 30 min d'UO <sub>2</sub> conc 1	Inhalation 4 h d'UO <sub>2</sub> conc 2	Inhalation 30 min d'UO <sub>4</sub>
Quantité d'U dans les poumons	104 ± 9 µg	2631 ± 340 µg	117 ± 33 µg
Quantité d'U dans le TGI	2 074 ± 422 µg	34 980 ± 8 184 µg	921 ± 284 µg
Quantité d'U dans le reste du corps	746 ± 124 µg	5 511 ± 2 230 µg	371 ± 130 µg

Ces expériences d'inhalation montrent qu'une très forte quantité d'uranium se retrouve dans le tractus gastro-intestinal. En effet, la quantité dans le TGI est de 8 à 20 fois supérieure à la quantité dans les poumons. Après inhalation, des particules peuvent se retrouver dans le TGI par le mécanisme de remontée mucociliaire. Le dosage étant réalisé dès la fin de l'inhalation et les quantités étant très élevées, l'hypothèse la plus probable est que l'uranium a été ingéré pendant l'exposition. Cette quantité d'uranium ingérée va donc être principalement éliminée dans les fèces mais va également passer dans la circulation sanguine en traversant la barrière gastro-intestinale. En effet, le taux d'absorption gastro-intestinal est, en moyenne de 1 à 3 % de l'apport initial, selon la solubilité de l'uranium. Une partie de la contamination sera donc due à l'ingestion. De plus, malgré une inhalation de type « nose only » et le nettoyage du nez des animaux après exposition, le reste du corps et donc vraisemblablement la cavité nasale et le pelage sont contaminés. La quantité retrouvée dans le reste du corps est de 2 à 7 fois supérieure à la quantité dans les poumons. Il y a une forte probabilité que l'uranium sur le pelage soit ensuite ingéré du fait du nettoyage par léchage. Ces résultats sont donc à prendre en compte dans l'analyse des données expérimentales ne portant pas sur le système respiratoire.



## Chapitre II.3 - Le dosage de l'uranium

Dans le cadre de l'étude biocinétique, le dosage de l'uranium a été réalisé systématiquement dans les échantillons biologiques suivants : le poumon (+ trachée), les reins, le foie, le tractus gastro-intestinal, les fémurs, la rate, 1 g de sang, 5 ml d'urine, les fèces. Dans des cas particuliers, le cœur, la carcasse (séparation muscles et squelette) et la peau avec les pattes et la queue ont également été dosés.

### II.3.1 - Dosage de l'uranium total : Kinetic Phosphorescence Analysis (KPA)

Les échantillons sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au dosage. Le dosage de l'uranium par KPA dans les organes ou les excréta nécessite au préalable leur minéralisation (Ejnik *et al.*, 2000b). Brièvement, la minéralisation des échantillons comprend d'abord une calcination avec un passage dans un four à moufle à  $600^{\circ}\text{C}$ , pendant environ une semaine, avec une montée progressive jusqu'à cette température. Des cycles, dans des bains d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$  65%,  $13,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) additionné d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$  30%) suivis d'évaporation sur plaque chauffante à  $100^{\circ}\text{C}$ , sont réalisés jusqu'à ce que l'échantillon soit d'une couleur blanche. Cette opération prend environ trois semaines. Certains échantillons, comme le foie ou le sang, peuvent être repassés 24h à  $600^{\circ}\text{C}$ . Pour le dosage, les échantillons minéralisés sont repris et dilués dans de l'acide nitrique (concentration finale de 1,25N).

Le KPA (Figure 17) permet d'obtenir une mesure de l'uranium pondéral présent dans un échantillon. L'uranium peut être excité avec passage d'un état singulet excité vers un état triplet excité. Lors de la transition de retour vers l'état fondamental, une émission d'un rayonnement faible de phosphorescence est produite pouvant durer des heures au lieu de quelques nanosecondes pour la fluorescence. La méthode de dosage du KPA (Chemchek, Richland, USA) est basée sur la mesure de la vitesse de décroissance de la phosphorescence suite à une excitation laser (à 425 nm) et sur l'établissement d'une courbe de calibration qui permet d'en déduire la concentration d'uranium (Hedaya *et al.*, 1997). Les mesures sont effectuées simultanément sur une cellule de référence contenant une solution d'uranium à la concentration de  $250 \mu\text{g.U.L}^{-1}$ , pour palier aux déviations instrumentales (Intensité du laser, température ...). La limite de détection théorique est de  $1.10^{-2} \mu\text{g.L}^{-1}$ .

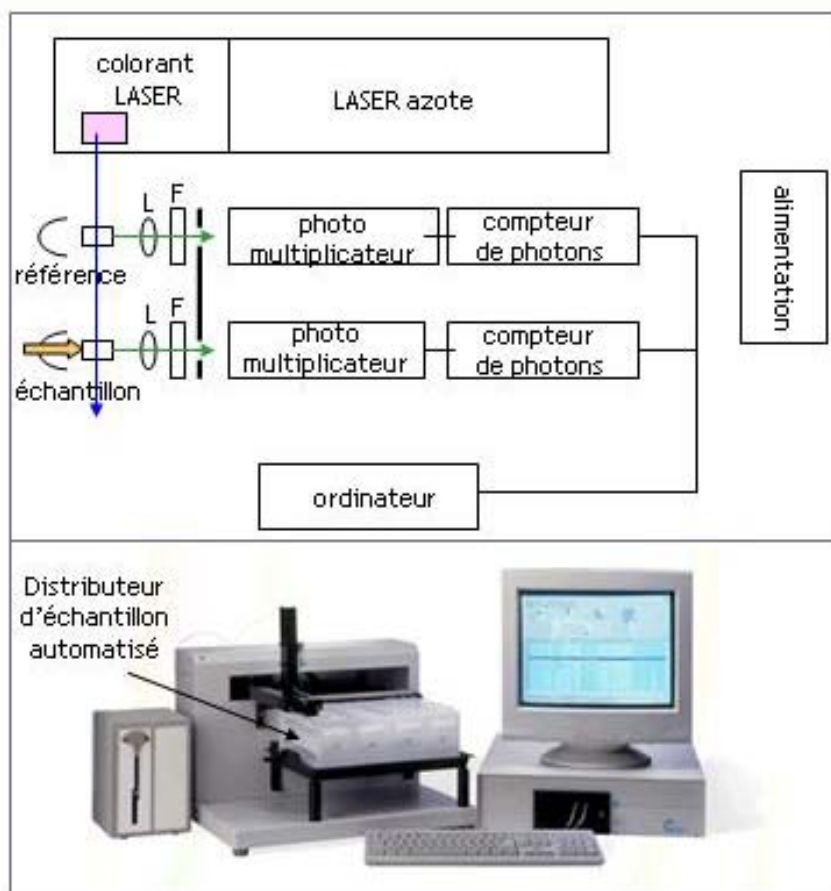


Figure 17 : Le KPA

Les critères d'acceptabilité des résultats du dosage de l'uranium au KPA sont les suivants :

Paramètre instrumental d'émission :

- Pulse du LASER : 1000.
- Time gate : 52 $\mu$ s.

Paramètre de l'échantillon mesuré :

- Linéarité de la gamme.
- « Reference ratio » (rapport de l'intensité du signal sur intensité de la calibration) : > 0,8.
- « Lifetime » (constante de vitesse de décroissance de la phosphorescence de l'uranium) : entre 150 et 250.
- $R^2$  (coeff. de corrélation de la droite de régression de la décroissance de la phosphorescence) : entre 0,97 et 1.



### II.3.2 - Dosage de l' $\text{UO}_4$ dans les échantillons doublement contaminés : Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS)

Dans le cas des doubles contaminations ( $\text{UO}_2 + \text{UO}_4$ ), il est nécessaire de pouvoir distinguer l'uranium provenant de l' $\text{UO}_4$  de l'uranium provenant de l' $\text{UO}_2$ . La différence dans les compositions isotopiques de ces deux composés peut permettre cette distinction : l' $\text{UO}_4$ , qui est un uranium de retraitement, est le seul à contenir de l' $^{236}\text{U}$  (voir Tableau 5). La technique de dosage utilisée est l'ICP-MS.

L'ICP-MS est une technique analytique destinée à quantifier les éléments par spectrométrie de masse à partir d'ions générés par un plasma d'argon à couplage inductif (Figure 18).

La préparation des échantillons pour l'ICP-MS est comparable à celle utilisée pour le KPA, exceptée pour les urines qui peuvent être analysées sans minéralisation préalable (Ejnik *et al.*, 2000a, Ejnik *et al.*, 2005). L'échantillon est introduit dans l'ICP-MS par une pompe péristaltique vers la chambre de nébulisation. Seule une faible fraction de l'échantillon est nébulisée et poursuit son parcours jusqu'à la torche à plasma. Le plasma est induit par une bobine d'induction, sa température est d'environ  $8000^\circ\text{K}$ . Dans le plasma, le gaz est ionisé mais globalement électriquement neutre. Il est caractérisé par la présence d'électrons libres qui permettent l'ionisation des atomes constituant l'échantillon. La transmission des ions se fait par un système à étage de pression et de lentilles. Au niveau du spectromètre de masse, quadripôle constitué de deux paires de barreaux cylindriques, les ions sont séparés en fonction de leur rapport de masse sur charge après application de champs électriques contrôlés sur les barres du quadripôle. Chaque ion arrivant sur le détecteur génère un courant qui est amplifié et analysé par le système d'exploitation.

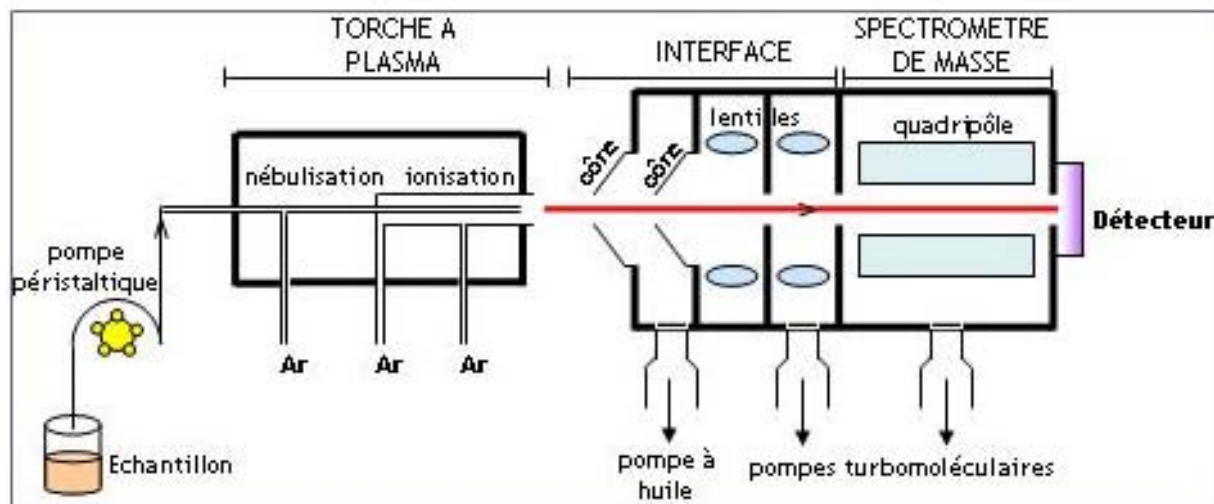


Figure 18 : L'ICP-MS

Le bismuth sert d'étalon interne ( $1\mu\text{g.L}^{-1}$ ), il est ajouté lors de la dilution de l'échantillon à analyser dans de l'acide nitrique ultrapur. Chaque échantillon est dosé cinq fois à partir d'une même dilution. La limite de détection théorique est de  $1,07 \cdot 10^{-4} \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Les critères d'acceptabilité des résultats du dosage de l'uranium à l'ICP-MS sont les suivants :

- Moyenne du nombre de coups sur la solution étalon à 1ppb de bismuth et sur la solution étalon à 1ppb d'U (sur 10 mesures) :  $> 110\,000$  coups sur  $^{238}\text{U}$ .
- Moyenne du nombre de coups sur la solution d'acide de reprise des échantillons : entre 200 et 400 coups (= mesure du bruit de fond).
- Répétitivité de la mesure (sur 10 mesures) :  $< 3\%$ .

Sachant que  $^{236}\text{U}$  n'est présent que dans l' $\text{UO}_4$  de retraitement, la quantité d'uranium venant initialement de cet oxyde est calculée, pour chaque échantillon analysé, à partir de l'isotopie en masse de l' $\text{UO}_4$  de départ, à savoir  $0,061\%$  de  $^{236}\text{U}$ . Un bilan en masse sur les isotopes  $^{238}\text{U}$  et  $^{235}\text{U}$  permet aussi un calcul de la quantité d'uranium provenant de l' $\text{UO}_2$  de départ et de l'uranium naturel.

A partir des échantillons doublement contaminés, la comparaison des techniques KPA et ICP-MS pour le dosage de l'uranium ainsi que le détail des calculs de la quantité d' $\text{UO}_4$  sont présentés dans l'annexe 2 (Frelon *et al.*, 2005). Une comparaison avec la technique de spectrométrie alpha est également détaillée dans cet article.

## Chapitre II.4 - Le test des comètes

Différentes techniques peuvent estimer le potentiel génotoxique de molécules (Figure 19).

- Des tests de mutations géniques. *In vivo*, le but est d'observer des mutations dans un gène endogène comme celui de l'HPRT.
- Des tests de mutations chromosomiques avec le test des micronoyaux.
- Des tests d'altérations primaires de l'ADN avec des tests sur bactéries, le test des comètes, la mesure des adduits à l'ADN.

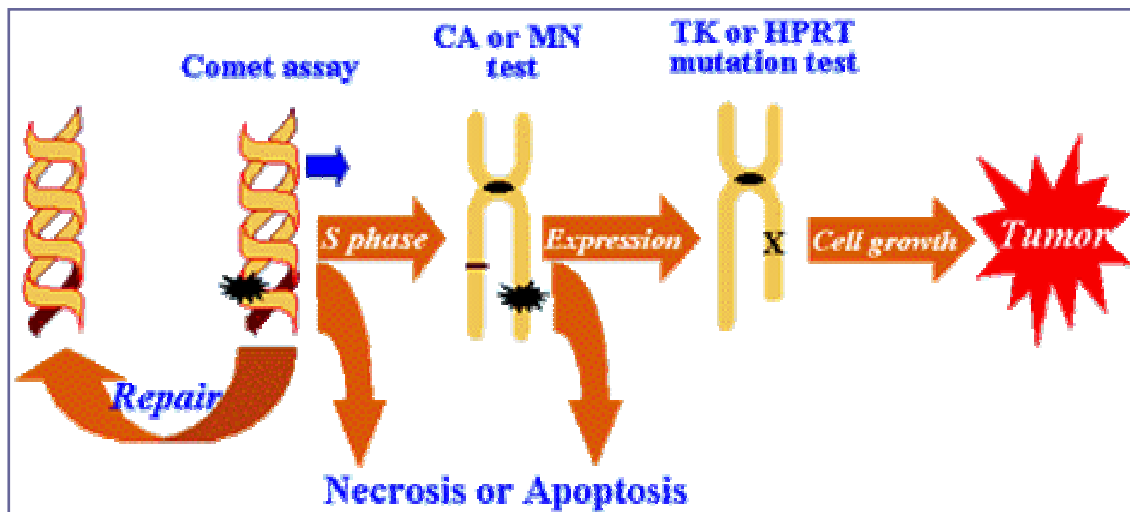


Figure 19 : Différents tests de génotoxicité (Sasaki Y.F.)

CA, chromosomal aberration; MN micronucleus

Dans le cadre de cette thèse, le test des comètes a été choisi pour différentes raisons :

- il permet d'étudier des événements précoces conduisant éventuellement à une mutation,
- il est utilisable sur différents types cellulaires,
- il est extrêmement sensible et peut détecter jusqu'à 100 cassures de brin par génome,
- il ne nécessite qu'un faible nombre de cellules,
- il est facile à mettre en œuvre, notamment lors d'exposition *in vivo*

### II.4.1 - Le test des comètes, principe et applications

Le test des comètes ou "Single Cell Gel Electrophoresis" (SCGE) est défini comme une technique microélectrophorétique rapide, simple et sensible qui permet de visualiser les dommages de l'ADN chez des cellules eucaryotes individuelles ; de nombreuses revues y sont consacrées (Collins, 2002, 2004, Fairbairn *et al.*, 1995, McKelvey-Martin *et al.*, 1993, Olive, 2002, Speit et Hartmann, 2005, Tice *et al.*, 2000). Rydberg et Johanson ont été les premiers à décrire cette technique en utilisant l'acridine orange pour différencier les cassures simple et double brin (Rydberg et Johanson, 1978). Ostling et Johanson ont introduit une étape d'électrophorèse effectuée à pH neutre (Ostling et Johanson, 1984). Les techniques généralement acceptées sont basées sur celles de Singh pour la détection des cassures simple brin (Singh *et al.*, 1988) et de Olive pour les cassures double brin (Olive *et al.*, 1991). Le principal inconvénient est qu'il n'existe pas encore de protocole et de méthode d'interprétation standardisés.

De manière générale et brièvement, après traitement *ex vivo*, *in vitro* et *in vivo*, les cellules isolées sont mélangées à de l'agarose à faible point de fusion et déposées sur des lames précédemment recouvertes d'un gel d'agarose. Les cellules, emprisonnées dans le gel, sont lysées en trempant les lames dans un tampon contenant des détergents et une forte concentration en sels. Les lames sont ensuite déposées dans une cuve d'électrophorèse. Après dénaturation ou non de l'ADN, une électrophorèse est réalisée (Figure 20). Ce test est basé sur la capacité de l'ADN, chargé négativement, de migrer dans le gel d'agarose soumis à un champ électrique. Les cassures au sein de la molécule d'ADN génèrent des fragments dont la distance de migration est inversement proportionnelle à leur taille, les petits fragments migrant plus que les gros. Après la migration, les lames sont neutralisées et fixées. La technique de préparation des lames "sèches" facilite les lectures et surtout permettent de préparer des lames permanentes (Klaude *et al.*, 1996). Après coloration, l'ADN d'une cellule intacte apparaît comme une sphère de 25 à 35  $\mu\text{m}$  de diamètre et l'ADN d'une cellule lésée s'étire proportionnellement au nombre de cassures (Figure 20).

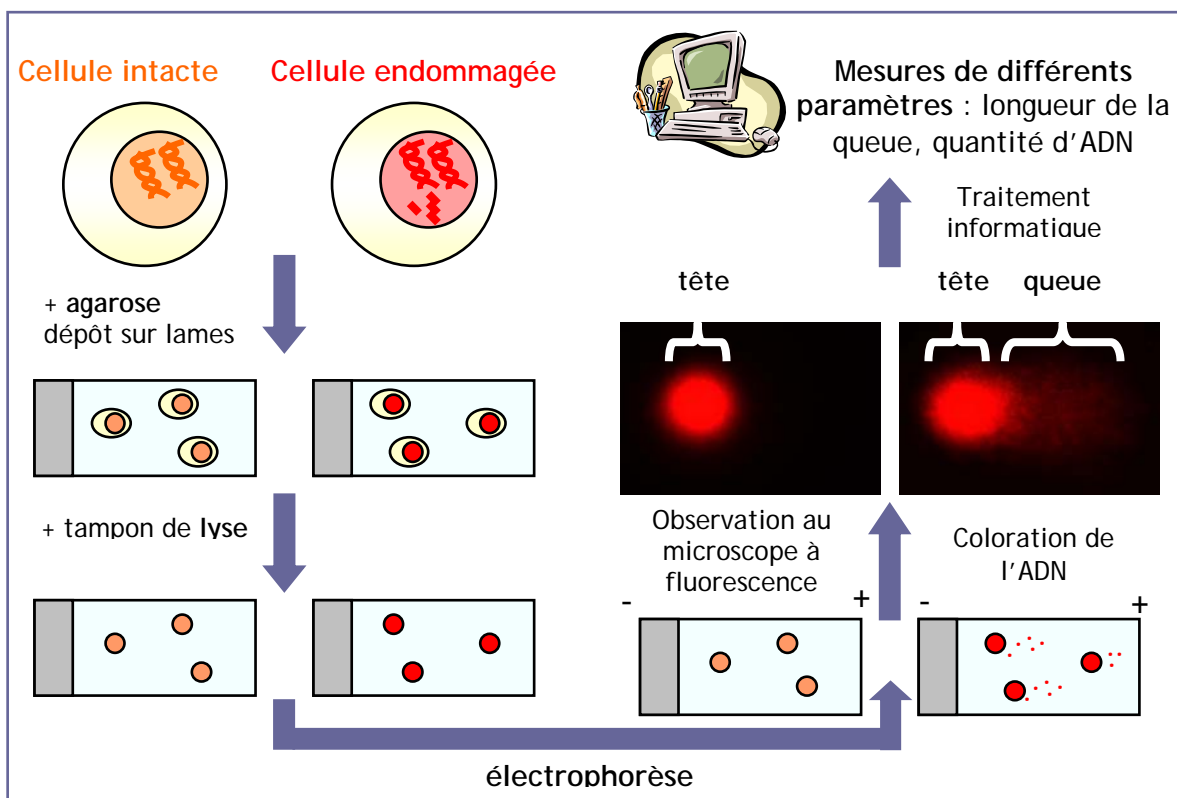


Figure 20 : Principe du test des comètes

Le protocole en condition alcaline permet de détecter les cassures de brin (simple et double) et les sites labiles alcalins. Les cassures simple brin détectables peuvent être des zones de réparation et des cassures simple brin ou des cassures double brin issues de deux cassures simples brins. D'autres types de lésions tels que les adduits, les pontages ... peuvent être révélés indirectement par les systèmes de réparation par excision-resynthèse. Le test des comètes en condition neutre permet quant à lui de détecter uniquement les cassures double brin et les pontages.

L'évaluation des lésions peut s'effectuer d'une façon semi-quantitative et l'utilisation de système d'analyse d'images autorise une évaluation quantitative. Olive et collaborateurs ont en effet défini un paramètre : le "Tail Moment" (TM). Ce facteur donné en unité arbitraire est le produit de la longueur de la comète ( $\mu\text{m}$ ) par le pourcentage d'ADN dans sa partie distale. De plus, l'évaluation de la viabilité est souvent un point essentiel pour interpréter le test des comètes. Des cellules nécrotiques et apoptotiques peuvent par la fragmentation de l'ADN induire de fausses réponses positives. De telles cellules génèrent cependant des comètes atypiques facilement identifiables (Figure 21, (Collins, 2004)).

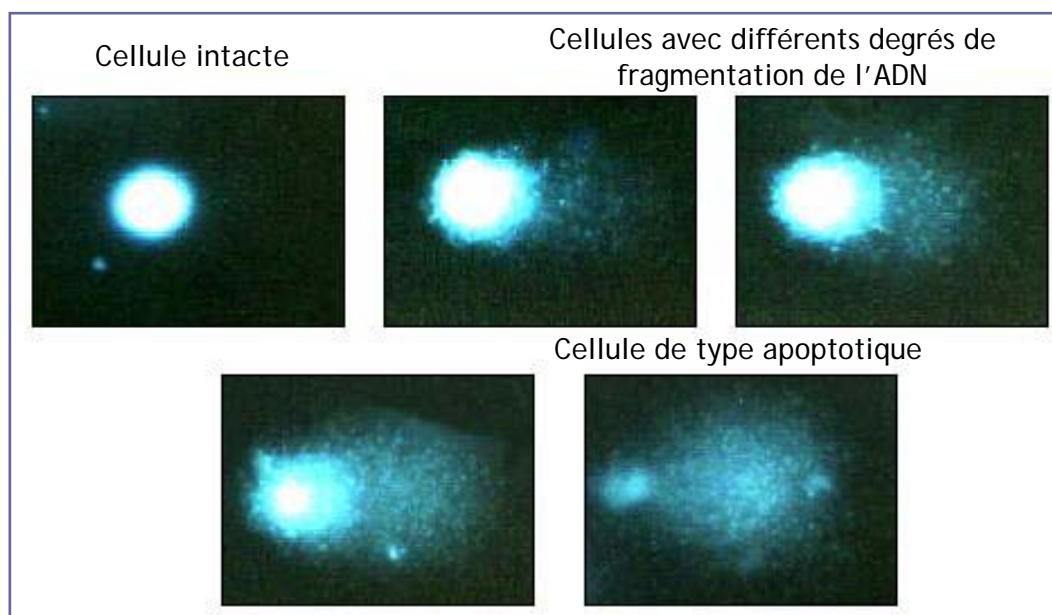


Figure 21 : Différents niveaux de fragmentation de l'ADN observable par le test des comètes (Collins, 2004)

L'interprétation des résultats est souvent délicate et aucune méthode statistique n'est universellement acceptée. Généralement, une analyse, portant sur 50 cellules par lame et 2 lames par dose pour un total de 100 cellules, est considérée comme acceptable. Des comparaisons de moyennes arithmétiques, de modes ou de moyennes géométriques par des tests paramétriques ou non avec les contrôles appropriés, ont été utilisées (Duez *et al.*, 2003, Wiklund et Agurell, 2003). L'interprétation des résultats peut aussi être basée sur une analyse des distributions des TM selon une loi de  $\chi^2$  (Bauer *et al.*, 1998).

L'efficacité du test des comètes a été étudié par Andersen et collaborateurs sur plus de 212 produits (Anderson *et al.*, 1998). Sa sensibilité est de 88%, sa spécificité de 64%, sa prédictibilité pour les agents cancérigènes de 91% et de 41% pour les non cancérigènes. Cependant le test des comètes étant une technique relativement récente et le nombre de non carcinogènes testés étant encore insuffisant. Une autre étude a été réalisée sur 208 composés chimiques *in vivo* sur différents organes de souris ou de rat. Une comparaison avec des études de carcinogénèse a été effectuée (Sasaki *et al.*, 2000). Il en résulte que les organes montrant une augmentation du taux de dommages de l'ADN avec le test des comètes ne sont pas nécessairement les organes cibles de la carcinogénèse. Un effet génotoxique au niveau d'un organe est nécessaire mais insuffisant pour prédire un effet cancérigène. Le test des comètes apparaît donc utile

pour tester l'effet génotoxique *in vivo* de composés génotoxique *in vitro* ; il donne en effet une bonne estimation du potentiel carcinogène du composé (Sasaki *et al.*, 2000).

Des comparaisons entre différentes techniques ont également été réalisées. Sur 117 carcinogènes positifs avec le test d'Ames, qui est un test sur des bactéries largement utilisé comme premier criblage, 110 étaient positifs avec le test des comètes. Le test des comètes, dans cette étude, montre une forte réponse positive pour des carcinogènes génotoxiques et une forte réponse négative pour des composés non-carcinogènes chez le rongeur (Sasaki *et al.*, 2000). Trente six composés pharmaceutiques, dont le potentiel génotoxique était inconnu, ont été testés comparativement avec le test des comètes et le test des micronoyaux sur des cellules V79 de hamster chinois. Un fort degré de concordance a été montré. Cependant, 16 résultats sur 38 sont positifs avec le test des micronoyaux et négatifs dans le test des comètes. Les auteurs expliquent ceci par le fait que certains composés ont un effet aneugène, qui est détecté dans le test des micronoyaux mais pas dans celui des comètes (Hartmann *et al.*, 2001). Treize drogues ont été testées par le test des comètes et par le test d'aberrations chromosomiques sur des cellules V79 de hamster chinois et des lymphocytes humains. L'étude a montré que les résultats obtenus avec les deux tests étaient fortement concordants quel que soit le type de cellules utilisées (Hartmann *et al.*, 2003b).

Le potentiel génotoxique de différentes poudres (cobalt pur, alliages de cobalt, carbure cobalt-tungstène) a aussi été testé. Les résultats d'étude *in vitro* sur des leucocytes humains isolés ont montré que les tests des comètes et des micronoyaux étaient capables de détecter des différences dans les potentiels génotoxiques des poudres testées. Le test des micronoyaux semble moins sensible pour rechercher des effets toxiques synergiques des poudres (Van Goethem *et al.*, 1997).

Dans l'ensemble, le test des comètes est donc particulièrement sensible *in vivo* et donne une bonne indication sur l'effet génotoxique du composé testé.

Le champ d'application du test des comètes s'étend à de nombreux domaines de la toxicologie tels que la toxicologie génétique, la radiobiologie (Garaj-Vrhovac et Kopjar, 2003, Garaj-Vrhovac *et al.*, 2002, Olive, 1999, Tice et Strauss, 1995, Touil *et al.*, 2002), et les études consécutives à l'inhalation de toxiques (Knudsen *et al.*, 2005, Sardas *et al.*, 1998, Speit *et al.*, 2003, Sul *et al.*, 2003). Ce test est de plus en plus préconisé *in vivo* pour confirmer des analyses *in vitro* (Brendler-Schwaab *et al.*, 2005, Hartmann *et al.*, 2004). Il est en outre utilisé dans des applications cliniques et de

biomonitoring (Figure 22) (Collins *et al.*, 1997, Faust *et al.*, 2004, Kassie *et al.*, 2000, Moller *et al.*, 2000, Olive *et al.*, 1999).

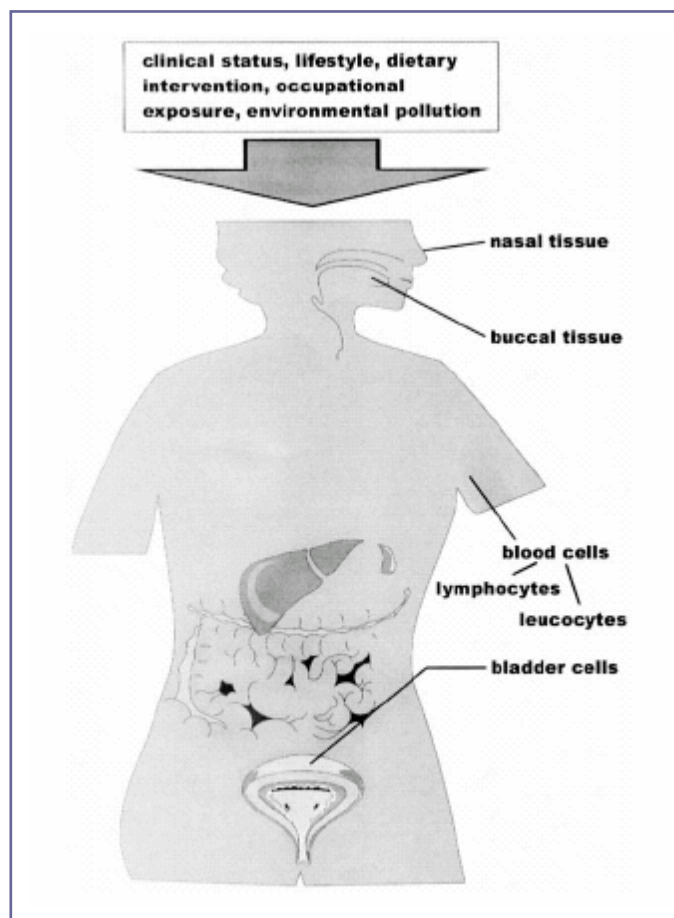


Figure 22 : Tissus humains dont les cellules peuvent être isolées pour le test des comètes en biomonitoring (Kassie, 2000)



## II.4.2 - Le test des comètes dans nos expériences

Le test des comètes en condition alcaline est basé sur les travaux de Singh (Singh *et al.*, 1988) modifié (De Boeck *et al.*, 1998, De Meo *et al.*, 1991, Hartmann *et al.*, 2003a). Le protocole est détaillé dans l'annexe 3.

Le test des comètes en version neutre s'inspire de celui de Singh et collaborateurs (Singh, 2000, Singh *et al.*, 2003). Les différences de protocole (annexe 3), avec celui du test des comètes en condition alcaline, se situent au niveau de la composition du tampon d'électrophorèse (100 mM Tris et 300 mM Sodium acétate, pH 9), du temps passé dans ce tampon et des conditions d'électrophorèse ( $0.4 \text{ V.cm}^{-1}$  (12 V, 100 mA) pendant 1h). Les cassures d'ADN double brin, détectées par le test en condition neutre, sont considérées comme les lésions caractéristiques des rayonnements ionisants, même si elles ne représentent que 5% des dommages totaux (Fairbairn *et al.*, 1995, Iliakis, 1991, Olive, 1999).

Ces protocoles ont été testés *in vitro* sur des cellules issues du lavage broncho-alvéolaire (BAL) isolées à partir de rat non contaminé. Les cellules du BAL ont été mises en contact avec soit uniquement du PBS pour avoir un contrôle négatif, soit de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , soit de l'étoposide pendant 1 heure 30 minutes à 37°C. Le peroxyde d'hydrogène est un composé chimique connu pour induire majoritairement des cassures simple brin. L'étoposide (Sigma E1383) est quant à lui un radiomimétique induisant non seulement des cassures simple brin mais aussi des cassures double brin. C'est un inhibiteur des topoisomérases II qui produit des cassures double brin au niveau des sites de liaison des topoisomérases II à l'ADN. Ces agents induisent des lésions de l'ADN assez hétérogènes (Olive et Banath, 1993, Olive et Durand, 2005). Après la période d'exposition des cellules, le test des comètes en conditions alcaline et neutre a été réalisé en utilisant un duplicate par condition de test des comètes et d'exposition. Cent cellules par condition, à raison de 50 par lame, ont été analysées. La comparaison des médianes des OTM est faite avec un test statistique de Mann-Whitney. Les résultats sont présentés ci-après (Figure 23).

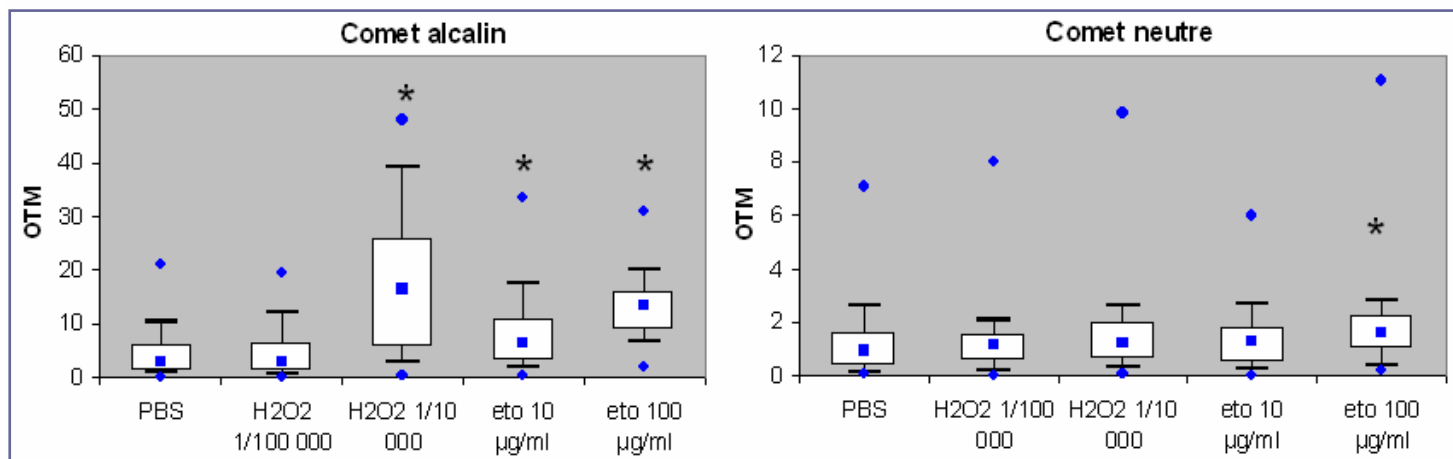


Figure 23 : Test des protocoles du test des comètes, conditions alcaline et neutre

eto = étoposide

Le peroxyde d'hydrogène au 1/10 000 induit une réponse hétérogène et très forte avec le test des comètes en condition alcaline (médiane des OTM à 16,3 comparée à celle du contrôle à 2,9) ; en revanche aucune cassure n'est détectée par le test des comètes en condition neutre (médiane OTM = 1,2 comparée à 0,98). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'induit donc bien que des cassures simple brin, détectées seulement par le test en condition alcaline. L'étoposide induit des dommages de l'ADN détectés en condition alcaline, la plus forte dose testée induisant le plus de dommage (médiane OTM avec l'étoposide à 10 µg.ml<sup>-1</sup> = 6,2 et médiane OTM avec l'étoposide à 100 µg.ml<sup>-1</sup> = 13,3, comparées à 2,9). En revanche, seule la dose d'étoposide la plus forte induit des cassures double brin observables avec le test des comètes en condition neutre (médiane OTM avec l'étoposide à 10 µg.ml<sup>-1</sup> = 1,3 et médiane OTM avec l'étoposide à 100 µg.ml<sup>-1</sup> = 1,6, comparées à 0,98). L'étoposide, dans nos conditions, induit bien des dommages détectables par le test en condition alcaline ; les cassures double brin sont détectées par le test en condition neutre à partir d'une dose plus importante que celle nécessaire pour induire des dommages observables par le test en condition alcaline.

*In vivo*, le test des comètes en condition alcaline a été réalisé, le jour même de l'euthanasie, sur les types cellulaires suivants : les cellules épithéliales nasales isolées par incubation enzymatique *in situ* ((Steele et Arnold, 1985)), les cellules du BAL, les cellules rénales isolées par incubation enzymatique ((Robbiano *et al.*, 1996, Sasaki *et al.*, 1997)) et les cellules du sang total (Chuang et Hu, 2004). Les techniques d'isolement des différents types cellulaires sont également présentées en annexe 3. En effet, les essais après congélation, (24h) sur les cellules du rein et du foie (Hu *et al.*,

2002), n'ayant pas été concluants, même en présence d'un cryoprotecteur, le test a été fait sur un maximum de types cellulaires différents le jour même de l'euthanasie. Le test des comètes en condition neutre a aussi été réalisé, le jour même de l'euthanasie, sur les cellules du BAL.

Le test des comètes (condition alcaline et neutre) *in vivo* est réalisé systématiquement sur 3 rats par type d'exposition et par temps d'euthanasie. Chaque condition, c'est-à-dire un type cellulaire/ rat/ temps d'euthanasie/ type d'exposition, est réalisée en duplicate, 50 cellules par lame sont lues, ce qui conduit à l'obtention de 100 OTM pour une condition.

L'analyse des résultats est basée sur le paramètre OTM (Olive Tail Moment) défini comme le produit du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète par la distance entre les barycentres de la tête et de la queue (Olive *et al.*, 1990) et calculé et par le logiciel Komet 5.5 (OTM = (Tail.mean - Head.mean) x Tail%DNA/100 (Kinetic Imaging, 2001)).

Enfin, l'analyse statistique des résultats *in vivo* est basée sur les travaux de Bauer et collaborateurs (Bauer *et al.*, 1998). Il est important de souligner que les réponses individuelles sont hétérogènes et les distributions des paramètres (TM, OTM ...) ne sont pas gaussiennes. L'utilisation de tests paramétriques basés sur les moyennes et les écarts types n'est pas adéquate. Il est donc intéressant d'utiliser un paramètre global afin de prendre en compte ces considérations. Bauer et collaborateurs ont proposé une analyse sur les distributions (fréquences) des valeurs individuelles (Bauer *et al.*, 1998). Ils ont effectué une régression non linéaire selon une fonction chi2. La particularité de cette fonction est que sa forme change en fonction de son degré de liberté n. Ce paramètre peut être utilisé comme un paramètre global. Lorsque n augmente (cellules endommagées), la fonction tend vers une forme gaussienne (Jean *et al.*, 2001) et il faut que n soit supérieur à 2 pour traduire correctement les distributions obtenues avec le test des comètes.

$$\text{Fonction chi2 : } P(\chi^2) = \frac{(\chi^2)^{\frac{n}{2}-1} \times e^{-\frac{1}{2}\chi^2}}{2^{\frac{n}{2}} \times \Gamma\left(\frac{n}{2}\right)} \quad \text{avec la fonction gamma tel que : } \Gamma\left(\frac{n}{2}\right) = \int_0^{\infty} e^{-t} \times t^{\frac{n}{2}-1} dt$$

A partir des paramètres individuels (c'est-à-dire les 100 OTM obtenus par l'analyse d'un duplicate), il est donc possible d'obtenir la distribution de ces valeurs, et ceci en passant par la détermination de fréquences normalisées. L'utilisation du logiciel TableCurve 2D (Jandel, version 5.0) permet ensuite de trouver l'équation de la fonction

chi2 qui représente le mieux cette distribution et de déterminer la valeur du degré de liberté n, qui est renommé OTMchi2. On obtient donc une valeur OTMchi2 par condition (un type cellulaire / rat / temps d'euthanasie / type d'exposition). Pour comparer, à un temps t, les réponses au niveau d'un type cellulaire entre deux groupes d'animaux exposés différemment, on compare donc les moyennes des 3 valeurs OTMchi2 obtenues (puisque 3 rats par type d'exposition et par temps d'euthanasie) avec :

$$\varepsilon = \frac{Moy_A - Moy_B}{\sqrt{ET_A^2 + ET_B^2}}$$

si epsilon > 1.96 : p < 0.05 %  
si epsilon > 2.576 : p < 0.01 %  
si epsilon > 3.29 : p < 0.001 %

## Chapitre II.5 - Les effets sur le comportement

Dans le but d'aborder les effets de l'uranium inhalé sur certaines fonctions cognitives des animaux, des dosages de l'uranium dans certaines structures du cerveau et des tests de comportements ont été réalisés. Ces tests ont été effectués uniquement avec des animaux exposés de manière répétée à l' $UO_2$ .

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, il n'y a pas d'étude sur ce sujet après inhalation d'uranium. Cependant, des études récentes ont étudié l'accumulation de l'uranium ou le comportement après d'autres modes de contamination (Bussy, 2005). Après l'incorporation, l'uranium est en effet capable de s'accumuler, de manière hétérogène, dans différentes structures du cerveau, comme cela a été montré suite à des implants d'uranium appauvri (Pellmar *et al.*, 1999a, Pellmar *et al.*, 1999b), à de l'injection intra-péritonéale (Barber *et al.*, 2005), à de l'ingestion (Paquet *et al.*, 2005). Une étude a montré le passage de l'uranium au travers de la barrière hémato-encéphalique, après perfusion d'une solution d'uranium naturel ( $5.10^{-6} \text{mol.L}^{-1}$ ) directement dans l'artère carotide interne (Lemercier *et al.*, 2003). Ces dépôts d'uranium dans des régions cérébrales particulières pourraient être concomitants au développement d'altérations comportementales, observées après ingestion, en particulier l'augmentation de la locomotion spontanée (Bellés *et al.*, 2005, Briner et Murray, 2005)). Lestaevel *et al.* ont montré qu'une injection d'uranium appauvri sub-néphrotoxique (i.p. à  $144 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) abaissait la quantité de sommeil paradoxal le troisième jour après l'injection (Lestaevel *et al.*, 2005). Avec une quantité moindre ( $70 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), aucun effet n'a pu être observé.

Le bulbe olfactif est une structure importante à prendre en compte dans le cas de contamination par inhalation. En effet, les neurones olfactifs sont en contact à la fois avec la muqueuse nasale et le bulbe olfactif en traversant les os du crâne (Figure 24).

Les structures, dans lesquelles l'uranium a été dosé, sont le bulbe olfactif, le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet (Figure 25). Ces dosages permettent à la fois de compléter les données biocinétiques après contamination à l'uranium par inhalation et de corrélérer d'éventuels effets comportementaux avec une localisation particulière de l'uranium (Article 3).

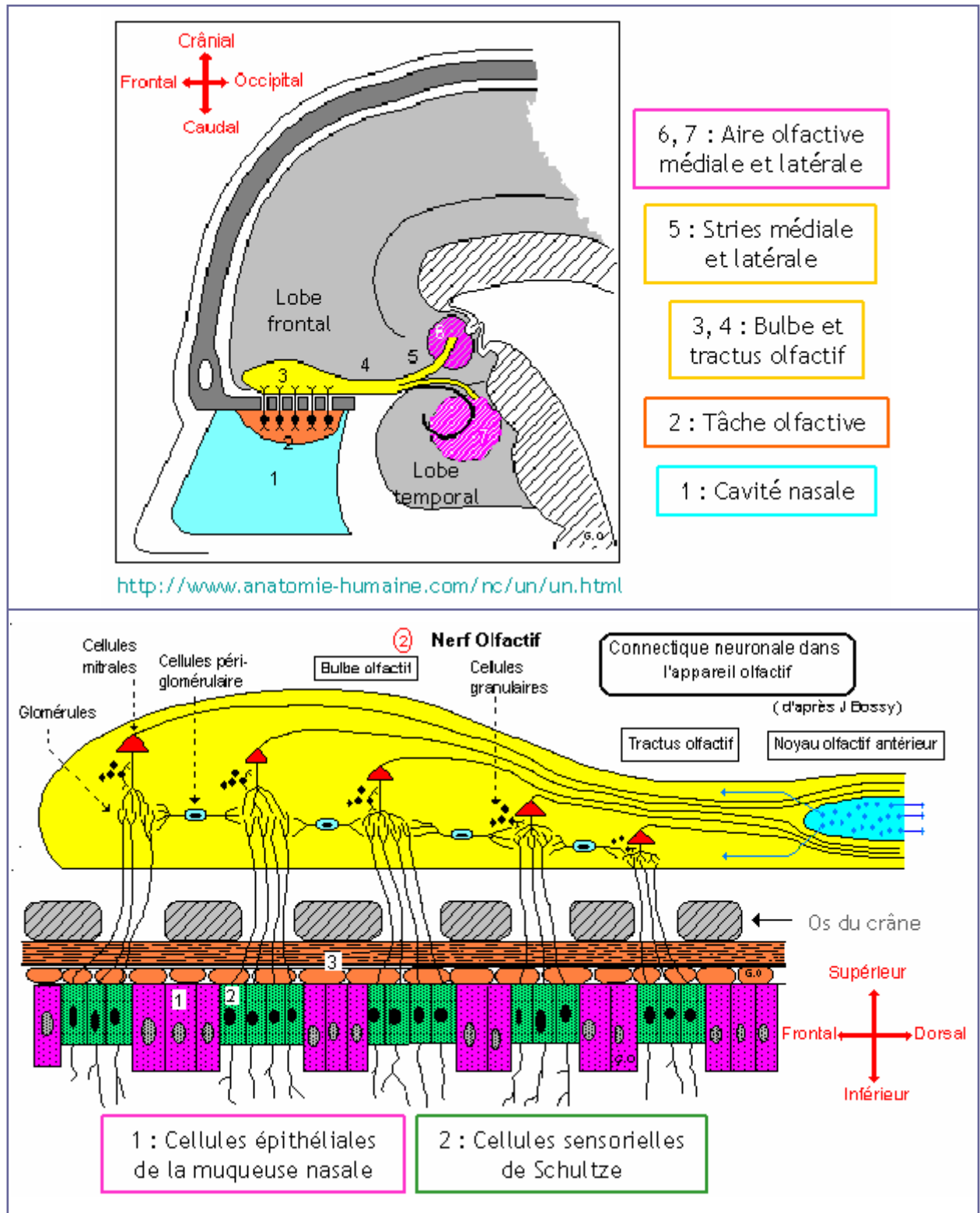
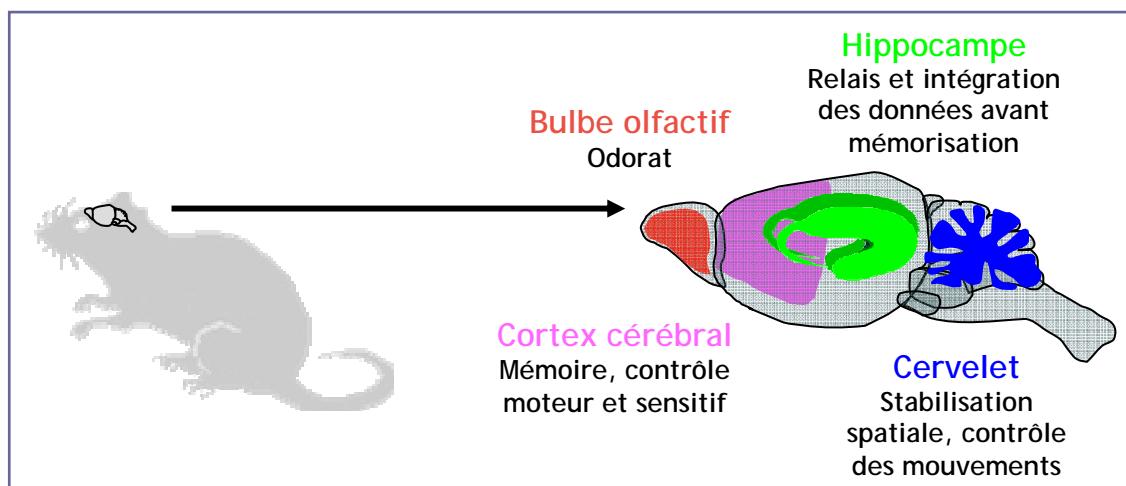


Figure 24 : Anatomie du système olfactif



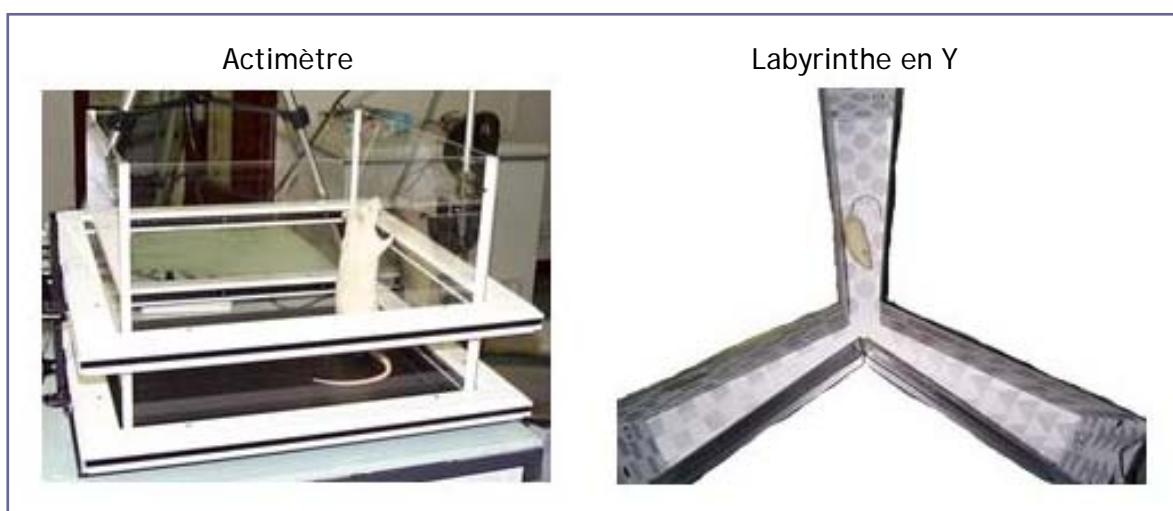
*Figure 25 : Structures cérébrales, prélevées pour le dosage de l'uranium, et leurs fonctions principales*

Pour les tests de comportements, les rats sont amenés dans la pièce dédiée à cette activité au moins 24h avant le début des tests pour permettre une acclimatation (Article 3).

Le premier test réalisé est celui de l'activité motrice (Figure 26). Deux actimètres automatiques (carré de 45 X 45 cm) permettent d'enregistrer, grâce à des cellules infrarouges, l'activité horizontale et les redressements de l'animal (Bioseb, France). Les cellules infrarouges, à 2 cm de hauteur, sont espacées tous les 2,5 cm pour mesurer les mouvements horizontaux tandis qu'une cellule à 16 cm de hauteur permet de mesurer les mouvements verticaux. L'enregistrement, par un système vidéo composé de deux caméras reliées à un magnétoscope et à un écran TV, permet un éventuel contrôle a posteriori. L'activité motrice est mesurée automatiquement sur chaque période de 5 min au cours d'une séance de 20 min par rat. Les redressements et les déplacements horizontaux sont comptabilisés séparément. Les actimètres sont essuyés avec un papier imbibé d'eau entre deux rats afin de ne pas perturber l'activité des rats suivants.

Le labyrinthe en Y, qui est un test de mémoire de travail spatial, est réalisé le lendemain du test de l'actimètre (Figure 26). Le labyrinthe en Y (PVC) est formé de trois branches de 70 cm de long, 50 cm de haut, 10 cm de large au centre et 20 cm de large aux extrémités, les branches convergeant à angles égaux. Les parois intérieures sont tapissées de vinyle formant des motifs différents par branche en noir, gris et blanc et respectant une luminosité équivalente. Une caméra vidéo est reliée à un magnétoscope et un écran. Le rat est placé au centre du labyrinthe pour une séance de 10 minutes. La séance est filmée. Le labyrinthe est essuyé avec un papier imbibé d'eau

entre deux rats. La lecture se fait a posteriori sur l'enregistrement. Les branches visitées sont notées. Une alternance est définie comme étant la visite des trois différentes branches successivement (Pothion *et al.*, 2004). Les variables suivantes sont relevées : le nombre total de visites et le pourcentage d'alternance. Ce dernier correspond au rapport suivant :  $100 \times \text{nombre d'alternances} / \text{nombre maximum d'alternance possible}$ .



*Figure 26 : Les tests de comportements*



## Chapitre II.6 - Les groupes d'exposition

Différents types d'exposition par inhalation ont été réalisés : des expositions aiguës, répétées et des doubles expositions, impliquant à la fois l'UO<sub>2</sub> et l'UO<sub>4</sub>. Les différentes inhalations sont récapitulées dans le Tableau 9. Chaque type d'exposition correspond à un groupe de rats.

*Tableau 9 : Les différentes expositions par inhalation*

Inhalation	Nom du groupe	Temps de l'inhalation	Concentration des aérosols (cf. Tableau 7)	Charge pulmonaire à J1
aiguë UO <sub>2</sub>	AcUO2-1	30 min	190 mg.m <sup>-3</sup>	46 µg.g <sup>-1</sup>
aiguë UO <sub>2</sub>	AcUO2-2	2 h	375 mg.m <sup>-3</sup>	420 µg.g <sup>-1</sup>
aiguë UO <sub>2</sub>	AcUO2-3	3 h	375 mg.m <sup>-3</sup>	650 µg.g <sup>-1</sup> (estimé)
répétée UO <sub>2</sub>	RepUO2 n°1	1 h, 2 j/sem, pendant 3 sem	190 mg.m <sup>-3</sup>	496 µg.g <sup>-1</sup>
répétée UO <sub>2</sub>	RepUO2 n°2	30 min, 4 j/sem, pendant 3 sem	190 mg.m <sup>-3</sup>	504 µg.g <sup>-1</sup>
aiguë UO <sub>4</sub>	AcUO4	30 min	116 mg.m <sup>3</sup>	65 µg.g <sup>-1</sup>
aiguë UO <sub>2</sub> puis aiguë UO <sub>4</sub>	AcUO2+UO4	UO <sub>2</sub> : 3 h à 375 mg.m <sup>-3</sup> UO <sub>4</sub> : 30 min à 116 mg.m <sup>3</sup>		506 µg.g <sup>-1</sup>
répétée UO <sub>2</sub> puis aiguë UO <sub>4</sub>	RepUO2+UO4	UO <sub>2</sub> : 30 min, 4 j/sem, pendant 3 sem à 190 mg.m <sup>-3</sup> UO <sub>4</sub> : 30 min à 116 mg.m <sup>3</sup>		555 µg.g <sup>-1</sup>
air	Control	Plusieurs types		

Si l'on considère la charge pulmonaire en uranium suite à ces expositions, les expositions répétées d'UO<sub>2</sub> sont proches des inhalations aiguës d'UO<sub>2</sub>, AcUO2-2 et AcUO2-3. L'inhalation aiguë d'UO<sub>2</sub>, AcUO2-1, se rapproche de l'inhalation aiguë d'UO<sub>4</sub>.

Les **doubles expositions** sont réalisées sur des groupes d'animaux différents et combinent soit une exposition aiguë d'UO<sub>2</sub> (identique au groupe AcUO2-3) suivie de l'inhalation aiguë d'UO<sub>4</sub> (nom du groupe : AcUO2+UO4), soit une exposition répétée d'UO<sub>2</sub> (identique au groupe RepUO2 n°2) suivie de l'inhalation aiguë d'UO<sub>4</sub> (nom du groupe : RepUO2+UO4). L'inhalation d'UO<sub>4</sub> est effectuée, dans les deux cas, 11 jours après la fin de l'exposition d'UO<sub>2</sub>. Ce délai correspond au temps nécessaire à la fois au nettoyage de la boîte à gants et à l'élimination de l'UO<sub>2</sub> dans les urines.

Les différentes inhalations aiguës d'UO<sub>2</sub> permettent d'étudier l'effet de la dose. L'effet de la solubilité est, quant à lui, étudié à l'aide des inhalations aiguës d'UO<sub>2</sub> et

d'UO<sub>4</sub>. Enfin, les inhalations répétées et aiguë d'UO<sub>2</sub> ont été réalisées pour définir l'effet du type d'exposition. Quant aux doubles expositions, elles permettent l'étude à la fois de l'effet combiné et du type d'exposition.

Les jours d'euthanasie pour ces différents groupes d'animaux sont présentés dans la Figure 27.

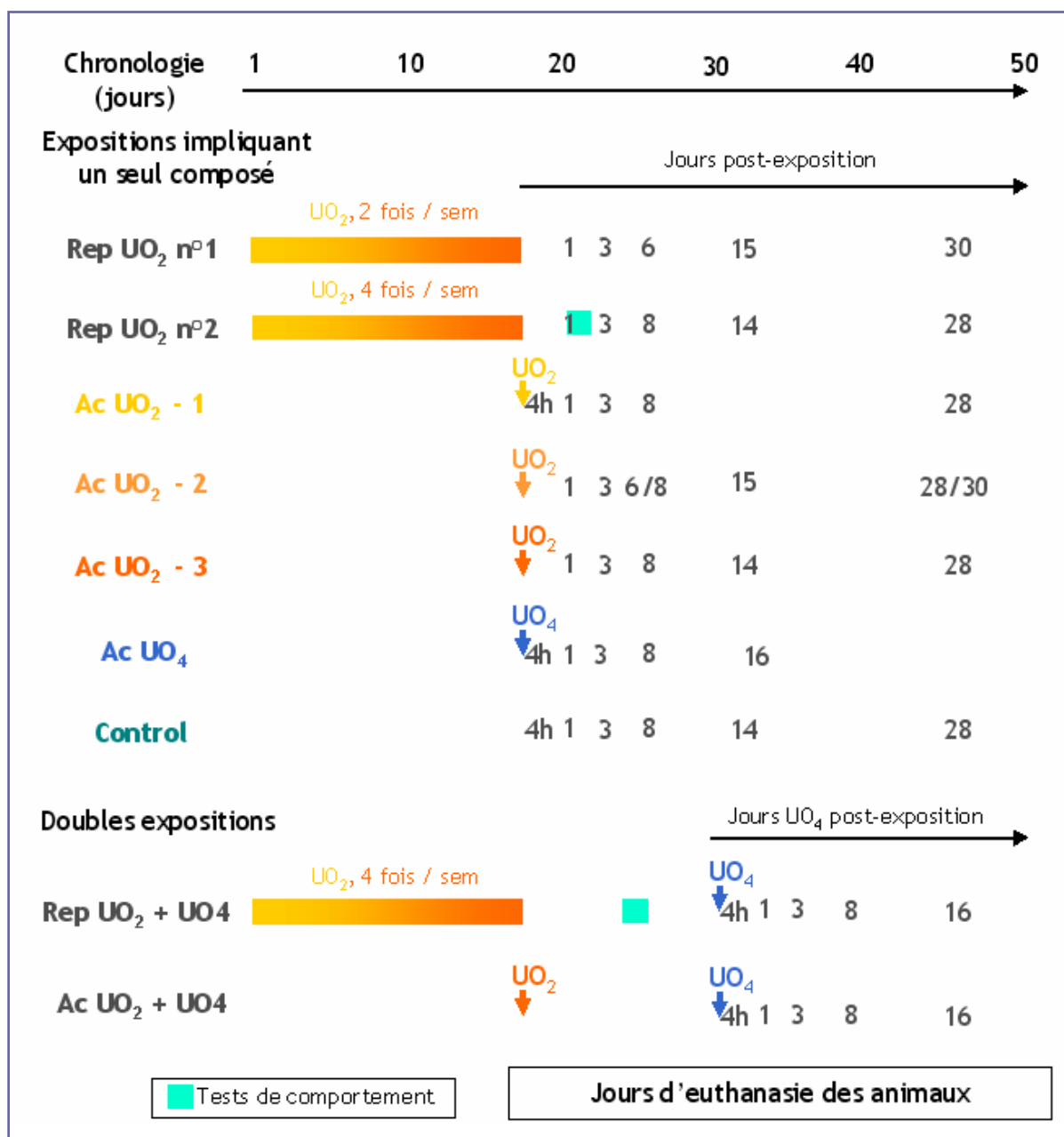


Figure 27 : Les différents groupes de rats et les temps d'euthanasie

Les rats destinés à l'étude de biocinétique ne sont pas les mêmes que ceux destinés à l'étude de génotoxicité. En effet, la mesure de l'uranium est effectuée sur la totalité des organes, l'étude génotoxique nécessite donc d'autres animaux. Il n'y a pas

eu d'étude génotoxique pour le groupe RepUO2 n°1 ni d'étude biocinétique complète pour le groupe AcUO2-3. Les données de biocinétique des différents groupes sont dans l'annexe 4 pour les principaux organes cibles et les excréta.

Pour l'étude de génotoxicité, 3 rats sont euthanasiés par groupe et par temps d'euthanasie ; pour l'étude biocinétique, entre 3 et 5 rats par groupe et par temps sont euthanasiés.

L'ensemble des conditions expérimentales est repris dans les différents articles présentés dans le chapitre, Résultats, suivant.



Chapitre III -

RESULTATS



## Chapitre III.1 - Test de l'hypothèse mathématique des modèles de la CIPR : Comparaison modèle / expérience

Le premier axe de cette thèse consistait à tester le modèle chronique de la CIPR qui indique qu'il est possible de modéliser une contamination chronique par la somme d'incorporations aiguës successives et indépendantes. Pour ce faire, une première approche consiste à comparer des biocinétiques expérimentales obtenues chez le rat avec des biocinétiques théoriques obtenues à partir du modèle « Homme » modifié pour le rat.

### III.1.1 - Construction du modèle « Rat » et comparaison des biocinétiques expérimentales et théoriques

#### III.1.1.1 - Résumé de l'article 1

L'évaluation des risques suite à l'inhalation de particules d'uranium passe par l'estimation de la quantité incorporée et de la dose reçue. Cette estimation peut se faire grâce aux dosages de l'uranium dans des échantillons biologiques (en général urine ou fèces) et aux modèles biocinétiques de la CIPR. Les modèles représentent une exposition répétée comme la somme d'incorporations aiguës successives et indépendantes. Cette représentation a été testée en comparant les biocinétiques théoriques et expérimentales obtenues chez des rats exposés à de l'uranium insoluble par inhalation répétée.

Dans un premier temps, un modèle biocinétique adapté à notre modèle animal, le rat, mais basé sur les modèles de la CIPR, a été construit à partir de données biocinétiques expérimentales obtenues après une exposition aiguë à l' $UO_2$  (groupe AcUO2-2 correspondant au groupe AcUO2 dans l'article 1). Ce modèle modifié pour le rat (Article 1 - Figures 2, 3, 4, 5 et Tables 1, 2, 3, 4) a permis de calculer les fonctions biocinétiques théoriques qui seraient obtenues suite à des inhalations répétées d' $UO_2$ .

Deux types d'exposition répétée d' $UO_2$  ont été modélisés et réalisés expérimentalement afin de tester l'adéquation du modèle avec les résultats : 1 h à  $190 \pm 41 \text{ mg.m}^{-3}$ , 2 j/sem, pendant 3 semaines (RepUO2 n°1) et 30 min à  $190 \pm 41 \text{ mg.m}^{-3}$ , 4

j/sem, pendant 3 semaines (RepUO<sub>2</sub> n°2). Ces deux expositions répétées permettent de tester le modèle deux fois en modifiant la fréquence des inhalations, sans faire varier la durée totale d'exposition et la charge pulmonaire finale. Les concentrations en uranium après exposition sont mesurées dans différents organes (poumons, reins, TGI et fémurs) et les excréta.

L'analyse des paramètres généraux de santé montre que les animaux réagissent différemment à une exposition aiguë et à une exposition répétée. L'inhalation aiguë d'UO<sub>2</sub> induit une baisse transitoire de la consommation alimentaire qui se traduit par une diminution du poids. En revanche aucune perturbation n'est observée suite aux expositions répétées.

La comparaison des deux biocinétiques expérimentales de l'UO<sub>2</sub>, après expositions répétées, ne montre pas de différence de concentration en uranium dans la majorité des organes étudiés, exception faite du tractus gastro-intestinal (TGI). Quinze jours après l'exposition, la concentration d'uranium dans le TGI des animaux exposés deux fois par semaine est comparable à celle des animaux témoins ; en revanche celle des animaux exposés quatre fois par semaine est 1,5 fois supérieure à celle des témoins ( $p < 0,05$ ). Cette observation, qui devra être confirmée ultérieurement, pourrait être expliquée par un effet de la fréquence d'exposition. L'augmentation de la fréquence d'exposition, à quantité totale d'uranium inhalée équivalente, pourrait légèrement modifier les mécanismes de remontée mucociliaire ou d'accumulation de l'uranium dans le TGI.

La comparaison des biocinétiques expérimentales d'exposition répétée avec les biocinétiques théoriques correspondantes (Article 1 - Figures 6, 7 et Tables 5, 6) montre que le modèle permet de décrire correctement les résultats obtenus expérimentalement pour les excréta et la majorité des organes testés. Les écarts observés peuvent être expliqués par le fait que le modèle établi pour le rat n'est pas parfait et qu'il ne prend pas en compte le taux de contamination naturel. Le tissu osseux constitue cependant une exception notable. Pour les deux expositions répétées testées, les concentrations théoriques calculées par le modèle sont trois fois plus importantes dans l'os que celles mesurées expérimentalement. Une des hypothèses, qui permettrait d'expliquer cette différence, serait que l'uranium déposé après la première inhalation induit une toxicité osseuse. Des effets de l'uranium sur l'os ont en effet déjà été décrits, en particulier une diminution du taux de formation et une augmentation du



taux de résorption de l'os. Ces effets pourraient diminuer la rétention osseuse de l'uranium inhalé par la suite et, par conséquent, la rétention osseuse de l'uranium après exposition répétée ne pourrait pas être modélisée par une itération d'expositions aiguës indépendantes.

Dans nos conditions expérimentales, aucune incorporation n'a d'effet significatif sur la biocinétique des incorporations suivantes. L'utilisation itérative du modèle de la CIPR, pour décrire les biocinétiques après expositions répétées, semble correcte pour la plupart des organes testés et les excréta, excepté pour le squelette où le modèle surestime la rétention de l'uranium.

### III.1.1.2 - Article 1 - The effect of repeated inhalation on the distribution of uranium in rats

Article accepté dans "*Journal of Toxicology and Environmental Health*"

Marjorie Monleau<sup>1</sup>, Eric Blanchardon<sup>2</sup>, Marie Claraz<sup>1</sup>, François Paquet<sup>1</sup>, Valérie Chazel<sup>1</sup>

1 IRSN/DRPH/SRBE/LRTOX, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale, BP 166, 26702 Pierrelatte Cedex, France

2 IRSN/DRPH/SDI/LEDI, Laboratoire d'Evaluation de la Dose Interne, BP17, 92262 Fontenay aux Roses Cedex, France

Keywords: Uranium, rat, chronic exposure, inhalation, ICRP model

Les valeurs des quantités expérimentales en uranium présentées dans les figures 5, 6 et 7 de l'article 1 sont données dans l'annexe 4. L'annexe 4 contient aussi d'autres données de biocinétique, en particulier celle du groupe AcUO2-1.

## Abstract

For the assessment of doses after inhalation of airborne uranium compounds by workers, the International Commission on Radiological Protection (ICRP) developed compartmental models that are used to calculate reference dose coefficients, retention and excretion functions. It is assumed that each acute intake has no effect on the biokinetics of later intakes. Consequently, retention and excretion after multiple or chronic exposure are predicted using the same models as after acute exposure. This assumption was tested here on rats exposed to repeated inhalation of uranium dioxide ( $\text{UO}_2$ ). First, excretion and organ retention were determined after a single inhalation of  $\text{UO}_2$ . The follow-up of incorporated activity was used to design a biokinetic model for uranium inhaled by rats. Second, the biokinetics of uranium were monitored in two experiments of repeated inhalations of uranium dioxide under different intake patterns. For these two experiments, the organs retention and excretion after repeated  $\text{UO}_2$  inhalation were predicted using the biokinetic model and compared to the experimental measurement. Under the two sets of experimental conditions considered, the prediction of the biokinetic model based on acute exposure data was consistent with the biokinetics observed after repeated  $\text{UO}_2$  inhalations, with the possible exception of retention in the skeleton.

## Introduction

Uranium (U) is a natural radioactive element in the actinides group. Uranium, with its different isotopic compositions (natural, depleted, enriched), has numerous industrial and military uses (Craft et al., 2004). In the nuclear fuel cycle facilities, workers could face the inhalation of airborne uranium compounds leading to internal contamination (Fulco et al., 2000).

Evaluation of the risks from U inhalation requires estimating the level of exposure. The mobilization and systemic distribution of U cannot be directly measured in humans but must be inferred from the rate of urinary or fecal excretion using a biokinetic model (McDiarmid et al., 2002; Stradling et al., 2003; McDiarmid et al., 2004). In the case of contamination by inhalation, the human respiratory tract model described by the International Commission on Radiological Protection (ICRP) (ICRP, 1994) and the U systemic model of ICRP (ICRP, 1995) are used to design monitoring programs and interpret activity measurements (Bailey et al., 2003). The models are used to calculate dose coefficients, retention and excretion functions. To date, most of the available data come from acute or short-term exposures and models are based on these acute, time-limited data.

Inhalation of uranium may be either acute or chronic. It is assumed in the models that acute or chronic exposure to uranium has no effect on its biokinetics (ICRP, 1979). Consequently, the retention and excretion after multiple or chronic exposure are predicted using the same models as after acute exposure, and are expected to be the sum of the contributions of the multiple intakes. This hypothesis is probably true in many cases, but may be questioned in some situations. Benson et al. (1992, 1995) showed that repeated inhalation of nickel oxide (NiO) impairs lung clearance of subsequently inhaled NiO showing that the knowledge acquired from situations of acute exposure cannot automatically be extrapolated to situations of protracted exposure.

Our study questions the hypothesis that the same model can be applied to predict excretion and retention after both acute and chronic U inhalation. For that purpose, the design of a biokinetic model, presented here, for the rat was based on experimental data collected after a single acute inhalation of uranium dioxide (UO<sub>2</sub>). Then, this model was applied to predict biokinetics of U after repeated inhalation in two different patterns. Finally, the theoretical prediction of the model was compared to the experimental biokinetics in order to discuss the possible observation of a discrepancy related to biokinetic effects specific to the repeated inhalation.

## Materials and Methods

### Animals

Sixteen-week old, pathogen-free adult male OFA Sprague Dawley rats weighing  $552\text{g} \pm 36\text{g}$  were obtained from Charles River Laboratories, France. Rats were housed by pairs in traditional cages and placed individually in metabolism cages at given times. In a first series of experiments, 46 rats were divided into three groups. Group RepUO<sub>2</sub> n°1 (16 rats) was exposed to repeated UO<sub>2</sub> inhalation, group AcUO<sub>2</sub> (18 rats) was exposed to a single UO<sub>2</sub> inhalation and group C (12 rats) was the control group. In a second series, another group RepUO<sub>2</sub> n°2 (16 rats) was exposed to repeated UO<sub>2</sub> inhalation at different intake patterns. The general health parameters of the rats (animal weight, food and water consumption) were monitored weekly throughout the experiments. The study was conducted in accordance with French legislation concerning the protection of animals used for experimental purposes.

### Aerosol generation

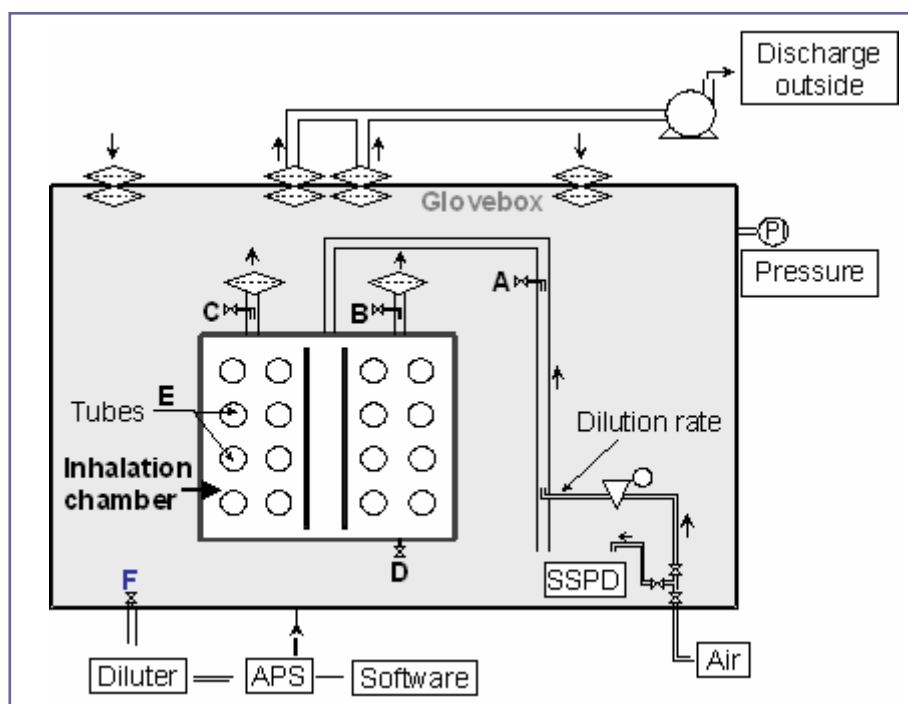
The industrial UO<sub>2</sub> powder found at workplaces in U fuel cycle facilities was supplied by COGEMA (FRANCE). The UO<sub>2</sub> characteristics were insoluble U with specific alpha activity =  $13.10^3 \text{ Bq.g}^{-1}$ ; density =  $11.44 \text{ g.cm}^{-3}$ ; isotopic composition by mass: <sup>238</sup>U = 99.755%, <sup>235</sup>U = 0.244%, <sup>234</sup>U = 0.001%, <sup>236</sup>U < 0.0003%, <sup>232</sup>U < 0.00001%.

The UO<sub>2</sub> aerosols were generated using a Small-Scale Powder Dispenser (SSPD, model 3433, TSI, USA) which disperses small quantities of powder by lifting particles from a turntable using a venturi vacuum. The concentrated aerosol flow was mixed with a second regulated flow of clean air to create the total airflow, with the required dust aerosol concentration, for introduction into the top of the inhalation chamber. The total airflow introduced into the chamber, regardless of dust concentration, was 41.5 l/min.

The particle size distribution of the aerosols administered to the rats was determined using a cascade Andersen impactor and an Aerodynamic Particle Sizer (APS, model 3310A, combined with a diluter, model 3302, TSI, USA) (Peters and Leith, 2003). Sixty-eight % particle mass presented an aerodynamic diameter in the range 0.4 - 9 µm. With the impactor, the aerodynamic median activity diameter (AMAD) was 2.53 µm (geometric standard deviation, gsd = 1.93). With the APS, the mass median aerodynamic diameter of the UO<sub>2</sub> particles was 1.8 µm (gsd = 1.66) and the number median aerodynamic diameter = 0.91 µm (gsd = 1.48).

### Aerosol administration

The aerosol was administered using a nose-only inhalation system based on previously-published methods (Phalen et al., 1984; André et al., 1989) and the general layout of the installation is presented in Article 1 - Figure 1. The nose-only inhalation system and the aerosol delivery were self-contained in a glovebox. The system was composed of three parts. The first part contained the aerosol generator and the aerosols were generated in the inhalation chamber (second part). The third part was used to position the animal. The rats were maintained in contention tubes and the tubes inserted in a panel in contact with the inhalation chamber. The inhalation chamber contained 16 exposures port. Uranium aerosols were delivered via the top inlet of the chamber and distributed to the nose of each animal. The concentration of particles in the inhalation chamber was calibrated by sampling onto membrane filters (pore size 0.8  $\mu\text{m}$ , 25 mm diameter, in cellulose acetate, Millipore).



*Article 1 - Figure 1 : General layout of the inhalation system*

SSPD: Small-Scale Powder Disperser, aerosol generation

APS: Aerodynamic Particle Sizer, particle size distribution and concentration

The rats were acclimatized to housing facilities, metabolism cages and contention tubes for at least two weeks. Following the acclimatization period, repeated exposure started at 20 weeks of age. Group RepUO<sub>2</sub> n°1 was repeatedly exposed for 1 hr to UO<sub>2</sub> with an aerosol concentration of 190 mg.m<sup>-3</sup> ± 41 mg.m<sup>-3</sup> (lung intake about

200 µg), 2 days per week, for 3 weeks. During this time, rat groups AcUO<sub>2</sub> and C were maintained under similar conditions but exposed to clean air. On the last repeated exposure day of group RepUO<sub>2</sub> n°1, group AcUO<sub>2</sub> was exposed to a single UO<sub>2</sub> inhalation for 2 hr with an aerosol concentration of 375 mg.m<sup>-3</sup> ± 120 mg.m<sup>-3</sup> (lung intake about 1000 µg). Group RepUO<sub>2</sub> n°2 was repeatedly exposed for 30 min to UO<sub>2</sub> with an aerosol concentration of 190 mg.m<sup>-3</sup> ± 41 mg.m<sup>-3</sup> (lung intake about 100 µg), 4 days per week, for 3 weeks. The total lung intakes are similar for groups RepUO<sub>2</sub> n°1 and RepUO<sub>2</sub> n°2. To limit the possible contamination of skin (with hair), the head of the rat was cleaned after each inhalation.

### Biokinetics

The rats were housed in metabolism cages for 10 days post-exposure (either repeated or single acute administration) and then twice a week for 3 weeks. Urine and feces were collected daily. Three rats from groups RepUO<sub>2</sub> n°1 and AcUO<sub>2</sub> were sacrificed 1, 3, 6, 15 or 30 days post-exposure and two rats from AcUO<sub>2</sub> group at 90 days. Three rats from control group C were sacrificed at 1, 3, 15 or 30 days. Three rats from group RepUO<sub>2</sub> n°2 were sacrificed 1, 3, 8, 14 or 28 days post-exposure.

The rats were anesthetized with a gaseous anesthetic (isoflurane) and exsanguinated via the abdominal artery. They were autopsied immediately to collect lungs (with trachea), kidneys, liver, blood (1 ml), gastrointestinal tract (from esophagus to colon without feces), femurs, spleen and skin and carcass (with muscles). The collected tissues were placed in separate bottles, weighed, frozen and maintained at -20°C until analyzed for U concentration.

The samples were ashed for U content analyses, using a previously published method (Ejnik et al., 2000), and the U content was determined by Kinetic Phosphorescence Analysis: KPA, Chemcheck, USA (Hedaya et al., 1997). The statistical comparison between the different groups was made using a non parametrical Mann-Whitney test (p<0.05).

### Biokinetic models implementation

The software Cyclomod (Malarbet, 1998) predicts the human urinary and fecal excretion of U and its retention in the compartments of the ICRP models after a given intake. It is based on the biokinetic models of ICRP publications 30, 66 and 69 (ICRP, 1979; ICRP, 1994; ICRP, 1995) and the algorithm described by Birchall and James (1987).

The biokinetics model for rats is described in the results. To obtain this rat model, the Cyclomod software biokinetic parameter values, which initially refer to the

ICRP reference for human, were changed so that the predicted retention and excretion functions matched the experimental data from rat organs and excreta measurements after acute inhalation (group AcUO<sub>2</sub>).

## Results

### General health parameters of rats

The rats of the control group C and groups RepUO<sub>2</sub> n°1 and RepUO<sub>2</sub> n°2 exposed to repeated inhalation had similar weight curves (data not shown). At the end of the exposure, the weight of these rats was about 565g ± 30g and 1 month later about 610g ± 40g. In contrast, the mean weight of AcUO<sub>2</sub> group exposed to acute inhalation decreased over 10 days following the single acute UO<sub>2</sub> inhalation and was statistically different from the other groups at 10 days post-exposure (528g ± 36g). Then the mean weight stabilized and afterwards increased in the same way as the mean weight of the other groups but remained lower (560g ± 26g, 1 month post-exposure).

The food consumption of the control group C and groups RepUO<sub>2</sub> n°1 and RepUO<sub>2</sub> n°2 rats was similar (around 22g ± 5g). Food consumption was lower for group AcUO<sub>2</sub> rats exposed to acute inhalation, 2 and 3 days post-exposure (around 15g ± 5g), than for the other three times. The water consumption was the same for the 4 groups. No significant variations in organ weights were observed.

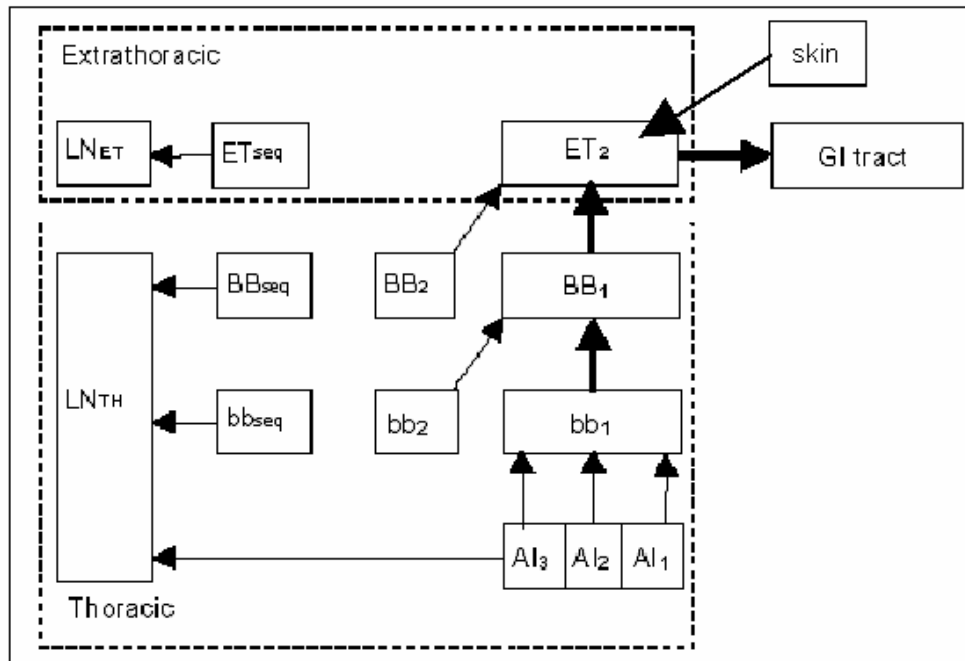
### Design of a biokinetic model for rats

The UO<sub>2</sub> biokinetic data from group AcUO<sub>2</sub> (shown in Article 1 - Figure 5), exposed to single inhalation, was used to design a U dust inhalation biokinetic model for rats. The lung is the entry organ with about 370 µg of U/g tissue 1 day post-exposure. However, a small part of inhaled U was dissolved in the blood, distributed in organs and eliminated in urine via the kidneys. The kidney, a target organ of U, contained an average of 0.8 µgU/g tissue. The spleen contained a maximum of 0.216 µgU/g tissue at 3 days post-exposure. This U concentration, at 30 days post-exposure, was 0.029 µgU/g tissue that is always higher than the control value (around 0.013 µgU/g tissue). The liver contained 0.092 µgU/g tissue at 1 day post-exposure that is slightly higher than the control (around 0.003 µgU/g tissue) and its concentration of U reached the level of the control at 30 days post-exposure (0.004 µgU/g tissue). Furthermore, significant



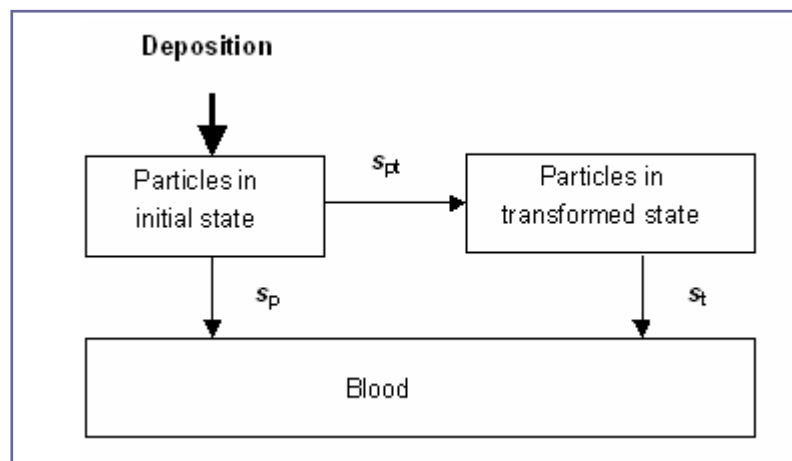
quantities of U were eliminated in feces (about 1729  $\mu\text{gU/g}$  feces). In spite of the choice of administration by nose-only inhalation and the cleaning of the rat head, the skin and hair of the rats were contaminated at an average of 4  $\mu\text{gU/g}$  tissue (data not shown). This U could be subsequently ingested by licking during grooming.

The biokinetic model structure for rats is presented in Article 1 - Figures 2, 3 and 4, and parameters are shown in Article 1 - Tables 1 and 2. Reference organ masses were needed to convert model predictions of organ contents to concentrations, for comparison with the data from U inhalation experiments. Reference values (Article 1 - Table 3) are based on measurements on the animals used in this study (male OFA Sprague Dawley rats, 6 month old) and checked with bibliographical information (Leggett and Pellmar, 2003). The respiratory tract deposition pattern was modified first to match the model prediction to the experimental data. Then the transfer and absorption rates of the gastrointestinal tract were changed. A new compartment was added to the ICRP model representing the skin and hair of the rat (Article 1 - Figure 2). It takes into account the U swallowed by rats while washing their contaminated hair and snouts. The amount of ingested U quickly decreases during the first few days after inhalation (data not shown) and introducing this compartment enables fecal excretion kinetics to be predicted correctly. Then the respiratory tract absorption rates and the urinary excretion rate were modified, and finally, the transfer rates of the other organ compartments were adjusted to the observed organ retentions. All the organs collected and analyzed have been used for the design of the rat biokinetic model. The organs which do not correspond to a specific compartment of the model, like the spleen, have been taken into account as part of the "other soft tissues" compartment.

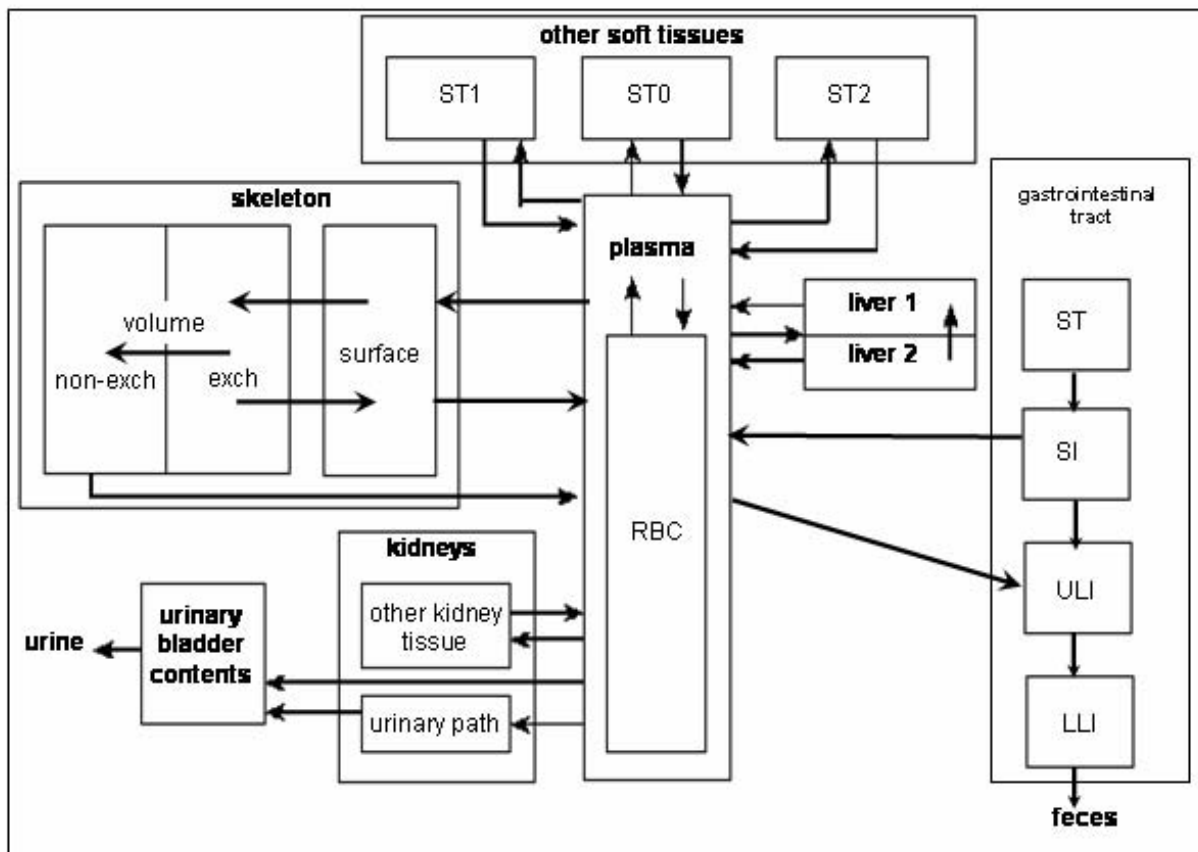


Article 1 - Figure 2 : Biokinetic model for uranium respiratory tract (derived from ICRP, 1994)

Al, alveolar interstitial region; bb, bronchiolar airways; BB, bronchial airways; ET, extrathoracic airways; seq, sequestered; LN<sub>ET</sub>, extrathoracic lymph nodes; LN<sub>TH</sub>, thoracic lymph nodes.



Article 1 - Figure 3 : Time-dependent absorption into blood from each compartment of the respiratory tract model (derived from ICRP, 1994), not including the skin compartment



Article 1 - Figure 4 : Biokinetic model for uranium (GI tract and systemic, derived from ICRP, 1979 and ICRP, 1995)

ST0, tenacious retention; ST1, intermediate turnover; ST2, rapid turnover; RBC, red blood cells; ST, stomach contents; SI, small intestine contents; ULI, upper large intestine contents; LLI, lower large intestine contents; exch., exchangeable bone compartment; non-exch., non-exchangeable bone compartment.

*Article 1 - Table 1: Parameter values used in the biokinetic model for uranium in rats*

Transfer	Transfer rate (d <sup>-1</sup> ) for human (ICRP)	Transfer rate (d <sup>-1</sup> ) for rat
S <sub>p</sub>	0.1	0.5
S <sub>t</sub>	0.0001	0.0005
S <sub>pt</sub>	100	100
Al <sub>1</sub> to bb <sub>1</sub>	0.02	0.02
Al <sub>2</sub> to bb <sub>1</sub>	0.001	0.001
Al <sub>3</sub> to bb <sub>1</sub>	0.0001	0.0001
Al <sub>3</sub> to LN <sub>TH</sub>	0.00002	0.00002
bb <sub>1</sub> to BB <sub>1</sub>	2	2
bb <sub>2</sub> to BB <sub>1</sub>	0.03	0.03
bb <sub>seq</sub> to LN <sub>TH</sub>	0.01	0.01
BB <sub>1</sub> to ET <sub>2</sub>	10	10
BB <sub>2</sub> to ET <sub>2</sub>	0.03	0.03
BB <sub>seq</sub> to LN <sub>TH</sub>	0.01	0.01
ET <sub>seq</sub> to LN <sub>ET</sub>	0.001	0.001
skin to ET <sub>2</sub>	-	0.291
ET <sub>2</sub> to ST	100	100
ST to SI	24	26.4
SI to ULI	6	7.2
ULI to LLI	1.8	4.86
LLI to feces	1	5.5
SI to plasma	0.012	0.0271
plasma to ST0	10.5	60
plasma to RBC	0.245	1.4
plasma to urinary bladder content	15.43	126
plasma to urinary path	2.94	25.5
plasma to other kidney tissue	0.0122	0.7
plasma to ULI contents	0.122	7
plasma to liver 1	0.367	5.94
plasma to ST1	1.63	21
plasma to ST2	0.0735	2.8
plasma to bone surface	2.04 (trabecular) -1.63 (cortical)	17.5
ST0 to plasma	8.32	8.32
RBC to plasma	0.347	0.139
urinary path to urinary bladder content	0.099	0.1083
other kidney tissue to plasma	0.00038	0.01386
liver 1 to plasma	0.092	0.147
liver 1 to liver 2	0.00693	0.00693
ST1 to plasma	0.0347	0.0578
ST2 to plasma	0.000019	0.00347
bone surface to plasma	0.0693	0.693
bone surface to exch volume	0.0693	0.0693
liver 2 to plasma	0.00019	0.00693
non-exch. volume to plasma	0.000493 (trabecular) - 0.0000821 (cortical)	0.018
exch. volume to bone surface	0.0173	0.0173
exch. volume to non-exch volume	0.00578	0.03468
urinary bladder content to urine	12	1

*Article 1 - Table 2 : Initial deposition pattern in the respiratory tract model*

Region	Fraction (% of total deposition) for human (reference worker - AMAD 5 $\mu$ m)	Fraction (% of total deposition) for rat
Al	5.3 <sup>(*)</sup>	8.9 <sup>(*)</sup>
BB	1.8 (33% in BB2 - 0.7% in BBseq)	2.2 <sup>(#)</sup>
bb	1.1 (40% in bb2 - 0.7% in bbseq)	1.8 <sup>(#)</sup>
ET	73.8	80
skin	-	7.1

<sup>(\*)</sup> Fractions 0.3, 0.6 and 0.1 of the value are assigned to Al<sub>1</sub>, Al<sub>2</sub> and Al<sub>3</sub> respectively. <sup>(#)</sup> Half of the value is assigned to the slow clearing compartment bb<sub>2</sub> or BB<sub>2</sub> and a 0.007 fraction is deposited in bb<sub>seq</sub> or BB<sub>seq</sub>.

*Article 1 - Table 3 : Reference organ weights for rats*

Tissue	Total body	Kidneys	Femurs	Liver	Lung with trachea	Gastrointestinal tract	Blood
Weight (g)	600	4	4.2	20	2.9	32	21

Article 1 - Figure 5 illustrates the design of the biokinetic model for rats. The experimental retention of U, in 4 organs and the daily urinary and fecal excretion after single inhalation is represented along with its prediction by the current ICRP model, designed for humans, and by our biokinetic model for rats. The relative error between the biokinetic model values for rats and the experiment is presented in Article 1 - Table 4. The biokinetic model for rats accurately described the experimental data trend after a single inhalation. In the lung, the discrepancy between the model and the experiment was only 10% on average; the worst discrepancy is the underestimate of the order of 40% by the predicted retention at 30 days post-exposure but the model allows for the wide dispersion interval of experimental values. In the kidneys, the discrepancy between predicted and experimental retention was only 7% on average. The experimental values showed a peak at 3 days but the model was unable to represent this trend and this explains the rather large discrepancy at 1 day (60%). In the gastrointestinal tract, the discrepancy between the model and the experiment was 40% on average until 6 days as the model underestimated the experimental trend. Then the model appeared to underestimate the real long-term U content but the late period experimental values were at the natural U background contamination level that is not taken into account by the model. In the femur, the average discrepancy between the model and the experiment was only 22%. The model could not match the medium term of urine excretion but overestimated with a relative error of 62% after 3 days and up to

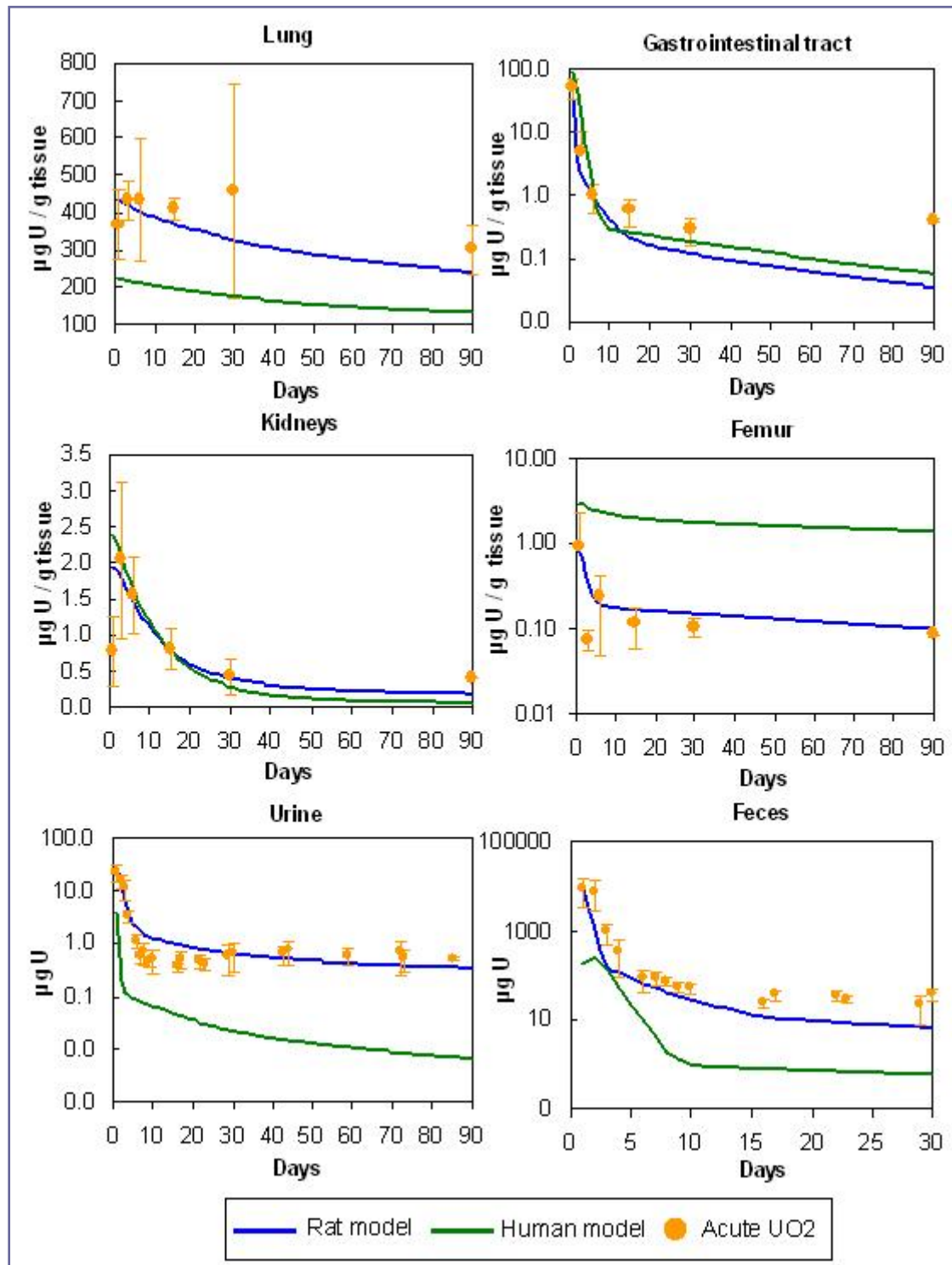
17 days; after that, the discrepancy between the model and the experiment was lower (around 35%). In the feces, the model underestimates the experimental excretion between 2 and 4 days; the late period experimental values are at the natural U background contamination level that is not taken in account by the model and this explains the constant underestimation by the model (relative error around 66%).

This rat model was applied to compute the theoretical biokinetics after the two repeated UO<sub>2</sub> inhalations as a sum of the contribution of successive independent acute intakes. The retention was predicted in organs and the urinary and fecal excretion of U for 1 month after the end of the repeated exposure.

*Article 1 - Table 4 : Relative error between the values for the biokinetic model for rats and the experiment of group AcUO2 against the number of days post-exposure*

Days	Lung	Kidneys	Gastrointestinal tract	Femur	Days	Urine	Feces
1	0.156	0.607	0.011	-0.091	1	0.031	0.005
3	-0.036	-0.132	-1.172	0.788	2	-0.019	-3.304
6	-0.071	-0.048	0.005	-0.180	3	-0.616	-4.397
15	-0.109	0.002	-1.692	0.309	4	0.185	-2.039
30	-0.397	-0.076	-1.437	0.302	5	0.587	0.046
90	-0.253	-1.211	-10.404	0.118	7	0.667	-0.596
					8	0.559	-0.666
					9	0.681	-0.619
					10	0.624	-0.830
					16	0.623	0.017
					17	0.450	-0.790
					22	0.405	-1.053
					23	0.446	-0.944
					29	0.341	-0.508
					30	0.121	-2.039
					43	-0.289	
					59	-0.414	
					73	-0.402	
					85	-0.437	

Relative error = (model value - experimental mean value)/model value.



Article 1 - Figure 5 : Uranium content  $\mu\text{g} / \text{gram tissue}$  (lung, femur, gastrointestinal tract, kidney) or urine and feces over 24-hr as a function of days post-exposure

(Green line) theoretical biokinetics of single UO<sub>2</sub> inhalation predicted with human model; (Blue line) theoretical biokinetics of single UO<sub>2</sub> inhalation predicted with the rat biokinetic model; (Orange dot) means  $\pm$  SD of experimental content values of group AcUO<sub>2</sub> rats exposed by single inhalation. n = 3 at 1, 3, 6/8, 14/15 and 28/30 days and n = 2 at 90 days for tissues; n = 6 - 15 for urine or feces up to 10 days, n = 3 for urine or feces after 10 days.

Comparison between the theoretical and experimental biokinetics of the two series of repeated UO<sub>2</sub> inhalations by rats

The comparisons between theoretical and experimental post-exposure biokinetics in the lung, gastrointestinal tract, kidneys, femur, urine and feces are shown in Article 1 - Figure 6 for group RepUO2 n°1 and in Article 1 - Figure 7 for group RepUO2 n°2. The relative errors between the theoretical and experimental values are presented in Article 1 - Table 5 for group RepUO2 n°1 and in Article 1 - Table 6 for group RepUO2 n°2.

The experimental U distributions in the two case of exposure, groups RepUO2 n°1 and RepUO2 n°2 (in Article 1 - Figures 6 and 7), were similar 1 day post-exposure. The lung is the entry organ with about 500 µg of U/g tissue 1 day post-exposure and U level in the lung decreases slowly. The U biokinetics were similar in the majority of organs except for the gastro intestinal tract. Fifteen days post-exposure, the mean U concentration for group RepUO2 n°1 was comparable to the control values (0.384 µgU/g tissue at 30 days for the group A1) whereas the mean U concentration for group RepUO2 n°2 was higher than the control values (0.561 µgU/g tissue at 28 days for the group A2). Uranium concentration in urine 1 day post-exposure was 0.83 µgU/ml for group RepUO2 n°1 and 0.36 for group RepUO2 n°2. Uranium concentration in urine decreased relatively rapidly for the first 8 days post-exposure and then reached a plateau that was still higher than the control concentration 30 days post-exposure. In feces, a significant quantity of U was measured the first day post-exposure and U excretion decreased very rapidly (by a factor of 100-fold in 5 days). One month post-exposure, the U quantity in feces was close to the control values.

The theoretical retentions in lung and kidneys match the experimental values dispersion interval for the two experiments: relative error for the lung was around 7.8% for experiment RepUO2 n°1 and 13% for RepUO2 n°2. Relative error for the kidneys was around 20% for experiment RepUO2 n°1 and 21% for RepUO2 n°2. In the two experiments, the theoretical gastrointestinal tract retention underestimated the U content for the first days post-exposure; it is a consequence of a shortcoming in the biokinetic model for rats. The late period experimental values for group RepUO2 n°1 (0.384 µgU/g tissue at 30 days) were at the natural U background contamination level (0.355 µgU/g tissue at 30 days for group C) that is not taken into account by the model.

The theoretical urine excretion 3 days post-exposure up to 15 days was somewhat higher than the experimental values in the two experiments (relative error around of 60%). Since the difference is of the same order of magnitude, this is probably



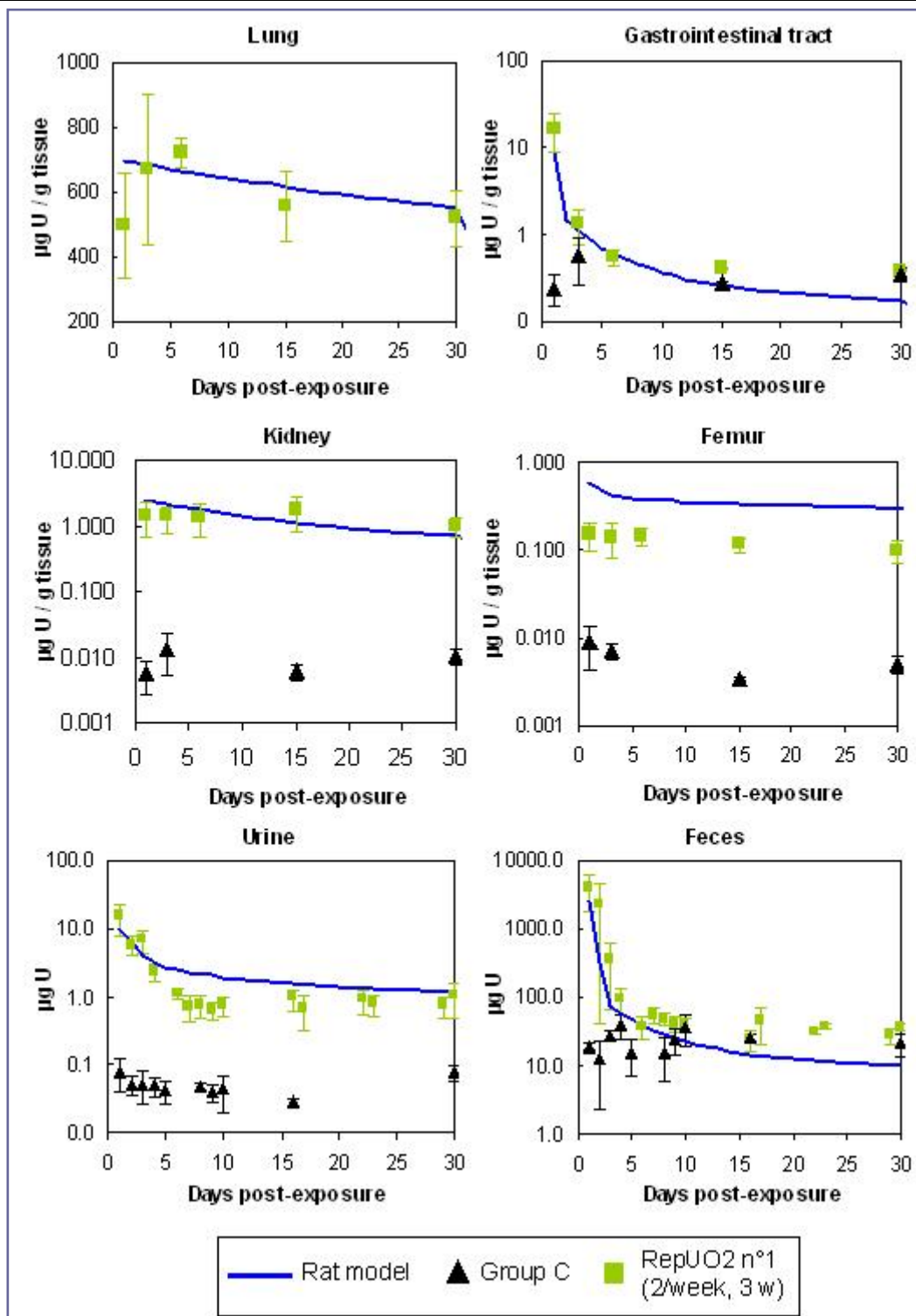
due to the shortcoming in the biokinetic model for rats described previously. After 15 days, the discrepancy between the theoretical and experimental biokinetics was around 30%. In the feces, the theoretical biokinetics similarly underestimated the U excretion but of the same order as the uncertainty of the biokinetic model for rats. After 15 days, experimental fecal excretion reached control values.

Finally, the theoretical biokinetics seemed to overestimate bone retention in the femur in the two experiments, by a factor of three. The discrepancy in femur retention between the theoretical and experimental values was around 60% for experiment RepUO2 n°1 and 68% for experiment RepUO2 n°2. A shortcoming in the biokinetic model for rats cannot account for this alone because the relative error for the femur was less than 31% one week after acute intake (Article 1 - Table 4).

*Article 1 - Table 5 : Relative error between the theoretical and experimental values for rat group RepUO2 n°1 against the number of days post-exposure*

Days	Lung	Kidneys	Gastrointestinal tract	Femur	Days	Urine	Feces
1	0.291	0.298	-0.826	0.693	1	-0.638	-0.492
3	0.025	0.231	-0.228	0.605	2	-0.079	-6.048
6	-0.084	0.082	0.081	0.537	3	-0.986	-3.584
15	0.099	-0.869	-0.552	0.586	4	0.093	-0.629
30	0.060	-0.718	-1.263	0.610	6	0.449	0.028
					7	0.612	-0.684
					8	0.567	-0.699
					9	0.619	-0.609
					10	0.530	-0.741
					16	0.260	-0.657
					17	0.459	-2.212
					22	0.185	-1.622
					23	0.284	-2.304
					29	0.250	-1.755
					30	-0.071	-2.854

Relative error = (theoretical value - experimental mean value)/theoretical value.



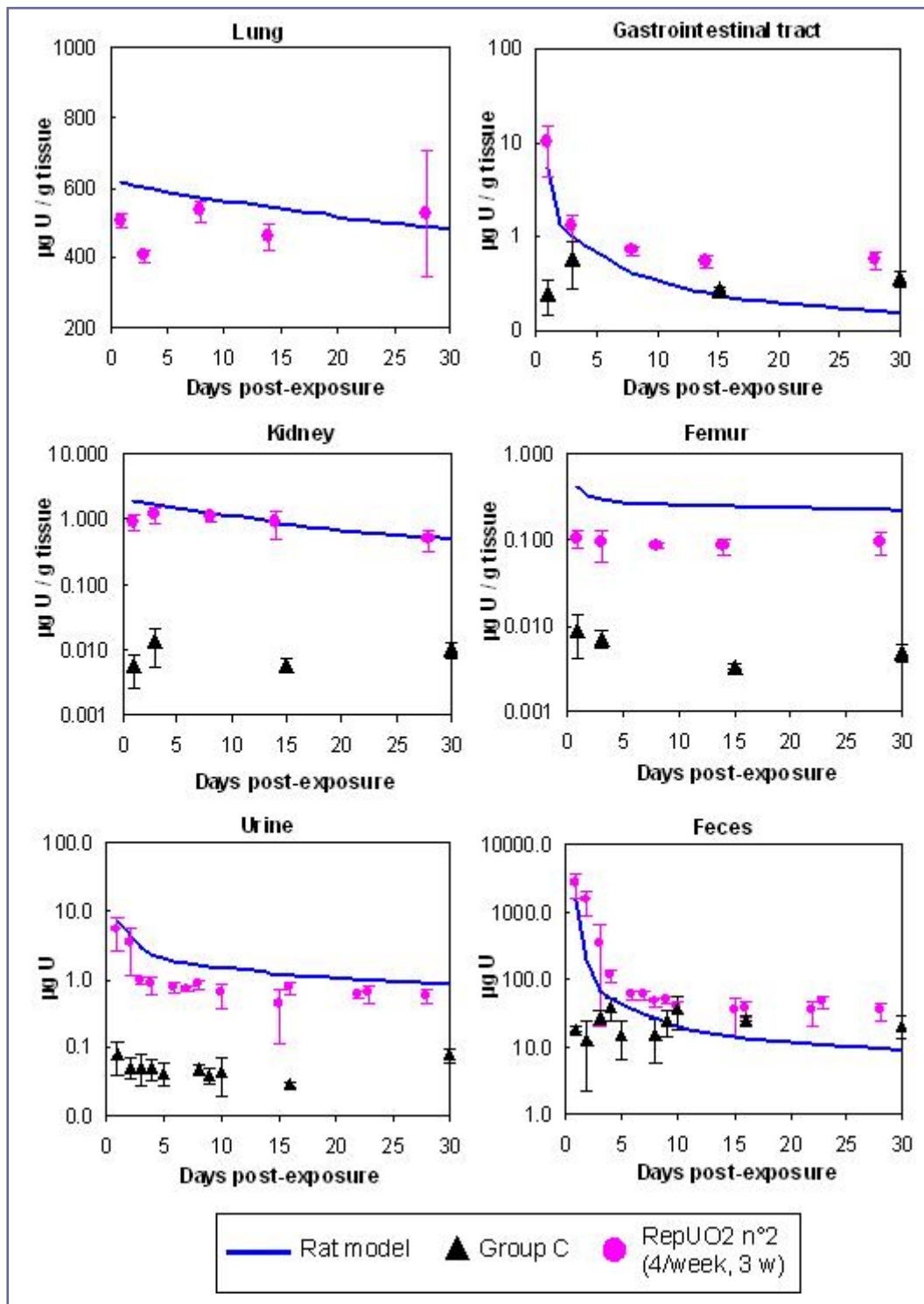
Article 1 - Figure 6 : Uranium content  $\mu\text{g} / \text{gram}$  (lung, gastrointestinal tract, kidney and femur) or in urine and feces over 24-hr as a function of days post-exposure for group RepUO2 n°1

(Blue line) theoretical biokinetics of repeated UO<sub>2</sub> inhalation predicted with the iteration of the rat model; (Green square) means  $\pm$  SD of experimental content values of group RepUO2 n°1 rats exposed 1hr twice a week; n = 3 for tissues; n = 6 - 15 for urine or feces up to 10 days, n = 3 for urine or feces after 10 days. (Black triangle) means  $\pm$  SD of the three experimental content values of control rats, group C.

*Article 1 - Table 6 : Relative error between the theoretical and experimental values of rat group RepUO2 n°2 against the number of days post-exposure*

Days	Lung	Kidneys	Gastrointestinal tract	Femur	Days	Urine	Feces
1	0.178	0.531	-0.820	0.742	1	0.265	-0.818
3	0.328	0.317	-0.288	0.728	2	0.221	-6.414
6	0.071	0.134	-0.653	0.673	3	0.677	-3.908
15	0.154	0.015	-1.170	0.665	4	0.644	-1.103
30	-0.074	0.057	-2.501	0.576	6	0.592	-0.671
					7	0.573	-0.958
					8	0.472	-0.776
					10	0.583	-0.914
					15	0.651	-1.469
					16	0.345	-1.703
					22	0.391	-2.117
					23	0.373	-3.369
					28	0.356	-2.732

Relative error = (theoretical value - experimental mean value)/theoretical value.



Article 1 - Figure 7 : Uranium content µg / gram (lung, gastrointestinal tract, kidney and femur) or in urine and feces over 24-hr as a function of days post-exposure for group RepUO2 n°2

(Blue line) theoretical biokinetics of repeated UO<sub>2</sub> inhalation predicted with the iteration of the rat model; (Pink dot) means ± SD of experimental content values of group RepUO<sub>2</sub> n°2 rats exposed 30 min, four a week; n = 3 for tissues; n = 6 - 15 for urine or feces up to 10 days, n = 3 for urine or feces after 10 days. (Black triangle) means ± SD of the three experimental content values of control rats, group C.

## Discussion

Considering the general health parameters, the rats seemed to withstand a single administration by inhalation differently from repeated administration. The single administration involved a quantity of U dust 4 times higher than for each of the repeated inhalations of group A1 but one and a half times lower than the cumulative intake of the repeated exposure. This single exposure induced a transient decrease in food consumption and in body weight in the affected rats as compared to the three other groups. Moreover, the food efficiency was not significantly modified. Therefore the decrease in food consumption probably explains the observed loss of body weight. This decrease in food consumption may explain the subsequent drop in body weight. As previously described (Diamond et al., 1989; Houpert et al., 2003), one of the most sensitive parameters for early detection of U acute toxicity is food intake and reduced body weight gain, even with low U concentrations. In the case of the repeated exposure, no disturbance was observed and this was consistent with previously published results (Leach et al., 1970). The effects of U on the general health parameters are therefore different after acute and repeated administration.

Few studies evaluated the distribution of U after chronic exposure by inhalation using animal models. Previous studies performed by chronic inhalation of  $5.8 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$  of  $\text{UO}_2$  (5.4 hr/day; 5 days/week for 1 year) showed predominant accumulation of U in the lungs and tracheobronchial lymph nodes (Leach et al., 1970). This was due to the low solubility of the  $\text{UO}_2$  compound and is in accordance with our experimental data.

No significant difference was observed in the U distribution in the majority of organs between the two groups exposed by repeated inhalation, except for the gastrointestinal tract where a difference was observed. Fifteen days post-exposure, group RepUO2 n°1, which was exposed two days per week, had a mean U concentration comparable to the control values whereas group RepUO2 n°2, which was exposed 4 days per week, had a mean U concentration higher than the control values. This observation could be a consequence of the exposure frequency. A hypothesis could be that the increased frequency of exposure modified the mucociliary movement mechanism or the accumulation of U in the intestine.

A high quantity of U was measured in the feces the first day post-exposure and U excretion decreased rapidly. Uranium in the feces might originate from the lung, by mucociliary movement, which is a rapid mechanism of pulmonary clearance and from U ingestion during exposure. Our experimental excretion biokinetics results in the urine

and feces, are consistent with those of Downs et al. (1967), who studied the excretion of U dioxide by rats following chronic exposure (5 mg.m<sup>-3</sup>; 6 hr/day; 5 days/week for periods of 17 - 140 days).

The main purpose of this study was to validate the use of the ICRP biokinetic models for workers subjected to repeated inhalation. However, since our experiments were performed on rats, the ICRP models had to be adapted to the biokinetics of the animal. This was done by retaining the general structure of the ICRP model and adjusting the transfer rate coefficients until the prediction of the model matched the experimental retentions and excretions adequately measured after acute inhalation. A similar approach was applied by Leggett and Pellmar (2003) to compare the biokinetics of depleted U from fragments implanted in rats to a model based on previous studies of the behavior of common forms of U after uptake by blood. They adopted values of transfer coefficients that differ more or less from ours within a maximum factor of 10. These differences can be explained by the fact that the model developed by Leggett (1989, 1994) describes the general trend of data obtained from experiments performed on different strains, ages and gender of rats and different conditions of exposure, while the model presented here is specifically adapted to the biokinetics of the chemical form of U, and the conditions of exposure, strain, age and gender of rats used in our experiments. Still, the biokinetics may be altered by the high level of exposure that was chosen to highlight possible effects specific to the repeated inhalation but may also induce some abnormal biokinetic effects by itself. However, damage to the kidney, which is the most sensitive target of high U contamination, seems unlikely here. The level of urea and creatinine, assessed in the serum of another group of rats exposed at the same level as the RepUO2 n°2 group, was not increased, compared to the control, from one day to one month after the exposure (Monleau et al., in press). Furthermore, the acute and repeated inhalation experiments were performed at the same magnitude of exposure in order to make sure that their results can be compared. Also, the loss of about 8% of body weight that was observed after the single acute inhalation may cause an increase of the organ versus body weight ratios that may influence the distribution of U on which the model is based. But such increase could not be shown to be statistically significant.

The ICRP also published a specific respiratory tract model for rats (ICRP, 2002) that can be used to study the solubility of inhaled compounds. This ICRP model differs significantly from ours in that it is simpler, as no sequestered activity or lymph node compartments were retained, and that it assumed more in-depth deposition (about 90%

deposited in the alveolar-interstitial region versus about 70% in our model) and faster clearance. Again, our respiratory tract model was designed to match the absorption to blood and clearance to the gastrointestinal tract observed in our specific experimental setting. But, as the lung retention of the insoluble form of U used in this study appeared constant within the experimental uncertainty, it was not possible to match the clearance parameters to the observed lung content. Therefore, our model should not be used to predict retention in specific regions of the lungs. It still provides adequate predictions of lung retention and absorption to blood for the purpose of our study, but the ICRP model should be preferred for more general use.

The biokinetic model for rats designed for acute inhalation of U correctly predicts the biokinetics of U after repeated exposures in the majority of the tested organs and excreta. Most of the differences observed are attributable to minor defects of the model or are due to the fact that the model does not take into account the natural U background contamination, which could mask some deviation between the model and the experiment. However, the model appears to overestimate bone retention after repeated exposures by a factor of three.

Animal studies (Morrow et al., 1982; Ballou et al., 1986) and follow-up of human exposure (Kathren and Moore, 1986; Singh et al., 1987; Kathren et al., 1989; Kurttio et al., 2002) demonstrate that, regardless of the route of exposure, the kidneys and bone are the primary reservoirs for U. The kidney is the critical target for U toxicity (Diamond et al., 1989; Kocher, 1989; Leggett, 1989; Kurttio et al., 2002) and the skeleton acts as a major reservoir for U (Morrow et al., 1972; Ballou et al., 1986; Leggett, 1994). The early distribution of U in the skeleton apparently follows the movement of calcium to some extent (Leggett, 1994). Uranium was assumed to deposit on the bone surface and the uranyl ion ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) was assumed to be exchanged with calcium ions at the surfaces of bone mineral crystals but not to participate in crystal formation (Leggett, 1994). Gradually, U is redistributed in the bone. Based on the similarities in U and calcium behavior in bone, a bone model originally developed for application to the alkaline earth elements and lead was applied to U. Bone retention after exposure by inhalation is dependent on the dissolution in blood. Model predictions were based on the assumptions that the rate of absorption of U to blood was constant during the exposure period (Leggett, 1994). However, the lower than expected retention in the skeleton could be explained by a small decrease in this rate during repeated inhalation, and also by possible increased release or decreased uptake of U by bone. The first hypothesis is improbable because a decrease in the rate of absorption of U to blood could be

reflected in the U retention in other organs, particularly kidneys. Moreover, U is known to induce bone toxicity. Acute (uranyl nitrate injection (Guglielmotti et al., 1984)) or chronic (UO<sub>2</sub> powder implanted subcutaneously (Diaz Sylvester et al., 2002)) exposure to U may lead to decreased bone formation rate and also increased bone resorption (Ubios et al., 1991) in rats. In humans, increased bone turnover, particularly increased bone resorption, and exposure to natural U through drinking water was correlated, which suggests that bone, in addition to kidneys, may be another target for U toxicity (Kurttio et al., 2002, 2005). After a single exposure, U is deposited on bone and may induce bone toxicity. This toxicity may have consequences on the biokinetics that are not taken into account by a compartmental model with constant parameters and may particularly influence the biokinetics in the case of repeated exposure. The U deposited after the first inhalation of repeated exposure may possibly reduce bone formation rate and increase bone resorption. Hence this effect may decrease the uptake of U by the bone inhaled during subsequent repeated exposure. This hypothesis may explain why the model validated for acute exposure underestimates bone retention after repeated exposure. These results do not necessarily mean, however, that U has no effect on other organs but simply that the effect on bone displays the earliest biokinetic consequences.

Another study has shown overestimation of U accumulation by the iterative use of a biokinetic acute model for predicting chronic exposure by U ingestion (Paquet et al., 2005). This is observable in kidneys and femurs as early as 3 months after the beginning of exposure. They postulate that biokinetics parameters (distribution in organs, biological half lives) change when duration of exposure increases due to changes in U gastrointestinal absorption in ageing rats (Doubek and Armbrecht, 1987; Vaquero, 2002). Their experimental conditions were different from those used in our work but both studies demonstrated that, after chronic or repeated exposures, retention in skeleton cannot be extrapolated from acute exposure data.



## Conclusions

This study of rats exposed to uranium by repeated inhalation is a first approach to test the commonly used hypothesis that a compartmental model with constant coefficients validated under conditions of acute inhalation remains valid under chronic exposure. The biokinetic results obtained after two different repeated UO<sub>2</sub> inhalation experiments were, overall, well represented by the sum of the contribution of successive independent acute intakes. Under these experimental conditions, each acute intake seems to have little effect on the biokinetics of later intakes. Nonetheless, a deviation is observed, in the two experiments, for retention in the femur where the model may overestimate bone retention. Consequently, current models that are based on acute exposure data might be inaccurate for some organs. The question remains whether this is applicable to other exposure patterns and radionuclides other than uranium and, obviously, whether it is applicable to humans.

## Acknowledgements

We wish to thank O. Delissen, B. Dhieux, C. Maubert, A.M. Moreels and E. Tourlonias for their assistance during the exposure, euthanasia and dissection. This work was partially supported by COGEMA (DOSINTER programme).

## References

- André, S., Charuau, J., Rateau, G., Vavasseur, C. and Métivier, H. 1989. Design of a new inhalation device for rodents and primates. *J Aerosol Sci.* 20: 647-656.
- Bailey, M. R., Ansoborlo, E., Guilmette, R. A. and Paquet, F. 2003. Practical application of the ICRP Human Respiratory Tract Model. *Radiat Prot Dosimet.* 105: 71-76.
- Ballou, J. E., Gies, R. A., Case, A. C., Haggard, D. L., Buschbom, R. L. and Ryan, J. L. 1986. Deposition and early disposition of inhaled  $^{233}\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$  and  $^{232}\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$  in the rat. *Health Phys.* 51: 755-771.
- Benson, J. M., Chang, I. Y., Cheng, Y. S., Hahn, F. F., Kennedy, C. H., Barr, E. B., Maples, K. R. and Snipes, M. B. 1995. Particle clearance and histopathology in lungs of F344/N rats and B6C3F1 mice inhaling nickel oxide or nickel sulfate. *Fundam. Appl. Toxicol.* 28: 232-244.
- Benson, J. M., Chang, I. Y., Cheng, Y. S., Hahn, F. F. and Snipes, M. B. 1992. Effects of repeated inhalation exposure of F344 rats and B6C3F1 mice to nickel oxide and nickel sulfate hexahydrate on lung clearance. *LRRR report.*
- Birchall, A. and James, A. C. 1987. A general algorithm for solving compartmental models with constant coefficients and its implementation on a microcomputer. National Radiological Protection Board. NRPB-R216.
- Craft, E., Abu-Qare, A., Flaherty, M., Garofolo, M., Rincavage, H. and Abou-Donia, M. 2004. Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 7: 297-317.
- Diamond, G. L., Morrow, P. E., Panner, B. J., Gelein, R. M. and Baggs, R. B. 1989. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam. Applied. Toxicol.* 13: 65-78.
- Diaz Sylvester, P. L., Lopez, R., Ubios, A. M. and Cabrini, R. L. 2002. Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation. *Arch Environ Health.* 57: 320-325.
- Doubek, W. G. and Armbrecht, H. J. 1987. Changes in intestinal glucose transport over the lifespan of the rat. *Mech Ageing Dev.* 39: 91-102.
- Downs, W. L., Wilson, H. B., Sylvester, G. E., Leach, L. J. and Maynard, E. A. 1967. Excretion of uranium by rats following inhalation of uranium dioxide. *Health Phys.* 13: 445-453.
- Ejnik, J. W., Hamilton, M. M., Adams, P. R. and Carmichael, A. J. 2000. Optimal sample preparation conditions for the determination of uranium in biological samples by kinetic phosphorescence analysis (KPA). *J Pharm Biomed Anal.* 24: 227-235.
- Fulco, C. E., Liverman, C. T. and Sox, H. C. 2000. Depleted Uranium. Gulf War and Health. 1. Depleted uranium, Pyridostigmine bromide, Sarin and Vaccines: 89-168.
- Guglielmotti, M. B., Ubios, A. M., De Rey, B. M. and Cabrini, R. L. 1984. Effects of acute intoxication with uranyl nitrate on bone formation. *Experientia.* 40: 474-476.
- Hedaya, M. A., Birkenfeld, H. P. and Kathren, R. L. 1997. A sensitive method for the determination of uranium in biological samples utilizing kinetic phosphorescence analysis (KPA). *J Pharm Biomed Anal.* 15: 1157-1165.
- Houpert, P., Muller, D., Chazel, V., Claraz, M. and Paquet, F. 2003. Effect of DTPA on the nephrotoxicity induced by uranium in rat. *Radiat Prot Dosimetry.* 105: 517-520.
- ICRP. 1979. Limits for intakes of radionuclides by workers, part 1. Publication 30. Oxford, Pergamon Press.
- ICRP. 1994. Human respiratory tract model for radiological protection. Publication 66. Oxford, Pergamon Press. 24: 1-3.

- ICRP. 1995. Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides: Part 3 Ingestion dose coefficients. Publication 69. Oxford, Pergamon Press.
- ICRP. 2002. Guide for the Practical Application of the ICRP Human Respiratory Tract Model. Supporting Guidance 3. Oxford, Pergamon Press. 32: 1-2.
- Kathren, R. L., McInroy, J. F., Moore, R. H. and Dietert, S. E. 1989. Uranium in the tissues of an occupationally exposed individual. *Health Phys.* 57: 17-21.
- Kathren, R. L. and Moore, R. H. 1986. Acute accidental inhalation of U: a 38-year follow-up. *Health Phys.* 51: 609-619.
- Kocher, D. C. 1989. Relationship between kidney burden and radiation dose from chronic ingestion of U: implications for radiation standards for the public. *Health Phys.* 57: 9-15.
- Kurttio, P., Auvinen, A., Salonen, L., Saha, H., Pekkanen, J., Makelainen, I., Vaisanen, S. B., Penttila, I. M. and Komulainen, H. 2002. Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect.* 110: 337-342.
- Kurttio, P., Komulainen, H., Leino, A., Salonen, L., Auvinen, A. and Saha, H. 2005. Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect.* 113: 68-72.
- Leach, L. J., Maynard, E. A., Hodge, H. C., Scott, J. K., Yuile, C. L., Sylvester, G. E. and Wilson, H. B. 1970. A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO<sub>2</sub>) dust. I. Retention and biologic effect in the monkey, dog and rat. *Health Phys.* 18: 599-612.
- Leggett, R. W. 1989. The behaviour and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys.* 57: 365-383.
- Leggett, R. W. 1994. Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium. *Health Phys.* 67: 589-610.
- Leggett, R. W. and Pellmar, T. C. 2003. The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J Environ Radioact.* 64: 205-225.
- Malarbet, J. L. 1998. Calculations of radionuclide organ retentions from ICRP biokinetic recycling models. *Radiat Prot Dosimetry.* 79: 379-381.
- McDiarmid, M. A., Engelhardt, S., Oliver, M., Gucer, P., Wilson, P. D., Kane, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Handwerker, B., Albertini, R. J., Jacobson-Kram, D., Thorne, C. D. and Squibb, K. S. 2004. Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans: a 10-year follow-up. *J Toxicol Environ Health A.* 67: 277-96.
- McDiarmid, M. A., Hooper, F. J., Squibb, K., McPhaul, K., Engelhardt, S. M., Kane, R., DiPino, R. and Kabat, M. 2002. Health effects and biological monitoring results of Gulf War veterans exposed to depleted uranium. *Mil Med.* 167: 123-124.
- Monleau, M., De Meo, M., Paquet, F., Chazel, V., Dumenil, G. and Claraz, M. in press. Genotoxic and inflammatory effects of uranium particles inhaled by rats. *Toxicol Sci.*
- Morrow, P., Gelein, R., Beiter, H., Scott, J., Picano, J. and Yuile, C. 1982. Inhalation and intravenous studies of UF<sub>6</sub>/UO<sub>2</sub>F<sub>2</sub> in dogs. *Health Phys.* 43: 859-873.
- Morrow, P. E., Gibb, F. R. and Beiter, H. D. 1972. Inhalation studies of uranium trioxide. *Health Phys.* 23: 273-280.
- Paquet, F., Houpert, P., Blanchardon, E., Delissen, O., Maubert, C., Dhieux, B., Moreels, A. M., Frelon, S., Voisin, P. and Gourmelon, P. 2005. Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys.* in press.
- Peters, T. M. and Leith, D. 2003. Concentration measurement and counting efficiency of the aerodynamic particle sizer 3321. *J Aerosol Sci.* 34: 627-634.
- Phalen, R. F., Mannix, R. C. and Drew, R. T. 1984. Inhalation exposure methodology. *Environ Health Perspect.* 56: 23-34.

- Singh, N. P., Bennett, D. D., Wrenn, M. E. and Saccomanno, G. 1987. Concentrations of alpha-emitting isotopes of U and Th in uranium miners' and millers' tissues. *Health Phys.* 53: 261-265.
- Stradling, N., Hodgson, A., Ansoborlo, E., Berard, P., Etherington, G., Fell, T. and LeGuen, B. 2003. Optimising monitoring regimens for inhaled uranium oxides. *Radiat Prot Dosimet.* 105: 109-114.
- Ubios, A. M., Guglielmotti, M. B., Steimetz, T. and Cabrini, R. L. 1991. Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ Res.* 54: 17-23.
- Vaquero, M. P. 2002. Magnesium and trace elements in the elderly: intake, status and recommendations. *J Nutr Health Aging.* 6: 147-153.

### III.1.1.3 - Compléments de l'article 1

D'autres organes ont été dosés, principalement : le foie et le sang (1 g) ainsi que la carcasse.

Les valeurs expérimentales dans le foie et le sang sont, comme pour la majorité des autres organes, proches des valeurs prédites par le modèle (Figure 28), bien que les concentrations au niveau sanguin en uranium des animaux exposés soient du même ordre de grandeur que celles des rats témoins.

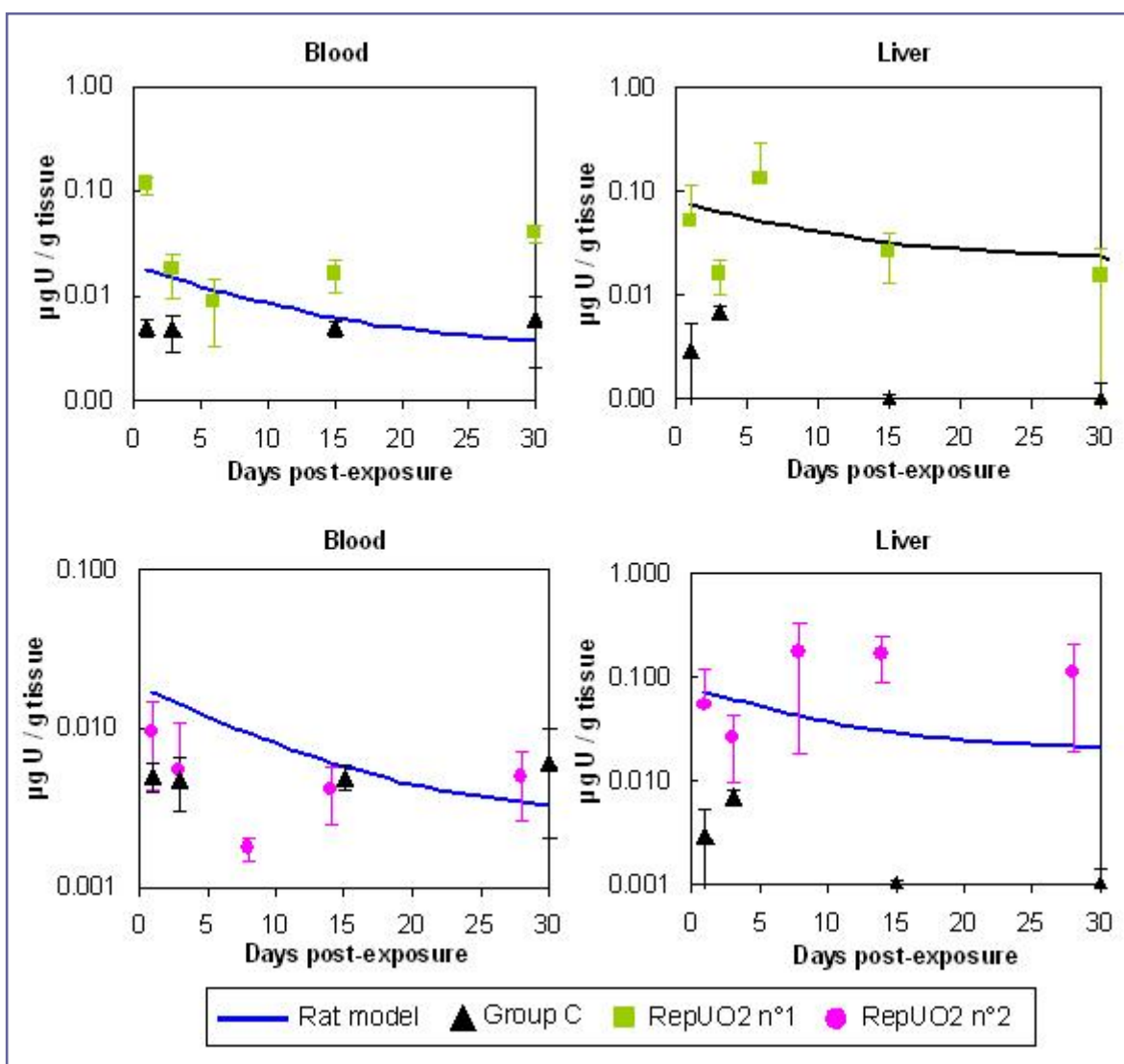


Figure 28 : Concentrations d'uranium dans le sang et le foie

Les biocinétiques ont été étudiées après la période d'exposition. Mais le modèle peut aussi être testé pendant l'exposition répétée, i.e. pendant la phase d'accumulation d'une durée de 20 jours. Aucun animal n'ayant été euthanasié pendant

l'exposition, les cinétiques d'accumulation dans les organes ne sont pas connues. En revanche les animaux du groupe RepUO2 n°1 ont été placés en cages à métabolisme pendant l'exposition durant les huit premiers jours suivant la première inhalation puis le 14<sup>ème</sup> et le 15<sup>ème</sup> jour afin de mesurer les cinétiques de l'uranium dans les excréta. Ces cinétiques sont présentées dans la Figure 29 à partir de la 1<sup>ère</sup> inhalation et jusqu'au premier jour après la fin de l'exposition répétée, c'est-à-dire 21 jours après la première inhalation.

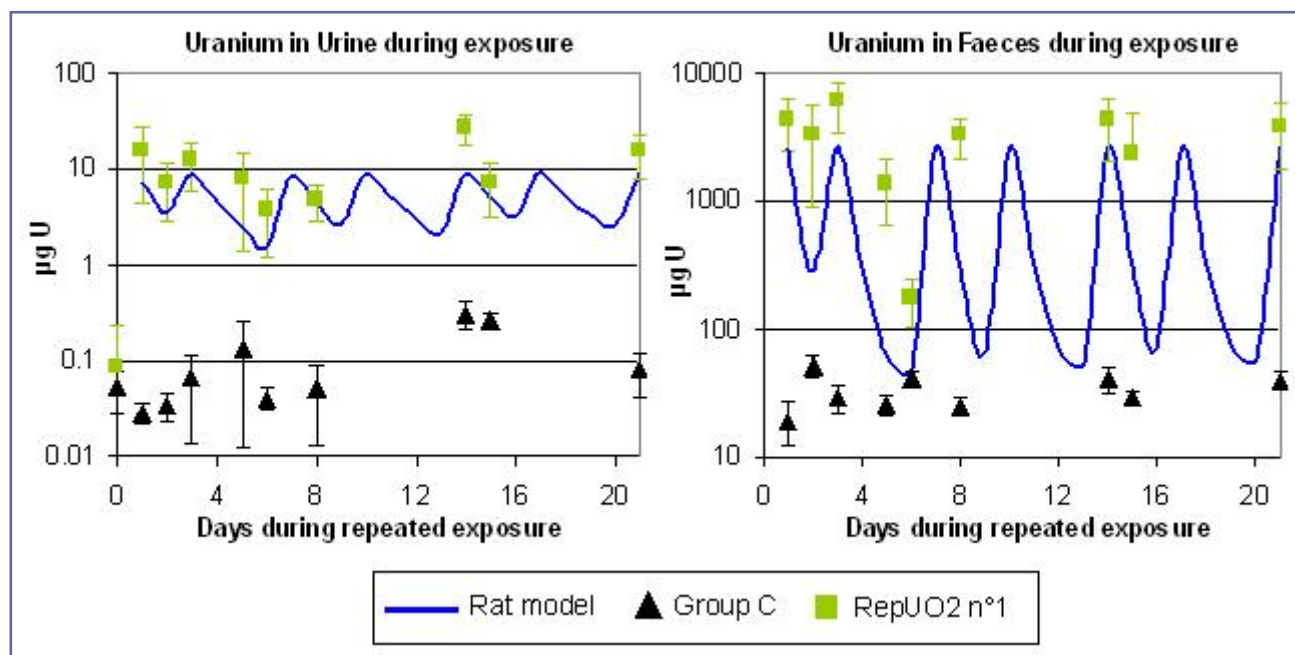


Figure 29 : Quantités d'uranium dans les excréta pendant l'exposition répétée

Moyenne  $\pm$  SD, n = 16 pour le groupe RepUO2 n°1, n = 3 pour le groupe contrôle

Le modèle prédit des pics d'excrétion de l'uranium dans les excréta après chaque inhalation puis une diminution de la quantité d'uranium entre les inhalations. Il semblerait qu'expérimentalement, l'allure de l'excrétion urinaire de l'uranium soit identique, avec peut être une diminution plus lente entre les inhalations que ce que prédit le modèle. Dans les fèces, la quantité d'uranium reste plus élevée pour les périodes comprises entre les inhalations comparativement avec ce que prédit le modèle. Au 2<sup>ème</sup> jour, la quantité d'uranium excrétée expérimentale est de  $3281 \pm 2392$  µg, alors que le modèle prédit 2545 µg et au 5<sup>ème</sup> jour la quantité excrétée est de  $174,4 \pm 72,4$  µg, alors que le modèle prédit 47 µg. Tester aussi le modèle sur les organes pendant l'exposition pourrait donc être intéressant.

## III.1.2 - Implications pour le suivi des travailleurs du nucléaire

### III.1.2.1 - Résumé de l'article 2

Les deux hypothèses utilisées en pratique lors du suivi des travailleurs du nucléaire pour estimer une dose résultant d'une incorporation à une date inconnue sont testées à l'aide des valeurs expérimentales obtenues après les expositions RepUO2 n°1 et du modèle biocinétique adapté au rat. Cette analyse utilise le schéma d'exposition expérimental décrit précédemment ; cependant l'objectif est bien différent de l'article précédent.

Ces deux hypothèses sont appelées hypothèse « T/2 » et hypothèse « chronique » (cf. Chap. I.2.2). L'hypothèse T/2 suppose que la contamination a eu lieu au milieu de l'intervalle de temps (T) entre deux examens médicaux. L'incorporation théorique est  $M/m(T/2)$ , où M est la quantité mesurée lors du contrôle médical (donc à la fin du temps T) et  $m(T/2)$  la valeur prédite par le modèle pour une incorporation de 1 Bq qui aurait eu lieu au milieu de l'intervalle de temps T (Article 2 - Figure 1). L'hypothèse chronique suppose que la contamination a eu lieu tout au long de l'intervalle de temps T de manière continue. Dans ce cas, l'incorporation théorique est  $M/p(T)$  où M est la quantité mesurée lors du contrôle médical et  $p(T)$  la valeur prédite dans le cas d'une incorporation journalière de 1 Bq (Article 2 - Figure 1).

Plusieurs scénarios sont testés : soit l'intervalle de temps entre deux examens médicaux est équivalent à la durée de la contamination, soit il est plus court ou plus long.

L'incorporation théorique calculée à partir des mesures de rétention pulmonaire est relativement fiable quelle que soit l'hypothèse choisie (Article 2 - Table 1) et quel que soit le scénario temporel (Article 2 - Tables 2 et 3). Cependant les mesures de rétention pulmonaire ont des limites de détection élevées ce qui ne rend pas toujours possible l'estimation de l'incorporation.

A partir des mesures dans les urines, lorsque la durée de la contamination est la même que l'intervalle de temps entre les contrôles médicaux, les deux hypothèses donnent une estimation correcte de l'incorporation, avec un avantage pour l'hypothèse chronique (Article 2 - Table 1).

Lorsque l'intervalle de temps entre les contrôles médicaux est différent de la durée de la contamination (Article 2 - Table 3, cas 2 et Table 4), les deux hypothèses donnent de bonnes estimations à condition que la contamination dure jusqu'au moment

de l'examen médical. L'hypothèse chronique, dans ce cas, surestime toujours avec un facteur inférieur à 2.

En revanche, lorsque l'intervalle de temps entre les contrôles médicaux est supérieur à la durée de la contamination et que l'examen médical a lieu plusieurs jours après la fin de la contamination (Article 2 - Table 3, cas 1), l'hypothèse chronique sous-estime très fortement l'incorporation (d'un facteur 15) tandis que l'hypothèse T/2 ne la sous-estime que d'un facteur 4.

L'incorporation théorique calculée à partir des mesures dans les urines est réalisable bien que l' $UO_2$  soit insoluble. L'hypothèse chronique est la plus réaliste lorsque la contamination est en cours lors de l'examen médical. Néanmoins, lorsque la contamination est achevée avant l'examen médical, l'hypothèse T/2 est préférable.

Dans l'ensemble, les estimations de l'incorporation sont correctes et l'hypothèse chronique donnerait des estimations plus précises. L'hypothèse T/2 a plutôt tendance à surestimer l'incorporation et est plus prudente lorsque le profil de contamination est inconnu.



### III.1.2.2 - Article 2 - Biokinetics models in rats exposed to repeated inhalation of uranium: implications for the monitoring of nuclear workers

Note acceptée dans *"Radioprotection"*

Marjorie Monleau<sup>1</sup>, Eric Blanchardon<sup>2</sup>, Marie Claraz<sup>1</sup>, François Paquet<sup>1</sup>, Valérie Chazel<sup>1</sup>

1 IRSN/DRPH/SRBE/LRTOX, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale, BP 166, 26702 Pierrelatte Cedex, France

2 IRSN/DRPH/SDI/LEDI, Laboratoire d'Evaluation de la Dose Interne, BP17, 92262 Fontenay aux Roses Cedex, France

Keywords: uranium, biokinetic, chronic exposure, inhalation, model

### Résumé

Les modèles dosimétriques de la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) permettent de calculer les coefficients de dose et les fonctions de rétention et d'excrétion utilisés pour l'estimation de la dose engagée suite à une inhalation chronique ou accidentelle d'aérosols radioactifs. La première source d'erreur dans l'estimation dosimétrique pour la surveillance de routine des travailleurs du nucléaire est l'inconnu sur la ou les dates d'incorporations. Aussi, les deux hypothèses le plus couramment utilisées pour estimer une dose résultant d'une incorporation à une date inconnue sont testées expérimentalement à partir d'un modèle d'inhalation répétée chez le rat. L'incorporation théorique calculée à partir des mesures de rétention pulmonaire est relativement fiable quelle que soit l'hypothèse choisie. L'incorporation théorique calculée à partir des mesures des excréta dépend du choix de l'hypothèse et du profil de contamination.

### Abstract

For dose assessment following chronic or accidental inhalation of radioactive aerosols, the dosimetric models of the International Commission on Radiological Protection (ICRP) provide dose coefficients, retention and excretion functions. Unknown date or dates of intake is the major source of uncertainty in dose assessment during routine monitoring of nuclear workers. The two assumptions commonly made in dose assessment from an unknown time pattern of intake have been tested experimentally with a model of repeated inhalation by rats. The hypothetical intake derived from lung measurement was relatively reliable under the two hypotheses. The hypothetical intake derived from excreta measurement depended on the choice of hypothesis and on the real time pattern of intake.

## Introduction

Inhalation of airborne uranium compounds such as  $\text{UO}_2$ ,  $\text{UO}_3$  and  $\text{U}_3\text{O}_8$  is one of the major considerations for the health protection of nuclear workers involved in uranium concentration, purification, enrichment and in fuel fabrication (Boffetta *et al.*, 1991; Fulco *et al.*, 2000; Chazel *et al.*, 2001). After contamination, the systemic distribution of uranium cannot be directly measured in humans and must be inferred from the urinary or faecal uranium excretion rate using a biokinetic model (McDiarmid *et al.*, 2002; Bailey *et al.*, 2003; Stradling *et al.*, 2003; McDiarmid *et al.*, 2004). For contamination through inhalation, the human respiratory tract model described in ICRP Publication 66 (ICRP, 1994) and the uranium systemic model of ICRP Publication 69 (ICRP, 1995) are used to design monitoring programmes and interpret activity measurements (Bailey, Ansoborlo *et al.*, 2003). These models are implemented to produce dose coefficients, retention and excretion functions.

Nuclear workers potentially exposed to radionuclides are monitored routinely at pre-determined time intervals. To interpret the monitoring data when no established incident took place, it is usually assumed that the possible intake happened at the middle of the monitoring interval (T/2 hypothesis). If chronic exposure is suspected, it is assumed that the intake occurred continuously (chronic hypothesis) during the entire monitoring interval (ICRP, 1997). Using the biokinetic model of uranium under either of these two hypotheses, can lead to under- or over- estimation of the real intake and, consequently, of the assessed dose and risk.

This study uses experimental data to compare the known experimental intake with the estimations obtained under the two hypotheses about the plausible time pattern of exposure used for nuclear workers (chronic or T/2 hypothesis).

## Materials and Methods

### Animals

Sixteen-week old, pathogen-free adult male OFA Sprague Dawley rats weighing  $562\text{g} \pm 26\text{g}$  were obtained from Charles River Laboratories, France. General health parameters of the rats (animal weight, food and water consumption) were monitored weekly throughout the experiments. The study was conducted in accordance with French legislation on the protection of animals used for experimental purposes.

### Aerosol generation

The industrial  $\text{UO}_2$  powder found at workplaces in uranium fuel cycle facilities was supplied by COGEMA (Pierrelatte, France). The  $\text{UO}_2$  characteristics were depleted insoluble (absorption Type S) uranium, specific alpha activity =  $13.10^3 \text{ Bq.g}^{-1}$ ; density =  $11.44 \text{ g.cm}^{-3}$ ; isotopic composition by mass:  $^{238}\text{U} = 99.755\%$ ,  $^{235}\text{U} = 0.244\%$ ,  $^{234}\text{U} = 0.001\%$ ,  $^{236}\text{U} < 0.0003\%$ ,  $^{232}\text{U} < 0.00001\%$ .

The instrument used for the  $\text{UO}_2$  aerosol generation was a Small-Scale Powder Disperser (SSPD, model 3433, TSI, St. Paul, MN 55164, USA). The concentration of particles in the inhalation chamber was calibrated by sampling onto membrane filters (pore size  $0.8 \mu\text{m}$ , 25 mm diameter, in cellulose acetate, Millipore). The particle size distribution of the aerosols administered to the rats was determined using an Andersen cascade impactor and an Aerodynamic Particle Sizer (APS, model 3310A, combined with a diluter, model 3302, TSI, USA). Sixty eight percent of the particles mass had an aerodynamic diameter from  $0.4$  to  $9 \mu\text{m}$ . With the impactor, the aerodynamic median activity diameter (AMAD) was  $2.53 \mu\text{m}$  (geometric standard deviation,  $\text{gsd} = 1.93$ ). With the APS, the mass median aerodynamic diameter of the  $\text{UO}_2$  particles was  $1.8 \mu\text{m}$  ( $\text{gsd} = 1.66$ ) and the number median aerodynamic diameter =  $0.91 \mu\text{m}$  ( $\text{gsd} = 1.48$ ).

### Aerosol administration

The aerosol administration, achieved using a nose-only inhalation system (Phalen *et al.*, 1984; André *et al.*, 1989; Monleau *et al.*, in press). The rats were acclimatised to the housing facilities, metabolism cages and restraining tubes for at least two weeks. Following acclimatisation, repeated exposure started at twenty weeks of age. Animals were divided into two groups and exposed to repeated inhalations of  $\text{UO}_2$  (group U = 15 rats) or clean air (group C = 12 rats) respectively. Group U was repeatedly exposed by inhalation for one hour to  $\text{UO}_2$  with an aerosol concentration of  $190 \text{ mg.m}^{-3}$  (lung intake around  $200 \mu\text{g}$ ), twice a week for three weeks (7 inhalations).

### Uranium measurement

Rats were housed in metabolism cages for ten days post-exposure and then twice a week. Urine and faeces were collected every day. Three rats from group U were sacrificed 1, 3, 6, 15 and 30 days after the end of the repeated exposure and three rats from the control group C were sacrificed at days 1, 3, 15 and 30. Rats were anaesthetised with isoflurane and exsanguinated via the abdominal artery. They were autopsied immediately to collect the lungs (with trachea). The collected samples were placed in separate bottles, weighed, frozen and maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysed for uranium concentration.

To analyse the uranium content, the samples were ashed based on a previously-published method (Ejnik *et al.*, 2000) and the uranium mass content was determined by Kinetic Phosphorescence Analysis (KPA), Chemcheck, Richland, VA, USA (Hedaya *et al.*, 1997).

### Rat inhalation model

The Cyclomod software programme (Malarbet, 1998) was used to design and implement the biokinetic model of uranium in rats (Monleau *et al.*, in press). Cyclomod predicts human urinary and faecal excretion of uranium and its retention in the ICRP biokinetic model compartments after a given intake. It is based on the models of ICRP publications 30, 66 and 69 (ICRP, 1979; 1994; 1995) and the algorithm described by Birchall and James (Birchall *et al.*, 1987).

The transfer rates were adjusted to data from studies of acute intake of uranium by rats already published in the literature and reviewed by Leggett (Leggett *et al.*, 2003) and from an inhalation study of the acute intake of uranium by rats carried out in our laboratory (Monleau *et al.*, in press). For the acute inhalation study, sixteen rats were exposed by inhalation for two hours to  $\text{UO}_2$  with an aerosol concentration of  $375 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ; the uranium biokinetics in organs and excreta were monitored at 1, 3, 6, 15 and 30 days post-exposure. The biokinetic parameter values of the Cyclomod software, which initially refers to the ICRP human reference values, were changed so that the predicted retention and excretion functions matched the experimental data from rat organ and excreta measurements after the acute inhalation (Monleau *et al.*, in press). This rat inhalation model is used in this study to obtain the reference curves necessary to estimate the hypothetical intakes.

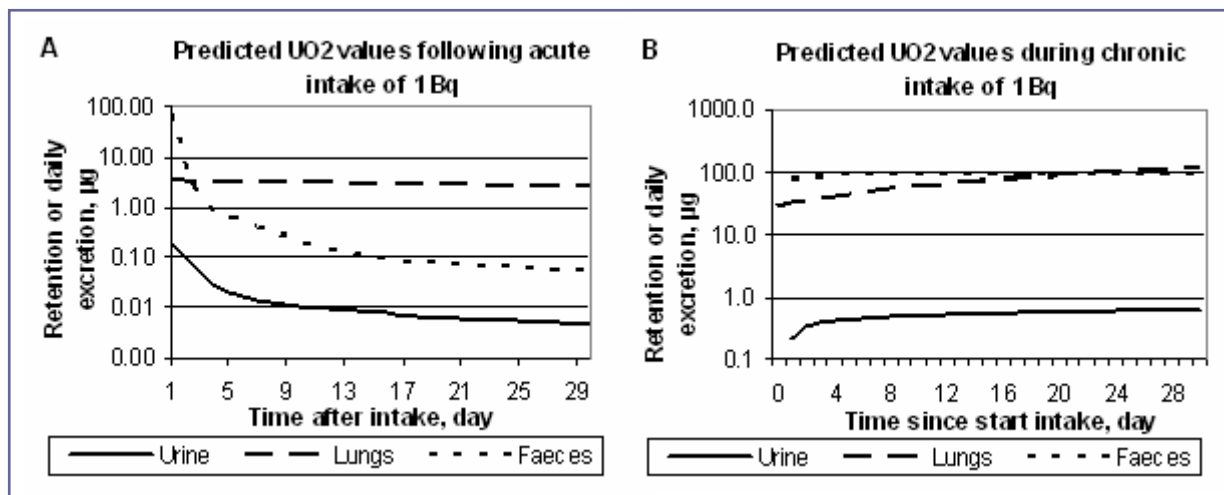
### Test of the two hypotheses used for monitoring programme

During routine monitoring, when a positive measurement value is obtained and the time of intake within the monitoring period is unknown, it is usually assumed it took place at the middle of the monitoring interval ( $T/2$  hypothesis). For a monitoring interval  $T$ , the hypothetical intake is  $M/m_{(T/2)}$ , where  $M$  is the measured quantity in lungs or excreta at the end of the monitoring interval and  $m_{(T/2)}$  is the predicted value for an intake of 1 Bq that occurred at the mid-point of the monitoring interval  $T$  (ICRP, 1997). If chronic exposure is suspected, it can be assumed that the intake occurred continuously (chronic hypothesis) during the entire monitoring interval. In this case, the hypothetical intake is  $M/p_{(T)}$ , where  $M$  is the measured quantity in lungs or excreta at the end of the monitoring interval and  $p_{(T)}$  is the predicted value for a daily intake of 1 Bq that occurred throughout monitoring interval  $T$ . The hypothetical intakes based on the biokinetic model were compared with the experimental intake.

Different contamination time patterns and monitoring intervals were considered. The monitoring interval was either smaller or larger than the experimental exposure time. In these different cases, the estimated experimental intake was compared with the hypothetical intakes obtained under both hypotheses from lung or urine measurements.

## Results and Discussion

For routine monitoring of workers, only intake by inhalation is considered (ICRP, 1997). The reference uranium biokinetics for rats obtained from the rat inhalation model under the two hypotheses, mid-interval and chronic exposure, are illustrated in Article 2 - Figure 1 (respectively A and B). These functions were used to calculate the hypothetical intakes.



*Article 2 - Figure 1 : Biokinetics of uranium dioxide in lungs ( $\mu\text{g/g}$  lungs), urine and faeces ( $\mu\text{g}$ ) as predicted by the rat inhalation model as a function of days*

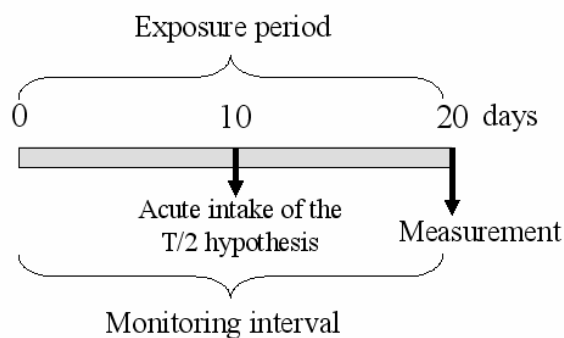
A presents the reference biokinetics for the T/2 hypothesis: predicted retention and excretion values of UO<sub>2</sub> following acute inhalation of 1Bq. B presents the reference biokinetics for the chronic hypothesis: predicted retention and excretion values of UO<sub>2</sub> following continuous chronic inhalation of 1Bq/day.

We first considered a monitoring interval equal to the experimental exposure time. Article 2 - Table 1 compares the experimental intake with the hypothetical intakes estimated from measurements in the lungs and excreta under both hypotheses.

Under the T/2 hypothesis, the hypothetical intake derived from the lung measurement supplied the most realistic estimation, although the intake was slightly underestimated by a factor of two. The hypothetical intakes derived from excreta measurements were overestimated from the urine measurement (by about a factor of 4) to highly overestimated from the faecal measurement (by a factor of 44). This significant overestimation of intake derived from faecal measurement can probably be explained by the high faecal excretion by rats in the first day (data not shown). This very rapid faecal excretion kinetic observed in rats makes it difficult to extrapolate this result to humans. Under the chronic hypothesis, the hypothetical intake derived from

the lung measurement showed little variation and the estimations from excreta measurements were more realistic.

*Article 2 - Table 1 : Test of two hypotheses for interpretation of routine monitoring of uranium in lungs and excreta*



<b>1A - T/2 Hypothesis</b> <i>T/2 = 10 days</i>	Lungs	Urine	Faeces
Experimental retention (µg/g lung) or daily excretion (µg) 1 day post-exposure	600	15	3866
Predicted value 10 days after acute intake of 1Bq (µg/g or µg)	2.99	0.01	0.22
Cumulated intake (Bq)		400	
Hypothetical intake (Bq)	200	1500	17573
Hypothetical versus experimental intake	0.5	3.8	44

<b>1B - Chronic hypothesis</b>	Lungs	Urine	Faeces
Experimental retention (µg/g lung) or daily excretion (µg) 1 day post-exposure	600	15	3866
Predicted value (µg/g or µg) for a daily intake of 1Bq for 20 days	91	0.56	90
Daily intake (Bq/day)		19	
Hypothetical intake (Bq/day)	6.6	26.6	43
Hypothetical versus experimental intake	0.35	1.4	2.3

We postulate here that the monitoring interval is equal to the exposure period of 20 days. 1A - T/2 hypothesis, the hypothetical intake took place at day 10, the middle of the monitoring interval. 2B - Chronic intake hypothesis.



As a conclusion, whatever the hypothesis, the theoretical intake derived from the lung measurement is reasonable but slightly underestimated. But lung measurements are not often used in practice, because only very large intakes can be detected by direct *in vivo* measurement. Although uranium dioxide is relatively insoluble, the estimation of the intake from urine measurement is correct, with an overestimation by a factor lower than 4. The estimation of uranium intakes and doses from urine samples are very sensitive to the dissolution rate in the lungs. On the other hand, the estimation from faecal measurement is reasonable only under the chronic hypothesis.

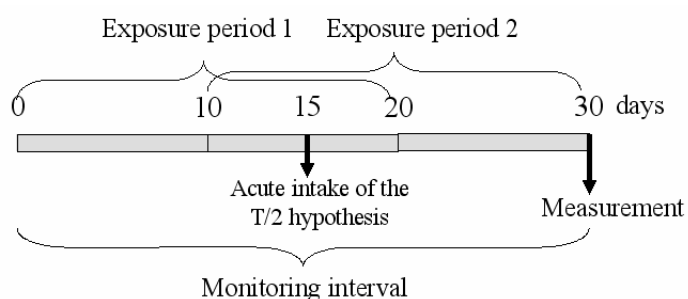
In the second case-study, the intake from lung and urine measurements was estimated for a monitoring interval being ten days longer than the exposure period. The contamination period may take place at the beginning or at the end of the monitoring interval. Experimental and theoretical intakes were compared under both hypotheses from lung (Article 2 - Table 2) and urine (Article 2 - Table 3) measurements.

From the lung measurement, the hypothetical intakes were underestimated (by a factor of 2 to 4) regardless of the hypothesis and the position of the exposure period in the monitoring interval. The T/2 hypothesis may seem a little better (underestimation only by a factor of 2) but with no significant advantage on the chronic hypothesis.

*Article 2 - Table 2 : Test of two hypotheses for interpretation of routine monitoring of uranium in lungs*

2A - T/2 Hypothesis <i>T/2 = 15 days</i>	Exposure (1) at beginning of interval	Exposure (2) at end of interval
Experimental retention in lungs ( $\mu\text{g/g}$ )	10 days post- exposure 550	1 day post- exposure 600
Predicted value 15 days after acute intake of 1Bq ( $\mu\text{g/g}$ )	2.85	2.85
Cumulated intake (Bq)	400	
Hypothetical intake (Bq)	193	210
Hypothetical versus experimental intake	0.48	0.53

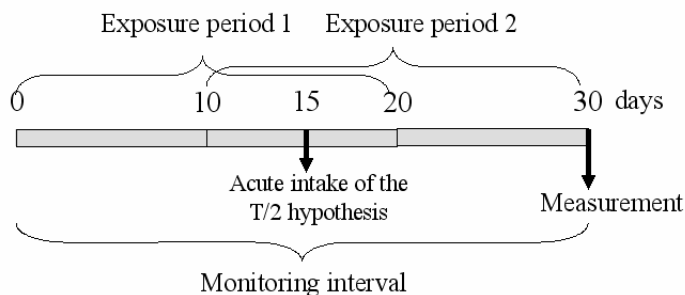
2B - Chronic hypothesis	Exposure at beginning of interval (1)	Exposure at end of interval (2)
Experimental retention in lungs ( $\mu\text{g/g}$ )	10 days post-exposure 550	1 day post-exposure 600
Predicted value ( $\mu\text{g/g}$ ) for a daily intake of 1Bq for 30 days	114	114
Daily intake (Bq/day)	19	
Hypothetical intake (Bq/day)	4.8	5.3
Hypothetical versus experimental intake	0.25	0.28



We postulate here that the monitoring interval is 10 days longer than the exposure period. Exposure period = 20 days; monitoring interval = 30 days. 2A - T/2 hypothesis, the hypothetical intake took place at day 15, the middle of the monitoring interval. 2B - Chronic intake hypothesis.

From the urine measurement (Article 2 - Table 3), the hypothetical intakes were underestimated when the exposure period was at the beginning of the monitoring interval, all the more if the chronic hypothesis was applied (by a factor of 15). However, when the exposure period was at the end of the monitoring interval, the hypothetical intakes were overestimated and the T/2 hypothesis overestimated the intake more (by a factor around 5) than the chronic hypothesis (by a factor of 1.3).

*Article 2 - Table 3 : Test of two hypotheses for interpretation of routine monitoring of uranium in urine*



<b>3A - T/2 Hypothesis</b> <i>T/2 = 15 days</i>	Exposure (1) at beginning of interval	Exposure (2) at end of interval
Experimental daily excretion in urine ( $\mu\text{g}$ )	10 days post-exposure 0.75	1 day post-exposure 15
Predicted value 15 days after acute intake of 1Bq ( $\mu\text{g}$ )	0.0078	0.0078
Cumulated intake (Bq)	400	
Hypothetical intake (Bq)	96	1923
Hypothetical versus experimental intake	0.24	4.8

<b>3B - Chronic hypothesis</b>	Exposure at beginning of interval (1)	Exposure at end of interval (2)
Experimental daily excretion in urine ( $\mu\text{g}$ )	10 days post-exposure 0.75	1 day post-exposure 15
Predicted value ( $\mu\text{g}$ ) for a daily intake of 1Bq for 30 days	0.612	0.612
Daily intake (Bq/day)	19	
Hypothetical intake (Bq/day)	1.23	24.5
Hypothetical versus experimental intake	0.065	1.3

We postulate here that the monitoring interval is 10 days longer than the exposure period. Exposure period = 20 days; monitoring interval = 30 days. 3A - T/2 hypothesis, the hypothetical intake took place at 15 days, the middle of the monitoring interval. 3B - Chronic intake hypothesis.

In conclusion, the hypothetical intakes derived from lung measurement were fairly insensitive to a possible error in estimating the exposure period, unlike the hypothetical intakes derived from urine measurement.

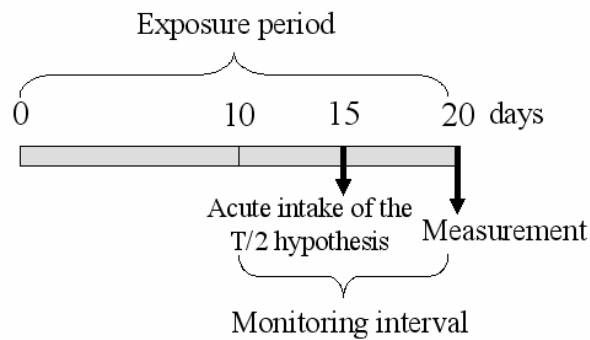
In the third case-study, the intakes from lung and urine measurements were estimated for a monitoring interval being ten days shorter than the exposure period. The monitoring interval may take place at the beginning or at the end of the exposure period. When the monitoring interval is at the beginning of the exposure period, the situation is comparable to the scenario described in Article 2 - Table 1 with a shorter exposure period corresponding to the monitoring interval. The case where the monitoring interval is at the end of the exposure period could correspond to the situation of a past contamination not detected during the previous monitoring or to the first monitoring of a worker contaminated elsewhere. Experimental and theoretical intakes from lung and urine measurements were compared under both hypotheses when the monitoring interval is at the end of the exposure period (Article 2 - Table 4).

Regardless of the hypothesis, the hypothetical intakes were underestimated (by a factor around 2) when estimated from lung measurement and were overestimated (by a factor around 2) when estimated from urine measurement.

*Article 2 - Table 4 : Test of two hypotheses for interpretation of routine monitoring of uranium in lungs and urine*

4A - T/2 Hypothesis <i>T/2 = 5 days</i>	Lungs	Urine
Experimental retention ( $\mu\text{g/g}$ lung) or daily excretion ( $\mu\text{g}$ ) 1 day post-exposure	600	15
Predicted value 5 days after acute intake of 1Bq ( $\mu\text{g/g}$ or $\mu\text{g}$ )	3.15	0.02
Cumulated intake (Bq)	400	
Hypothetical intake (Bq)	190	750
Hypothetical versus experimental intake	0.47	1.9

4B - Chronic hypothesis	Lungs	Urine
Experimental retention (µg/g lung) or daily excretion (µg) 1 day post-exposure	600	15
Predicted value (µg/g or µg) for a daily intake of 1Bq for 10 days	60	0.48
Daily intake (Bq/day)	19	
Hypothetical intake (Bq/day)	10	31
Hypothetical versus experimental intake	0.5	1.6



We postulate here that the monitoring interval is 10 days shorter than the exposure period of 20 days. 4A - T/2 hypothesis, the hypothetical intake took place at the middle of the monitoring interval (day 5) which corresponds to 15 days of exposure. 4B - Chronic intake hypothesis.

## Conclusions

In case of inhalation of an insoluble uranium compound, the hypothetical intake derived from the lung measurement is relatively reliable under both T/2 and chronic hypotheses used in monitoring programmes, as it is only lightly affected by the contamination time pattern. The main disadvantage is that the limit of detection of uranium by lung measurement is rather high (at least 20 Bq).

The hypothetical intake from excreta measurement depends much on the assumption on the time of intake. Assuming the most realistic contamination time pattern has a fundamental impact on the reliability of intake and dose assessments. The chronic hypothesis is more realistic if the monitoring interval is similar to the actual contamination period. Otherwise, the T/2 hypothesis is more conservative, as it tends to overestimate the intake in the majority of cases or to underestimate it only slightly.

The monitoring programmes must take into account the possible contamination type, the sensitivity of the measurement techniques and the biokinetics of the radionuclide to specify a monitoring interval that allows a reasonably accurate estimation of intakes when the time of exposure is unknown.

## Acknowledgements

We wish to thank O. Delissen, B. Dhieux, C. Maubert, and A.M. Moreels for their assistance during exposure, euthanasia and dissection. This work was partially supported by COGEMA (DOSINTER programme).

## References

- André S., Charuau J., Rateau G., Vavasseur C. and Métivier H. (1989) Design of a new inhalation device for rodents and primates, *J Aeros Sci* 20 (6), 647-656.
- Bailey M.R., Ansoborlo E., Guilmette R.A. and Paquet F. (2003) Practical application of the ICRP Human Respiratory Tract Model, *Radiat Prot Dosimetry* 105 (1-4), 71-6.
- Birchall A. and James A.C. (1987) A general algorithm for solving compartmental models with constant coefficients and its implementation on a microcomputer, *National Radiological Protection Board.NRPB-R216*. Chilton.
- Boffetta P., Cardis E., Vainio H., Coleman M.P., Kogevinas M., Nordberg G., Parkin D.M., Partensky C., Shuker D. and Tomatis L. (1991) Cancer risks related to electricity production, *Eur.J Cancer* 27 (11), 1504-1519.
- Chazel V., Houpert P., Paquet F. and Ansoborlo E. (2001) Effect of absorption parameters on calculation of the dose coefficient: example of classification of industrial uranium compounds, *Radiat.Prot.Dosimetry*. 94 (3), 261-268.
- Ejnik J.W., Hamilton M.M., Adams P.R. and Carmichael A.J. (2000) Optimal sample preparation conditions for the determination of uranium in biological samples by kinetic phosphorescence analysis (KPA), *J Pharm Biomed Anal* 24 (2), 227-235.
- Fulco C.E., Liverman C.T. and Sox H.C. (2000) Depleted Uranium, *Gulf War and Health*.1. Depleted uranium, Pyridostigmine bromide, Sarin and Vaccines: 89-168. Fulco, Liverman and Sox. Washington, National Academies press.
- Hedaya M.A., Birkenfeld H.P. and Kathren R.L. (1997) A sensitive method for the determination of uranium in biological samples utilizing kinetic phosphorescence analysis (KPA), *J Pharm Biomed Anal* 15 (8), 1157-1165.
- ICRP Publication 30 (1979) Limits for intakes of radionuclides by workers, part 1, *Ann. ICRP*. 2, 3-4.
- ICRP Publication 66 (1994) Human respiratory tract model for radiological protection, *Ann. ICRP* 24, 1-3.
- ICRP Publication 69 (1995) Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides: Part 3 Ingestion dose coefficients, *Ann. ICRP* 25, 1.
- ICRP Publication 78 (1997) Individual monitoring for internal exposure of workers, *Ann. ICRP* 27, 3-4.
- Leggett R.W. and Pellmar T.C. (2003) The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments, *J Environ Radioact* 64 (2-3), 205-25.
- Malarbet J.L. (1998) Calculations of radionuclide organ retentions from ICRP biokinetic recycling models, *Radiat Prot Dosimetry* 79 (1-4), 379-381.
- McDiarmid M.A., Hooper F.J., Squibb K., McPhaul K., Engelhardt S.M., Kane R., DiPino R. and Kabat M. (2002) Health effects and biological monitoring results of Gulf War veterans exposed to depleted uranium, *Mil Med* 167 (2 Suppl), 123-4.
- McDiarmid M.A., Squibb K. and Engelhardt S.M. (2004) Biologic monitoring for urinary uranium in gulf war I veterans, *Health Phys* 87 (1), 51-6.
- Monleau M., Blanchardon E., Claraz M., Paquet F. and Chazel V. (in press) The effect of repeated inhalation on the distribution of uranium in rats, *J Toxicol Environ Health*.
- Phalen R.F., Mannix R.C. and Drew R.T. (1984) Inhalation exposure methodology, *Environ Health Perspect Jun*;56, 23-34.
- Stradling N., Hodgson A., Ansoborlo E., Berard P., Etherington G., Fell T. and LeGuen B. (2003) Optimising monitoring regimens for inhaled uranium oxides, *Radiat Prot Dosimetry* 105 (1-4), 109-14.





## Chapitre III.2 - Effets biologiques des particules d'uranium inhalées par des rats

### III.2.1 - L'accumulation de l'uranium dans le cerveau et les effets comportementaux

#### III.2.1.1 - Résumé de l'article 3

Quelques études expérimentales suggèrent une relation entre une contamination à l'uranium et des effets sur le système nerveux central. Ces effets sont étudiés ici chez le rat après exposition par inhalation répétée d'UO<sub>2</sub> (RepUO2 n°2, group U dans l'article 3) par la mesure de l'accumulation d'uranium dans différentes structures cérébrales et par l'utilisation de deux tests de comportement, l'un permettant d'évaluer l'activité locomotrice spontanée par le biais d'un actimètre et l'autre permettant de tester la mémoire de travail spatial par l'utilisation d'un labyrinthe en Y.

Les résultats montrent que l'uranium s'accumule dans le cerveau de façon hétérogène. Un jour après contamination, la concentration de l'uranium varie comme suit : bulbe olfactif > hippocampe > cortex frontal > cervelet. Huit jours après, les concentrations sont identiques à celles des témoins (group C dans l'article 3). Une hypothèse serait que l'uranium utiliserait plusieurs voies d'entrée dans le cerveau. Une première serait effectuée au travers de la barrière hémato-encéphalique, nécessitant au préalable la dissolution de l'uranium dans les poumons et/ou dans le tractus gastro-intestinal vers le sang. Une seconde voie pourrait être la voie olfactive, la partie soluble de l'uranium empruntant le nerf olfactif.

D'autre part, l'inhalation répétée d'uranium entraîne des effets comportementaux qui se traduisent par une augmentation de l'activité de locomotion spontanée un jour après contamination et une diminution de la mémoire de travail spatial six jours après contamination chez les rats exposés comparés aux témoins. Des perturbations de la locomotion ont déjà été observées pour d'autres métaux après inhalation, et pour d'autres voies de contamination, en particulier celle de l'ingestion, avec de l'uranium appauvri.

### III.2.1.2 - Article 3 - Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations

Article accepté dans "*Neuroscience letters*"  
2005, Vol 390, pages 31-36

Marjorie Monleau, Cyrill Bussy, Philippe Lestaevel, Pascale Houpert, François Paquet,  
Valérie Chazel

Laboratoire de radiotoxicologie expérimentale, IRSN/DRPH/SRBE, BP166, 26702  
Pierrerelatte, France

Keywords: uranium, inhalation, chronic, behaviour, rat, biokinetics

#### Abstract

Depleted uranium has numerous industrial and military uses. Contamination by inhalation of airborne compounds is probably the most important route of exposure. In humans, there are no data clearly demonstrating neurotoxicity of uranium, yet some experimental studies suggest a link between neurological toxicity and uranium exposure. In this work, the bioaccumulation of uranium in male rats after exposure to repeated depleted uranium dioxide inhalation (30 min inhalation at  $197 \text{ mg.m}^{-3}$ , 4 days a week for 3 weeks) has been studied, together with the behavioural effects. The uranium concentrations in the brain 1 day after the end of the exposure period varied as follows: olfactory bulb > hippocampus > frontal cortex > cerebellum, subsequently decreasing rapidly. The spontaneous locomotion activity of exposed rats was increased 1 day post exposure and the spatial working memory was less efficient 6 days post exposure, compared with control rats. These data suggest that depleted uranium is able to enter the brain after exposure to repeated inhalation, producing behavioural changes.

## Introduction

Uranium is a natural radioactive heavy metal. Kidneys and bones are the primary reservoirs for uranium regardless of the route of exposure and the kidney is the critical target organ for uranium toxicity [7,24,28]. Depleted uranium is a by-product of the nuclear industry and of nuclear weapons production [6]. Its radioactive activity is approximately 40% lower than that of naturally occurring uranium. Uranium dioxide ( $\text{UO}_2$ ), trioxide ( $\text{UO}_3$ ) and octoxide ( $\text{U}_3\text{O}_8$ ) are important intermediates in the fabrication of nuclear fuels [5] and are the main chemical forms produced by explosion of uranium munitions [4,11]. Exposure to depleted uranium may occur through dust inhalation, by deposition of dust on skin and by ingestion of contaminated soil or dust [10]. Contamination through dust inhalation is probably the most significant exposure for workers [16] and soldiers [10,12,16,36].

After chronic exposure to depleted uranium fragments or acute injection, uranium was found to cross the blood-brain barrier in rats, becoming deposited heterogeneously in the brain [1,29]. The distribution was shown to be dose dependent [29]. Neurological effects from inhaling uranium were found in cats and dogs, including muscular weakness, instability of gait and anorexia [13,16,35]. Electrophysiological changes have been demonstrated in vitro in the hippocampus of rats [30]. All these studies suggest a link between neurological toxicity in animals and uranium exposure.

In humans, it was never clearly demonstrated that uranium affects the central nervous system and there are no data showing excessive neurological disease or mortality after uranium exposure. Some studies, however, showed states of depression or agitation in workers exposed to high concentrations of uranium [21] and neurological effects, including cognitive impairment [22]. Following the Gulf War, neuropsychiatry studies of soldiers injured by depleted uranium fragments demonstrated a statistically significant relationship between elevated urinary uranium excretion and declining performance efficiency [27]. However, this relationship was no longer statistically significant, in the 10-year follow up [25,26].

The study presented here aimed at elucidating the effects of uranium in the central nervous system of rat. It presents data on the bioaccumulation of uranium in the brain and on the behavioural effects after repeated depleted uranium inhalations.

## Materials and Methods

The industrial UO<sub>2</sub> powder came from uranium fuel cycle facilities and was supplied by COGEMA (France). The UO<sub>2</sub> characteristics were depleted insoluble uranium, specific alpha activity =  $13.10^3$  Bq.g<sup>-1</sup>; density = 11.44 g.cm<sup>-3</sup>; isotopic composition in mass: <sup>238</sup>U= 99.75%, <sup>235</sup>U= 0.24%, <sup>234</sup>U= 0.001%.

The UO<sub>2</sub> aerosols were generated using a Small-Scale Powder Disperser (SSPD, model 3433, TSI, USA). The particle concentration and particle size distribution were calibrated in our laboratory before the animal exposure. The concentration of particles in the inhalation chamber was calibrated by sampling onto membrane filters (pore size 0.8 µm, 25mm diameter, in cellulose acetate, Millipore). The particle size distribution of the aerosols administered to the rats was determined using a cascade Andersen impactor. The aerodynamic median activity diameter (AMAD) was 2.53 µm (geometric standard deviation, G.S.D. = 1.93).

Seventy-five, 16-week-old, pathogen-free adult male OFA Sprague-Dawley rats, weighing 555 g ± 44 g, were obtained from Charles River Laboratories, France. The rats were housed under standard laboratory conditions. General health parameters (animal weight, food and water consumption) were monitored weekly throughout the experiments. The study was conducted in accordance with French legislation on the protection of animals used for experimental purposes.

Following 2 weeks of acclimatization to both animal housing and inhalation system, repeated exposure started at 19-week-old. Exposure was achieved through a nose-only inhalation system. Animals were divided in two groups and exposed to repeated UO<sub>2</sub> inhalations (group U = 42 rats) and clean air (group C = 33 rats) respectively. Group U was repeatedly exposed to UO<sub>2</sub> inhalations for 30 min with an aerosol concentration of 190 ± 41 mg.m<sup>-3</sup> (lung intake of about 40µg.g<sup>-1</sup> lung), 4 days a week for 3 weeks.

Twenty-seven rats were used to study the bioaccumulation of uranium in the brain. Eighteen rats were exposed to uranium (group U) and nine rats were the controls (group C). Six rats from group U and three rats from group C were anaesthetised with isoflurane and exsanguinated via the abdominal artery at 1, 3 and 8 days after exposure. The rats were autopsied to collect the hippocampus, olfactory bulb, frontal cortex, cerebellum and the rest of the brain and the lungs. The collected tissues were placed in separate bottles, weighed, frozen and maintained at -20°C until analysed for

uranium concentration. For the uranium analyses, the samples were mineralised based on a previously published method [14] and the uranium content was determined by Kinetic Phosphorescence Analysis (KPA, Chemcheck, USA) [17]. The changes between groups were considered significant on the basis of a non-parametric Mann-Whitney statistical test with  $p < 0.05$ .

Forty-eight rats were used for the behavioural experiments. Two independent experiments A and B were performed with 24 rats (12 from group U and 12 from group C) for each experiment.

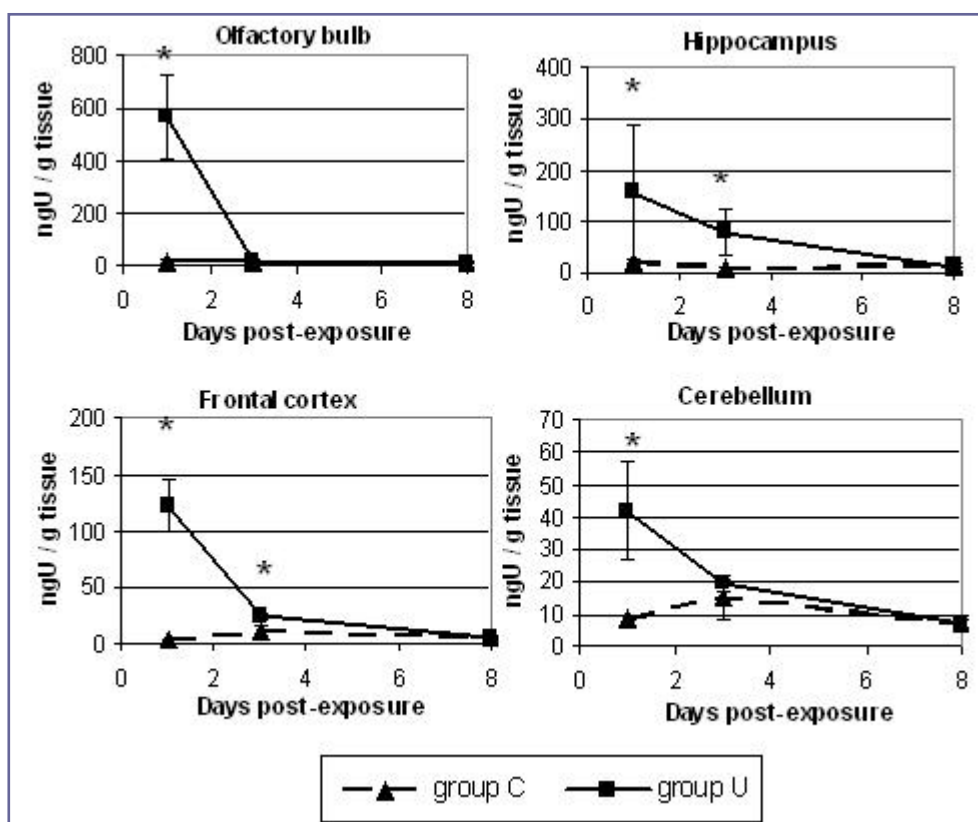
The spontaneous locomotion was first performed in two individual open fields (45 cm×45 cm) equipped with invisible infrared beams, with lines every 2.5 cm and one line 16 cm high, monitored by an automated activity monitoring system (Bioseb, France). Counting occurred when the rat moved horizontally, showing predominantly locomotor behaviour, or vertically, showing rearing activity. The locomotion and rearing numbers were recorded over a 20-min period. This test was carried out 1 day post exposure for experiment A and 5 days post exposure for experiment B.

The spatial working memory was assessed with the same animals the following day in a Y-maze (three arms, 70 cm long, 50 cm high, 10 cm wide at the bottom, 20 cm wide at the top and converged at an equal angle). The sequence and number of visits in each arm were recorded over a 10-min period. Alternation was recorded if the animal entered the least recently visited arm [33]. The number of visits in each arm illustrates the general exploratory activity of rats, while the spontaneous alternation illustrates the spatial working memory. This test was performed 2 days post exposure for experiment A and 6 days post exposure for experiment B. A non-parametric Mann-Whitney statistical test was used for the statistical analysis to compare exposed and control groups (U and C) in each experiment (A and B).

## Results

The general health parameters (weight of rats, consumption of food and water) were similar between uranium and control groups (data not shown).

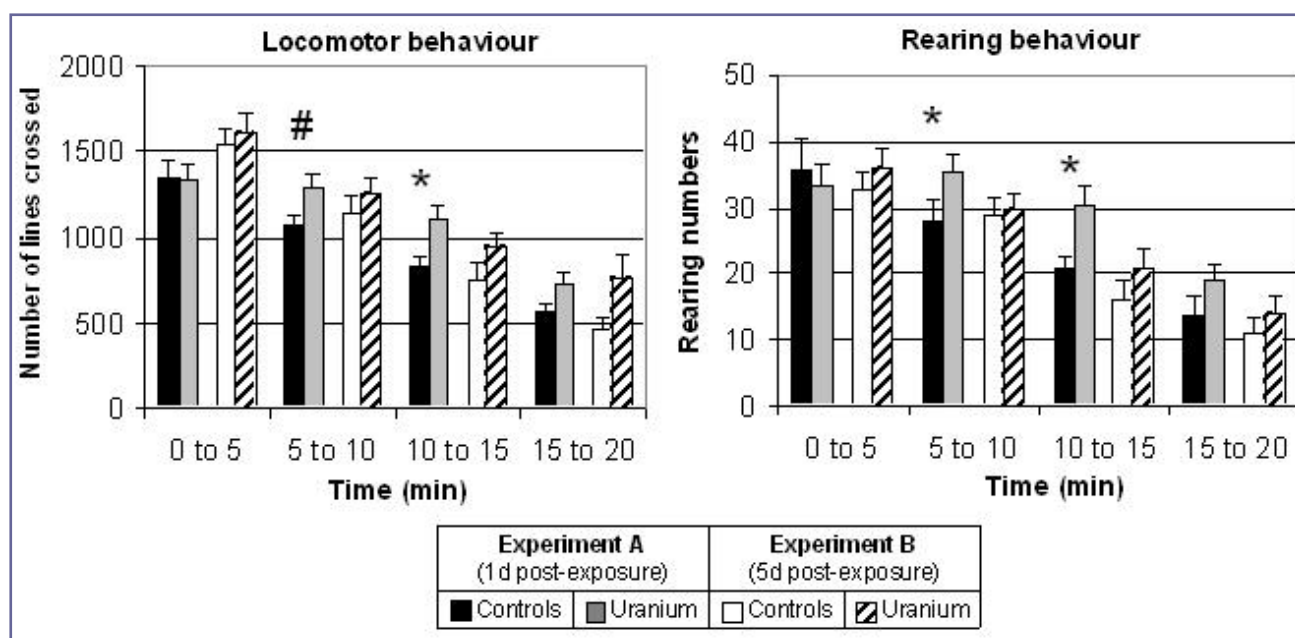
The bioaccumulation of uranium in the various brain areas is shown in Article 3 - Figure 1. Uranium levels in the brain areas of the exposed group were statistically higher than those of the controls 1 day post exposure and were not distributed uniformly. Within the brain, uranium quantities per gram of tissues, 1 day post exposure, varied as follows (concentrations in group U versus group C): olfactory bulb ( $567 \text{ ng.g}^{-1}$  versus  $16 \text{ ng.g}^{-1}$ ) > hippocampus ( $156 \text{ ng.g}^{-1}$  versus  $20 \text{ ng.g}^{-1}$ ) > frontal cortex ( $122 \text{ ng.g}^{-1}$  versus  $4 \text{ ng.g}^{-1}$ ) > cerebellum ( $42 \text{ ng.g}^{-1}$  versus  $8 \text{ ng.g}^{-1}$ ). Uranium levels then decreased rapidly and reached the control values as early as 3 days post exposure.



Article 3 - Figure 1 : Uranium concentration in rat brain areas as a function of days post-exposure

Data are represented as mean  $\pm$  S.D. n = 6 for exposed rats, group U. n = 3 for control rats, group C. p values below 0.05 between the U and C groups.

The locomotor and rearing behaviours are shown in Article 3 - Figure 2. A general upwards trend in locomotor and rearing activities was observed after 5 min for the exposed group U compared with the control group C for both experiments. However, this increase was statistically significant only for experiment A. For the locomotor behaviour, the exposed group demonstrated a borderline effect for 5-10 min period at  $p = 0.07$  and a significant effect for 10-15 min period ( $p = 0.04$ ) compared with the control. For the rearing numbers, the exposed group (experiment A) was significantly different from control from 5-10 min period ( $p = 0.04$ ) to 10-15 min period ( $p = 0.01$ ). The exposed rats had upper spontaneous locomotion compared with the control rats 1 day post exposure with an increase of around 25% in locomotor behaviour and around 35% in rearing behaviour.

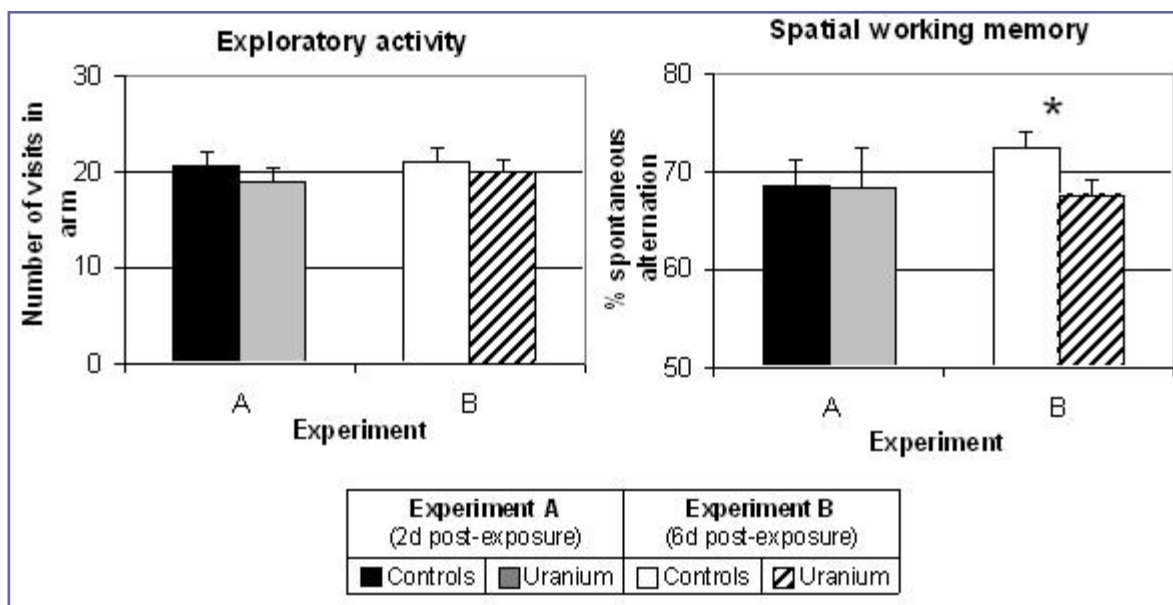


*Article 3 - Figure 2 : Effects of uranium inhalation on spontaneous locomotion in rats*

The locomotor and rearing behaviours are presented for 5-min periods throughout the entire test (20 min). Bars represent mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 12$ . The exposed U group, in experiment A, is significantly different from control at  $p < 0.04$  (\*) and reached a significance of 0.07 (#).

The spatial working memory test was measured by the number of visits in each arm and the percentage of spontaneous alternation during a 10-min period. The results for both parameters are shown in Article 3 - Figure 3. The exploratory activity was similar between the exposed and the control groups for both experiments. An analysis of spatial working memory shows no difference between exposed and control rats (68.5% alternation for each) at 1 day post exposure (experiment A). The percentage of

alternation of the exposed U group (67.5%) was statistically lower than that of the control C group (72.4%) with  $p = 0.03$ , 6 days post exposure (experiment B). The exposed rats had a less-efficient spatial working memory compared with the control rats 6 days post exposure with a decrease lower than 10%.



*Article 3 - Figure 3 : Effects of uranium inhalation on spatial working memory in rats*

The exploratory activity and the spatial working memory are shown after 10 min (total length of the Y-maze test) for experiments A and B. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 12$ . The exposed U group, in experiment B, is significantly different from control at  $p = 0.03$ .

## Discussion

The bioaccumulation results show that depleted uranium can enter the rat's brain after repeated inhalations. Uranium levels in the various brain areas tested were statistically higher than those in the controls 1 day post exposure. The uranium distribution was not homogeneous and varied as follows: olfactory bulb > hippocampus > frontal cortex > cerebellum. Uranium levels then decreased rapidly and reached the control values as early as 3 days post exposure.

There are potentially three main, different ways for compounds to enter the brain following inhalation exposure [39]. Firstly, molecules may enter the systemic circulation after either dissolution in lungs or mucociliary clearance and then gastrointestinal absorption. These molecules then move into the central nervous system from the blood through the cerebral capillaries (blood-brain barrier) or via the cerebrospinal fluid (blood-cerebrospinal fluid barrier). Secondly, molecules may be



taken up via the olfactory epithelial pathway. Finally, transport may take place through the olfactory nerve itself (which connects the nasal lumen and the olfactory bulb), whereby molecules gain access by moving into the olfactory receptor neurons and travelling along the olfactory nerve to the olfactory bulb [38,39]. This mechanism has already been shown for various metals - manganese, cadmium, nickel, mercury, cobalt and zinc - in animals [18,19,31,32,40]. But this kind of particle transport cannot be generalised for all the metals. Rao et al. [34] have shown that iron is not readily transported to the brain via olfactory pathways after acute inhalation, although the olfactory bulb was the brain area which contained the highest iron concentration. Most of the iron remained in the nasal regions of the olfactory system and less than 4% of iron deposited on the olfactory mucosa was observed in the olfactory bulb [34]. This has to be compared with manganese, where 70% of the manganese initially deposited on the olfactory mucosa was found in the olfactory bulb 1 day post exposure [2]. In these studies, the ratio of the metal concentration in the olfactory bulb and lungs was 70% for manganese [2] and 3% for iron [34]. These differences of behaviour may be due to differences of solubility. Dorman et al. [9] have shown that, after repeated inhalation (6 h/day, 7 days/week for 2 weeks at 3 mg.m<sup>-3</sup>), the relatively soluble manganese MnSO<sub>4</sub> (ratio olfactory bulb/lung = 61.4%) enters the brain more easily than the insoluble manganese Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (ratio = 9%).

In our experiment using insoluble uranium dioxide, the metal concentration ratio in the olfactory bulb and lungs was only 0.11% (the lung concentration 1 day post exposure was 500 µg.g<sup>-1</sup> lung). One hypothesis is that uranium, following inhalation of insoluble UO<sub>2</sub>, could be transported to the brain via multiple routes. The first route may be transport from the systemic compartment through the blood-brain barrier. This path requires a preliminary dissolution of UO<sub>2</sub> in the lungs and/or transfer from the lungs to the gastrointestinal tract by mucociliary clearance and then absorption to blood. The second route may be the olfactory nerves that probably transport a small, soluble part, of the compound. This hypothesis can explain the highest uranium concentration found in the olfactory bulb. It is clear that further, similar experiments using soluble uranium and visualising the transport of uranium from the nose to the brain are required to understand the mechanisms of uranium brain transport better.

Very few studies have been carried out to assess the neurotoxic effects associated with inhalation exposure to metals, despite the knowledge that most metal intoxication in workers occur via this route. Our study notes for the first time that

exposure to insoluble depleted uranium by repeated inhalation can produce behavioural effects in male rats.

These effects were first observed, in open field, as an increase in the spontaneous locomotion activity of exposed rats compared with the controls 1 day post exposure. These data are in agreement with previous inhalation studies on metal-induced locomotion disturbances, such as mercury, cadmium and manganese [8,15,37]. Briner and Murray [3] have shown an increased activity in open field, in terms of line crossing and rearing, in male rats after 2 weeks of uranium ingestion at a dose of 150 mg.L<sup>-1</sup>. Despite a variety of exposure methods, their results on the locomotor effects of depleted uranium match our own.

The behavioural effects of depleted uranium were secondly analysed in Y-maze. The exploratory activity was not modified although a perturbation in spontaneous locomotion activity has been observed in open field. These results are not in contradiction since the Y-maze is less sensitive. A less-efficient spatial working memory was observed 6 days post exposure. We must consider that the observed effect becomes apparent between the second day (test day for experiment A) and the sixth day (test day for experiment B) post exposure.

In our experiment, the hippocampus is the brain area which contains most of the uranium concentration after the olfactory bulb, and which still contains uranium significantly 3 days post exposure. The hippocampus is known to be involved in the spatial working memory [23]. Depleted uranium was shown to induce electrophysiological changes in vitro in hippocampal slices [30]. One hypothesis is that uranium alters the hippocampus and thus the performance in a Y-maze. Previous studies performed in our laboratory have shown a bioaccumulation of uranium in different brain areas, particularly hippocampus, and a reduction of spatial working memory in rats exposed to enriched uranium by chronic ingestion of 40 mgU.L<sup>-1</sup> during 1.5 months [20]. All the results showed that uranium exposure, with different types of exposure, could perturb the spatial working memory.

The systematic relationship between exposure or uranium levels in the brain and effects is difficult to demonstrate as we have used a single dose of uranium. Further experiments are necessary to establish a dose-response relationship. These initial results have been performed with a high uranium concentration, to know if effects on behaviour could be observed. Additional studies, particularly with lower doses and longer exposure times and using other measures of behaviour, are necessary to identify the mechanisms by which depleted uranium may produce behavioural changes.

In conclusion, this study demonstrates firstly that, after exposure through repeated inhalations, depleted insoluble uranium can enter the brain and accumulates differently from one brain area to the next. The brain transport mechanism is not clarified, however. Secondly, depleted uranium can produce behavioural changes in animals shown by an increase in the spontaneous locomotion activity 1 day post exposure and a less-efficient spatial working memory 6 days post exposure. The question now arises on the neurobehavioural effects in humans.

### **Acknowledgements**

We wish to thank C. Maubert and O. Delissen for their technical assistance. We are also grateful to C. Amourette (CRSSA, La Tronche, France) for her critical review of this manuscript. This work was partially supported by COGEMA.

## References

- [1] D.S. Barber, M.F. Ehrich, B.S. Jortner, The effect of stress on the temporal and regional distribution of uranium in rat brain after acute uranyl acetate exposure, *J. Toxicol. Environ. Health A* 68 (2005) 99-111.
- [2] K.A. Brenneman, B.A. Wong, M.A. Buccellato, E.R. Costa, E.A. Gross, D.C. Dorman, Direct olfactory transport of inhaled manganese ((<sup>54</sup>MnCl<sub>2</sub>) to the rat brain: toxicokinetic investigations in a unilateral nasal occlusion model, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169 (2000) 324-248.
- [3] W. Briner, J. Murray, Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats, *Neurotoxicol. Teratol.* 27 (2005) 135-144.
- [4] V. Chazel, P. Gerasimo, V. Dabouis, P. Laroche, F. Paquet, Characterisation and dissolution of depleted uranium aerosols produced during impacts of kinetic energy penetrators against a tank, *Radiat. Prot. Dosimetry* 105 (2003) 163-166.
- [5] V. Chazel, P. Houpert, F. Paquet, E. Ansoborlo, Effect of absorption parameters on calculation of the dose coefficient: example of classification of industrial uranium compounds, *Radiat. Prot. Dosimetry* 94 (2001) 261-268.
- [6] E. Craft, A. Abu-Qare, M. Flaherty, M. Garofolo, H. Rincavage, M. Abou-Donia, Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects, *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 7 (2004) 297-317.
- [7] G.L. Diamond, P.E. Morrow, B.J. Panner, R.M. Gelein, R.B. Baggs, Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat, *Fundam. Appl. Toxicol.* 13 (1989) 65-78.
- [8] S. Dogra, A.K. Khanna, M. Waseem, J.L. Kaw, Tissue cadmium and locomotor behavior following acute inhalation exposure to cadmium aerosol in rats, *Vet. Hum. Toxicol.* 43 (2001) 176-178.
- [9] D.C. Dorman, M.F. Struve, R.A. James, M.W. Marshall, C.U. Parkinson, B.A. Wong, Influence of particle solubility on the delivery of inhaled manganese to the rat brain: manganese sulfate and manganese tetroxide pharmacokinetics following repeated (14-day) exposure, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170 (2001) 79-87.
- [10] A. Durakovic, Medical effects of internal contamination with uranium, *Croat. Med. J.* 40 (1999) 49-66.
- [11] A. Durakovic, On depleted uranium: gulf war and Balkan syndrome, *Croat. Med. J.* 42 (2001) 130-134.
- [12] A. Durakovic, P. Horan, L.A. Dietz, I. Zimmerman, Estimate of the time zero lung burden of depleted uranium in Persian Gulf War veterans by the 24-hour urinary excretion and exponential decay analysis, *Mil. Med.* 168 (2003) 600-605.
- [13] H.P. Dygert, *Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds*, McGraw-Hill Book Inc., 1949.
- [14] J.W. Ejniak, M.M. Hamilton, P.R. Adams, A.J. Carmichael, Optimal sample preparation conditions for the determination of uranium in biological samples by kinetic phosphorescence analysis (KPA), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2000) 227-235.
- [15] A. Fredriksson, L. Dencker, T. Archer, B.R. Danielsson, Prenatal coexposure to metallic mercury vapour and methylmercury produce interactive behavioural changes in adult rats, *Neurotoxicol. Teratol.* 18 (1996) 129-134.
- [16] C.E. Fulco, C.T. Liverman, H.C. Sox, Depleted uranium, in: C.E. Fulco, C.T. Liverman, H.C. Sox (Eds.), *Gulf War and Health*, Vol. 1. Depleted Uranium, Pyridostigmine Bromide, Sarin and Vaccines, National Academies Press, Washington, 2000, pp. 89- 168.
- [17] M.A. Hedaya, H.P. Birkenfeld, R.L. Kathren, A sensitive method for the determination of uranium in biological samples utilizing kinetic phosphorescence analysis (KPA), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1157-1165.

- [18] J. Henriksson, J. Tallkvist, H. Tjalve, Uptake of nickel into the brain via olfactory neurons in rats, *Toxicol. Lett.* 91 (1997) 153-162.
- [19] J. Henriksson, H. Tjalve, Uptake of inorganic mercury in the olfactory bulbs via olfactory pathways in rats, *Environ. Res.* 77 (1998) 130-140.
- [20] P. Houpert, P. Lestaevel, C. Bussy, F. Paquet, P. Gourmelon, Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat, *Neurotoxicology*, in press.
- [21] J.W. Howland, Studies on human exposures to uranium compounds, in: C.H. Voegtlin, H.C. (Ed.), *Pharmacology and Toxicology of Uranium*, McGraw-Hill Book Company, New York, 1949, pp. 993-1017.
- [22] R.L. Kathren, R.H. Moore, Acute accidental inhalation of U: a 38-year follow-up, *Health Phys.* 51 (1986) 609-619.
- [23] R. Lalonde, The neurobiological basis of spontaneous alternation, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26 (2002) 91-104.
- [24] R.W. Leggett, The behaviour and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment, *Health Phys.* 57 (1989) 365-383.
- [25] M.A. McDiarmid, S. Engelhardt, M. Oliver, P. Gucer, P.D. Wilson, R. Kane, M. Kabat, B. Kaup, L. Anderson, D. Hoover, L. Brown, B. Handwerger, R.J. Albertini, D. Jacobson-Kram, C.D. Thorne, K.S. Squibb, Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans: a 10-year follow-up, *J. Toxicol. Environ. Health A* 67 (2004) 277-296.
- [26] M.A. McDiarmid, F.J. Hooper, K. Squibb, K. McPhaul, S.M. Engelhardt, R. Kane, R. DiPino, M. Kabat, Health effects and biological monitoring results of Gulf War veterans exposed to depleted uranium, *Mil. Med.* 167 (2002) 123-124.
- [27] M.A. McDiarmid, J.P. Keogh, F.J. Hooper, K. McPhaul, K. Squibb, R. Kane, R. DiPino, M. Kabat, B. Kaup, L. Anderson, D. Hoover, L. Brown, M. Hamilton, D. Jacobson-Kram, B. Burrows, M. Walsh, Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans, *Environ. Res.* 82 (2000) 168-180.
- [28] P.E. Morrow, F.R. Gibb, L.J. Leach, The clearance of uranium dioxide dust from the lungs following single and multiple inhalation exposures, *Health Phys.* 12 (1966) 1217-1223.
- [29] T.C. Pellmar, A.F. Fuciarelli, J.W. Ejniak, M. Hamilton, J. Hogan, S. Strocko, C. Emond, H.M. Mottaz, M.R. Landauer, Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets, *Toxicol. Sci.* 49 (1999) 29-39.
- [30] T.C. Pellmar, D.O. Keyser, C. Emery, J.B. Hogan, Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments, *Neurotoxicology* 20 (1999) 785-792.
- [31] E. Persson, J. Henriksson, J. Tallkvist, C. Rouleau, H. Tjalve, Transport and subcellular distribution of intranasally administered zinc in the olfactory system of rats and pikes, *Toxicology* 191 (2003) 97-108.
- [32] E. Persson, J. Henriksson, H. Tjalve, Uptake of cobalt from the nasal mucosa into the brain via olfactory pathways in rats, *Toxicol. Lett.* 145 (2003) 19-27.
- [33] S. Pothion, J.C. Bizot, F. Trovero, C. Belzung, Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress, *Behav. Brain Res.* 155 (2004) 135-146.
- [34] D.B. Rao, B.A. Wong, B.E. McManus, A.M. McElveen, A.R. James, D.C. Dorman, Inhaled iron, unlike manganese, is not transported to the rat brain via the olfactory pathway, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 193 (2003) 116-126.
- [35] E. Roberts, Uranyl nitrate, in: *Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds*, McGraw-Hill, New York, 1949.
- [36] B. Salbu, K. Janssens, O.C. Lind, K. Proost, L. Gijssels, P.R. Danesi, Oxidation states of uranium in depleted uranium particles from Kuwait, *J. Environ. Radioact.* 78 (2005) 125-135.
- [37] F. Salehi, D. Krewski, D. Mergler, L. Normandin, G. Kennedy, S. Philippe, J. Zayed, Bioaccumulation and locomotor effects of manganese phosphate/sulfate mixture in

Sprague-Dawley rats following subchronic (90 days) inhalation exposure, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 191 (2003) 264-271.

[38] F.W. Sunderman Jr., Nasal toxicity, carcinogenicity, and olfactory uptake of metals, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 31 (2001) 3-24.

[39] H. Tjalve, J. Henriksson, Uptake of metals in the brain via olfactory pathways, *Neurotoxicology* 20 (1999) 181-195.

[40] H. Tjalve, J. Henriksson, J. Tallkvist, B.S. Larsson, N.G. Lindquist, Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathways in rats, *Pharmacol. Toxicol.* 79 (1996) 347-356.

## III.2.2 - Les effets génotoxiques et inflammatoires

### III.2.2.1 - Résumé de l'article 4

Le développement de fibroses et de cancers au niveau pulmonaire est un phénomène connu après inhalation de composés uranifères. Cependant les mécanismes moléculaires induisant ces effets pathologiques sont mal connus, particulièrement *in vivo*. Les atteintes du matériel génétique et le développement de phénomènes inflammatoires, deux points clés dans le processus fibrotique et/ou cancérigène, ont été caractérisés consécutivement à des expositions d'uranium par inhalation, et ce particulièrement après inhalation répétée.

Ces atteintes sont évaluées en fonction de l'importance de la charge pulmonaire, par la comparaison des groupes AcUO<sub>2</sub>-1, -2 et -3, de la solubilité du composé uranifère inhalé, par comparaison des groupes AcUO<sub>2</sub>-1 et AcUO<sub>4</sub>, et du type aiguë ou répétée de l'exposition, par comparaison des groupes AcUO<sub>2</sub>-3 et RepUO<sub>2</sub> (n°2). Les paramètres généraux de santé des animaux sont étudiés par le suivi du poids des rats, de leurs consommations d'aliment et d'eau et par des dosages biochimiques sériques. Les atteintes de l'ADN sont évaluées, par le test des comètes, sur les cellules épithéliales nasales et sur les cellules rénales en condition alcaline ainsi que sur les cellules du lavage broncho-alvéolaire (BAL) en conditions alcaline et neutre. La réponse inflammatoire a été évaluée par l'expression de gènes de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-8, MIP-2 et IFN- $\gamma$ ) et anti-inflammatoire (IL-10) ainsi que par le dosage des peroxydes dans le tissu pulmonaire.

Il s'avère que les paramètres généraux de santé (Article 4 - Tables 3, 4) après les différentes inhalations d'uranium sont dépendants de la dose, de la solubilité du composé et du type d'inhalation. L'inhalation d'UO<sub>4</sub>, composé soluble, a provoqué une néphrotoxicité, contrairement à l'inhalation d'UO<sub>2</sub>, composé insoluble. L'atteinte rénale se traduit par une détérioration de l'ensemble des paramètres généraux de santé. De plus, contrairement à une inhalation aiguë à charge pulmonaire équivalente, les inhalations répétées d'UO<sub>2</sub> ne perturbent pas l'état général des animaux.

Aucun effet génotoxique n'a été observé dans les cellules épithéliales nasales quelles que soient les conditions d'exposition. Dans les cellules du BAL, aucun effet de la solubilité du composé n'a été mis en évidence à la dose testée (40  $\mu\text{gU}\cdot\text{g}^{-1}\text{Poumon}$ ) mais un effet est observé à la dose d'UO<sub>2</sub> la plus élevée (600  $\mu\text{gU}\cdot\text{g}^{-1}\text{Poumon}$ ). Les inhalations répétées (RepUO<sub>2</sub>) induisent une réponse plus forte et persistante qu'une

inhalation aiguë (Article 4 - Figure 1). Dans les cellules rénales, de légers dommages de l'ADN sont induits uniquement dans le groupe exposé de façon répétée (Article 4 - Figure 3). Une exposition répétée semble donc produire un effet de potentialisation.

Pour tester cette dernière hypothèse et pour mieux comprendre les origines des effets génotoxiques, la réponse inflammatoire a été étudiée au niveau pulmonaire dans les groupes exposés de façon aiguë ou répétée à des aérosols d'UO<sub>2</sub> (AcUO<sub>2</sub>-3, RepUO<sub>2</sub> et Control). Lorsque la réponse inflammatoire est déséquilibrée ou devient excessive et/ou persistante, elle peut induire des dysfonctionnements et des dommages tissulaires. Elle favorise également la production de radicaux libres, qui peuvent induire des effets génotoxiques. L'inhalation aiguë induit, un jour après l'exposition, l'expression de gène pro- (TNF- $\alpha$ , IL-8 mais pas MIP-2 et IFN- $\gamma$ ) et anti- (IL-10) inflammatoire alors que l'exposition répétée induit, 3 jours après, uniquement l'expression de gènes pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-8, MIP-2 mais pas IFN- $\gamma$ ) (Article 4 - Figure 4). Le taux de peroxydes est augmenté sur une période plus longue dans le groupe RepUO<sub>2</sub> que dans le groupe AcUO<sub>2</sub>-3 (Article 4 - Figure 5). Ces résultats suggèrent l'induction d'une réponse inflammatoire dans le poumon. Les profils d'expression des gènes et de production des peroxydes étant différents après expositions par inhalations aiguë et répétée, l'inhalation répétée pourrait ainsi se traduire par une réponse inflammatoire déséquilibrée et plus persistante.

Le test des comètes sur les cellules du BAL a été utilisé en condition neutre sur les groupes qui avaient des dommages de l'ADN révélés par le test en condition alcaline (Article 4 - Figure 2). Ce test montre que les dommages de l'ADN sont à la fois des cassures simple et double brin.

Les particules d'uranium chez des rats exposés par inhalation induisent, dans les cellules du BAL, des cassures de l'ADN simple et double brin. Ces atteintes semblent conditionnées par un effet seuil, dépendent du type d'inhalation, aiguë ou répétée. Elles indiquent aussi que les radiations pourraient contribuer aux effets génotoxiques induits par l'uranium *in vivo* et ce, bien que l'uranium utilisé soit faiblement radioactif. L'augmentation de l'expression de cytokines inflammatoires et une production élevée de peroxydes dans le poumon suggèrent que les dommages de l'ADN sont en partie une conséquence du processus inflammatoire et du stress oxydatif. Les effets génotoxiques ainsi que les profils d'expression des cytokines et de la production de peroxydes sont différents entre des expositions par inhalation aiguë ou répétée. De plus, des cassures de l'ADN sont aussi provoquées dans les cellules rénales, uniquement après les



inhalations répétées. L'étalement de la dose semble donc avoir un effet de potentialisation.

### III.2.2.2 - Article 4 - Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats

Article accepté dans *"Toxicological Sciences"*

Marjorie Monleau<sup>1</sup>, Michel De Méo<sup>2</sup>, François Paquet<sup>1</sup>, Valérie Chazel<sup>1</sup>,  
Gérard Duménil<sup>3</sup>, Marie Donnadieu-Claraz<sup>1</sup>

1 IRSN/DRPH/SRBE, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale, BP 166, 26702 Pierrelatte Cedex, France

2 Laboratoire de Biogénotoxicologie et mutagenèse environnementale, Université de la Méditerranée, Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille, France

3 Laboratoire de Microbiologie, Université de la Méditerranée, Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille, France

Keywords: Depleted uranium, inhalation, acute exposure, repeated exposure, genotoxicity, inflammation

Les valeurs brutes des OTM pour l'ensemble des résultats des tests des comètes de l'article 4 sont données dans l'annexe 5. Les valeurs de biocinétique sont dans l'annexe 4.

## Abstract

Depleted uranium (DU) is a radioactive heavy metal coming from the nuclear industry and used in numerous military applications. Uranium inhalation can lead to the development of fibrosis and neoplasia in the lungs. As little is known concerning the molecular processes leading to these pathological effects, some of the events in terms of genotoxicity and inflammation were investigated in rats exposed to DU by inhalation. Our results show that exposure to DU by inhalation resulted in DNA strand breaks in broncho-alveolar lavage (BAL) cells and in increase of inflammatory cytokine expression and production of hydroperoxides in lung tissue suggesting that the DNA damage was in part a consequence of the inflammatory processes and oxidative stress. The effects seemed to be linked to the doses, were independent of the solubility of uranium compounds and correlating with the type of inhalation. Repeated inhalations seemed to induce an effect of potentiation in BAL cells and also in kidney cells. Comet assay in neutral conditions revealed that DNA damage in BAL cells was composed partly by double strands breaks suggesting that radiation could contribute to DU genotoxic effects *in vivo*. All these *in vivo* results contribute to a better understanding of the pathological effect of DU inhalation.

## Introduction

Uranium (U) is a natural radioactive heavy metal. U is used as fuel in nuclear power plants and is present, in the different steps of the nuclear industry, in different forms with different isotopic compositions (natural, depleted and enriched) and solubilities (Chazel *et al.*, 2000). Depleted uranium (DU) is a by-product of the nuclear industry (The royal society, 2001). Its specific activity is approximately 40 % lower than that of naturally occurring U. Because of its high density and metallurgical properties, DU is used in heavy tank armor, armor-piercing bullets, and missiles by the military. There is a risk of workers and military personal being exposed to DU. Inhalation is the major route exposure leading to internal contamination in workers and soldiers (ATSDR, 1999; The royal society, 2001). Moreover, U contamination by repeated or single inhalations can occur and the health effects of these different exposures are poorly known.

Different epidemiological studies have been performed on U miners and workers in the nuclear industry. These studies have shown an excess relative risk of lung cancer and fibrosis associated with the exposure to radon decay products (ATSDR, 1999) but it was difficult to ascertain the effects really attributable to U. Moreover, an increase in chromosomal aberrations or genetic damage in blood samples was observed among Gulf War veterans exposed by embedded DU shrapnel fragments (McDiarmid *et al.*, 2004), human exposed to uranyl compounds (Prabhavathi *et al.*, 1995; Prabhavathi *et al.*, 2000) and in U exposed miners (Meszaros *et al.*, 2004; Zaire *et al.*, 1996). Assessment of the carcinogenic risks from DU is complicated by the dual toxicity of U, radiological as well as chemical. However, *in vitro*, DU has been shown to induce the transformation of human osteoblast cells to a tumorigenic phenotype (Miller *et al.*, 1998) and result in genomic instability manifested as delayed reproductive death and micronuclei formation (Miller, 2002; Miller *et al.*, 2003).

The majority of literature on U inhalation with animal models concerns the studies on U biokinetics and macroscopic effects (ATSDR, 1999). It has been demonstrated that exposure by inhalation to U dust particles can lead to an U accumulation predominantly in the lungs and tracheobronchial lymph nodes, in function of U solubility, as well as the development of neoplasia and fibrosis at the pulmonary level (ATSDR, 1999). Little is known, particularly *in vivo*, concerning the molecular processes leading to the pathological effects associated with exposure of DU. After inhalation and deposition of particulate matter, particles principally reach two main target cells: macrophages and epithelial cells (Schins and Borm, 1999). Macrophages are

involved in particle clearance and retention in the alveolar compartment (Tasat and De Rey, 1987). Activated macrophages are known to secrete different mediators: pro- and anti-inflammatory cytokines (Driscoll, 2000; Driscoll *et al.*, 1997). *In vitro* studies with U exposure on macrophages have shown effects on cell viability (Kalinich *et al.*, 2002; Tasat and De Rey, 1987) and an induction of TNF- $\alpha$  secretion and MAPK activation (Gazin *et al.*, 2004). The inflammatory response is a key component of host defense but excessive or persistent inflammation contributes to the pathogenesis of disease (Oberdorster *et al.*, 1994). Genotoxicity can be caused by direct actions of particles or indirect mechanisms, often mediated by reactive oxygen species (ROS) produced by inflammatory cells (Kirsch-Volders *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 1997).

To better understand the processes leading to the pathological effects associated with DU inhalation, we examined some of the events in terms of genotoxicity and inflammation after DU exposures to inhalation in rats. The effects were studied for different situations: dose, solubility of the compounds and type of inhalation.

## Materials and Methods

### Animals

Pathogen-free adult male OFA Sprague Dawley rats weighing around 500 g were obtained from Charles River Laboratories, France. Rats were housed by pairs in traditional cages. General health parameters of the rats (animal weight, food and water consumption) were monitored weekly. The study was conducted in accordance with French legislation concerning the protection of animals used for experimental purposes. The non parametrical statistical comparison between the different groups was made predominantly by a Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ).

### Aerosol generation

The industrial U dioxide ( $\text{UO}_2$ ) and U peroxide ( $\text{UO}_4$ ) powders found at workplaces in U fuel cycle facilities were supplied by COGEMA (France). The  $\text{UO}_2$  characteristics were: insoluble DU; specific alpha activity =  $13.10^3 \text{ Bq.g}^{-1}$ ; isotopic composition by mass:  $^{238}\text{U} = 99.75 \%$ ,  $^{235}\text{U} = 0.24 \%$ ,  $^{234}\text{U} = 0.001 \%$ ,  $^{236}\text{U} < 0.0003 \%$ ,  $^{232}\text{U} < 0.00001 \%$ . The  $\text{UO}_4$  characteristics were: soluble reprocessed DU; specific alpha activity =  $25.10^3 \text{ Bq.g}^{-1}$ ; isotopic composition by mass:  $^{238}\text{U} = 99.54 \%$ ,  $^{235}\text{U} = 0.39 \%$ ,  $^{234}\text{U} = 0.005 \%$ ,  $^{236}\text{U} = 0.061 \%$ ,  $^{232}\text{U} < 0.00001 \%$ . The device used for aerosol generation was a Small-Scale Powder Disperser (SSPD, model 3433, TSI, USA).

The particle size distribution of the aerosols administered to the rats was determined using a cascade Andersen impactor and an Aerodynamic Particle Sizer (APS, model 3310A, combined with a diluter, model 3302, TSI, USA). The aerodynamic median activity diameter (AMAD) of  $\text{UO}_2$  aerosols was  $2.53 \mu\text{m}$  (geometric standard deviation,  $\text{gsd} = 1.93$ ), the mass median aerodynamic diameter (MMAD) was  $1.8 \mu\text{m}$  ( $\text{gsd} = 1.66$ ) and the number median aerodynamic diameter =  $0.91 \mu\text{m}$  ( $\text{gsd} = 1.48$ ). The AMAD of  $\text{UO}_4$  aerosols was  $2.34 \mu\text{m}$  ( $\text{gsd} = 2.01$ ), the MMAD was  $1.31 \mu\text{m}$  ( $\text{gsd} = 1.70$ ) and the number median aerodynamic diameter =  $0.74 \mu\text{m}$  ( $\text{gsd} = 1.38$ ). These DU compounds and these aerosol types are found in the nuclear industry and after impacts involving DU munitions (Chazel *et al.*, 2003; Chazel *et al.*, 2000; Salbu *et al.*, 2005). The DU particles could reach the alveoli of the lungs because of their size.

### Animal exposure and euthanasia

The aerosols were administered using a nose-only inhalation system previously described (Monleau *et al.*, In press). The concentration of particles in the inhalation chamber was calibrated by sampling onto membrane filters (pore size  $0.8 \mu\text{m}$ , 25 mm

diameter, in cellulose acetate, Millipore). Rats were acclimatized to housing facilities and contention tubes during a period of at least two weeks. Different inhalation exposures were carried out with several rat groups presented in Article 4 - Table 1.

*Article 4 - Table 1 : Experimental protocol for inhalation study*

Inhalation type	Group name	Inhalation duration	Aerosols concentration	Euthanasia post-exposure
acute UO <sub>2</sub>	AcUO2-1	30 min	190 ± 41 mg.m <sup>-3</sup>	4 hours, 1, 3 and 8 days
acute UO <sub>2</sub>	AcUO2-2	2 h	375 ± 70 mg.m <sup>-3</sup>	1, 3 and 8 days
acute UO <sub>2</sub>	AcUO2-3	3 h	375 ± 70 mg.m <sup>-3</sup>	1, 3, 8 and 14 days
repeated UO <sub>2</sub>	RepUO2	30 min, 4 days/week, for 3 weeks	190 ± 41 mg.m <sup>-3</sup>	1, 3, 8 and 14 days
acute UO <sub>4</sub>	AcUO4	30 min	116 ± 60 mg.m <sup>-3</sup>	4 hours, 1, 3 and 8 days
air	Control	30 min, 4 days/week, for 3 weeks	air	1, 3, 8 and 14 days

h: hours, min: minutes

The aerosol concentrations inhaled by rats were high comparing with the derived air concentrations for workers. The concentrations for intakes of DU by workers are, for inhalation of 5 µm particles, around 0.075 mg.m<sup>-3</sup> for an insoluble compound and 0.72 mg.m<sup>-3</sup> for a soluble compound (ICRP, 1994). On the other hand, our aerosol concentrations were in the range of concentrations estimated for inhalation of DU during the different battlefield scenarios (0.05 to 5000 mg.m<sup>-3</sup>) (The royal society, 2001).

The U contents in organs from the AcUO2-2 and RepUO2 groups (especially lungs and kidneys) were determined in rats, exposed similarly for another study, by Kinetic Phosphorescence Analysis (KPA, Chemcheck, USA) (Monleau *et al.*, In press). The lung intake in the AcUO2-3 group was estimated as comparable to the cumulated intake in the RepUO2 group. The lung intake in the AcUO2-1 group was comparable to the intake in the AcUO4 group, one day after exposure (data no shown). Therefore, with these different exposure groups, we can study the DU effects as a function of dose with the different single inhalations of UO<sub>2</sub> (AcUO2-1, -2, -3), as a function of compound solubility with the single inhalations of insoluble UO<sub>2</sub> (AcUO2-1) and soluble UO<sub>4</sub> (AcUO4) and in relation to the type of inhalation with the single or repeated inhalations of UO<sub>2</sub> (AcUO2-3 and RepUO2). Uranium contents from RepUO2 group have showed that the nephrotoxic dose was not really exceeded. The effects, which could be observed, were not a consequence of a renal dysfunction.

Three rats per group were anaesthetized at each time post-exposure by intraperitoneal injection of pentobarbital ( $1 \mu\text{l.g}^{-1}$ ) and exsanguinated via the abdominal artery. The protocols "Isolation of epithelial nasal cells" to "Comet assay" were used for each rat from each group at each time post-exposure and performed on the day of euthanasia.

#### Biochemical analyses

The serum of blood from the groups AcUO4, RepUO2 and Control was isolated and maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis of the plasma biochemical parameters. The concentrations in alanine amino-transferase (ALT,  $\text{U.L}^{-1}$ ), aspartate amino-transferase (AST,  $\text{U.L}^{-1}$ ), creatinine (CREAT,  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) and urea ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ) were measured by routine methods (using a Konelab 20/20i, Thermo Electron, France).

#### Isolation of epithelial nasal cells

The *in situ* enzyme incubation technique described by Steele and Arnold was used to isolate the nasal turbinate epithelial cells (Steele and Arnold, 1985). Briefly, the nasal cavity was filled with an enzyme mix (protease type XIV 0.5%, collagenase type IV 0.1% and hyaluronidase type IV-S 0.1%) via a tube inserted in trachea. After incubation, the cell suspension was retrieved in a centrifuge tube by washing and centrifuged at 1500 rpm for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The pellet was resuspended in 250  $\mu\text{l}$  of PBS. 170  $\mu\text{l}$  was used for the comet assay and 80  $\mu\text{l}$  for the cell viability.

#### Isolation of BAL cells

After removing the lungs with trachea (and heart), broncho-alveolar lavage fluid (BALF) was collected by cannulating the trachea and washing with 50 ml of sterile saline solution at  $37^{\circ}\text{C}$ . BALF was centrifuged at  $900 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 min and the BAL cells were resuspended in 2 ml of PBS. BAL cells are mainly composed of alveolar macrophages (around 95% (Derelanko and Hollinger, 2002)). After BAL, the lungs were minced and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until protein or RNA extractions.

#### Isolation of kidney cells

Five-hundred mg of the kidney was minced and washed with  $\text{Ca}^{2+}$  - and  $\text{Mg}^{2+}$  - free Hanks' balanced salt solution (HBSS free) supplemented with 20 mM HEPES and 0.8 mM EDTA. The suspension was incubated in a solution of 0.25 % trypsin and 0.05 % EDTA in HBSS free at  $37^{\circ}\text{C}$  with gentle stirring for 10 min (Robbiano *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*,



1997). The suspension was centrifuged at 700 x g at 4°C for 10 min and the pellet was resuspended in 1 ml of PBS.

#### Comet assay

Comet assay was used to determine DNA strand breaks *in vivo*. The comet assay under alkaline conditions simultaneously detects DNA single and double strand breaks and alkali-labile sites, while the neutral conditions allow the detection of DNA double-strand breaks considered to be the “biological relevant” lesions for radiation damage (Olive, 1999). For all samples, cell viability was > 85 % (determined with a Malassez haemocytometer using the trypan blue exclusion technique). The comet assay was performed, essentially following the procedure of Singh et al., under alkaline conditions (De Meo *et al.*, 1991; Singh *et al.*, 1988) with epithelial nasal cells (85 µl per slide), BAL cells ( $3 \cdot 10^4$  cells per slide) and kidneys cells ( $3 \cdot 10^5$  cells per slide). The comet assay was performed also under neutral conditions for BAL cells (Singh, 2000; Singh *et al.*, 2003).

Two slides were prepared for each sample. During the entire test, samples and slides were maintained at 4°C in the dark. Briefly, the isolated cells were mixed with a solution of low melting point agarose in PBS (0.5% final) and placed onto a slide pre-coated with 0.5 % agarose in distilled water. The slide was dipped in lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH10, 4°C) for 1h. The slide was placed on an electrophoretic unit containing an electrophoretic buffer for 30 min in an alkaline condition or for 20 min under neutral conditions for DNA unwinding. The alkaline electrophoretic buffer was composed of 300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH>13 whereas the neutral electrophoretic buffer was composed of 100 mM Tris and 300 mM Sodium acétate, pH 9. The slide was subjected to an electric field at 4°C of 0.84 V/cm (25 V, 350 mA) for 20 min under alkaline conditions and of 0.4 V/cm (12 V, 100 mA) for 1h under neutral conditions. Following electrophoresis, the slide was neutralized in 0.4 M Tris-HCl (pH 7.5) for 10 min, rinsed with water, dehydrated in 100% ethanol and air-dried at room temperature overnight. The dried slide was stained with 2.5 µg/ml propidium iodide and examined at 250 x magnification using an Olympus BX61 fluorescent microscope equipped with a UPlanFI 20XUV objective. Image analysis was performed by using Cohu camera and Fenestra Komet software (version 5.5, Kinetic Imaging, BFI Optilas, France).

For each sample (one tissue/one rat/one exposure condition), 100 cells (50 cells/duplicate) were scored. The increase in the Olive tail moment (OTM) was used to quantify DNA damage. A major advantage of using the OTM as an index of DNA damage is that both the amount of damaged DNA and the distance of migration of the genetic

material in the tail are represented by a single number. Normalized distribution frequencies of OTM were calculated using 40 OTM classes between the minimal and maximal values for each set of data. Non linear regression analysis was performed using a chi-square function model. The degree of freedom ( $n$ ), called OTMchi2, of the model has been previously shown to be a quantitative parameter to describe the level of DNA damage (Bauer *et al.*, 1998; Jean *et al.*, 2001). The degree of freedom was calculated using the curve-fitting software Table Curve 2D (Jandel Scientific Software). Each sample (100 cells/cell type/time post-exposure/animal) corresponds to an OTMchi2, expressed in arbitrary units. For a time post-exposure and cell type, the OTMchi2 from 3 exposed rats were calculated and compared to the OTMchi2 from the control group performed the same day.

#### Quantification of cytokine mRNA levels: RT-PCR analysis

These experiments were performed on lung samples from RepUO2, AcUO2-3 and Control groups at 1, 3 and 14 days post-exposure. Total RNAs were extracted from lung tissue (60 mg) using the RNA isolation mini kit (Qiagen, France). The RNA concentration was determined by measuring the absorbance at 260 nm. The integrity of the RNA was evaluated by measuring the 260:280 nm ratios and confirmed by visualization of intact 18S and 28S RNA bands after agarose gel electrophoresis. Total RNAs (1 µg) were used to generate cDNA by reverse transcription using 200U SuperScript Reverse Transcriptase (GIBCO) in a 20-µl reaction buffer containing 1X Superscript buffer (GIBCO), 1 mM 2-deoxynucleotide 5'-triphosphate, 20 ng random hexamer, 10 mM DTT, and 20U Rnase inhibitor. After incubation for 60 min at 42°C, the reaction was terminated by a denaturing enzyme for 15 min at 70°C. The mRNA levels of the pro-inflammatory cytokines: tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-8 (IL-8), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ); the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10) and the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) were measured in duplicate by real-time (RT) PCR. Sequences for the forward and reverse primers used in the present study are listed in Article 4 - Table 2.

The ABI PRISM 7000 Sequence Detection System was used for detected RT-PCR products with the SYBR Green I assay (Applied Biosystems, France), according to manufacturer recommendations. The PCR cycling conditions were performed for all samples as follows: 50°C, 2 min; 95°C, 10 min and 40 cycles with 95°C, 15 sec and 60°C, 1 min. PCR fluorescent signals were normalized to the fluorescent signal obtained from the housekeeping gene HPRT for each sample.

*Article 4 - Table 2 : SYBR Green primer sequences used for RT-PCR reactions*

Gene name	Primers	5'-3' sequence
HPRT	sense antisense	GCTCGAGATGTCATGAAGGAGA TCAGCGCTTTAATGTAATCCAGC
TNF- $\alpha$	sense antisense	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
MIP-2	sense antisense	GCTTGAGTGTGACGCC CTTTTGGACCGCCCTTGAGA
IL-8	sense antisense	GACTGTTGTGGCCCGTGAG CCGTCAAGCTCTGGATGTTCT
IFN- $\gamma$	sense antisense	CACGCCGCGTCTTGGT TCTAGGCTTTCAATGAGTGTGCC
IL-10	sense antisense	GTTGCCAAGCCTTGTCAGAAA TTTCTGGGCCATGGTTCTCT

#### Hydroperoxide level determination

Measuring peroxides in samples was an important factor in determining the degree of free radicals present in specific tissues that reflect a potential oxidative stress. Lung samples (600 mg) from RepUO<sub>2</sub>, AcUO<sub>2</sub>-3 and Control groups at 1, 3 and 14 days post-exposure were homogenized in 1ml phosphate buffer (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01 mM EDTA, pH 7.5) on ice then centrifuged at 15,000 x g for 15 min at 4°C. The supernatants were stored at -80°C for later assessment. Protein levels in supernatants were determined by Bradford dosage.

The peroxide levels, aqueous and lipid hydroperoxides, were determined using a PeroxiDetect kit (Sigma, France). Briefly, the samples were incubated for 30 min at 25°C with an aqueous reagent (1 ml solution of 100 mM sorbitol and 125  $\mu$ M xylenol orange in water and 10  $\mu$ l of 25 mM ferrous ammonium sulfate in 2.5 M sulphuric acid) or organic reagent (1 ml solution of 4 mM butylated hydroxytoluene and 125  $\mu$ M xylenol orange in 90% methanol and 10 $\mu$ l of 25 mM ferrous ammonium sulfate in 2.5 M sulphuric acid). The hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in aqueous solutions and lipid hydroperoxide levels in organic solvents were measured by absorbance at 560 nm.

## Results

### General health parameters

The general health parameters are shown in Article 4 - Table 3 for the different groups and for some relevant days post-exposure. The Control, AcUO2-1 and RepUO2 rat groups had similar weight curves. However, the mean weight of the rats of the AcUO2-2, AcUO2-3 and AcUO4 groups decreased after acute inhalation during the first 10 days. The mean weight then stabilized and afterwards increased in the same way as the mean weight of the other groups but nevertheless remaining lower. The food consumption of rats was similar for the Control, AcUO2-1 and RepUO2 groups but was momentarily lower (Day 4) for the AcUO2-2, AcUO2-3 and AcUO4 groups. The decrease in rat weights and food consumption for the AcUO2-2 group was lower than the decrease for the AcUO2-3 group. The water consumption followed the same pattern as food consumption, except for the AcUO2-2 group where no change during time was noticed. These results showed that the general health parameters of rats exposed to uranium compounds by inhalation were dependant of the dose, solubility and type of inhalation (acute or repeated).

*Article 4 - Table 3 : General health parameters of different rat groups*

	Days post-exposure	Control	AcUO4	AcUO2-1	AcUO2-2	AcUO2-3	RepUO2
Rat weight (g)	0	563 ± 25	554 ± 35	577 ± 26	552 ± 50	513 ± 57	565 ± 32
	10	578 ± 29	431# ± 36	590 ± 37	528# ± 36	469# ± 60	575 ± 36
	14	592 ± 31	483# ± 27	600 ± 29	541# ± 38	520# ± 81	610 ± 29
Food (g)	0	21 ± 2	20 ± 3	20 ± 3	21 ± 6	21 ± 6	18 ± 4
	4	24 ± 3	1# ± 1	23 ± 5	15# ± 4	5# ± 6	20 ± 3
	10	25 ± 3	30 ± 2	26 ± 5	21.5 ± 2	17 ± 5	25 ± 2
Water (g)	0	35 ± 7	31 ± 6	30 ± 7	32 ± 4	37 ± 9	38 ± 9
	4	37 ± 6	14# ± 5	38 ± 4	35 ± 7	18# ± 10	35 ± 6
	10	38 ± 5	36.5 ± 5	37 ± 4	35 ± 9	32 ± 6	36 ± 12

The values are given as mean ± SE, n > 3. # p<0.05 between the exposed groups and the control group.

Analysis of the biochemical parameters in serum of the Control, AcUO4 and RepUO2 groups (Article 4 - Table 4) revealed stable levels of ALT and AST, sign of no liver failure. Kidney failure was observed only for the AcUO4 group, with an increase in concentrations of both creatinine and urea at 3 and 8 days post-exposure. It is due to the UO<sub>4</sub> solubility.

*Article 4 - Table 4 : Biochemical parameters in serum for the groups Control (n=4), AcUO4 (n=3) and RepUO2 (n=6)*

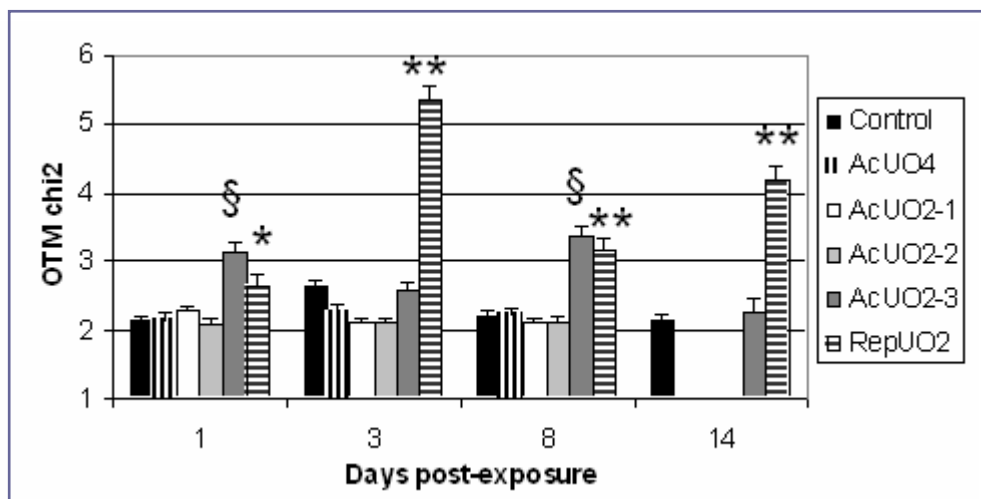
	Days post-exposure	Control	AcUO4	RepUO2
CREAT $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1	49 $\pm$ 5	44 $\pm$ 6	48 $\pm$ 3
	3	52 $\pm$ 6	73# $\pm$ 8	48 $\pm$ 3
	8	49 $\pm$ 6	264# $\pm$ 168	49 $\pm$ 1
UREA $\text{mmol.L}^{-1}$	1	6 $\pm$ 0.8	6.9 $\pm$ 1	6.1 $\pm$ 0.7
	3	6.1 $\pm$ 0.4	11# $\pm$ 2	6 $\pm$ 0.7
	8	6.2 $\pm$ 0.6	34# $\pm$ 22	6.1 $\pm$ 0.4
ALT $\text{U.L}^{-1}$	1	39 $\pm$ 15	35 $\pm$ 14	30 $\pm$ 4
	3	35 $\pm$ 9	34 $\pm$ 14	34 $\pm$ 14
	8	31 $\pm$ 9	28 $\pm$ 16	27 $\pm$ 6
AST $\text{U.L}^{-1}$	1	126 $\pm$ 61	86 $\pm$ 29	132 $\pm$ 23
	3	115 $\pm$ 55	72 $\pm$ 15	133 $\pm$ 32
	8	152 $\pm$ 87	127 $\pm$ 32	122 $\pm$ 21

The values are given as mean  $\pm$  SE. #  $p < 0.05$  between the exposed groups and the control group.

#### DNA damage

The number of DNA strand breaks in epithelial nasal cells was unaffected by the different exposures at the different days post-exposure tested (data not shown) with an OTM chi2 ranging from 2 to 3 in both control and exposed groups. This heterogeneity in the response could mask a slight effect.

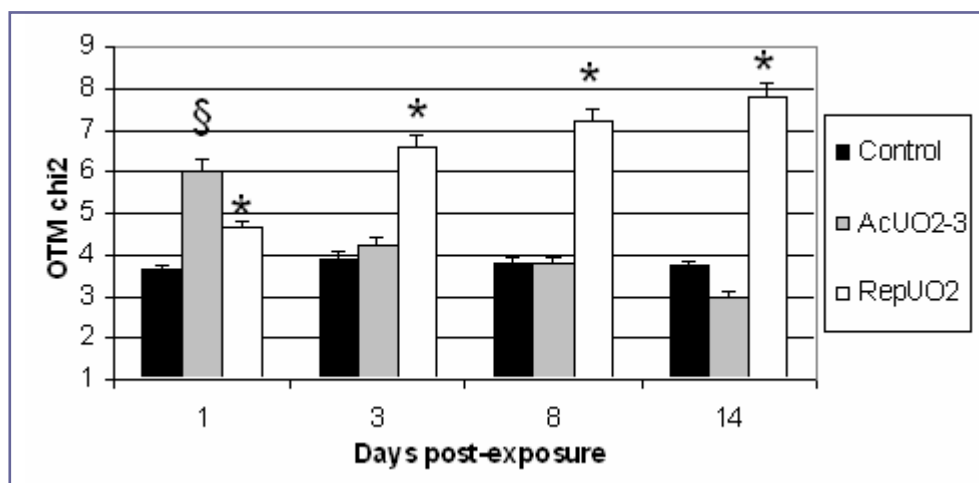
The OTMchi2 values, after comet assay under alkaline conditions in BAL cells, were presented at the different days post-exposure (Article 4 - Figure 1). A positive induction of DNA damage was observed only after the highest single inhalation of  $\text{UO}_2$  ( $600 \mu\text{g.g}^{-1}$  Lung in AcUO2-3 group) at 1 and 8 days post-exposure. No DNA damage was observed at the tested dose ( $40 \mu\text{g.g}^{-1}$  Lung) in the AcUO2-1 and AcUO4 groups. BAL cells from the RepUO2 group showed DNA damage at all days post-exposure. Compared to the AcUO2-3 group, repeated inhalations induced longer responses.



*Article 4 - Figure 1 : Comet assay under alkaline conditions in BAL cells*

Mean of OTMchi2 values are presented in relation to days post-exposure. \*  $p < 0.01$  and \*\*  $p < 0.001$  between Control and RepUO2. §  $p < 0.001$  between Control and AcUO2-3.

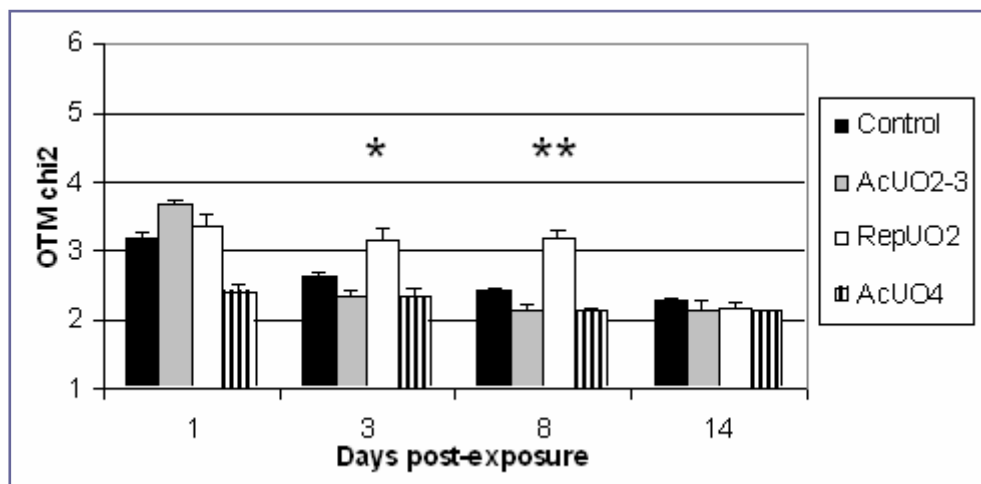
The AcUO2-3 and RepUO2 groups, with a genotoxic response under alkaline conditions, also showed DNA damage after comet assay under neutral conditions (Article 4 - Figure 2), except for the AcUO2-3 group at 8 days post-exposure. UO<sub>2</sub> inhalations induced both single and double DNA strand breaks in BAL cells.



*Article 4 - Figure 2 : Comet assay under neutral conditions in BAL cells*

Mean of OTMchi2 values are presented in relation to days post-exposure. \*  $p < 0.001$  between Control and RepUO2. §  $p < 0.001$  between Control and AcUO2-3.

The results of comet assay under alkaline conditions in kidney cells (Article 4 - Figure 3) only showed a positive response in the RepUO2 group with DNA damages at 3 and 8 days post-exposure.

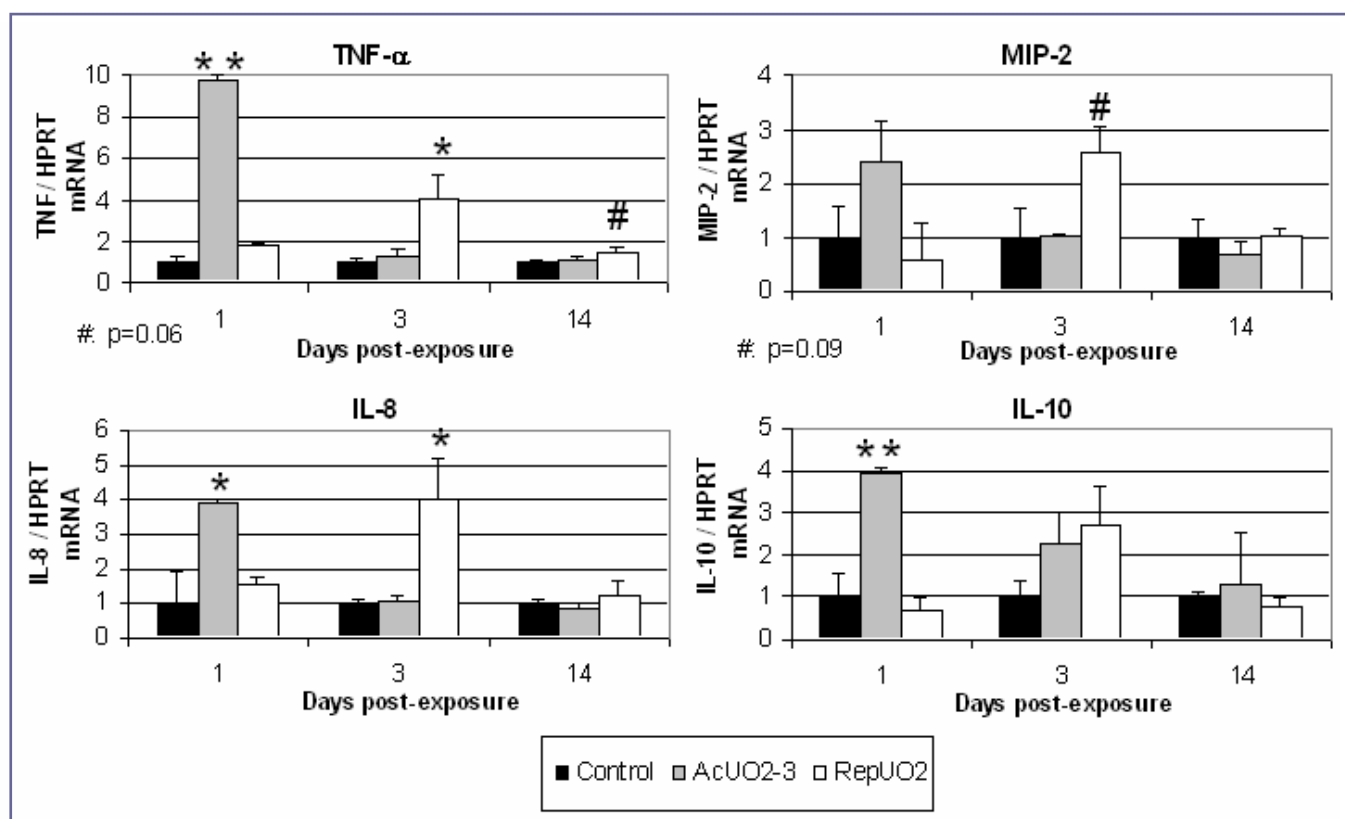


*Article 4 - Figure 3 : Comet assay under alkaline conditions in kidney cells*

Mean of OTMchi2 values are presented in relation to days post-exposure. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.001$  between Control and RepUO2.

Inflammation cytokines

The expression of cytokines TNF- $\alpha$ , MIP-2, IL8, IFN- $\gamma$  (data no shown) and IL-10, involving inflammatory responses to particles, were investigated in lung tissue from Control, AcUO2-3 and RepUO2 groups at 1, 3 and 14 days post-exposure (Article 4 - Figure 4). Single inhalation exposure to UO<sub>2</sub> (AcUO2-3) significantly increased the mRNA levels of TNF- $\alpha$ , IL8 and IL-10 but not IFN- $\gamma$ , only 1 day post-exposure. Repeated inhalation exposure to UO<sub>2</sub> (RepUO2) increased significantly the mRNA levels of TNF- $\alpha$  and IL8 and reached a significance for MIP-2 but not IFN- $\gamma$  and IL-10 at 3 days post-exposure and reached a significance for TNF- $\alpha$  at 14 days post-exposure.



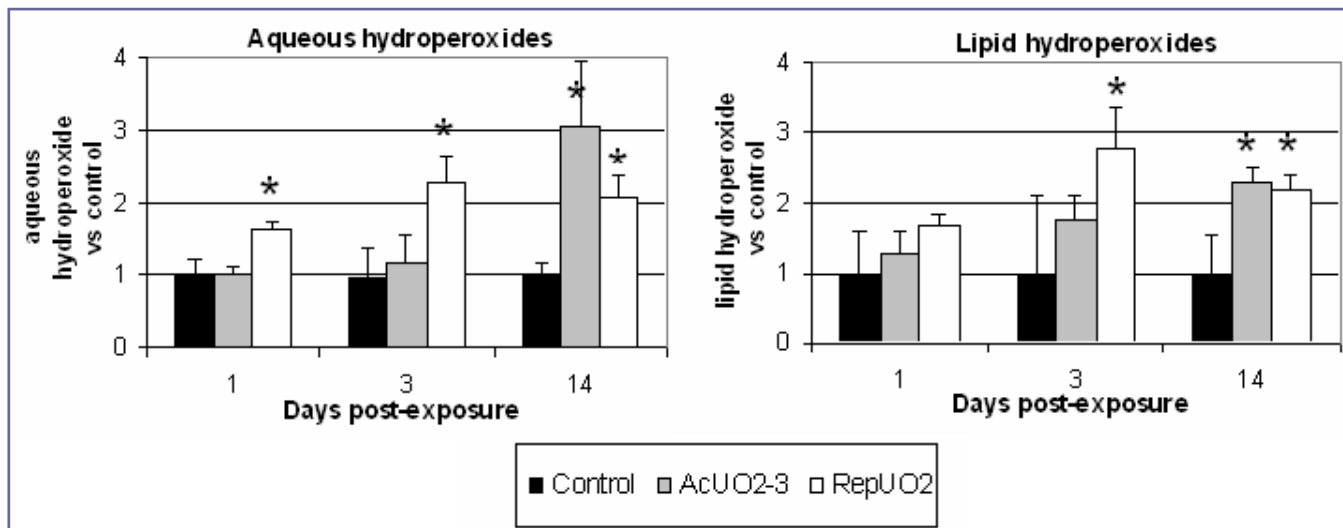
Article 4 - Figure 4 : Relative mRNA expression of the cytokines TNF- $\alpha$ , MIP-2, IL-8 and IL-10 in lung tissues at 1, 3 and 14 days post-exposure for the groups Control (n=5), AcUO2-3 (n=3) and RepUO2 (n=3)

\*\* p<0.01, \* p<0.05 and # reached a significance indicated on the graph between the exposed and control group. The results are expressed as a ratio to the mRNA levels of the reference gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). Data are the means  $\pm$  S.E.M.

### Hydroperoxide level

The measurement of peroxide levels in lungs made it possible to evaluate the level of free radicals (Article 4 - Figure 5). The levels of aqueous and lipid hydroperoxides in lung from the AcUO2-3 group were significantly higher as compared to the control group at only 14 days post-exposure while, in the RepUO2 group, the levels of aqueous hydroperoxides were significantly higher at 1, 3 and 14 days post-exposure and the levels of lipid hydroperoxides were significantly higher at 3 and 14 days post-exposure.





Article 4 - Figure 5 : Hydroperoxide levels in lung tissues at 1, 3 and 14 days post-exposure for the groups Control (n=5), AcUO2-3 (n=3) and RepUO2 (n=3)

\*  $p < 0.05$  between exposed and control group.

## Discussion

Very few studies have been carried out to assess the processes associated with the effects of inhalation exposure to U or DU, despite the knowledge that most U intoxication in workers occurs via this route. The molecular consequences of DU inhalation are poorly known *in vivo*, particularly in case of repeated exposure. The studies on military personal concern principally the case of exposure by embedded DU shrapnel fragments (McDiarmid *et al.*, 2004; Pellmar *et al.*, 1999). However the inhalation is another important route of contamination and finally the estimation of the health effect of DU inhalations by soldiers are based on the knowledge acquired on U miners, nuclear workers and animal studies of U inhalations (The royal society, 2001). In this study, some of the events in terms of genotoxicity and inflammation were investigated after DU exposures to inhalation in rats.

The comet assay is tested recently for human biomonitoring studies (Kassie *et al.*, 2000; Moller, 2005) including radiobiology (Olive, 1999; Tice and Strauss, 1995) and inhalation exposure (Knudsen *et al.*, 2005; Sul *et al.*, 2003). Different extents of DNA damage, measured by comet assay under alkaline conditions, were observed, in the present study, after DU inhalations for different target organs as a function of the exposure and the time post-exposure. Comparison of the different acute UO<sub>2</sub> inhalations

showed that the genotoxic effect appeared only at the highest tested dose suggesting that a threshold dose could exist in BAL cells. No effect on the compound solubility could be observed at the tested dose. And at the same cumulative dose as AcUO<sub>2</sub>-3, given as 12 lower doses, DNA damage in RepUO<sub>2</sub> group was induced in BAL cells at all days post-exposure tested. After lung deposition, U is absorbed into the blood plasma and lymph as a function of this solubility and distributed to the different organs. The kidney is the site of U accumulation and the critical target organ for U toxicity (ATSDR, 1999; Gilman *et al.*, 1998). Induction of DNA damage in kidney cells was observed only after repeated UO<sub>2</sub> exposure. When no DNA damage was observed, it has been hypothesized that endogenous antioxidant levels may influence the susceptibility to some toxic effects of metal which would explain why we did not detect induction of DNA damage in acute exposures (Gochfeld, 1997). A threshold for *in vivo* genotoxicity is often a consequence of adequate DNA repair and/or antioxidant status (Kirsch-Volders *et al.*, 2000). The consequences of repeated inhalation compared to acute exposure could be opposite in function of the compound. For example, it was reported that pretreatment of cadmium produces adaptative tolerance (Hart *et al.*, 1996; Valverde *et al.*, 2000) and, on the other hand, repeated inhalations of lead induced a genotoxic response in more organs than after a single inhalation (Valverde *et al.*, 2002). In this study, DU particles after repeated inhalation seemed to induce a potentiation effect of U toxicity in BAL and kidneys cells.

Comet assay under neutral conditions makes us possible to underlined that, after acute or repeated UO<sub>2</sub> inhalations (around 500 µgUO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup> Lung that is 7 Bq.g<sup>-1</sup> Lung), the observed DNA damage in BAL cells was in part double DNA strand breaks. Double DNA strand breaks could be double strand breaks or two nearby single strand breaks. Miller *et al.* have suggested that radiation can play a role in DU-induced biological effect *in vitro*. They have shown that DU induced a significant elevation in the dicentric frequency in human osteosarcoma (HOS) cells in contrast to incubation with other heavy metals and an increase in neoplastic transformation process dependant to the specific activity (Miller *et al.*, 2002b). The mechanisms by which radiation can contribute to the DU effects are unknown. A hypothesis is that the radiation and chemical effects could be synergistic.

We investigated the inflammatory gene expression in lungs because genotoxicity can be a consequence of the inflammatory response and a relationship between inflammation and tumorigenesis has been shown with poorly soluble dusts (Driscoll *et al.*, 1996). TNF-α is one of the pre-eminent pleiotropic cytokines. It reflects the release

of cytokines from macrophages and neutrophils, as well as the cytokine activity of various lung cell types, such as bronchial epithelial cells (Ermer *et al.*, 2003). It acts as an initiator of the respiratory tract inflammatory response to particles (Driscoll, 2000) by the orchestration of cytokine networking, the induction of production of ROS and the recruitment of inflammatory cells (Vassalli, 1992). But TNF- $\alpha$  can mediate tissue injury such as fibrosis (Vassalli, 1992). IFN- $\gamma$  is produced by immune effector cells in response to a variety of stimuli. It modulates the fibrotic response in the lung by inhibiting the growth of fibroblasts (Narayanan *et al.*, 1992) and suppressing collagen synthesis and histamine content (Gurujeyalakshmi and Giri, 1995). IFN- $\gamma$  also modulates the inflammatory response. IL-8 is a leukocyte chemotactic activating cytokine (chemokine) and is produced by various types of cells upon stimulation with inflammatory stimuli, while exerting a variety of functions on leukocytes in particular (Harada *et al.*, 1994; Mukaida *et al.*, 1998). MIP-2 is a heparin-binding protein that exhibits a number of inflammatory and immunoregulatory activities. MIP-2 plays a major role in mediating the neutrophilic inflammatory response of the rodent lung to particles such as quartz and crocidolite asbestos (Driscoll, 2000). TNF- $\alpha$  and MIP-2 seems to play a major role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress (Driscoll, 2000; Long *et al.*, 2004). IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that inhibits the production of others cytokines and indirectly the innate immune responses, such as the macrophage function and activation (Moore *et al.*, 2001).

In the present study, the acute inhalation exposure to UO<sub>2</sub> induced a rapid and brief inflammatory gene expression in rat lungs with a rapid increase of both pro-inflammatory cytokines (IL-8 and particularly TNF- $\alpha$  but not MIP-2 and IFN- $\gamma$ ) and anti-inflammatory cytokine (IL-10). The repeated inhalation exposure to UO<sub>2</sub> also seemed to induce an inflammatory gene expression but time-delayed compared to the single exposure with comparable lung deposit. This inflammatory gene expression was characterized by an increase in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-8 and MIP-2 but not IFN- $\gamma$  at 3 days post-exposure and possibly at 14 days post-exposure for TNF- $\alpha$ , which seems to suggest a slight persistent expression of TNF- $\alpha$ . On the other hand, anti-inflammatory cytokine IL-10 mRNA was not increased, suggesting an imbalance in the inflammatory gene expression. Our results were in accordance with an *in vitro* study which showed that U exposure of macrophage cell line induces accumulation of TNF- $\alpha$  mRNA and induction of TNF- $\alpha$  secretion but not of IL-10 (Gazin *et al.*, 2004). An increased prevalence of both fibronectin and TNF- $\alpha$  has also been found in the BAL fluid of U miners (Popp *et al.*, 2000).

As previously described, the production of ROS was linked to the effect of particles and the inflammatory response. The most important cellular effects of ROS in the lung may include damage to cell membranes by means of lipid peroxidation processes, oxidation of proteins and damage to the DNA of target cells (Schins and Borm, 1999). Excessive and persistent formation of ROS from inflammatory cells is considered as the characteristic of the indirect genotoxicity of particles following exposure to relatively high concentrations of poorly soluble dust (Schins, 2002). An increase in peroxides levels were revealed in lung tissue, after repeated exposure, for several days contrary to the acute exposure. This leads credence to the notion that repeated inhalation exposure to  $UO_2$  does not produce an adaptative tolerance. A previous *in vitro* study has shown that DU can catalyze biochemical reactions, involving ROS like hydroxyl radicals, singlet oxygen and/or superoxide radicals, inducing oxidative DNA damage without significant radioactive decay (Miller *et al.*, 2002a). SOD, catalase, and GPx constitute the main components of the antioxidant defense system and modification in their expression reflects a potential oxidative stress. A study observed that ingested U induces, in mice kidneys, a dose-dependent production of  $H_2O_2$  and an increase in SOD and GPx mRNA levels (Taulan *et al.*, 2004). Such different data suggest that DU can induce oxidative stress.

In summary, the *in vivo* results showed firstly that DU inhalations could induce DNA damage in different rat cell types. In BAL cells, DNA lesions were linked to the dose, independent of the solubility of U compounds while correlating with the type of inhalation and were composed partly by double strand breaks suggesting that radiation could contribute to DU genotoxic effects *in vivo*. In kidney cells, only repeated exposure was able to induce DNA strand breaks. Secondly, insoluble DU particles induced time-dependent increases in mRNA levels of different cytokines and in hydroperoxide production in rat lungs; the pattern differs between acute and repeated inhalation exposures. These results suggest that the DNA damage was partly a consequence of the inflammatory processes and ROS production and that repeated exposure of insoluble DU particles could induce a potentiation effect. All these observations contribute to better understand the pathologies associated with U inhalation, the mechanism of DU toxicity and may have a significant impact on risk assessment.

## Acknowledgements

We wish to thank O. Delissen, B. Dhieux, C. Maubert and E. Tournonias for their assistance during exposure, euthanasia and dissection as well as S. Grison for help in biochemical analysis. We would also like to thank Y. Gueguen and M. Souidi for their advice on molecular biology techniques and O. Gremy and C. Linard for their advice and kindly providing us with PcR probes. This experiment was partially supported by COGEMA (DOSINTER programme).

## References

- ATSDR (1999). Toxicological profile for uranium. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of health and human services.
- Bauer, E., Recknagel, R. D., Fiedler, U., Wollweber, L., Bock, C., and Greulich, K. O. (1998). The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square ( $\chi^2$ ) not a gaussian distribution. *Mutat Res.* **398**, 101-10.
- Chazel, V., Gerasimo, P., Dabouis, V., Laroche, P., and Paquet, F. (2003). Characterisation and dissolution of depleted uranium aerosols produced during impacts of kinetic energy penetrators against a tank. *Radiat Prot Dosimetry.* **105**, 163-6.
- Chazel, V., Houpert, P., Ansoberlo, E., Henge-Napoli, M. H., and Paquet, F. (2000). Variation of solubility, biokinetics and dose coefficient of industrial uranium oxides according to specific surface area. *Radiat. Prot. Dosimetry.* **88**, 223-231.
- De Meo, M., Laget, M., Castegnaro, M., and Dumenil, G. (1991). Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. *Mutat. Res.* **260**, 295-306.
- Derelanko, M. J., and Hollinger, M. A., eds. (2002). *Handbook of Toxicology*. CRC Press, Second Edition, Boca Raton, Florida, USA.
- Driscoll, K. E. (2000). TNF $\alpha$  and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicol Lett.* **112-113**, 177-83.
- Driscoll, K. E., Carter, J. M., Hassenbein, D. G., and Howard, B. (1997). Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ Health Perspect.* **105 Suppl 5**, 1159-64.
- Driscoll, K. E., Carter, J. M., Howard, B. W., Hassenbein, D. G., Pepelko, W., Baggs, R. B., and Oberdorster, G. (1996). Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol.* **136**, 372-80.
- Ermert, M., Pantazis, C., Duncker, H. R., Grimminger, F., Seeger, W., and Ermert, L. (2003). In situ localization of TNF $\alpha$ /beta, TACE and TNF receptors TNF-R1 and TNF-R2 in control and LPS-treated lung tissue. *Cytokine.* **22**, 89-100.
- Gazin, V., Kerdine, S., Grillon, G., Pallardy, M., and Raoul, H. (2004). Uranium induces TNF  $\alpha$  secretion and MAPK activation in a rat alveolar macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol.* **194**, 49-59.
- Gilman, A. P., Villeneuve, D. C., Secours, V. E., Yagminas, A. P., Tracy, B. L., Quinn, J. M., Valli, V. E., Willes, R. J., and Moss, M. A. (1998). Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci.* **41**, 117-28.

- Gochfeld, M. (1997). Factors influencing susceptibility to metals. *Environ Health Perspect.* **105 Suppl 4**, 817-22.
- Gurujeyalakshmi, G., and Giri, S. N. (1995). Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: downregulation of TGF-beta and procollagen I and III gene expression. *Exp Lung Res.* **21**, 791-808.
- Harada, A., Sekido, N., Akahoshi, T., Wada, T., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1994). Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol.* **56**, 559-64.
- Hart, B. A., Gong, Q., and Eneman, J. D. (1996). Pulmonary metallothionein expression in rats following single and repeated exposure to cadmium aerosols. *Toxicology.* **112**, 205-18.
- ICRP (1994). *Dose coefficients for intakes of radionuclides by workers*. Pergamon Press, Oxford.
- Jean, S., De Meo, M., Sabatier, A. S., Laget, M., Hubaud, J. C., Verrando, P., and Dumenil, G. (2001). Evaluation of sunscreen protection in Human melanocytes exposed to UVA or UVB irradiation using the alkaline comet assay. *Photochem. Photobiol.* **74**, 417-423.
- Kalinich, J. F., Ramakrishnan, N., Villa, V., and McClain, D. E. (2002). Depleted uranium-uranyl chloride induces apoptosis in mouse J774 macrophages. *Toxicology.* **179**, 105-114.
- Kassie, F., Parzefall, W., and Knasmuller, S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat.Res.* **463**, 13-31.
- Kirsch-Volders, M., Aardema, M., and Elhajouji, A. (2000). Concepts of threshold in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.* **464**, 3-11.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., and Decordier, I. (2003). Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol Lett.* **140-141**, 63-74.
- Knudsen, L. E., Gaskell, M., Martin, E. A., Poole, J., Scheepers, P. T., Jensen, A., Autrup, H., and Farmer, P. B. (2005). Genotoxic damage in mine workers exposed to diesel exhaust, and the effects of glutathione transferase genotypes. *Mutat Res.* **583**, 120-32.
- Long, H., Shi, T., Borm, P. J., Maatta, J., Husgafvel-Pursiainen, K., Savolainen, K., and Krombach, F. (2004). ROS-mediated TNF-alpha and MIP-2 gene expression in alveolar macrophages exposed to pine dust. *Part Fibre Toxicol.* **1**, 3.
- Martin, L. D., Krunkosky, T. M., Dye, J. A., Fischer, B. M., Jiang, N. F., Rochelle, L. G., Akley, N. J., Dreher, K. L., and Adler, K. B. (1997). The role of reactive oxygen and nitrogen species in the response of airway epithelium to particulates. *Environ Health Perspect.* **105 Suppl 5**, 1301-7.
- McDiarmid, M. A., Engelhardt, S., Oliver, M., Gucer, P., Wilson, P. D., Kane, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Handwerker, B., Albertini, R. J., Jacobson-Kram, D., Thorne, C. D., and Squibb, K. S. (2004). Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans: a 10-year follow-up. *J Toxicol Environ Health A.* **67**, 277-96.
- Meszaros, G., Bogнар, G., and Koteles, G. J. (2004). Long-term persistence of chromosome aberrations in uranium miners. *J Occup Health.* **46**, 310-5.
- Miller, A. C. (2002). Potential late health effects of depleted uranium and tungsten used in armor-piercing munitions : comparison of neoplastic transformation and genotoxicity with the known carcinogen nickel. *Military medicine.* **167**, 120-122.
- Miller, A. C., Blakely, W. F., Livengood, D., Whittaker, T., Xu, J., Ejniк, J. W., Hamilton, M. M., Parlette, E., John, T. S., Gerstenberg, H. M., and Hsu, H. (1998). Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride. *Environ Health Perspect.* **106**, 465-71.

- Miller, A. C., Brooks, K., Stewart, M., Anderson, B., Shi, L., McClain, D., and Page, N. (2003). Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation. *J Environ Radioact.* **64**, 247-59.
- Miller, A. C., Stewart, M., Brooks, A., Shi, L., and Page, N. (2002a). Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *J Inorganic Biochem.* **91**, 246-252.
- Miller, A. C., Xu, J., Stewart, M., Brooks, K., Hodge, S., Shi, L., Page, N., and McClain, D. (2002b). Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints. *Radiat Prot Dosimetry.* **99**, 275-8.
- Moller, P. (2005). Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **96 Suppl 1**, 1-42.
- Monleau, M., Blanchardon, E., Claraz, M., Paquet, F., and Chazel, V. (In press). The effect of repeated inhalation on the distribution of uranium in rats. *J Toxicol Environ Health.*
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* **19**, 683-765.
- Mukaida, N., Harada, A., and Matsushima, K. (1998). Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**, 9-23.
- Narayanan, A. S., Whitley, J., Souza, A., and Raghu, G. (1992). Effect of gamma-interferon on collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Chest.* **101**, 1326-31.
- Oberdorster, G., Ferin, J., and Lehnert, B. E. (1994). Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ. Health Perspect.* **102 Suppl 5**, 173-179.
- Olive, P. L. (1999). DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol.* **75**, 395-405.
- Pellmar, T. C., Fuciarelli, A. F., Ejniak, J. W., Hamilton, M., Hogan, J., Strocko, S., Emond, C., Mottaz, H. M., and Landauer, M. R. (1999). Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci.* **49**, 29-39.
- Popp, W., Plappert, U., Muller, W. U., Rehn, B., Schneider, J., Braun, A., Bauer, P. C., Vahrenholz, C., Presek, P., Brauksiepe, A., Enderle, G., Wust, T., Bruch, J., Fliedner, T. M., Konietzko, N., Streffer, C., Voitowitz, H. J., and Norpoth, K. (2000). Biomarkers of genetic damage and inflammation in blood and bronchoalveolar lavage fluid among former German uranium miners: a pilot study. *Radiat Environ Biophys.* **39**, 275-82.
- Prabhavathi, P. A., Fatima, S. K., Padmavathi, P., Kumari, C. K., and Reddy, P. P. (1995). Sister-chromatid exchanges in nuclear fuel workers. *Mutat. Res.* **347**, 31-35.
- Prabhavathi, P. A., S.K.Fatima, Rao, M. S., and Reddy, P. P. (2000). Analysis of chromosomal aberration frequencies in the peripheral blood lymphocytes of smokers exposed to uranyl compounds. *Mutat. Res.* **466**, 37-41.
- Robbiano, L., Mereto, E., Corbu, C., and Brambilla, G. (1996). DNA damage induced by seven N-nitroso compounds in primary cultures of human and rat kidney cells. *Mutat Res.* **368**, 41-47.
- Salbu, B., Janssens, K., Lind, O. C., Proost, K., Gijssels, L., and Danesi, P. R. (2005). Oxidation states of uranium in depleted uranium particles from Kuwait. *J Environ Radioact.* **78**, 125-35.
- Sasaki, Y. F., Tsuda, S., Izumiyama, F., and Nishidate, E. (1997). Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen,

- kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutat.Res.* **388**, 33-44.
- Schins, R. P. (2002). Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhal Toxicol.* **14**, 57-78.
- Schins, R. P., and Borm, P. J. (1999). Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Ann Occup Hyg.* **43**, 7-33.
- Singh, N. P. (2000). Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res.* **455**, 111-27.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp.Cell Res.* **175**, 184-191.
- Singh, N. P., Muller, C. H., and Berger, R. E. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril.* **80**, 1420-30.
- Steele, V. E., and Arnold, J. T. (1985). Isolation and long-term culture of rat, rabbit, and human nasal turbinate epithelial cells. *In Vitro Cell Dev.Biol.* **21**, 681-687.
- Sul, D., Oh, E., Im, H., Yang, M., Kim, C. W., and Lee, E. (2003). DNA damage in T- and B-lymphocytes and granulocytes in emission inspection and incineration workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* **538**, 109-19.
- Tasat, D. R., and De Rey, B. M. (1987). Cytotoxic effect of uranium dioxide on rat alveolar macrophages. *Environ.Res.* **44**, 71-81.
- Taulan, M., Paquet, F., Maubert, C., Delissen, O., Demaille, J., and Romey, M. C. (2004). Renal Toxicogenomic Response to Chronic Uranyl Nitrate Insult in Mice. *Environ Health Perspect.* **112**, 1628-1635.
- The royal society (2001). The health hazards of depleted uranium munitions, Part I. Science Advice Section, London.
- Tice, R. R., and Strauss, G. H. (1995). The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells.* **13 Suppl 1**, 207-14.
- Valverde, M., Fortoul, T. I., Diaz-Barriga, F., Mejia, J., and del Castillo, E. R. (2000). Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice. *Mutagenesis.* **15**, 109-14.
- Valverde, M., Fortoul, T. I., Diaz-Barriga, F., Mejia, J., and del Castillo, E. R. (2002). Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead : differential organ response. *Mutagenesis.* **17**, 55-61.
- Vassalli, P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.* **10**, 411-52.
- Zaire, R., Griffin, C. S., Simpson, P. J., Papworth, D. G., Savage, J. R., Armstrong, S., and Hulten, M. A. (1996). Analysis of lymphocytes from uranium mineworkers in Namibia for chromosomal damage using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mutat.Res.* **371**, 109-113.



### III.2.2.3 - Compléments de l'article 4

Vingt huit jours après l'exposition répétée, des dommages de l'ADN dans les cellules du BAL, des groupes concernés, sont encore observés, ce qui confirme que les effets, induits par l'inhalation répétée sont persistants dans ce type cellulaire. En revanche, dans les cellules rénales, aucun dommage n'est observé 28 jours après exposition dans les différents groupes.

Dans les cellules du BAL, un effet « seuil » de génotoxicité est suspecté mais non démontré. En effet, aucun dommage de l'ADN n'est observé suite aux expositions AcUO2-1 et AcUO2-2 alors que des dommages apparaissent suite à l'exposition AcUO2-3. Différents types de seuil ont été définis (Kirsch-Volders *et al.*, 2000, Kirsch-Volders *et al.*, 2003). Dans notre cas expérimental, l'uranium est bien présent dans les poumons suite aux différentes expositions aiguës mais aucun effet génotoxique n'est détecté, par le test des comètes, aux deux doses les plus basses, ce qui correspondrait à la définition du « Real (or biological) threshold ». Mais trois quantités d'UO<sub>2</sub> inhalées ne suffisent pas pour conclure sur un effet dose-réponse. De plus, les connaissances sur les mécanismes d'action de l'uranium ne sont pas encore assez connus pour cerner les concepts complexes de seuil.

Le test des comètes ne révèle aucun effet dans les cellules épithéliales nasales quels que soient les groupes et les temps testés (Figure 30). La réponse est particulièrement hétérogène ce qui pourrait masquer un éventuel effet.

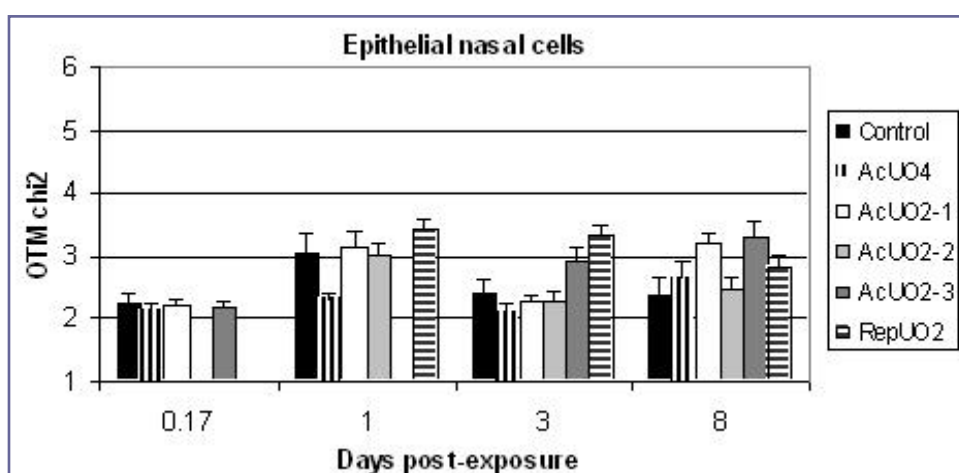


Figure 30 : Test des comètes en condition alcaline sur les cellules épithéliales nasales

Le test des comètes a aussi été réalisé, pour certains groupes, sur une population hétérogène de cellules pulmonaires issues de la digestion enzymatique de morceaux de poumon préalablement lavé (Figure 31). Comme dans les cellules du BAL, avec les groupes AcUO2-1, -2 et AcUO4, aucun effet n'a été observé.

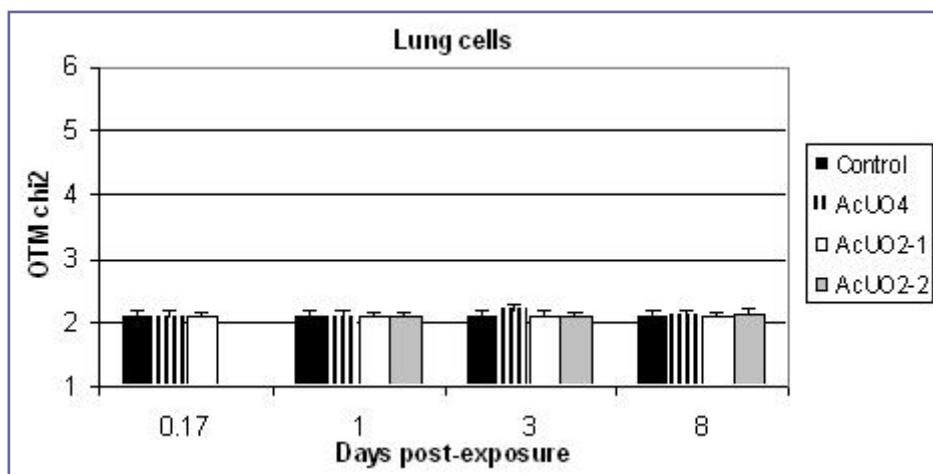


Figure 31 : Test des comètes en condition alcaline sur les cellules pulmonaires

## Chapitre III.3 - Effets biocinétiques et génotoxiques des doubles contaminations

Le modèle chronique de la CIPR a été testé selon une seconde approche consistant à suivre la biocinétique d'un composé inhalé seul ou après une exposition préalable à un autre composé. En effet, si le modèle de référence est correct, la biocinétique d'un composé, l' $UO_4$  dans notre cas, devrait être inchangée par une exposition préalable à un autre composé ( $UO_2$ ). Pour ce faire, une comparaison du groupe Ac $UO_4$  avec les groupes doublement exposés Rep $UO_2+UO_4$  et Ac $UO_2+UO_4$  a été faite.

De plus, les doubles contaminations permettent d'étudier les effets combinés d'une exposition avec de l' $UO_2$  et de l' $UO_4$ . En outre, il est intéressant de savoir si des expositions préalables, à l' $UO_2$  dans notre cas, sont capables d'induire des modifications ayant des conséquences sur les biocinétiques et les effets génotoxiques d'un composé inhalé *a posteriori*, tel que l' $UO_4$ . Enfin, en modifiant le type de l'exposition préalable à l' $UO_2$ , il est possible de tester à nouveau les conséquences d'une inhalation répétée par rapport à celui d'une inhalation aiguë. La comparaison des groupes Rep $UO_2+UO_4$  et Ac $UO_2+UO_4$  a permis de répondre à cette dernière interrogation.

### III.3.1 - Résumé de l'article 5

L'objectif est d'étudier l'effet génotoxique et la biocinétique d'un composé soluble inhalé de manière aiguë ( $UO_4$ ) chez des rats exposés ou non au préalable à un composé insoluble ( $UO_2$ ) par inhalation répétée ou aiguë.

Ce travail constitue une étude pilote car peu d'études sont consacrées à cette thématique. De plus, ils sont obtenus pour des niveaux d'exposition relativement élevés. Les résultats et leurs implications pour l'usage des modèles biocinétique de la CIPR sont donc à prendre avec la prudence nécessaire.

Les dommages de l'ADN sont ensuite recherchés, par le test des comètes, sur les cellules épithéliales nasales, les cellules du lavage broncho-alvéolaire et les cellules rénales. Le dosage de l'uranium dans les échantillons doublement contaminés (poumons, reins, fémurs, TGI et excréta) est réalisé par ICP-MS. Cette technique permet

d'estimer la quantité d'uranium provenant exclusivement de l' $\text{UO}_4$ , grâce à une composition isotopique différente de celle de l' $\text{UO}_2$ . Le calcul du rapport  $K/K+\text{Ur}$ , où  $K$  est la quantité d' $\text{UO}_4$  dans les reins et  $\text{Ur}$  la quantité d' $\text{UO}_4$  dans les urines, permet d'évaluer la quantité d'uranium retenue dans les reins par rapport à la quantité totale filtrée par les reins.

L'exposition aiguë ou répétée par l' $\text{UO}_2$  précédant l'inhalation d' $\text{UO}_4$  n'aggrave pas l'état général des rats (poids, consommations d'eau et de boisson, Article 5 - Table 1). L'inhalation d' $\text{UO}_4$  provoque une augmentation du volume uriné 2 jours après l'inhalation. Cette augmentation est plus précoce (24h) lorsqu'une exposition à l' $\text{UO}_2$  a précédé l'inhalation d' $\text{UO}_4$  (Article 5 - Table 2).

Des dommages de l'ADN sont détectés, par le test des comètes en condition alcaline, dans les cellules épithéliales nasales et les cellules du BAL à tous les temps testés après la double exposition Rep $\text{UO}_2+\text{UO}_4$ , et pas avec Ac $\text{UO}_2+\text{UO}_4$  (Article 5 - Figure 1). De plus, les dommages de l'ADN dans les cellules du BAL sont à la fois des cassures simple et double brin (Article 5 - Figure 2). L'augmentation du nombre de cellules dans le lavage broncho-alvéolaire, uniquement dans le groupe Rep $\text{UO}_2+\text{UO}_4$  à 3 et 8 jours après l'exposition à l' $\text{UO}_4$ , témoigne d'un recrutement de cellules dans le poumon et suggérerait une réponse inflammatoire. Dans les cellules rénales, des dommages sont aussi détectés dans le groupe Rep $\text{UO}_2+\text{UO}_4$ , 16 jours après exposition (Article 5 - Figure 1).

La biocinétique de l' $\text{UO}_4$  dans le poumon n'est pas modifiée par une exposition préalable (Article 5 - Figure 3). Les expositions d' $\text{UO}_2$  n'ont pas non plus modifié la biocinétique de l' $\text{UO}_4$  dans le TGI et les fèces les premiers jours après exposition à l' $\text{UO}_4$ . Cependant, les très fortes quantités d' $\text{UO}_4$  mesurées dans ces échantillons pourraient masquer une différence entre les groupes. En revanche, que ce soit dans le TGI ou les fèces, à partir de 8 et 16 jours après la contamination, la quantité d' $\text{UO}_4$  est plus faible lorsqu'une exposition à l' $\text{UO}_2$  a eu lieu précédemment (Article 5 - Figures 3 et 4). Une hypothèse permettant d'expliquer ce résultat serait que l' $\text{UO}_2$  inhalé au préalable modifierait l'efficacité de la remontée mucociliaire diminuant, par la suite, l'élimination de l' $\text{UO}_4$  par cette voie.

Dans les reins, une exposition préalable d' $\text{UO}_2$  augmente la quantité d' $\text{UO}_4$ , 4 heures et 1 jour après l'exposition. En revanche le pic d' $\text{UO}_4$  dans les reins se situe à 3 jours pour tous les groupes. Huit jours après l'exposition à l' $\text{UO}_4$ , les concentrations redeviennent comparables entre les 3 groupes (Article 5 - Figure 3). La quantité d' $\text{UO}_4$

dans les urines est augmentée uniquement lorsque l'inhalation d' $\text{UO}_4$  suit une exposition répétée d' $\text{UO}_2$  (Article 5 - Figure 4). L'exposition du groupe Rep $\text{UO}_2+\text{UO}_4$  induit une augmentation à la fois de la quantité d' $\text{UO}_4$  retenue dans les reins et éliminée par les urines. Ceci pourrait s'expliquer par une augmentation générale du passage de l' $\text{UO}_4$  dans la circulation sanguine puisque l' $\text{UO}_4$  semble être aussi plus retenu dans les fémurs. En revanche, lorsque l'inhalation d' $\text{UO}_4$  suit une inhalation aiguë d' $\text{UO}_2$ , la quantité d' $\text{UO}_4$  retrouvée dans les urines n'est pas augmentée tandis que le rapport  $\text{K}/\text{K}+\text{Ur}$  est amplifié (Article 5 - Figure 5). Ceci signifierait que l'inhalation aiguë d' $\text{UO}_2$  ralentit l'excrétion rénale de l' $\text{UO}_4$ .

Une exposition par inhalation à un uranium insoluble modifie donc la biocinétique d'un uranium soluble inhalé *a posteriori* au niveau des reins, du TGI et des excréta. Les mécanismes expliquant ces modifications ne sont pas élucidés. De plus, lorsque l'exposition préalable est une exposition répétée, des dommages de l'ADN apparaissent dans différents types cellulaires, ce qui pourrait être la conséquence d'une sensibilisation induite par l'exposition répétée.



### III.3.2 - Article 5 - Distribution and genotoxic effects after successive exposure to different uranium oxide particles inhaled by rats

Article soumis dans "*Inhalation Toxicology*"

Marjorie Monleau<sup>1</sup>, Michel De Méo<sup>2</sup>, Sandrine Frelon<sup>1</sup>, François Paquet<sup>1</sup>, Marie Claraz<sup>1</sup>,  
Gérard Duménil<sup>3</sup>, Valérie Chazel<sup>1</sup>

1 IRSN/DRPH/SRBE, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale, BP 166, 26702 Pierrelatte Cedex, France

2 Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale, Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille, France

3 Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille, France

Keywords: Uranium, Rat, Inhalation, Comet assay, Biokinetics, Double exposure

Les valeurs brutes des OTM pour l'ensemble des résultats des tests des comètes de l'article 5 sont données dans l'annexe 6.

**Abstract**

In nuclear fuel cycle facilities, workers may inhale airborne uranium compounds which leads to internal contamination, with various exposure scenarios depending on the workplace. These exposures can be chronic, repeated or acute and involved many different compounds. The effect of uranium after multiple scenarios of exposure is unknown. The aim of this study, therefore, was to investigate the genotoxic and biokinetics consequences of exposure to depleted insoluble uranium dioxide ( $UO_2$ ) by repeated or acute inhalation on subsequent acute inhalation of moderately soluble uranium peroxide ( $UO_4$ ) in rats. Genotoxic effects, assessed by comet assay, in different cell types were observed in the group exposed to  $UO_4$  inhalation preceded by repeated  $UO_2$  inhalations. In bronchoalveolar lavage cells, the DNA damage was caused by both single and double strand breaks. The study of  $UO_4$  bioaccumulation showed that the  $UO_2$  exposures had no influence on subsequent  $UO_4$  accumulation in lungs. Conversely, the  $UO_4$  biokinetics in the kidneys, gastrointestinal tract and excreta were slightly modified by previous  $UO_2$  exposures. These results show that both genotoxic and biokinetics effects of uranium may depend on pre-exposure. Repeated exposure induces a potentiation effect compared to acute exposure.



## Introduction

Exposures to complex mixtures of metals in the workplace are more likely to occur than exposures to a single compound alone (Madden, 2003). Various forms of uranium (U) are found in the case of the nuclear industry with a variety of isotopic compositions (natural, depleted, enriched) and solubilities (Chazel *et al.*, 2000). Moreover, internal contamination of workers can occur by accidental, acute and/or repeated, low-dose, U exposure, with inhalation the major exposure path (ATSDR, 1999).

Various epidemiological studies have been performed on U miners and workers in the nuclear industry. These studies have shown an excessive relative risk of lung cancer and fibrosis (ATSDR, 1999; Cardis *et al.*, 2005). An increase in chromosomal aberrations or genetic damage has also been observed in blood samples among workers and miners exposed to U compounds (Meszaros *et al.*, 2004; Prabhavathi *et al.*, 2000; Zaire *et al.*, 1996). Finally in animal studies, exposure by inhalation to U dust can lead not only to an U accumulation predominantly in the lungs and tracheobronchial lymph nodes, as a function of U solubility, but also to the development of neoplasia and fibrosis at pulmonary level (ATSDR, 1999; Mitchel *et al.*, 1999). A previous study showed that exposure to depleted insoluble U by inhalation resulted in DNA strand breaks in different cell types with an effect of potentiation after repeated inhalations (Monleau *et al.*, 2005). However, in the event of exposure by inhalation to various U compounds, the combined effects are unknown even though exposure to metal mixtures can lead to synergic or antagonism effects (Madden, 2003). Indeed, exposure to one compound or to mixtures induced different genotoxic, apoptotic and inflammatory responses suggesting the possibility of combined effects (De Boeck *et al.*, 1998; De Boeck *et al.*, 2003; Lombaert *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2004).

The U intake has to be estimated to evaluate the risks induced by U inhalation. This intake can be calculated with dosimetric models. These models assume that one exposure has no effect on the response of the organism to later intakes (ICRP, 1979; O'Brien, 2003). However, in successive exposure with various U compounds, the behavior of U is unknown and little experimental data apparently exists to challenge that assumption. Indeed, SO<sub>2</sub> has been shown to affect the clearance of subsequently inhaled TiO<sub>2</sub> particles (Ferin and Leach, 1973). Moreover, in rats, repeated inhalation of NiO induced alveolar macrophage hyperplasia and chronic alveolitis and impaired clearance of subsequently inhaled NiO and <sup>63</sup>NiO tracer particles, but did not affect the clearance of <sup>85</sup>Sr microspheres (Benson *et al.*, 1995; Benson *et al.*, 1992). Similar effects

might take place under certain conditions after exposure to U. Thus, knowledge of the U biokinetics based on various complex contamination scenarios is necessary to improve the monitoring of workers exposed to airborne U.

The aim of this study was (1) to investigate the genotoxic effects after successive exposures, involving two depleted U compounds with different solubilities and (2) to determine the effects of repeated or acute inhalations of insoluble U oxide ( $\text{UO}_2$ ) on the biokinetics of subsequently inhaled soluble U compound ( $\text{UO}_4$ ).

## Materials and Methods

### Animals

A total of 120 pathogen-free adult male OFA Sprague Dawley rats weighing around 500 g were obtained from Charles River Laboratories, France. The rats were housed by pairs in traditional cages under a 12 h/12 h light/dark cycle and, for the purposes of the biokinetics study, placed individually in metabolism cages at given times. Food and water were given *ad libitum*. The general health parameters of the rats were monitored weekly. The non-parametrical statistical comparison between the different groups was made by a Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ). The study was conducted in accordance with French legislation concerning the protection of animals used for experimental purposes.

### Aerosols generation

The industrial U dioxide ( $\text{UO}_2$ ) and U peroxide ( $\text{UO}_4$ ) powders found at workplaces in U fuel cycle facilities were supplied by COGEMA (France). The  $\text{UO}_2$  characteristics were: insoluble depleted U; specific alpha activity =  $13 \cdot 10^3 \text{ Bq} \cdot \text{g}^{-1}$ ; isotopic composition by mass:  $^{238}\text{U} = 99.75 \%$ ,  $^{235}\text{U} = 0.24 \%$ ,  $^{234}\text{U} = 0.001 \%$ ,  $^{236}\text{U} < 0.0003 \%$ ,  $^{232}\text{U} < 0.00001 \%$ . The  $\text{UO}_4$  characteristics were: soluble reprocessed DU; specific alpha activity =  $25 \cdot 10^3 \text{ Bq} \cdot \text{g}^{-1}$ ; isotopic composition by mass:  $^{238}\text{U} = 99.54 \%$ ,  $^{235}\text{U} = 0.39 \%$ ,  $^{234}\text{U} = 0.005 \%$ ,  $^{236}\text{U} = 0.061 \%$ ,  $^{232}\text{U} < 0.00001 \%$ . The device used for aerosol generation was a Small-Scale Powder Disperser (SSPD, model 3433, TSI, USA). The particle size distribution of the aerosols administered to the rats was determined using a cascade Andersen impactor and an Aerodynamic Particle Sizer (APS, model 3310A, combined with a diluter, model 3302, TSI, USA). The aerodynamic median activity diameter (AMAD) of  $\text{UO}_2$  aerosols was  $2.53 \mu\text{m}$  (geometric standard deviation,  $\text{gsd} = 1.93$ ), the mass median aerodynamic diameter (MMAD) was  $1.8 \mu\text{m}$  ( $\text{gsd} = 1.66$ ) and the number median aerodynamic diameter =  $0.91 \mu\text{m}$  ( $\text{gsd} = 1.48$ ). The AMAD of  $\text{UO}_4$  aerosols was  $2.34 \mu\text{m}$  ( $\text{gsd} = 2.01$ ), the MMAD was  $1.31 \mu\text{m}$  ( $\text{gsd} = 1.70$ ) and the number median aerodynamic diameter =  $0.74 \mu\text{m}$  ( $\text{gsd} = 1.38$ ).  $\text{UO}_2$  and  $\text{UO}_4$  aerosols are found in the nuclear industry with the same forms that were used in this study (Chazel et al., 2003; Chazel et al., 2000). These DU particles were able to reach the alveoli of the rat lungs due to their size.

### Aerosol exposure

The aerosols were administered using a nose-only inhalation system previously described (Monleau *et al.*, 2005). The concentration of particles in the inhalation chamber was calibrated by sampling onto membrane filters (pore size 0.8  $\mu\text{m}$ , 25 mm diameter, in cellulose acetate, Millipore). Rats were acclimatized to housing facilities and restraining tubes during a period of at least two weeks. Different exposure types were performed with different groups of rats:

- Acute  $\text{UO}_4$  inhalation for 30 minutes at  $116 \text{ mg.m}^{-3} \pm 60 \text{ mg.m}^{-3}$ : AcUO4 group (total of 35 rats).
- Acute  $\text{UO}_2$  inhalation for 3 hours at  $375 \text{ mg.m}^{-3} \pm 70 \text{ mg.m}^{-3}$  followed, 11 days later, by the acute  $\text{UO}_4$  inhalation: AcUO2+UO4 group (total of 30 rats).
- Repeated  $\text{UO}_2$  inhalations for 30 minutes at  $190 \text{ mg.m}^{-3} \pm 41 \text{ mg.m}^{-3}$ , 4 days/week, for 3 weeks, followed, 11 days later, by the acute  $\text{UO}_4$  inhalation: RepUO2+UO4 group (total of 40 rats).
- Control group: maintained under similar conditions (restraining tubes, metabolism cages ...) but breathed clean air (total of 15 rats).

The different inhalations used for the double exposures have been previously performed alone (Monleau *et al.*, 2005). The lung intake of the acute  $\text{UO}_2$  inhalation was comparable to the cumulated intake at the end of the repeated  $\text{UO}_2$  exposure. The  $\text{UO}_2$  intakes were higher (with a factor of about 7) than the  $\text{UO}_4$  intake. Each group of exposure contained rats required for both the biokinetics study and the genotoxic study.

### Biological study

Three rats per exposure group were anaesthetized 4 hours, 1, 3, 8 and 16 days following  $\text{UO}_4$  exposure by an intraperitoneal injection of pentobarbital ( $1 \mu\text{L.g}^{-1}$ ) and exsanguinated via the abdominal artery. The following protocols, previously described (Monleau *et al.*, 2005), were used for each group at each post-exposure time. The various cell types were isolated and the comet assays performed on the day of euthanasia.

#### Biochemical analyses

The serum of blood was isolated and maintained at  $-20^\circ\text{C}$  until the plasma biochemical parameters were analyzed. The concentrations of alanine amino-transferase (ALT, U.L-1), aspartate amino-transferase (AST, U.L-1), creatinine (CREAT,  $\mu\text{mol.L-1}$ ) and urea ( $\text{mmol.L-1}$ ) were measured by routine methods (using a Konelab 20/20i, Thermo Electron, France). A non parametrical statistical comparison between the different groups was made by a Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ).

#### Isolation of epithelial nasal cells

The *in situ* enzyme incubation technique was used to isolate the nasal turbinate epithelial cells (Steele and Arnold, 1985). Briefly, the nasal cavity was filled with an enzyme mix (protease type XIV 0.5%, collagenase type IV 0.1% and hyaluronidase type IV-S 0.1%) via a tube inserted in the trachea. After incubation, the cell suspension was retrieved in a centrifuge tube by washing and then centrifuged at 1500 rpm for 15 min at 4°C. The pellet was resuspended in 250 µL of PBS. 170 µL was used for the comet assay and 80 µL for the cell viability.

#### Isolation of broncho-alveolar lavage (BAL) cells

After removing the lungs (with trachea and heart), broncho-alveolar lavage fluid (BALF) was collected by cannulating the trachea and washing with 50 mL of sterile saline solution (0.9% NaCl) at 37°C. BALF was centrifuged at 900 x g at 4°C for 10 min and the BAL cells were re-suspended in 2 mL of PBS. BAL cells are composed for 95% of alveolar macrophages (Derelanko and Hollinger, 2002).

#### Isolation of kidney cells

500 mg of the kidney was minced and washed with Ca<sup>2+</sup> - and Mg<sup>2+</sup> - free Hanks' balanced salt solution (HBSS free) supplemented with 20 mM HEPES and 0.8 mM EDTA. The suspension was incubated in a solution of 0.25% trypsin and 0.05% EDTA in HBSS free at 37°C with gentle stirring for 10 min (Robbiano et al., 1996; Sasaki et al., 1997). The suspension was centrifuged at 700 x g at 4°C for 10 min and the pellet was re-suspended in 1 mL of PBS.

#### Comet assay (single cell gel electrophoresis)

The comet assay was used *in vivo* to determine DNA damage. Under alkaline conditions, it detects DNA single and double strand breaks and alkali-labile sites simultaneously, while the neutral conditions allow the detection of DNA double-strand breaks considered to be the "biological relevant" lesions for radiation damage. Cell viability was > 85% for all samples (determined with a Malassez haemocytometer using the trypan blue exclusion technique). The comet assay protocol was previously described (Monleau *et al.*, 2005). It was performed under alkaline conditions for epithelial nasal cells (85 µL per slide) and kidney cells (3.10<sup>5</sup> cells per slide) and under both neutral and alkaline conditions for BAL cells (3.10<sup>4</sup> cells per slide). Briefly, two slides were prepared for each sample. The isolated cells, mixed with a solution of low melting point agarose and placed onto a slide pre-coated with 0.5% agarose, was dipped in a lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH10, 4°C) for 1h. The slide was placed on an electrophoretic unit containing an electrophoretic buffer for 30 min in an alkaline condition or for 20 min under neutral

conditions for DNA unwinding. The alkaline electrophoretic buffer was composed of 300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH>13 whereas the neutral electrophoretic buffer was composed of 100 mM Tris and 300 mM sodium acetate, pH 9. The slide was subjected to an electric field of  $0.84 \text{ V.cm}^{-1}$  (25 V, 350 mA) for 20 min at 4°C under alkaline conditions and an electric field of  $0.4 \text{ V.cm}^{-1}$  (12 V, 100 mA) for 1h under neutral conditions. The slide was then neutralized, rinsed with water and dehydrated in 100% ethanol. After staining, the slide was examined at 250 x magnification using an Olympus BX61 fluorescent microscope equipped with a UPlanFI 20XUV objective. Image analysis was performed using a Cohu camera and Fenestra Komet software (version 5.5, Kinetic Imaging, BFI Optilas, France). For each sample (i.e. 1 tissue/ 1 rat/ 1 exposure condition), 100 cells (50 cells/duplicate) were scored. Normalized distribution frequencies of olive tail moment (OTM) were calculated using 40 OTM classes between the minimum and maximum values for each set of data. A non-linear regression analysis was performed using a chi-square function model. The degree of freedom ( $n$ ) of the model, called OTMchi2, has been shown previously to be a quantitative parameter used to describe the level of DNA damage (Bauer *et al.*, 1998; Jean *et al.*, 2001). The degree of freedom was calculated using the curve-fitting software Table Curve 2D (Jandel Scientific Software). Each sample (i.e. 100 cells/cell type/time post-exposure/animal) corresponds to an OTMchi2, expressed in an arbitrary units. For a post-exposure time and cell type, the OTMchi2 from three exposed rats were calculated and compared with the OTMchi2 from the control group.

#### Biokinetics study

The rats used for the biokinetic study were housed in metabolism cages for 4 days after  $\text{UO}_4$  exposure and then 2 days per week the following weeks. Four rats from the Ac $\text{UO}_4$  group, three rats from the Ac $\text{UO}_2+\text{UO}_4$  group and five rats from the Rep $\text{UO}_2+\text{UO}_4$  group were anaesthetized 4 hours, 1, 3, 8 and 16 days following the  $\text{UO}_4$  exposure with a gaseous anaesthetic (isoflurane) and exsanguinated via the abdominal artery. They were autopsied immediately to collect the lungs (with trachea), kidneys, femurs and gastrointestinal tract (from esophagus to colon without feces). The samples were ashed according to a previously published method (Ejnik *et al.*, 2000). U concentration was then determined by ICP-MS where the measurement of the non-natural  $^{236}\text{U}$  isotope could be used to determine the U amount from  $\text{UO}_4$  in samples containing both  $\text{UO}_2$  and  $\text{UO}_4$  (Frelon *et al.*, 2005). A non-parametrical statistical comparison between the different groups was made by a Mann-Whitney test ( $p<0.05$ ).

## Results

### General health parameters of rats

The general health parameters are illustrated in Article 5 - Tables 1 and 2 for the different groups and for some relevant days after  $\text{UO}_4$  exposure. In the three different exposed groups,  $\text{UO}_4$  exposure induced a decrease in the mean weight of the rats for about 6 days. The mean weight then stabilized before increasing but remained lower than for the Control group. The food and water consumption of exposed rats was momentarily lower than for the Control group. Another interesting parameter was the urinary volume excreted daily by rats. The acute  $\text{UO}_4$  exposure alone induced an increase of about a factor of 2 in the urinary volume between the first and second day after  $\text{UO}_4$  exposure. This increase is also observed when an  $\text{UO}_2$  exposure preceded  $\text{UO}_4$  inhalation, but seemed to appear earlier, within the first day after  $\text{UO}_4$  exposure.

*Article 5 - Table 1 : Body weight, food and water intakes of different rat groups*

	Days after $\text{UO}_4$ exposure	Control	Ac $\text{UO}_4$	Ac $\text{UO}_2$ + $\text{UO}_4$	Rep $\text{UO}_2$ + $\text{UO}_4$
Rat weight (g)	0	527 ± 63	491 ± 56	497 ± 47	525 ± 53
	6	554 ± 65	368 <sup>#</sup> ± 33	458 <sup>#</sup> ± 60	495 <sup>#</sup> ± 53
	13	565 ± 64	413 <sup>#</sup> ± 106	482 <sup>#</sup> ± 80	508 ± 30
Food consumption (g)	0	23 ± 4	20 ± 3	17 ± 5	18 ± 4
	4	25 ± 4	2 <sup>#</sup> ± 2	3 <sup>#</sup> ± 6	7 <sup>#</sup> ± 4
	9	26 ± 4	29 ± 3	10 ± 13	24 ± 3
Water consumption (g)	0	35 ± 5	32 ± 4	32 ± 6	30 ± 6
	4	38 ± 4	15 <sup>#</sup> ± 9	25 ± 11	21 <sup>#</sup> ± 5
	9	42 ± 6	35 ± 3	36 ± 12	33 ± 5

The values are given as mean ± SD, n > 3. # p<0.05 between the exposed and control groups.

*Article 5 - Table 2 : Urinary volume (ml) excreted per day*

Days after $\text{UO}_4$ exposure	Control	Ac $\text{UO}_4$	Ac $\text{UO}_2$ + $\text{UO}_4$	Rep $\text{UO}_2$ + $\text{UO}_4$
0	12 ± 8	21 ± 6	16 ± 9	11 ± 1
1		19 ± 6	48 <sup>#</sup> ± 13	23 <sup>#</sup> ± 10
2		36 <sup>#</sup> ± 19	27 <sup>#</sup> ± 9	19 ± 8
3		15 ± 7	17 ± 9	15 ± 6

The values are given as means ± SD, n > 5. # p<0.05 between the exposed and control groups.

The biochemical parameters in serum, ALT and AST, were stable, indicating a lack of liver failure, while both the concentrations of creatinine and urea increased, indicating kidney dysfunction (Article 5 - Table 3). This kidney dysfunction was observed at 3 days after UO<sub>4</sub> exposure in the three exposed groups and at 8 days after UO<sub>4</sub> exposure for the AcUO<sub>4</sub> and AcUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> groups.

*Article 5 - Table 3 : Biochemical parameters in serum for the Control (n=4), AcUO<sub>4</sub> (n=3), AcUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> (n=3) and RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> (n=3) groups*

	Days after UO <sub>4</sub> exposure	Control	AcUO <sub>4</sub>	AcUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub>	RepUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub>
CREAT μmol.L <sup>-1</sup>	3	52 ± 6	73 <sup>#</sup> ± 8	109 <sup>#</sup> ± 21	68 <sup>#</sup> ± 4
	8	49 ± 6	264 <sup>#</sup> ± 168	114 <sup>#</sup> ± 73	52 ± 4
UREA mmol.L <sup>-1</sup>	3	6.1 ± 0.4	11 <sup>#</sup> ± 2	10 <sup>#</sup> ± 1	8 <sup>#</sup> ± 1.3
	8	6.2 ± 0.6	34 <sup>#</sup> ± 22	8 ± 0.9	5.9 ± 0.6
ALT U.L <sup>-1</sup>	3	31 ± 9	34 ± 14	65 <sup>#</sup> ± 36	33 ± 7
	8	39 ± 17	28 ± 16	39 ± 15	46 ± 14
AST U.L <sup>-1</sup>	3	152 ± 87	72 ± 15	221 ± 72	141 ± 13
	8	149 ± 91	127 ± 32	151 ± 56	161 ± 29

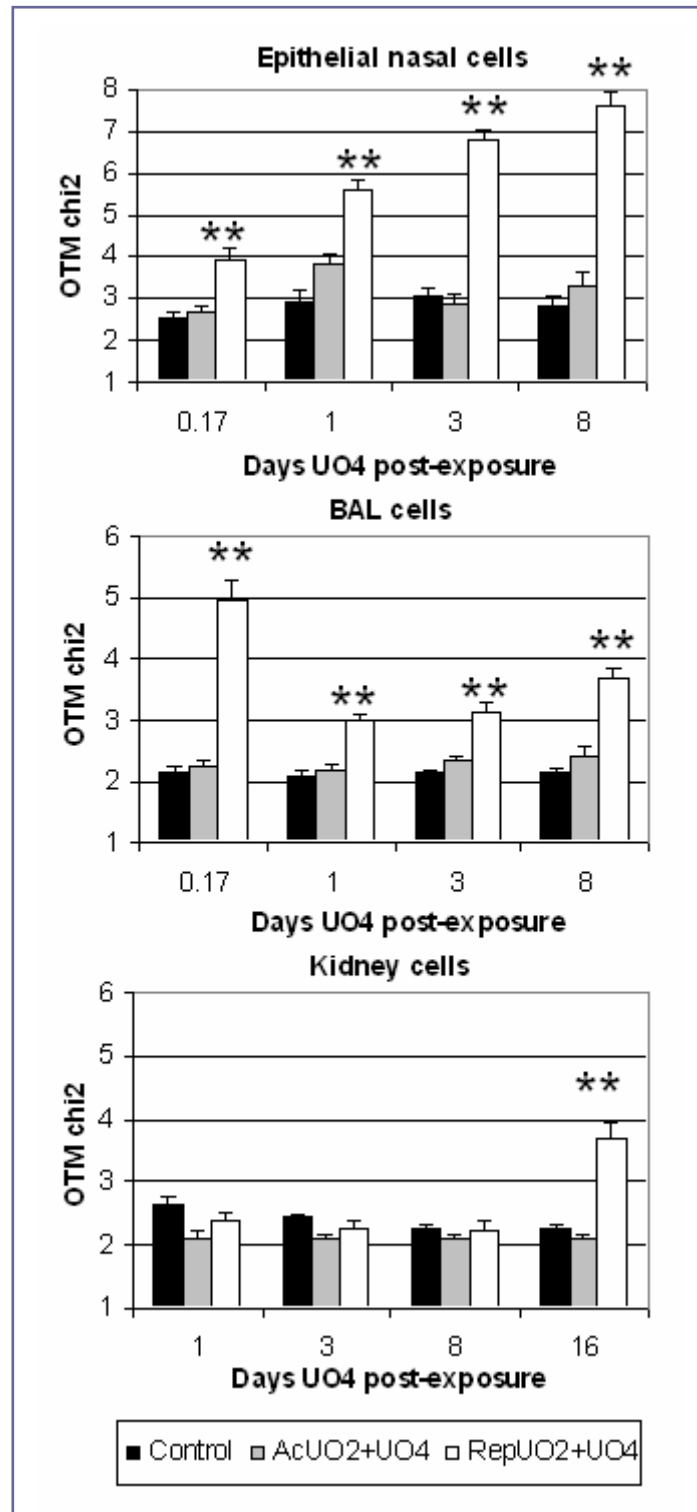
The values are given as means ± SD, n = 3. # p<0.05 between the exposed and control groups.

### DNA damage

DNA damage was investigated for groups with comparable total U intakes in lungs, i.e. groups subjected to double exposure, AcUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> and RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub>. The OTMchi2 values, after comet assay under alkaline conditions in the various cell types, were presented at the different days post-exposure (Article 5 - Figure 1). DNA strand breaks were induced only in the RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> group. In nasal and BAL cells, DNA damage was observed at 4 hours, 1, 3 and 8 days after UO<sub>4</sub> exposure. Moreover the total number of cells in the BAL fluid increased significantly, by a factor of about 2.5, at 3 and 8 days after UO<sub>4</sub> exposure in the RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> group (171 ± 6 .10<sup>5</sup> cells at 8 days) compared with both the Control and AcUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> groups (59 ± 29 .10<sup>5</sup> cells and 49 ± 19 .10<sup>5</sup> cells respectively at 8 days). In kidney cells, DNA strand breaks were observed at 16 days after UO<sub>4</sub> exposure in the RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> group.

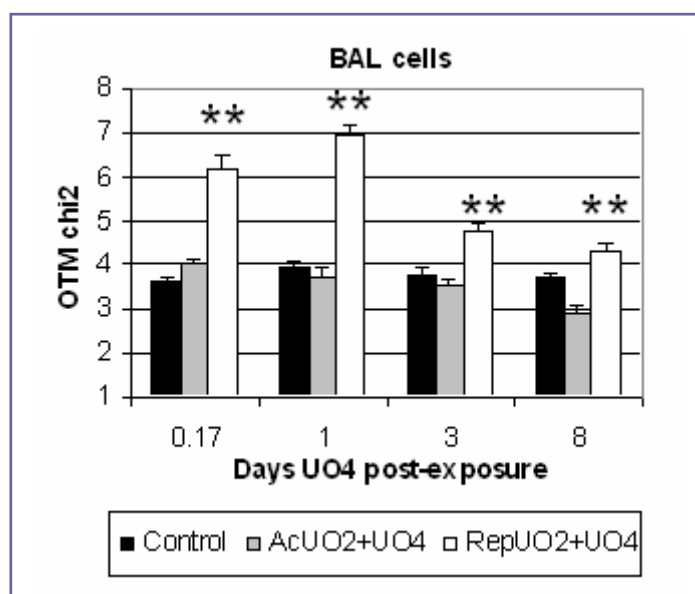
Comet assay under neutral conditions was assessed in BAL cells (Article 5 - Figure 2). DNA damage was also induced in the RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> group all days after UO<sub>4</sub> exposure.





Article 5 - Figure 1 : Comet assay under alkaline conditions in different cell types

Mean of OTMchi2 values are presented in relation to days UO<sub>4</sub> post-exposure. \*\* p<0.001 between the control and exposed groups.



Article 5 - Figure 2 : Comet assay under neutral conditions in BAL cells

Mean of OTMchi2 values are presented in relation to days UO<sub>4</sub> post-exposure. \*\* p<0.001 between the Control and exposed groups.

### Biokinetics

The total U intakes in lungs were similar for the groups with double exposure (AcUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> and RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> groups) (Article 5 - Table 4). The UO<sub>4</sub> intakes of the AcUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> and AcUO<sub>4</sub> groups were 2.4 higher than in the RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> group. Despite this difference, the U concentrations in kidneys reached nephrotoxic concentrations (which is from 1.2 µg.g<sup>-1</sup> in rats (Diamond *et al.*, 1989)) peaking 3 days after UO<sub>4</sub> exposure ranging from 6 µgUO<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> for the RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> group to 18.5 µgUO<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> for the other two groups. This U came mainly from UO<sub>4</sub> (data no shown).

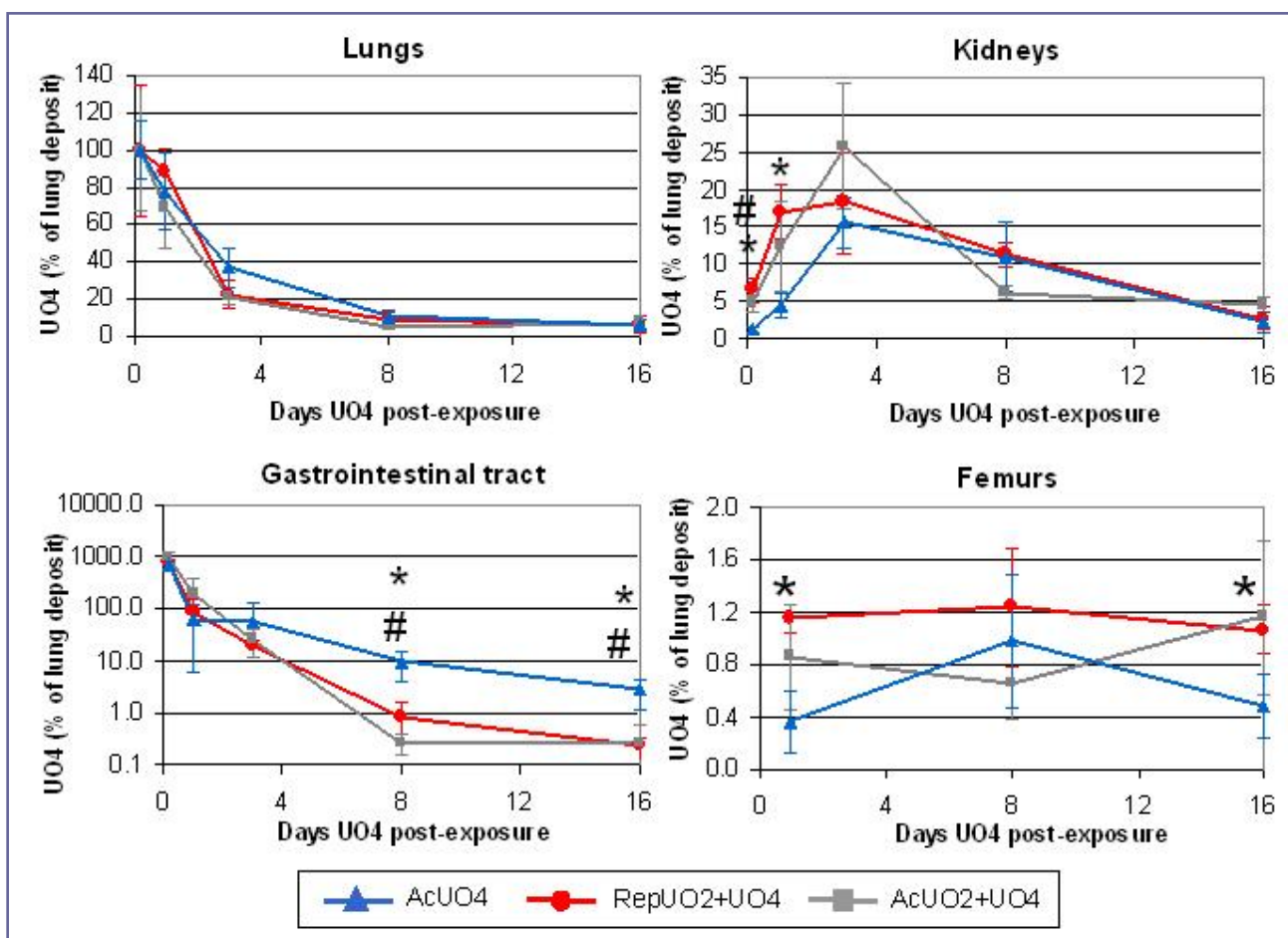
Article 5 - Table 4 : Uranium concentrations in lungs in the three exposed groups, 4 hours after UO<sub>4</sub> exposure

	AcUO <sub>4</sub>	AcUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub>	RepUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub>
U total (µgU.g <sup>-1</sup> )	93 ± 23	549 ± 90	507 ± 112
UO <sub>4</sub> (µgUO <sub>4</sub> .g <sup>-1</sup> )	95 ± 24	87 ± 34	37 <sup>#</sup> ± 15

The values are given as means ± SD. n = 4 for AcUO<sub>4</sub> group, n = 3 for AcUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> group and n = 5 for RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> group. # p<0.05 for the UO<sub>4</sub> concentration between RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> and the other two groups.

The UO<sub>4</sub> biokinetics in the lungs, kidneys, femurs and gastrointestinal tract are shown in Article 5 - Figure 3. To compare the UO<sub>4</sub> biokinetics between groups, the UO<sub>4</sub>

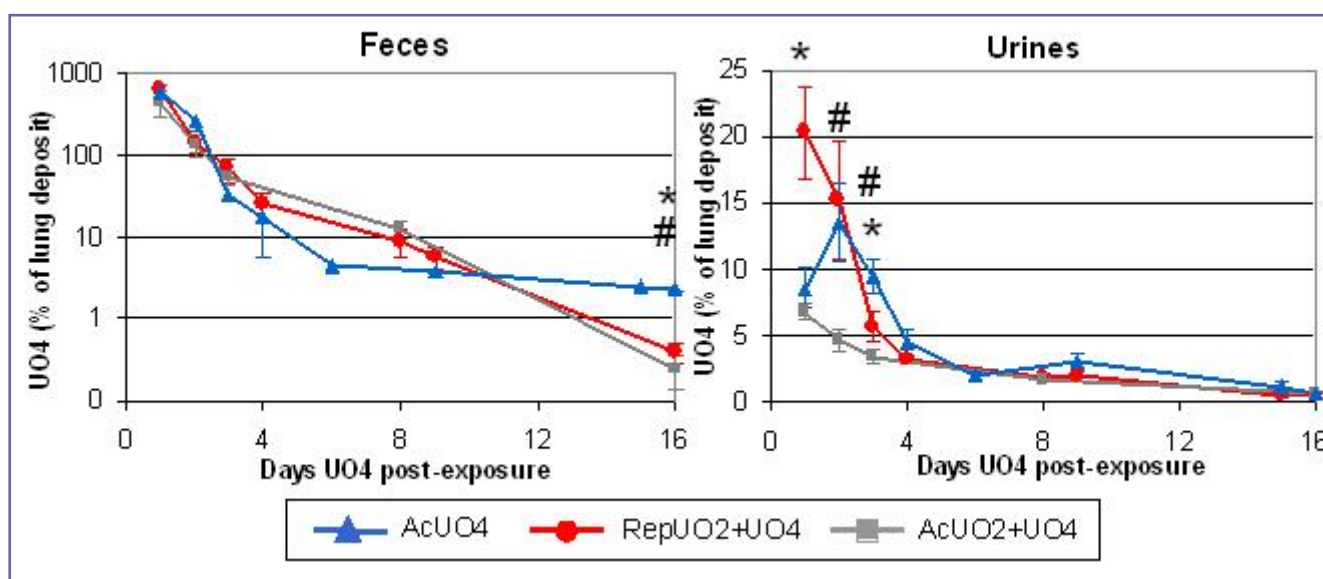
quantity was expressed as a percentage of the lung deposit. The lung deposit was specified as the  $UO_4$  quantity in lungs 4 hours after the  $UO_4$  exposure. No difference was observed in the  $UO_4$  retention in lungs between the three groups. The  $UO_4$  quantity in kidneys, 4 hours and 1 day after  $UO_4$  exposure, was higher (factor around 4) in the groups with double exposure than in the group without pre-exposure ( $p < 0.01$  between the groups Rep $UO_2+UO_4$  and Ac $UO_4$  and  $p < 0.05$  between the groups Ac $UO_2+UO_4$  and Ac $UO_4$ ). No difference was observed in the femurs between Ac $UO_2+UO_4$  and Ac $UO_4$  groups but, in the Rep $UO_2+UO_4$  group, the  $UO_4$  content in femurs was increased by a factor around 2. In the gastrointestinal tract,  $UO_4$  quantities were lower, 8 and 16 days after  $UO_4$  exposure, in the groups with double exposure than in the group without previous  $UO_2$  exposure ( $p < 0.01$  between the groups Rep $UO_2+UO_4$  and Ac $UO_4$  and  $p < 0.05$  between the groups Ac $UO_2+UO_4$  and Ac $UO_4$ ).



Article 5 - Figure 3 : Biokinetics of  $UO_4$  in the lungs, kidneys, gastro-intestinal tract and femurs as a function of days after  $UO_4$  exposure

% of  $UO_4$  lung deposit, mean  $\pm$  SD.  $n = 5$  for Rep $UO_2+UO_4$ ,  $n = 3$  for Ac $UO_2+UO_4$  and  $n = 4$  for Ac $UO_4$ . \*:  $p < 0.05$  between the Rep $UO_2+UO_4$  and Ac $UO_4$  groups, #:  $p < 0.05$  between the Ac $UO_2+UO_4$  and Ac $UO_4$  groups.

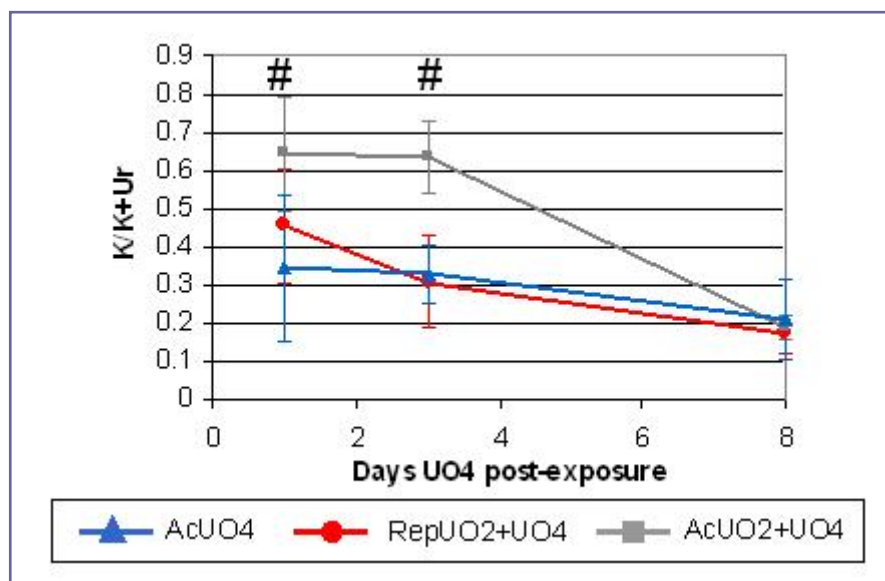
This is correlated with the  $UO_4$  quantities in feces for the Rep $UO_2+UO_4$  and Ac $UO_2+UO_4$  groups that were lower than found in the Ac $UO_4$  group at 16 days (Fig. 4). The  $UO_4$  quantity was high in the urine of the groups with double exposure from 1 day after  $UO_4$  exposure (Article 5 - Figure 4). On the other hand, in the Ac $UO_4$  group, the  $UO_4$  quantity seemed to reach a maximum 2 days after the  $UO_4$  exposure. Moreover, a difference was observed between the two groups with double exposure. In the Ac $UO_2+UO_4$  group, the  $UO_4$  quantity in urine was lower than the quantity in the Rep $UO_2+UO_4$  group. Finally, the three groups had similar  $UO_4$  biokinetics in urine from 4 days after  $UO_4$  exposure.



Article 5 - Figure 4 : Daily excretion of  $UO_4$  as a function of days after  $UO_4$  exposure

% of  $UO_4$  lung deposit, mean  $\pm$  SEM.  $n = 5$  for Rep $UO_2+UO_4$ ,  $n > 3$  for Ac $UO_2+UO_4$  and  $n > 4$  for Ac $UO_4$  group. \*:  $p < 0.05$  between the Rep $UO_2+UO_4$  and Ac $UO_4$  groups, #:  $p < 0.05$  between the Ac $UO_2+UO_4$  and Ac $UO_4$  groups.

The  $K/K+Ur$  ratio (where  $K$  is the  $UO_4$  content in kidneys and  $Ur$  is the  $UO_4$  content in urine) calculated for the different groups, was used to evaluate  $U$  excretion through the kidneys (Article 5 - Figure 5). This ratio was similar 1 and 3 days after the  $UO_4$  exposure for the Rep $UO_2+UO_4$  and Ac $UO_4$  groups (ratio around 0.4). However it was higher for the Ac $UO_2+UO_4$  group (ratio around 0.65). Eight days after  $UO_4$  exposure, the  $K/K+Ur$  ratio was similar in the three groups (ratio around 0.2).



Article 5 - Figure 5 : K/K+Ur ratio in the different groups 1, 3 and 8 days after UO<sub>4</sub> exposure

Mean ± SD. #: p < 0.05 between the AcUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> and AcUO<sub>4</sub> groups.

## Discussion

The effects of inhalation of U compounds after complex scenarios of exposure are poorly understood. It was previously described that one of the most sensitive parameters for an early detection of U acute toxicity is the food intake and the reduced body weight gain (Diamond *et al.*, 1989; Houpert *et al.*, 2003). In our study, the general health parameters of rats after UO<sub>4</sub> inhalation exposure did not seem to be aggravated by a preliminary acute or repeated UO<sub>2</sub> exposure. However, the acute UO<sub>4</sub> exposure induced an increase in urinary volume that occurred one day earlier when UO<sub>2</sub> exposure preceded UO<sub>4</sub> inhalation. An increase in the urinary volume suggests a kidney dysfunction that is confirmed by the increase of creatinine and urea in the blood serum.

The first epithelial tissue in contact with inhaled U is the nasal epithelium followed by the lung epithelium. The alveolar macrophages are the cells primarily responsible for the binding, ingestion and clearance of inhaled particles (Bowden, 1987) and retention of these particles in the alveolar compartment (Tasat and De Rey, 1987). A relation between inflammation and tumorigenesis has been shown with poorly soluble dusts (Driscoll *et al.*, 1996). DNA damage was induced in all the cellular types studied, i.e. epithelial nasal cells, BAL cells and kidneys cells, but only in the RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> group, and this for several days following the last inhalation. The number of cells in the

BAL fluid was increased only in the group that showed DNA damage in BAL cells. An increase in the number of BAL cells revealed a recruitment of inflammatory cells in the lung tissue, suggesting that the inflammatory response could be partially responsible for the DNA damage in BAL cells.

As these effects were observed in the RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> group and not in the AcUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> groups, we conclude that the repetition of the inhalations was essential to induce the effects. This is in accordance with our previous study showing that repeated UO<sub>2</sub> exposure, contrary to acute UO<sub>2</sub> exposure, induced DNA strand breaks in BAL and kidney cells (Monleau *et al.*, 2005). These different results lead us to the conclusion that the repetition of inhalation induces a potentiation effect in the BAL and kidney cells.

The previous study also showed that repeated UO<sub>2</sub> or acute UO<sub>4</sub> inhalations alone do not induce DNA strand breaks in epithelial nasal cells nor an increase in the number of BAL cells (Monleau *et al.*, 2005), contrary to the effects observed here in the RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> group. We thus assume that a synergic effect appeared between UO<sub>2</sub> and UO<sub>4</sub> in this case. These synergic effects could be observed due to the presence of the first inhaled compound, UO<sub>2</sub>, in the respiratory tract at the time of the UO<sub>4</sub> inhalation given its insolubility. The difference of solubility between UO<sub>2</sub> and UO<sub>4</sub> could be one explanation for the synergic effect, as toxicity could depend on particle solubility (Johnston *et al.*, 2000). It has been shown that, following welding fume treatment, both the soluble and insoluble fractions are involved with various aspects of the acute lung damage and inflammation (Taylor *et al.*, 2003). The two fractions can induce different responses and the total response is produced by additive effects (Taylor *et al.*, 2003).

DNA damage in BAL cells was also analyzed after comet assay under neutral conditions. The results showed that the observed DNA damage in BAL cells for the RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> group was a consequence of both single and double DNA strand breaks. This result has already obtained in a previous study where the same uranium oxides were involved (Monleau *et al.*, 2005). Miller *et al.* previously suggested that radiation can play a role in the depleted U-induced biological effect *in vitro*. Indeed, radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium was observed (Miller *et al.*, 2002). Our *in vivo* results could confirm this hypothesis.

In our study, the UO<sub>4</sub> biokinetics after single UO<sub>4</sub> inhalation (AcUO<sub>4</sub> group) agreed with previous UO<sub>4</sub> instillation studies (Ansoborlo *et al.*, 1998; Chazel *et al.*, 2001; Houpert *et al.*, 1999). A rapid clearance of U from lungs resulted partly from its translocation to the blood and U was subsequently excreted in the urine. Kidneys are

the site of both bioaccumulation, U toxicity and filtration into urine (Diamond *et al.*, 1989; Leggett, 1989). Both our inhalation study and a previous instillation study, with comparable lung deposit (around 200 µg), showed an UO<sub>4</sub> peak in kidneys of about 15% of the intake, 3 days post-exposure (Ansoborlo *et al.*, 1998).

In the inhalation study, high quantities of UO<sub>4</sub> were measured in the feces the first day after UO<sub>4</sub> exposure and then U excretion decreased very rapidly. U in the feces might originate from both the lung, by mucociliary movement, which is a rapid mechanism of pulmonary clearance and from U ingestion during exposure. In the two groups with double exposure, the UO<sub>4</sub> quantities in the gastrointestinal tract and the feces, 8 and 16 days after UO<sub>4</sub> exposure, were lower compared with the UO<sub>4</sub> inhalation without pre-exposure. One hypothesis is that the mucociliary movement from the deep lung would be impaired by the previous UO<sub>2</sub> exposure. The result would be modification of the UO<sub>4</sub> elimination via this route. This hypothesis was not confirmed by the amounts of U measured in the gastrointestinal tract and feces on the first days following UO<sub>4</sub> exposure, which were similar in the three groups. However, the first days after exposure, the high amounts of U ingested during exposure could mask any effects on the mucociliary movement.

The previous UO<sub>2</sub> exposures apparently modify the early UO<sub>4</sub> biokinetics in kidneys without modifying the day of appearance of the UO<sub>4</sub> peak in kidneys. The K/K+Ur ratio reflects the U amount retained in the kidneys compared to the total U amount filtered. This ratio for the AcUO<sub>4</sub> group was around 0.34 one day after the UO<sub>4</sub> exposure and was consistent with previous UO<sub>4</sub> instillation study where the ratio was ranging from 0.3 to 0.45 (Houpert *et al.*, 1999). It was constant, at one day, in function of the kidney concentration (nephrotoxic or not) (Houpert *et al.*, 1999). This ratio was not modified by a previous repeated UO<sub>2</sub> exposure (RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> group) as both UO<sub>4</sub> contents in kidneys and urine increased in this group. This result suggests that the previous repeated UO<sub>2</sub> exposure did not affect the pattern of urinary excretion but rather affected the U dissolution rate from lung to blood. This hypothesis seems to be confirmed as the UO<sub>4</sub> amounts also increased in the femurs of these rats. By contrast, the K/K+Ur ratio was increased when an acute UO<sub>2</sub> exposure preceded the UO<sub>4</sub> inhalation (AcUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> group). This result suggests that the previous acute UO<sub>2</sub> exposure affects the pattern of UO<sub>4</sub> urinary excretion.

In conclusion, this *in vivo* pilot study showed that exposure to insoluble U could slightly disturb the biokinetics of subsequently inhaled soluble U in rat kidneys, gastrointestinal tract and excreta. The effect observed in kidney seems to be function of the type of UO<sub>2</sub> pre-exposure. The mechanisms of these disturbances required investigation. Moreover, DNA damage, in different target cells, was induced in rats exposed to acutely-inhaled soluble U with previous repeated inhalations to insoluble U. A potentiation effect of the repeated inhalation was involved in the U toxicity after complex exposure scenarios and, moreover, a synergic effect can be suspected between two U compounds with different solubility. These results show the major impact of pre-exposure on the biokinetics and biological consequences of a subsequent inhalation exposure.

### Acknowledgements

We wish to thank Olivia Delissen, Bernadette Dhieux, Christophe Maubert and Elie Tourlonias for their assistance during exposure, euthanasia and dissection as well as Stéphane Grison for help in biochemical analyses. This research was partially funded by COGEMA (DOSINTER programme).

### References

- Ansoborlo, E., Chazel, V., Houpert, P., Henge-Napoli, M. H., Paquet, F., Hodgson, A., and Stradling, N. (1998). Assessment of physico-chemical and biokinetic properties of uranium peroxide hydrate UO<sub>4</sub>. *Health Phys.* **75**, 389-397.
- ATSDR (1999). Toxicological profile for uranium. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of health and human services.
- Bauer, E., Recknagel, R. D., Fiedler, U., Wollweber, L., Bock, C., and Greulich, K. O. (1998). The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (chi<sup>2</sup>) not a gaussian distribution. *Mutat Res.* **398**, 101-10.
- Benson, J. M., Chang, I. Y., Cheng, Y. S., Hahn, F. F., Kennedy, C. H., Barr, E. B., Maples, K. R., and Snipes, M. B. (1995). Particle clearance and histopathology in lungs of F344/N rats and B6C3F1 mice inhaling nickel oxide or nickel sulfate. *Fundam. Appl. Toxicol.* **28**, 232-244.
- Benson, J. M., Chang, I. Y., Cheng, Y. S., Hahn, F. F., and Snipes, M. B. (1992). Effects of repeated inhalation exposure of F344 rats and B6C3F1 mice to nickel oxide and nickel sulfate hexahydrate on lung clearance. *LRRR report*.
- Bowden, D. H. (1987). Macrophages, dust, and pulmonary diseases. *Exp Lung Res.* **12**, 89-107.



- Cardis, E., Vrijheid, M., Blettner, M., Gilbert, E., Hakama, M., Hill, C., Howe, G., Kaldor, J., Muirhead, C. R., Schubauer-Berigan, M., Yoshimura, T., Bermann, F., Cowper, G., Fix, J., Hacker, C., Heinmiller, B., Marshall, M., Thierry-Chef, I., Utterback, D., Ahn, Y.-O., Amoros, E., Ashmore, P., Auvinen, A., Bae, J.-M., Bernar Solano, J., Biau, A., Combalot, E., Deboodt, P., Diez Sacristan, A., Eklof, M., Engels, H., Engholm, G., Gulis, G., Habib, R., Holan, K., Hyvonen, H., Kerekes, A., Kurtinaitis, J., Malke, H., Martuzzi, M., Mastauskas, A., Monnet, A., Moser, M., Pearce, M. S., Richardson, D. B., Rodriguez-Artalejo, F., Rogel, A., Tardy, H., Telle-Lamberton, M., Turai, I., Usel, M., and Veress, K. (2005). Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries. *Bmj*. **in press**.
- Chazel, V., Gerasimo, P., Dabouis, V., Laroche, P., and Paquet, F. (2003). Characterisation and dissolution of depleted uranium aerosols produced during impacts of kinetic energy penetrators against a tank. *Radiat Prot Dosimetry*. **105**, 163-6.
- Chazel, V., Houpert, P., Ansoborlo, E., Henge-Napoli, M. H., and Paquet, F. (2000). Variation of solubility, biokinetics and dose coefficient of industrial uranium oxides according to specific surface area. *Radiat.Prot.Dosimetry*. **88**, 223-231.
- Chazel, V., Houpert, P., Paquet, F., and Ansoborlo, E. (2001). Effect of absorption parameters on calculation of the dose coefficient: example of classification of industrial uranium compounds. *Radiat.Prot.Dosimetry*. **94**, 261-268.
- De Boeck, M., Lison, D., and Kirsch-Volders, M. (1998). Evaluation of the in vitro direct and indirect genotoxic effects of cobalt compounds using the alkaline comet assay. Influence of interdonor and interexperimental variability. *Carcinogenesis*. **19**, 2021-9.
- De Boeck, M., Lombaert, N., De Backer, S., Finsy, R., Lison, D., and Kirsch-Volders, M. (2003). In vitro genotoxic effects of different combinations of cobalt and metallic carbide particles. *Mutagenesis*. **18**, 177-186.
- Derelanko, M. J., and Hollinger, M. A., eds. (2002). *Handbook of Toxicology*. CRC Press, Second Edition.
- Diamond, G. L., Morrow, P. E., Panner, B. J., Gelein, R. M., and Baggs, R. B. (1989). Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundamental and applied toxicology*. **13**, 65-78.
- Driscoll, K. E., Carter, J. M., Howard, B. W., Hassenbein, D. G., Pepelko, W., Baggs, R. B., and Oberdorster, G. (1996). Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol*. **136**, 372-80.
- Ejnik, J. W., Hamilton, M. M., Adams, P. R., and Carmichael, A. J. (2000). Optimal sample preparation conditions for the determination of uranium in biological samples by kinetic phosphorescence analysis (KPA). *J Pharm Biomed Anal*. **24**, 227-235.
- Ferin, J., and Leach, L. J. (1973). The effect of SO<sub>2</sub> on lung clearance of TiO<sub>2</sub> particles in rats. *Am.Ind.Hyg.Assoc.J*. **34**, 260-263.
- Frelon, S., Monleau, M., Turlonias, E., Delissen, O., Chazel, V., and Paquet, F. (2005). L'ICP-MS : un outil pour le suivi des contaminations internes à l'uranium. *CJASS*. **in press**.
- Houpert, P., Chazel, V., Paquet, F., Henge-Napoli, M. H., and Ansoborlo, E. (1999). The effects of the initial lung deposit on uranium biokinetics after administration as UF<sub>4</sub> and UO<sub>4</sub>. *Int.J.Radiat.Biol*. **75**, 373-377.
- Houpert, P., Muller, D., Chazel, V., Claraz, M., and Paquet, F. (2003). Effect of DTPA on the nephrotoxicity induced by uranium in rat. *Radiat Prot Dosimetry*. **105**, 517-520.
- ICRP (1979). *Limits for intakes of radionuclides by workers, part 1*. Pergamon Press, Oxford.

- Jean, S., De Meo, M., Sabatier, A. S., Laget, M., Hubaud, J. C., Verrando, P., and Dumenil, G. (2001). Evaluation of sunscreen protection in Human melanocytes exposed to UVA or UVB irradiation using the alkaline comet assay. *Photochem. Photobiol.* **74**, 417-423.
- Johnston, C. J., Driscoll, K. E., Finkelstein, J. N., Baggs, R., O'Reilly, M. A., Carter, J., Gelein, R., and Oberdorster, G. (2000). Pulmonary chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica. *Toxicol Sci.* **56**, 405-13.
- Leggett, R. W. (1989). The behaviour and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys.* **57**, 365-383.
- Lombaert, N., De Boeck, M., Decordier, I., Cundari, E., Lison, D., and Kirsch-Volders, M. (2004). Evaluation of the apoptogenic potential of hard metal dust (WC-Co), tungsten carbide and metallic cobalt. *Toxicol Lett.* **154**, 23-34.
- Madden, E. F. (2003). The role of combined metal interactions in metal carcinogenesis: a review. *Rev Environ Health.* **18**, 91-109.
- Meszaros, G., Bogнар, G., and Koteles, G. J. (2004). Long-term persistence of chromosome aberrations in uranium miners. *J Occup Health.* **46**, 310-5.
- Miller, A. C., Brooks, K., Smith, J., and Page, N. (2004). Effect of the militarily-relevant heavy metals, depleted uranium and heavy metal tungsten-alloy on gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). *Mol Cell Biochem.* **255**, 247-56.
- Miller, A. C., Xu, J., Stewart, M., Brooks, K., Hodge, S., Shi, L., Page, N., and McClain, D. (2002). Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints. *Radiat Prot Dosimetry.* **99**, 275-8.
- Mitchel, R. E., Jackson, J. S., and Heinmiller, B. (1999). Inhaled uranium ore dust and lung cancer risk in rats. *Health Phys.* **76**, 145-155.
- Monleau, M., De Meo, M., Paquet, F., Chazel, V., Dumenil, G., and Claraz, M. (2005). Genotoxic and inflammatory effects of uranium particles inhaled by rats. *Toxicol Sci.* in press.
- O'Brien, R. S. (2003). Assessment of intakes of mixtures of radionuclides. *Radiat Prot Dosimetry.* **105**, 95-100.
- Prabhavathi, P. A., S.K.Fatima, Rao, M. S., and Reddy, P. P. (2000). Analysis of chromosomal aberration frequencies in the peripheral blood lymphocytes of smokers exposed to uranyl compounds. *Mutat.Res.* **466**, 37-41.
- Robbiano, L., Mereto, E., Corbu, C., and Brambilla, G. (1996). DNA damage induced by seven N-nitroso compounds in primary cultures of human and rat kidney cells. *Mutat Res.* **368**, 41-47.
- Sasaki, Y. F., Tsuda, S., Izumiyama, F., and Nishidate, E. (1997). Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutat.Res.* **388**, 33-44.
- Steele, V. E., and Arnold, J. T. (1985). Isolation and long-term culture of rat, rabbit, and human nasal turbinate epithelial cells. *In Vitro Cell Dev.Biol.* **21**, 681-687.
- Tasat, D. R., and De Rey, B. M. (1987). Cytotoxic effect of uranium dioxide on rat alveolar macrophages. *Environ.Res.* **44**, 71-81.
- Taylor, M. D., Roberts, J. R., Leonard, S. S., Shi, X., and Antonini, J. M. (2003). Effects of welding fumes of differing composition and solubility on free radical production and acute lung injury and inflammation in rats. *Toxicol Sci.* **75**, 181-91.
- Zaire, R., Griffin, C. S., Simpson, P. J., Papworth, D. G., Savage, J. R., Armstrong, S., and Hulten, M. A. (1996). Analysis of lymphocytes from uranium mineworkers in Namibia for chromosomal damage using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mutat.Res.* **371**, 109-113.

### III.3.3 - Compléments de l'article 5

Les concentrations d'uranium total et d' $UO_4$  dans les poumons et dans les reins sont présentées en Figure 32.

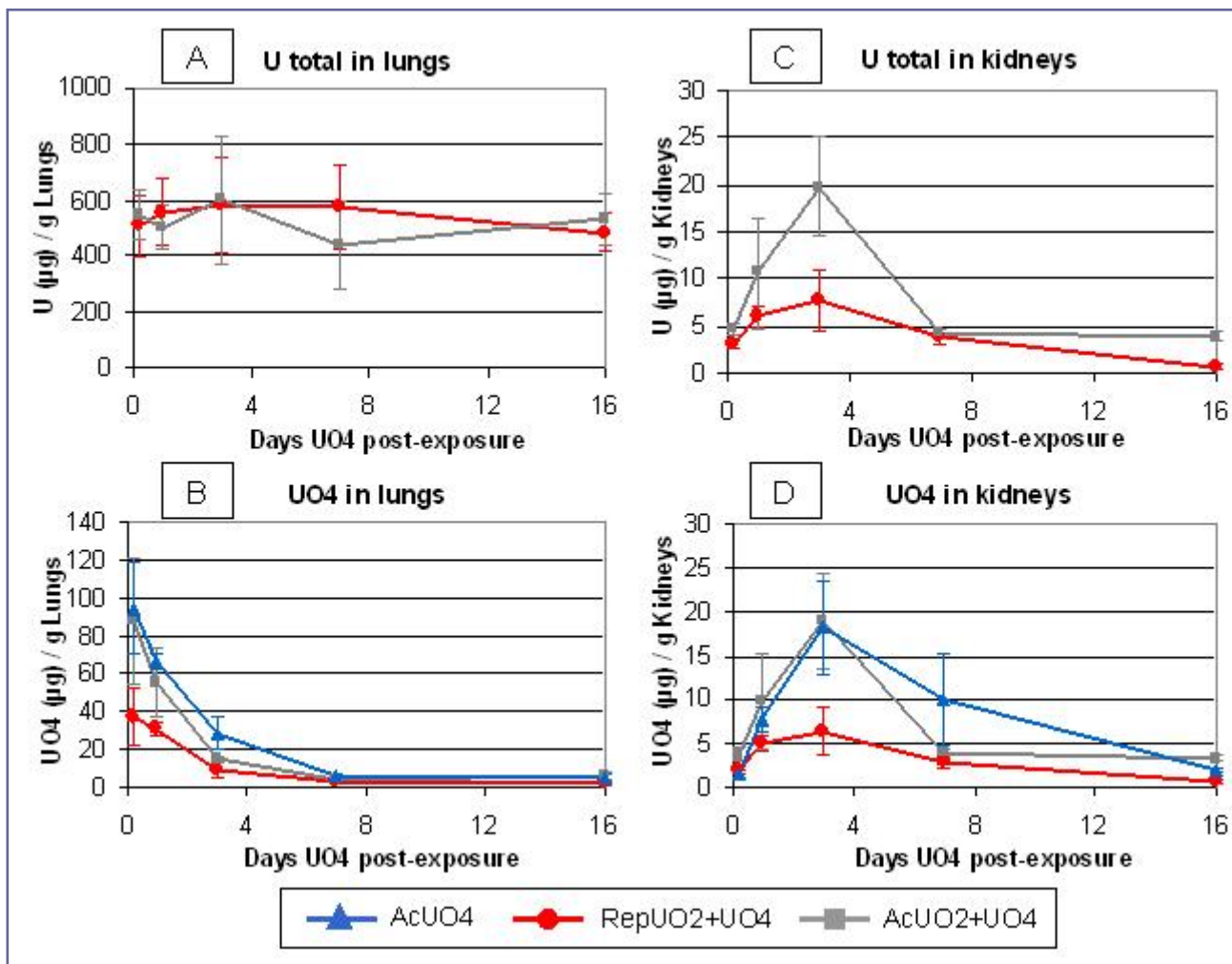


Figure 32 : Concentrations d'uranium dans les poumons et les reins après les doubles expositions

Moyenne  $\pm$  SD, n = 5 pour RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub>, n = 3 pour AcUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> et n = 4 pour AcUO<sub>4</sub>

La quantité totale d'uranium ( $UO_2 + UO_4$ ) dans les poumons (Figure 32 A) est comparable dans les deux groupes doublement contaminés. L'uranium dans les poumons correspond en majorité à de l' $UO_2$  insoluble, qui est épuré très lentement. En revanche, il y a 2,4 fois moins d' $UO_4$  dans le groupe RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> que dans les groupes AcUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> et AcUO<sub>4</sub> (Figure 32 B). Cette différence se répercute sur les quantités d' $UO_4$  dans les autres organes. L' $UO_4$  (Figure 32 D), qui est soluble, est éliminé rapidement des poumons et se retrouve, entre autre, dans les reins. Les reins contiennent en majorité

de l' $UO_4$  ; ceci s'observe en comparant les quantités d'uranium total et d' $UO_4$  (C et D de la Figure 32). De plus nous avons vu, dans l'article 1, qu'après l'exposition répétée RepUO2 n°2 la concentration en  $UO_2$  dans les reins n'était que d'environ  $1 \mu\text{g.g}^{-1}$  Rein (Article 1 - Figure 7). Il y a environ 3 fois moins d' $UO_4$  dans les reins du groupe RepUO2+UO4 que dans les deux autres groupes. Ainsi, pour pouvoir comparer les biocinétiques de l' $UO_4$  dans les 3 groupes, l'expression des résultats en pourcentage de la quantité inhalée a été nécessaire.

Les quantités d' $UO_4$  dosées également dans la rate et le foie ne montrent pas de différence significative entre les groupes (Figure 33).

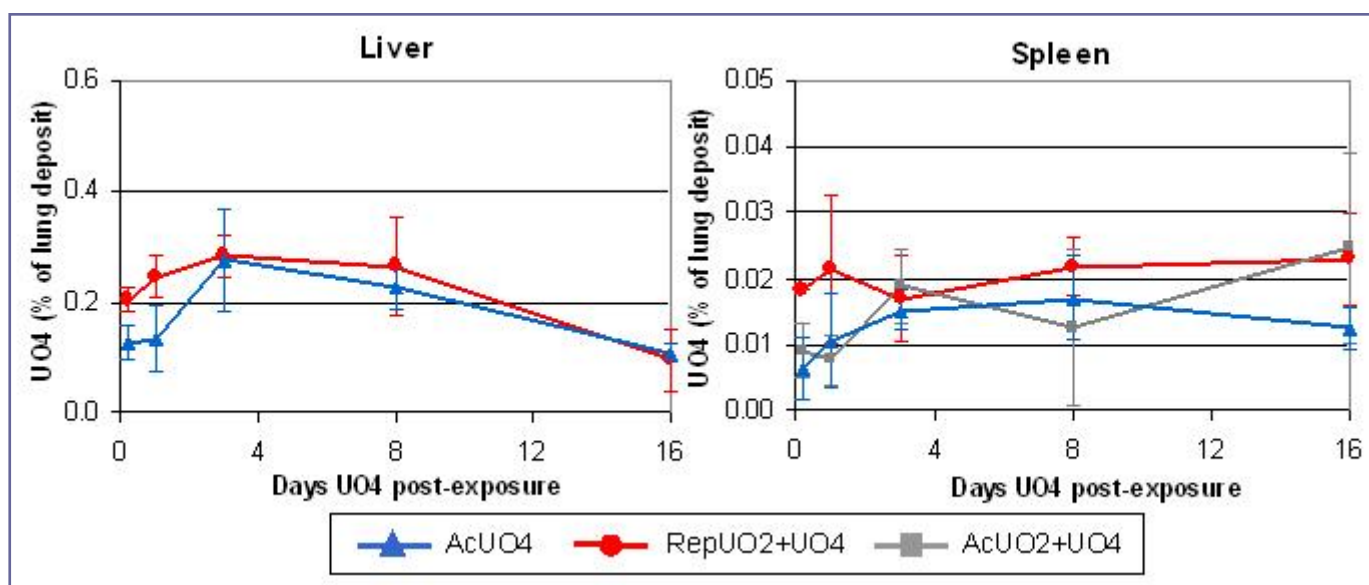


Figure 33 : Biocinétique de l' $UO_4$  dans le foie et la rate en fonction des jours après exposition à l' $UO_4$

% de la quantité d' $UO_4$  inhalée, moyenne  $\pm$  SD. n = 5 pour RepUO2+UO4, n = 3 pour AcUO2+UO4 et n = 4 pour AcUO4

## Chapitre III.4 - Synthèse des résultats / Summary of the results

### III.4.1 - Résultats des études biocinétiques

L'hypothèse qu'une contamination chronique peut être modélisée par la somme d'incorporations aiguës successives et indépendantes a été testée par deux approches différentes. La première, décrite dans l'article 1, a consisté à comparer les biocinétiques expérimentales de l' $\text{UO}_2$  après exposition par inhalation répétée avec les biocinétiques théoriques obtenues à partir du modèle modifié pour le rat. Elle a montré que cette hypothèse était valide, dans nos conditions expérimentales, pour les excréta et la majorité des organes, mais que le modèle surestimait la quantité d'uranium retenue dans le squelette. La deuxième approche a consisté à suivre la biocinétique de l' $\text{UO}_4$  inhalé seul ou après une exposition d' $\text{UO}_2$  (Article 5). Les résultats montrent que la biocinétique de l' $\text{UO}_4$  peut être sensiblement modifiée par l'exposition préalable d' $\text{UO}_2$  dans le TGI, les fèces, les reins et les urines.

L'hypothèse initiale semble donc ne pas être valide pour tous les cas de contamination. Cependant, dans le cadre des expériences d'exposition répétée d' $\text{UO}_2$ , les estimations des quantités incorporées à partir des modèles dosimétriques restent comparables aux incorporations expérimentales (Article 2). Nos expériences montrent que le modèle dosimétrique actuel reste un outil valable dans le cadre de la surveillance des travailleurs.

### III.4.2 - Résultats des études toxicologiques

Les conséquences toxicologiques d'expositions, par inhalation, aiguës d' $\text{UO}_2$  et d' $\text{UO}_4$ , d'une exposition répétée d' $\text{UO}_2$  et de doubles expositions, impliquant l' $\text{UO}_2$  et l' $\text{UO}_4$ , ont d'abord été étudiées sur l'organisme pris dans son ensemble.

Les effets des inhalations d'uranium sur les paramètres généraux de santé sont dépendants de la dose, de la solubilité du composé et du type d'inhalation (aiguë ou répétée). L'inhalation d' $\text{UO}_4$  soluble provoque une néphrotoxicité qui se traduit par une détérioration de l'ensemble des paramètres généraux de santé et une augmentation d'un facteur deux du volume uriné deux jours après l'inhalation. En revanche, les inhalations répétées d' $\text{UO}_2$  ne perturbent pas l'état général des animaux, contrairement

à des inhalations aiguës à dose comparable. Enfin, l'exposition à l' $UO_2$ , de manière aiguë ou répétée, avant l'inhalation d' $UO_4$ , si elle n'aggrave pas l'état général des rats, provoque une augmentation plus précoce de la diurèse.

L'exposition par inhalation répétée à des particules d' $UO_2$  entraîne une accumulation hétérogène d'uranium dans le système nerveux central et des modifications comportementales temporaires chez le rat qui se traduisent par une accroissement de l'activité locomotrice spontanée et une diminution de la mémoire de travail spatial (Article 3).

L'étude des cellules cibles a été réalisée par une analyse de la génotoxicité due aux différentes expositions étudiées.

L'ensemble des résultats présentés dans les articles 4 et 5 montrent qu'aucun effet génotoxique n'est observé dans les cellules épithéliales nasales que ce soit après expositions aiguës ou répétée d' $UO_2$  ou après exposition aiguë d' $UO_4$ . En revanche, après la double contamination Rep $UO_2+UO_4$  et à tous les temps testés, des dommages de l'ADN sont détectés. Leur étude, dans les cellules du lavage broncho-alvéolaire, démontre l'absence d'effet de l' $UO_4$  et de l' $UO_2$  à la dose testée la plus basse ( $40 \mu g \cdot g^{-1}$  Poumon) mais, en revanche, des effets à la dose d' $UO_2$  la plus élevée ( $600 \mu g \cdot g^{-1}$  Poumon). D'autre part, les inhalations répétées entraînent une réponse plus forte et persistante qu'une inhalation aiguë. Ces résultats sont confortés par l'étude des groupes doublement contaminés car un effet génotoxique apparaît seulement dans le groupe Rep $UO_2+UO_4$ . Dans les cellules rénales, de légers dommages de l'ADN sont observables uniquement dans les groupes Rep $UO_2$  n°2 et Rep $UO_2+UO_4$ . De plus, plusieurs types de perturbations de l'ADN, en particulier des cassures double brin, sont constatés.

Les particules d'uranium inhalées sont donc capables d'induire des dommages de l'ADN. Un effet de potentialisation de l'exposition répétée est observé. Des modifications biologiques provoquées spécifiquement par les inhalations répétées d' $UO_2$  pourraient en partie expliquer les effets génotoxiques obtenus.

Pour tester cette dernière hypothèse, la réponse inflammatoire au niveau pulmonaire a été analysée. Les taux des ARNm des cytokines testées et les quantités de peroxydes augmentent dans les poumons des rats exposés suggérant ainsi l'induction d'une réponse inflammatoire et d'un stress oxydatif. Les schémas d'expression des cytokines et de la production de peroxydes sont différents entre des expositions par inhalations aiguës et répétées. L'exposition répétée semble être à l'origine d'un déséquilibre de la réponse inflammatoire et d'une production de peroxydes sur des

périodes de temps plus importantes. L'uranium inhalé semble donc provoquer une réponse inflammatoire qui s'exprime différemment après une exposition par inhalation aiguë ou répétée.

### III.4.1 - Results of the biokinetic studies

The hypothesis that a chronic contamination can be modelled by the sum of acute successive and independent incorporations was tested using two different approaches. The first, described in article 1 consisted of comparing the experimental  $\text{UO}_2$  biokinetics after exposure by repeated inhalation with the theoretical biokinetics obtained from the modified model for the rat. It showed that this hypothesis was valid, in our experimental conditions, for the excreta and most of the organs, but that the model overestimated the quantity of uranium retained in the skeleton. The second approach was to monitor the  $\text{UO}_4$  biokinetics inhaled acutely or after exposure to  $\text{UO}_2$  (Article 5). The results showed that  $\text{UO}_4$  biokinetics can be significantly modified by prior exposure to  $\text{UO}_2$  in the GIT, the faeces, the kidneys and the urine.

The initial hypothesis seems therefore not to be valid for all instances of contamination. Nevertheless, in the framework of the experiments on repeated exposure to  $\text{UO}_2$ , the estimations of the quantities incorporated from the dosimetric models remain comparable to the experimental incorporations (Article 2). Our experiments show that the present dosimetric model remains a valid tool in the framework of monitoring workers.

### III.4.2 - Results of the toxicological studies

The toxicological consequences of acute  $\text{UO}_2$  and  $\text{UO}_4$  exposures, by inhalation, and of a repeated exposure to  $\text{UO}_2$  and double exposures, involving  $\text{UO}_2$  and  $\text{UO}_4$ , were first studied in relation to the organism as a whole.

The effects of uranium inhalations on general health parameters depend on the dose, the solubility of the component and of the type of inhalation (acute or repeated). The inhalation of soluble  $\text{UO}_4$  causes nephrotoxicity which results in a deterioration of all general health parameters and a twofold increase in the volume urinated two days after the inhalation. On the other hand, repeated inhalations of  $\text{UO}_2$  do not disturb the general state of the animals, in contrast to acute inhalations of comparable doses. Finally, exposure to  $\text{UO}_2$ , acute or repeated, before the inhalation of  $\text{UO}_4$ , while it does not worsen the general state of the rats, causes an earlier increase in urine output.

Exposure by repeated inhalation of particles of  $\text{UO}_2$  leads to a heterogeneous accumulation of uranium in the central nervous system and temporary behavioural modifications in rats which take the form of an increase in spontaneous locomotor activity and a decrease in the spatial working memory (Article 3).



The study of the target cells was performed by an analysis of the genotoxicity cause by the different exposures studied.

All the results presented in articles 4 and 5 show that no genotoxic effect has been observed in the epithelial nasal cells, whether after acute or repeated exposures to  $UO_2$  or after acute exposure to  $UO_4$ . On the other hand, after the double Rep $UO_2+UO_4$  contamination and every time tested, DNA damage was detected. Studies, in the cells of the broncho-alveolar lavage, showed no effect of  $UO_4$  and  $UO_2$  at the lowest tested dose ( $40 \mu\text{gU.g}^{-1}\text{Lung}$ ) but, on the other hand, effects at the highest  $UO_2$  dose ( $600 \mu\text{gU.g}^{-1}\text{Lung}$ ). On the other hand, repeated inhalations lead to a stronger and more persistent response than an acute inhalation. These results are supported by the study of the doubly contaminated groups as a genotoxic effect only appears in the group Rep $UO_2+UO_4$ . In the kidney cells, slight DNA damage is observable only in groups Rep $UO_2$  n°2 and Rep $UO_2+UO_4$ . Moreover, several types of DNA disruptions, in particular double strand breaks, were observed.

Inhaled uranium particles are thus capable of inducing DNA damage. A potentiation effect of repeated exposure has been observed. Biological modifications caused specifically by repeated inhalations of  $UO_2$  could partly explain the genotoxic effects obtained.

To test the latter hypothesis, inflammatory response at the level of the lung was analysed. The rates of the messenger RNAs of the cytokines tested and the quantities of peroxides increase in the lungs of rats exposed, thus suggesting the induction of an inflammatory response and oxydative stress. The explanatory diagrams for the cytokines and the production of peroxide differ between exposure by acute or repeated inhalations. Repeated exposure seems to produce an imbalance in the inflammatory response and to a production of peroxide over longer periods of time. Uranium inhaled therefore seems to cause an inflammatory response which is differently manifested after acute or repeated exposure by inhalation.



# Chapitre IV - Discussion et Perspectives



Le chapitre Discussion et Perspectives ouvre une discussion générale sur les résultats. Les différents points abordés dans les articles ne sont pas tous nécessairement repris.

## Chapitre IV.1 - Discussion des résultats de biocinétique

### IV.1.1 - Aspects techniques

Après les expositions par inhalation nose-only, la dispersion des résultats du dosage de l'uranium dans les organes est importante. Cette dispersion peut être attribuée à la fois à une hétérogénéité d'exposition (variation inter-position, cf. Tableau 7) et à une variabilité interindividuelle. L'hétérogénéité d'exposition par inhalation augmente avec la concentration des aérosols, le temps et la fréquence d'exposition.

*Tableau 10 : Comparaison des incorporations après inhalation chez le rat*

Référence	Exposition	Incorporation dans les poumons après exposition
AcUO <sub>2</sub> - 1	Aiguë 30 min, Conc 1 (cf. tableau 6 et 7)	38,5 ± 1,3 (µg.g <sup>-1</sup> ± SEM)
Article 1	RepUO <sub>2</sub> n°1	496 ± 94 (µg.g <sup>-1</sup> ± SEM)
Article 1	RepUO <sub>2</sub> n°2	504 ± 10 (µg.g <sup>-1</sup> ± SEM)
(Leach <i>et al.</i> , 1970)	UO <sub>2</sub> , 5 mg.m <sup>-3</sup> , 6h/j, 5j/sem, 3 sem	De 220 à 630, moy à 460 µg.g <sup>-1</sup>
(Lataillade <i>et al.</i> , 1995)	Aiguë PuO <sub>2</sub>	2920 ± 220 (Bq ± SEM)
(Fechter <i>et al.</i> , 2002)	MnO <sub>2</sub> , 3 mg.m <sup>-3</sup> , 6h/j, 5j/sem, 3 sem	2,5 ± 0,2 (µg.g <sup>-1</sup> ± SEM)
(Pellow <i>et al.</i> , 2003)	Aiguë <sup>233</sup> U <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	149 ± 8 Bq

Les variations que nous retrouvons sont proportionnellement comparables à celles obtenues lors d'autres expositions nose-only (Tableau 10). Certains auteurs ont montré des hétérogénéités similaires pour des aérosols de compositions diverses et des types d'exposition comparables.

Des problèmes lors de l'exposition à l' $UO_4$  ont été rencontrés. Contrairement à l' $UO_2$  de texture très fluide et sèche, l' $UO_4$  est une poudre compacte et hygroscopique qui a tendance à s'agglomérer, ce qui rend délicate la génération des aérosols à partir du SSPD. La reproductibilité de la génération a ainsi été perturbée. L'exposition par inhalation aiguë d' $UO_4$  dans le groupe d'animaux Rep $UO_2+UO_4$  a été plus faible que celle réalisée dans les groupes Ac $UO_2+UO_4$  et Ac $UO_4$ . Cela se traduit par une quantité d' $UO_4$  dans les poumons significativement plus faible 4h après l'exposition d' $UO_4$  dans le groupe Rep $UO_2+UO_4$  ( $p = 0,025$  entre le groupe Rep $UO_2+UO_4$  et les deux autres groupes, cf. Figure 32B). Cependant, un jour après, les quantités d' $UO_4$  dans les poumons des groupes Rep $UO_2+UO_4$  et Ac $UO_2+UO_4$  sont équivalentes ( $p = 0,053$ ). Toutefois malgré cette différence d'exposition, les trois groupes ont reçu une quantité d' $UO_4$  suffisante pour induire une forte néphrotoxicité (cf. Figure 32D).

La comparaison des biocinétiques de l' $UO_4$  dans les trois groupes ne peut être réalisée qu'en calculant les quantités d' $UO_4$  dans les organes en % de la quantité inhalée. En outre, cela permet en outre une comparaison directe avec des résultats de la littérature exprimés généralement de cette façon.

Il ne faut cependant pas écarter la possibilité que cette différence d'exposition d' $UO_4$  puisse avoir une influence sur sa biocinétique. Les résultats de biocinétique des doubles contaminations doivent donc être considérés avec prudence et ne sont, dans tous les cas, que des résultats descriptifs d'une étude pilote.

### IV.1.2 - Test du modèle de la CIPR

Les résultats présentés dans l'article 1 montrent que les expositions par inhalations répétées sont correctement modélisées par la somme d'expositions aiguës. L'hypothèse mathématique du modèle chronique de la CIPR semble donc correcte pour la plupart des organes testés et pour les excréta. Cependant au niveau du squelette, le modèle surestime la rétention de l'uranium. L'utilisation itérative des modèles de la CIPR pourrait aussi ne pas être optimale pour modéliser la biocinétique de l'uranium dans les reins et le squelette après contamination chronique par ingestion (Paquet *et al.*, 2005).

Une hypothèse serait que l'uranium déposé après la première inhalation induit une toxicité osseuse. Des effets de l'uranium sur l'os ont déjà été décrits et ils correspondent à une diminution du taux de formation (Diaz Sylvester *et al.*, 2002, Guglielmotti *et al.*, 1984) et à une augmentation du taux de résorption de l'os (Ubios *et al.*, 1991). Pendant l'exposition répétée ces effets pourraient diminuer la rétention de l'uranium inhalé par la suite. Cette hypothèse est envisageable car les études de Guglielmotti et Ubios, précédemment citées, ont montré que la toxicité osseuse apparaît au plus tard 14 jours après l'injection d'uranium. Les expositions répétées décrites ici s'étalent sur une durée de 3 semaines, délai probablement suffisant pour que l'uranium provoque une toxicité osseuse. En conséquence, la biocinétique de l'uranium au niveau osseux après exposition répétée pourrait ne pas correspondre à la somme des expositions aiguës.

Afin de tester cette hypothèse, une méthode simple consisterait à doser les taux de marqueurs du turnover de l'os. Dans le sérum sanguin, la phosphatase alcaline (AP) et l'ostéocalcine (BGP) seraient dosés en tant que marqueurs de la formation de l'os ; alors que l'hydroxyproline urinaire (OH-Prol) et la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) seraient dosés en tant que marqueurs de la résorption de l'os. Des expériences pourraient également être menées sur des animaux exposés par inhalation répétée d'uranium suivie d'une injection de calcium 45. Par comparaison avec des animaux non exposés par inhalation préalable, le suivi de la fixation du calcium sur l'os permettrait de vérifier si l'uranium induit une perturbation des taux de formation et/ou de résorption de l'os.

De manière générale, les effets biologiques d'une exposition à l'uranium sur l'os ont été peu étudiés. Il a pourtant été montré récemment chez l'Homme que l'uranium ingéré de manière chronique à faible dose (environ 27  $\mu\text{gU.L}^{-1}$ ) pourrait avoir un effet sur le turnover de l'os (Kurttio *et al.*, 2005).

Lorsqu'une exposition d' $\text{UO}_2$  a précédé celle d' $\text{UO}_4$ , les résultats biocinétiques de l'article 5 montrent que la quantité d' $\text{UO}_4$  est plus faible, à la fois dans le TGI et dans les fèces, respectivement à partir de 8 et 16 jours après l'inhalation d' $\text{UO}_4$ .

Cette différence pourrait s'expliquer par une modification du mécanisme de remontée mucociliaire induite par l'inhalation préalable d' $\text{UO}_2$ , qui diminuerait au final l'élimination de l' $\text{UO}_4$ . Deux hypothèses opposées peuvent être alors proposées :

- le système de remontée mucociliaire est défaillant, du fait de l'exposition préalable d' $\text{UO}_2$ , et donc l' $\text{UO}_4$  est moins bien épuré quelque soit le temps ;
- l'exposition à l' $\text{UO}_2$  favorise l'efficacité du système de remontée mucociliaire dès l'arrivée de l' $\text{UO}_4$  permettant ainsi son élimination. Dans ce cas, les quantités d' $\text{UO}_4$  devraient être plus importantes pour des temps courts dans le TGI et les fèces puis moins importantes pour des temps plus longs puisque la majorité de l' $\text{UO}_4$  aurait déjà été épurée.

Les deux phénomènes ont déjà été observés pour d'autres composés. Ferin et al. ont montré que les modifications de la clairance pulmonaire pouvaient dépendre de la dose et du temps de l'exposition (Ferin et Leach, 1973). Ainsi, des inhalations répétées à 1 ppm de  $\text{SO}_2$  pendant 10 jours ne modifient pas, voire augmentent, la clairance de particules de  $\text{TiO}_2$  inhalées ensuite. En revanche si les inhalations de  $\text{SO}_2$  durent 25 jours, la clairance du  $\text{TiO}_2$  est diminuée (Ferin et Leach, 1973). D'autre part, si la quantité de  $\text{SO}_2$  inhalée est augmentée à 20 ppm pendant 11 jours, la clairance de particules de  $\text{TiO}_2$  inhalées par la suite est diminuée (Ferin et Leach, 1973). Il a aussi été démontré qu'une exposition chronique par inhalation de  $\text{NiO}$  insoluble diminuait la clairance de particules traceur  $^{63}\text{NiO}$  (Benson *et al.*, 1995).

Il faudrait donc pouvoir étudier le phénomène de remontée mucociliaire dès les premiers jours après l'inhalation afin de déterminer laquelle de ces deux hypothèses explique nos résultats. Bien qu'aucune modification dans les quantités d' $\text{UO}_4$  ne soit observée les premiers jours dans le TGI et les fèces, nous pouvons supposer que, les quantités importantes d'uranium ingérées, pendant et dans les heures qui suivent l'inhalation, retrouvées rapidement dans le TGI et les fèces (cf. Article 5 - Figures 1 et 2 et Tableau 7 du matériels et méthodes), masquent un éventuel effet sur l'épuration mucociliaire les premiers jours suivant l'inhalation.

Des intubations de traceurs réalisées à la suite de l'exposition répétée et aiguë d' $\text{UO}_2$  pourraient permettre leur suivi et ainsi tester le mécanisme de remontée mucociliaire.



Comme il a été également décrit dans l'article 5, des expositions préalables aiguë ou répétée à un composé insoluble, l' $\text{UO}_2$ , n'ont pas les mêmes conséquences sur la biocinétique, dans des reins et les urines, que celui d'un composé soluble, l' $\text{UO}_4$ , inhalé ultérieurement. Il semblerait qu'une exposition répétée d' $\text{UO}_2$  induise un transfert plus important et plus rapide de la quantité d' $\text{UO}_4$  dans les reins et les urines à des temps courts ainsi qu'une légère augmentation de la quantité d' $\text{UO}_4$  retenue dans les fémurs. L'hypothèse avancée est que le taux de dissolution de l' $\text{UO}_4$  dans le sang est augmenté. Cependant, ces effets ne peuvent pas être exclusivement attribués à l'inhalation de particules d'uranium, ils peuvent aussi résulter de l'ingestion de ces mêmes particules. En revanche, une exposition aiguë d' $\text{UO}_2$  augmente la quantité d' $\text{UO}_4$  dans les reins et uniquement à des temps courts. Dans ce cas, l'élimination de l'uranium par les reins serait modifiée.

Au niveau rénal, une étude plus approfondie serait nécessaire afin d'identifier si, effectivement, les effets, à ce niveau, sont différents après les deux types de doubles expositions. Cette étude pourrait être réalisée sur des groupes de rats doublement contaminés, mais aussi sur des groupes exposés uniquement à l' $\text{UO}_2$  en inhalation répétée, tel que le groupe RepUO2, ou en inhalation aiguë, tel que le groupe AcUO2-3, car l'origine des effets observés pourrait être due au type d'exposition préalable. Cette étude pourrait être basée sur différentes techniques telles que l'histologie et l'immunohistologie sur des coupes de rein, des dosages des peroxydes, des protéines ainsi que l'analyse de l'expression de gènes à partir de tissu rénal.

Les deux approches développées ci-avant ont donc permis de tester l'hypothèse mathématique de la CIPR modélisant une contamination chronique par la somme d'incorporations aiguës successives et indépendantes. La première approche, comparant les biocinétiques expérimentales et théoriques de l' $\text{UO}_2$  après exposition par inhalation répétée, a montré que cette hypothèse était valide pour la majorité des organes exceptée pour le squelette. La deuxième approche, consistant à suivre la biocinétique de l' $\text{UO}_4$  inhalé seul ou après une exposition préalable à l' $\text{UO}_2$ , a montré que la biocinétique de l' $\text{UO}_4$  pouvait être sensiblement modifiée par l'exposition préalable dans différents organes et les excréta. L'ensemble des résultats montre que l'hypothèse de départ semble pouvoir être mise en doute dans certaines conditions.

Les deux approches ne ciblent pas des effets sur les mêmes organes ce qui pourraient s'expliquer par le fait qu'elles sont très différentes. Les conséquences des doubles expositions peuvent résulter d'effets combinés entre l' $\text{UO}_2$  et l' $\text{UO}_4$ . L'inhalation de l' $\text{UO}_4$ , soluble, pourrait révéler des modifications induites par l' $\text{UO}_2$ ,

insoluble car la solubilité d'un composé influence sa biocinétique mais aussi probablement son mode d'action. Nous parlerons de ces différents effets dans le chapitre suivant.

Cependant, dans le cadre des expériences d'exposition répétée d' $\text{UO}_2$ , les estimations des quantités incorporées à partir des modèles dosimétriques restent comparables aux incorporations expérimentales (Article 2). Bien que perfectible, le modèle dosimétrique actuel reste un outil valable dans le cadre de la surveillance des travailleurs.

Il serait donc intéressant de tester le modèle, à la fois pendant et après l'exposition, avec des temps d'exposition plus longs et des doses plus faibles. Ces conditions permettraient d'évaluer si les écarts entre le modèle et l'expérience, que nous avons observés, sont amplifiés ou non ou si des écarts apparaissent sur d'autres organes. Dans le cas de différences significatives, l'élaboration d'un modèle dosimétrique spécifique aux contaminations chroniques serait alors nécessaire.

Les expériences d'exposition par inhalation sont des manipulations lourdes en moyens matériels et humains. Une alternative serait d'étudier la biocinétique de l'uranium dans le cadre d'une exposition par ingestion (*via* des aliments contaminés ou l'eau de boisson). L'exposition par ingestion pourrait servir de modèle général pour tester les modèles dosimétriques, sous le contrôle d'expérience par inhalation avec un nombre d'animaux réduits. En effet, il est supposé qu'une fois que l'uranium a atteint la circulation sanguine, l'étude de sa distribution dans les différents organes ne dépend plus de la porte d'entrée. En revanche, les études d'exposition par inhalation peuvent être réalisées pour étudier spécifiquement les transferts à partir du système respiratoire et éventuellement vers le système nerveux central.

### IV.1.3 - Distribution de l'uranium dans le cerveau

Le système nerveux central ne correspond pas à un compartiment spécifique dans les modèles dosimétriques. Pourtant diverses études, abordées dans le chapitre I, ainsi que les résultats de l'article 3 montrent que l'uranium s'accumule dans le cerveau de manière hétérogène. Dans le cas de l'exposition répétée par inhalation, la distribution est la suivante un jour après l'exposition : bulbe olfactif ( $567 \text{ ng.g}^{-1}$ ) > hippocampe ( $156 \text{ ng.g}^{-1}$ ) > cortex frontal ( $122 \text{ ng.g}^{-1}$ ) > cervelet ( $42 \text{ ng.g}^{-1}$ ). Une hypothèse serait que l'uranium pourrait être transporté dans le cerveau en utilisant plusieurs voies.

Une première voie permettrait le passage de l'uranium au travers de la barrière hémato-encéphalique, après la translocation des particules dans la circulation sanguine suite à la dissolution de l'uranium des poumons et/ou du tractus gastro-intestinal. Le cerveau est protégé par la barrière hémato-encéphalique de tous les composés et des substances exogènes apportés par la circulation sanguine (Copin et Gasche, 2003) et il n'est séparé de la lumière des vaisseaux sanguins que par la membrane cellulaire des cellules endothéliales. Pour franchir la barrière, les composés doivent avoir soit une forte lipo-solubilité ce qui leur permet de traverser toutes les membranes cellulaires, soit une forte affinité pour des systèmes de transport spécialisés. Toutefois, la barrière hémato-encéphalique présente deux caractéristiques : elle est absente dans certaines zones très localisées du cerveau (organes périventriculaires dont les noyaux supra-optique et para-ventriculaire de l'hypothalamus) et possède une perméabilité régionale naturelle (Copin et Gasche, 2003).

Une seconde voie pourrait être spécifique à l'exposition par inhalation.

Une étude après injection de 1 mg d'acétate d'uranyle par kg (Barber *et al.*, 2005), a montré qu'après 8 heures, l'uranium se répartissait selon l'ordre suivant : striatum (ST :  $17,7 \pm 3,0 \text{ ng.g}^{-1}$ ), hippocampe (HI :  $9,8 \pm 1,9 \text{ ng.g}^{-1}$ ), cervelet (CE :  $6,1 \pm 0,9 \text{ ng.g}^{-1}$ ) et cortex (CO :  $4,2 \pm 0,8 \text{ ng.g}^{-1}$ ). Un jour après l'injection, la répartition devenait la suivante : CE ( $16,5 \pm 1,5 \text{ ng.g}^{-1}$ ), HI ( $8,3 \pm 0,8 \text{ ng.g}^{-1}$ ), ST ( $2,6 \pm 0,4 \text{ ng.g}^{-1}$ ), CO ( $1,5 \pm 0,4 \text{ ng.g}^{-1}$ ). Ces distributions diffèrent de celles obtenues après inhalation ce qui tend effectivement à montrer que les voies d'entrée de l'uranium dans le cerveau sont différentes selon le mode d'exposition.

Cependant, sur l'ensemble des études réalisées par des modes d'expositions autre que l'inhalation, il semblerait que l'hippocampe soit une zone privilégiée de concentration de l'uranium (implants d'uranium appauvri (Pellmar *et al.*, 1999a,

Pellmar *et al.*, 1999b); injection intra-péritonéale (Barber *et al.*, 2005); ingestion (Paquet *et al.*, 2005)). Une étude d'ingestion chronique d'uranium a montré que l'uranium a également une distribution cérébrale hétérogène qui évolue au cours de la contamination (hypothalamus, striatum et hippocampe concentrent le plus l'uranium) et que cette distribution est assez similaire à celle des autres métaux neurotoxiques ingérés (Bussy, 2005).

Après l'inhalation de particules, une voie directe, à partir de la muqueuse nasale permettrait le passage vers le cerveau. Les neurones olfactifs sont en contact à la fois avec la muqueuse nasale et le bulbe olfactif en traversant les os du crâne (cf. Chap II.5). Il a été montré que des particules pouvaient emprunter le neurone olfactif pour entrer dans le cerveau (Normandin *et al.*, 2002, Sunderman, 2001, Tjalve et Henriksson, 1999) ; cette voie de transport des particules vers le cerveau a été appelée « la voie olfactive ».

Les métaux exogènes ont une distribution hétérogène lorsqu'ils pénètrent dans le cerveau (Aschner, 2000, Roth et Garrick, 2003). Cependant après une exposition par inhalation, le bulbe olfactif apparaît systématiquement comme la structure cérébrale accumulant le plus de contaminant, même si la distribution dans les autres structures peut varier d'un métal à l'autre (exemples dans le Tableau 11).

*Tableau 11 : Distribution de métaux dans le cerveau après une exposition de type inhalation chez des rats*

Référence	Composé	Exposition	Dosage	Concentration dans le cerveau (à J1)
(Tjalve <i>et al.</i> , 1996)	$^{54}\text{Mn}^{2+}$	Intra-nasal	Rein : 1,5 $\text{ng.g}^{-1}$	BO > CO > HI > CE
	$^{109}\text{Cd}^{2+}$		Rein : 6,4 $\text{ng.g}^{-1}$	BO > HI > CO = CE
(Fechter <i>et al.</i> , 2002)	$\text{MnO}_2$	Inhalation, 6h/j, 5j/sem, 3 sem	Poumon : 2500 $\text{ng.g}^{-1}$	BO > CO
(Persson <i>et al.</i> , 2003a)	$^{65}\text{Zn}^{2+}$	Intra-nasal	Rein : 0,19 $\text{ng.g}^{-1}$	BO > HI > CE
(Persson <i>et al.</i> , 2003b)	$^{57}\text{Co}^{2+}$	Intra-nasal	Rein : 1,4 $\text{ng.g}^{-1}$	BO > CE
(Rao <i>et al.</i> , 2003)	$^{59}\text{Fe}^{2+}$	Inhalation unique	Poumon : 100 $\text{ng.g}^{-1}$	BO > CE

BO : bulbe olfactif, CO : cortex, HI : hippocampe, CE : cervelet

Il apparaît donc qu'une voie de passage des molécules vers le cerveau, probablement la voie olfactive, serait spécifique en cas d'exposition par inhalation.

Après une exposition par inhalation, la voie olfactive pourrait donc être la première voie d'entrée des particules d'uranium vers le cerveau. Suite à la guerre du Golfe, des équipes américaines (JL. Lewis, University of New Mexico) ont recherché d'éventuels effets neurologiques après inhalations d'uranium appauvri (National Institute of Environmental Health Sciences, 2005). L'hypothèse d'un transfert direct des particules d'uranium par le nerf olfactif a été évoquée (Evans, 2004). Ces résultats ne font pas encore l'objet de publication scientifique.

Une dernière voie d'accès directe des particules vers le cerveau, après inhalation, a été récemment proposée via le nerf trijumeau, le nerf maxillaire en particulier (Lewis *et al.*, 2005). Le nerf trijumeau est un nerf sensitif et moteur, il est principalement le nerf de la sensibilité de la face, des dents, des sinus para-nasaux et aussi de la cavité nasale (nerf maxillaire). Le nerf maxillaire se projette dans le noyau trijumeau du tractus spinal. Après exposition de rats par inhalation de  $MnCl_2$  (6h/j, 5j/sem pendant 2 sem à  $2,3 \text{ mg.m}^{-3}$ ), les auteurs mesurent des taux significatifs de manganèse dans le ganglion trijumeau et plus faiblement dans le noyau trijumeau spinal dès 2 heures après l'inhalation (Lewis *et al.*, 2005). Cependant la conclusion d'un passage direct par le nerf trijumeau est un peu hâtive car rien ne prouve un accès direct par cette voie.

Une expérience est en cours au laboratoire afin de tester l'hypothèse d'un transfert de l'uranium vers le cerveau, spécifique à l'inhalation. Des animaux ont été exposés par inhalation aiguë d' $UO_4$ . L'utilisation d'un composé soluble, plutôt que de l' $UO_2$  insoluble, devrait permettre de favoriser un éventuel transfert de l'uranium par la voie olfactive celle-ci étant dépendante de la solubilité du composé inhalé (Dorman *et al.*, 2001). De plus l' $UO_4$  utilisé contient de  $^{236}U$  ce qui facilitera son dosage et permettra de le discriminer de l'uranium naturellement présent dans le cerveau. Après l'inhalation d' $UO_4$ , les animaux ont reçu une injection intra-péritonéale d'une solution d'uranium enrichi marqué avec de  $^{233}U$ . Ceci permettra de quantifier le passage de l'uranium par la voie systémique. Le dosage de  $^{236}U$ ,  $^{233}U$  et le rapport 238/235U dans les diverses structures cérébrales permettra de tester les différentes voies de transfert de l'uranium vers le système nerveux central.



## Chapitre IV.2 - Discussion sur les résultats de Toxicologie

### IV.2.1 - Les paramètres généraux de santé

Si la prise de poids est décrite comme un paramètre sensible pour détecter une toxicité aiguë à l'uranium (Diamond *et al.*, 1989, Houpert *et al.*, 2003), ce paramètre n'est pas modifié lors d'une exposition chronique par inhalation (Leach *et al.*, 1970) ou par ingestion (Paquet *et al.*, 2005). Nos résultats confirment ces données bibliographiques ; l'exposition répétée d' $\text{UO}_2$  par inhalation ne perturbant pas la prise de poids, contrairement à une exposition aiguë avec une incorporation comparable.

Après inhalation aiguë d' $\text{UO}_4$ , une augmentation d'un facteur deux du volume urinaire est observée. Cette augmentation est probablement un signe d'apparition d'une insuffisance rénale, démontrée ensuite par l'augmentation d'urée et de créatinine dans le sang. Cette augmentation du volume urinaire est plus précoce lorsqu'une exposition d' $\text{UO}_2$  a lieu au préalable. Les expositions préalables pourraient provoquer un phénomène de sensibilisation au niveau rénal. Des analyses d'histopathologie et de l'expression de certaines molécules, impliquées dans la réabsorption du sodium, permettraient de tester cette hypothèse. En effet, il a été montré qu'une contamination chronique à faibles quantités d'uranium par ingestion était capable de diminuer l'expression, au niveau rénal, du gène de la pompe Na-K-ATPase (Taulan *et al.*, 2004). Cette pompe permet le transport basolatéral du sodium le long du néphron et des tubes collecteurs. Une diminution du nombre de pompe Na-K-ATPase peut induire une augmentation du volume urinaire via une diminution de la réabsorption du sodium (Kwon *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2003). La pompe Na-K-ATPase pourrait donc être un premier candidat à tester.

## IV.2.2 - Les dommages de l'ADN

Nos résultats montrent que les particules inhalées d'uranium appauvri sont capables *in vivo* d'induire des dommages de l'ADN. Le test des comètes est décrit comme efficace pour tester l'effet génotoxique *in vivo* de composés génotoxiques *in vitro* (Lin *et al.*, 1993, Miller *et al.*, 2003, Miller *et al.*, 2002b, Stearns *et al.*, 2005) et donne une bonne estimation du potentiel carcinogène du composé (Sasaki *et al.*, 2000).

### IV.2.2.1 Protection contre les lésions de l'ADN

Plusieurs types d'expositions, réalisées dans ce travail, n'induisent pas de dommages de l'ADN. Il n'y a pas de dommage après les expositions aiguës d'UO<sub>2</sub> les plus faibles, après l'exposition aiguë d'UO<sub>4</sub> et après la double exposition comprenant une exposition aiguë d'UO<sub>2</sub> suivi d'une exposition aiguë d'UO<sub>4</sub>, et ce aussi bien au niveau des cellules épithéliales nasales, des cellules issues du lavage broncho-alvéolaire et des cellules rénales. Il n'y a pas non plus de dommage dans les cellules épithéliales nasales après l'exposition aiguë d'UO<sub>2</sub> la plus forte et après l'exposition répétée d'UO<sub>2</sub>. De plus, lorsqu'une exposition induit des dommages de l'ADN, ces lésions ne sont pas observées pour tous les temps testés après exposition.

L'absence de dommage de l'ADN, dans un type cellulaire ou à un moment donné, est attribuable soit réellement à l'absence d'agression, soit à une réponse adéquate de la cellule à l'agression, en particulier par l'induction d'une réponse immunitaire contrôlée, de mécanismes anti-oxydants, de détoxification et de réparation (Bals et Hiemstra, 2004, Gochfeld, 1997).

Dans le cas des cellules épithéliales nasales, qui constituent le premier tissu épithélial en contact avec les particules d'uranium inhalées, la réponse obtenue par le test des comètes est assez hétérogène et pourrait masquer de légers effets (Valverde *et al.*, 2000). De plus, l'induction de dommage dans ce type cellulaire semble être transitoire. Pendant des inhalations répétées de plomb, des dommages dans les cellules nasales apparaissent au bout de deux semaines d'exposition puis les effets diminuent et finalement aucun effet n'est constaté au bout de quatre semaines d'exposition (Valverde *et al.*, 2002).

Dans le cas de l'exposition d'UO<sub>4</sub>, aucun effet génotoxique n'est observé dans les cellules rénales, bien que la quantité d'uranium soit à une dose néphrotoxique. Là



encore, soit il y a absence de dommages soit les mécanismes de défense jouent pleinement leur rôle. Mais il faut surtout préciser que le test des comètes détecte des dommages primaires de l'ADN qui ne sont pas systématiquement corrélés à l'effet toxique, et donc à la néphrotoxicité dans notre cas (Mensing *et al.*, 2002).

#### IV.2.2.2 Types cellulaires présentant des lésions de l'ADN

Des dommages de l'ADN sont observés après l'exposition aiguë d'UO<sub>2</sub> la plus forte, après l'exposition répétée d'UO<sub>2</sub> et après la double exposition comprenant une exposition répétée d'UO<sub>2</sub> suivie d'une exposition aiguë d'UO<sub>4</sub>.

Ces dommages sont observés principalement dans des cellules du système respiratoire en particulier les cellules épithéliales nasales et les cellules du lavage broncho-alvéolaire. L'UO<sub>2</sub> insoluble reste dans le poumon. La solubilité du composé joue un rôle important dans sa biocinétique (Eidson, 1994) et donc dans le temps de contact du composé avec le tissu et les cibles cellulaires potentielles.

Des dommages de l'ADN sont aussi observés dans les cellules rénales. Après contamination par inhalation, une fraction de l'uranium est transférée vers le compartiment systémique. Par conséquent des cellules extra-pulmonaires peuvent potentiellement devenir des cibles de la toxicité de l'uranium et présenter des dommages de l'ADN. En effet, l'inhalation d'autres métaux lourds, tels que le cadmium et le plomb induisent également des modifications de l'ADN dans des organes autres que le système respiratoire, tels que le rein, le foie, le cerveau et la moelle osseuse (Valverde *et al.*, 2000, Valverde *et al.*, 2002).

#### IV.2.2.3 Mécanismes d'induction des dommages de l'ADN

L'induction de dommages de l'ADN a été décrite, dans le chapitre sur l'état de l'art, principalement par des mécanismes d'interaction directe de la forme toxique du composé inhalé avec l'ADN, par la formation d'espèces réactives de l'oxygène et par l'induction d'une réponse inflammatoire entraînant elle-même un stress oxydatif. Les effets cancérigènes de différents métaux (cobalt, nickel, cuivre) sont ainsi souvent associés à la capacité du métal à produire un stress oxydant (Kawanishi *et al.*, 2002, Theophanides et Anastassopoulou, 2002).

D'autres mécanismes peuvent aussi provoquer des modifications de l'ADN. La toxicité des métaux peut être associée à leur capacité à interférer avec des fonctions biologiques nécessitant des métaux traces essentiels qui ont des rôles de catalyseurs au

sein du site actif d'enzymes, de messagers et d'effecteurs métaboliques, de transporteurs .... En effet, certains métaux comme le fer, le chrome, le cobalt, le manganèse, le magnésium, le cuivre, le calcium et le zinc, ont un rôle physiologique pour l'organisme, ce sont des éléments traces essentiels (Tableau 12). D'autres métaux comme le plomb, le cadmium, le mercure, le nickel, l'arsenic, l'aluminium et l'uranium n'ont pas de rôle physiologique connu.

Ainsi, le nickel pourrait remplacer le magnésium ( $Mg^{2+}$ ) qui est présent au niveau de la chromatine (Costa, 2002, Costa *et al.*, 2005, Costa *et al.*, 2001, Costa *et al.*, 2003, Oller *et al.*, 1997). L'expression de gènes étant régulée par l'état de condensation de la chromatine, les études montrent que le nickel pourrait inhiber leur expression en liant la protéine histone H1 au niveau de l'hétérochromatine, ce qui augmenterait la condensation de la chromatine et la méthylation de l'ADN.

*Tableau 12 : Exemples de fonctions de certains éléments trace essentiels*

Elément	Fonctions principales
Cuivre	Essentiel à tous les organismes Nécessaire à la formation des cellules rouges du sang (formation de l'hémoglobine et des cytochromes) Cofacteur de nombreuses réactions d'oxydo-réduction Participe à la catalyse du stockage et de l'élimination du fer Contribue aux fonctions du système nerveux central
Fer	Essentiel à tous les organismes Utilisé dans la synthèse de l'hème Rôle dans la composition de plusieurs enzymes (catalase, peroxydases, cytochrome...) et protéines (myoglobine) Nécessaire à la formation et à la fonction des cellules rouges du sang Important pour la fonction du cerveau
Magnésium	Cofacteur de nombreuses réactions enzymatiques Rôle dans la synthèse des protéines et des acides nucléiques Aide à la fonction des nerfs et des muscles Essentiel au développement normal Essentiel au maintien des os et des dents Contribue à la régulation de la température corporelle
Manganèse	Essentiel à tous les organismes Essentiel à la fonction d'enzymes dont des enzymes anti-oxydante Métabolisme des graisses, Développement du cartilage
Zinc	Essentiel à tous les organismes Essentiel à la fonction de protéines et à l'activité de plus de 200 enzymes impliquées dans la digestion, le métabolisme, la reproduction, la régulation de l'expression des gènes, la fonction anti-oxydante, le système immunitaire Essentiel au maintien du rythme de la croissance, au développement des organes reproducteurs et dans la vision

Le nickel, le sélénium, l'arsenic, le cobalt, le cadmium et le plomb sont capables d'interférer avec les systèmes de réparation et de contrôle du cycle cellulaire. Un mécanisme possible mis en évidence est le remplacement du magnésium et/ou du zinc,

des motifs en doigt de Zinc (*Zinc fingers*), des protéines de réparation de l'ADN (Bal *et al.*, 2003, Blessing *et al.*, 2004, Hartwig *et al.*, 2002b, Hartwig et Schwerdtle, 2002, Ho, 2004, Kopera *et al.*, 2004, Lison *et al.*, 2001, Silbergeld, 2003). De telles protéines participent par exemple aux mécanismes de réparation par excision de nucléotide (*NER*), comme les protéines XPA et RPA, aux mécanismes de réparation par excision de base (*BER*), comme les protéines Fpg et Ligase III et aux mécanismes de signalement des dommages de l'ADN, comme les protéines PARP et p53. La perturbation des systèmes de réparation est un mécanisme qui participe à l'apparition de dommages de l'ADN. Une étude récente, qui a analysé les protéines du cerveau humain contenant des métaux comme le zinc, le fer ..., a trouvé l'uranium associé à une vingtaine de protéines (Becker *et al.*, 2005). On peut donc se demander si l'uranium a un rôle physiologique ou s'il est capable d'interférer avec des éléments traces essentiels.

Dans notre étude, les dommages de l'ADN aux niveaux des cellules du lavage broncho-alvéolaire sont mis en évidence pour plusieurs temps après l'exposition. Des systèmes de réparation déficients et/ou une production continue de dommages sans doute induite par un état inflammatoire, peuvent être suspectés. Nous avons testé cette dernière hypothèse et montré que l'uranium inhalé semblait capable de provoquer une réponse inflammatoire et un stress oxydatif au niveau pulmonaire. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats dont, en premier lieu, le dosage protéique des cytokines testées en ARNm au niveau pulmonaire et l'analyse de l'expression de cytokines au niveau des cellules du BAL. D'autres cytokines importantes lors de l'inhalation de particules pourraient être étudiées afin de préciser la nature de la réponse inflammatoire, comme l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6. Le dosage de la 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-oxodG) permettrait de tester, plus directement, si les dommages de l'ADN sont dus à un stress oxydatif. En effet, la 8-oxodG est la plus abondante lésion formée pendant un stress oxydatif (Evans *et al.*, 2004).

De plus nous avons montré que les altérations de l'ADN étaient vraisemblablement de plusieurs natures : des cassures simple et double brin. Le test des comètes réalisé avec une étape de digestion enzymatique préciserait la nature des bases impliquées. L'utilisation de l'endonucléase III permettrait la détection des pyrimidines oxydées et la FPG, formamidopurimidine DNA glycosylase, celle des purines oxydées. L'induction de différents types de lésions de l'ADN permet de supposer que plusieurs mécanismes sont impliqués dans ces dommages.

Il apparaît donc, au regard de nos résultats et de ceux décrits dans la littérature, qu'une partie des dommages de l'ADN provoqués par l'inhalation de particules d'uranium pourrait être attribuable à une toxicité directe, à la production d'un stress oxydatif et à l'induction d'une réponse inflammatoire. D'autres mécanismes, pouvant expliquer cet effet génotoxique, sont encore à étudier, en particulier les interférences possibles avec des mécanismes impliquant d'autres métaux divalents. Ainsi divers mécanismes et divers types de dommages seraient impliqués dans la génotoxicité de l'uranium.

#### IV.2.2.4 Effets d'une exposition répétée vs exposition aiguë

La répétition d'une exposition peut entraîner deux réponses opposées : soit un effet adaptatif, soit un effet aggravant.

L'inhalation répétée de cadmium induit un effet adaptatif (Hart *et al.*, 2001). L'exposition répétée à des doses faibles provoque le développement d'une réponse qui permet aux cellules de devenir plus tolérantes à une exposition ultérieure à des doses plus élevées de cadmium mais aussi à d'autres agressions. La manifestation de cet effet adaptatif est l'augmentation des systèmes de détoxification, en particulier par l'augmentation du taux de métallothionéine (Hart *et al.*, 1996) et a pour but de protéger le poumon. Les dommages de l'ADN induits, chez la souris, par une exposition répétée par inhalation de cadmium ne s'amplifient pas avec la durée de l'exposition (Valverde *et al.*, 2000). Cependant, ce phénomène adaptatif n'empêche pas un effet cancérogène à long terme, et pourrait même y prédisposer (Hart *et al.*, 2001).

Au contraire, des inhalations répétées de plomb sont à l'origine d'altérations de l'ADN dans de nombreux organes alors qu'une exposition unique n'induit des dommages que dans le poumon et le foie (Valverde *et al.*, 2002). L'exposition répétée par instillation de particules de cobalt et de carbure de tungstène (1 mg/100g de poids corporel, une fois par mois pendant 4 mois) provoque une fibrose au niveau pulmonaire contrairement à une instillation unique (à 1 ou 5 mg/100g de poids corporel) (Lasfargues *et al.*, 1995).

En comparant les expositions répétée et aiguë d'UO<sub>2</sub> ainsi que les doubles expositions, un effet aggravant de l'exposition répétée d'uranium, induisant des dommages de l'ADN, est observé pour l'ensemble des types cellulaires testés.

Les différentes conséquences entre une exposition répétée et aiguë pourraient s'expliquer d'une part par une intensité différente dans les réponses induites et/ou d'autre part par le déclenchement de mécanismes spécifiques.

Des modifications particulières de l'expression génique pourraient expliquer ces différences suite à une exposition aiguë ou répétée. Il a été montré, au niveau rénal chez la souris, des modifications du profil d'expression génique qui étaient différentes après une exposition à l'uranium par ingestion chronique à faible dose (non néphrotoxique) ou une exposition aiguë à dose néphrotoxique (Taulan, 2004, Taulan *et al.*, 2004) (Tableau 13).

*Tableau 13 : Modifications du transcriptome murin après exposition à du nitrate d'uranyle par analyse SAGE (thèse Magali Taulan, 2004)*

Mécanismes cellulaires	Exposition aiguë (i.p. 50 µg, analyse 48h après)	Exposition chronique (ingestion à 40 mgU.L <sup>-1</sup> pendant 4 mois)
Mécanismes de détoxification	Glutathione peroxidase 3, peroxiredoxin, metallothionein 2, ferritin light chain, SOD, selenoprotein	SOD, glutathione S-transferase, selenoprotein R
Transduction du signal	MAPK family, ras family, serine threonine kinase family	GHR, NGF-R, adenylate cyclase, FGF-R
Anabolisme/ catabolisme protéique	Cystatin, COP9, ubiquitin C, proteasome, ribosomal protein L9, S8, S26, S29, P1, FBR	COP9, proteasome, ubiquitin B, ribosomal protein S26, P1, FBR
Inflammation	Osteopontin, uromodulin, TNFα-ip, galectin3, TPT1	Uromodulin, TPT1
Apoptose	Bcl2 family, SMT3, ubiquitine-like	
Transports cellulaires	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, calnexin, NaPi	Solute carrier family 34 (NaPi)

Sur-expression ; Sous-expression

Une autre hypothèse serait qu'une administration répétée au composé toxique modifie sa propre transformation. Les métaux, tels que le mercure, le plomb, le chrome ..., subissent des modifications dont les mécanismes sont encore mal connus. Il a été montré que certains métaux peuvent être transformés par des réductions/oxydations, par des alkylations/déalkylations ou des processus de conjugaison (Manzo *et al.*, 1992).

Dans notre étude, les profils d'expression des gènes des cytokines et des peroxydes mesurés dans le poumon sont différents après expositions répétée et aiguë. En particulier, l'expression d'IL-10 n'est pas induite après l'exposition répétée et les taux de peroxydes sont augmentés sur une période plus longue. Une hypothèse serait que la réponse inflammatoire est déséquilibrée et le stress oxydatif apparaît de manière chronique dans le cas d'une exposition répétée. Ces différences, dans la nature de la réponse inflammatoire et dans la durée d'induction d'un stress oxydatif, pourraient expliquer, en partie, la potentialisation des dommages de l'ADN observés après les expositions répétées à l' $UO_2$ , au niveau du système respiratoire. L'étude comparative, entre les expositions répétée et aiguë, des effets induits au niveau pulmonaire est à poursuivre.

#### IV.2.2.5 Toxicités chimique, radiologique et particulaire

La toxicité des particules d'uranium, comme cela a déjà été mentionné, pourrait être la combinaison des toxicités chimique, radiologique et particulaire. Déterminer clairement la part de chacune est impossible car aucun effet, même les différents types de dommages de l'ADN, n'est entièrement spécifique de l'une de ces toxicités.

Afin d'identifier si une toxicité radiologique pourrait participer à la toxicité globale induite suite à l'inhalation de particules d'uranium appauvri, nous avons cherché à savoir si des cassures double brin étaient apparues. En effet, celles-ci sont produites par un nombre limité de composés (des inhibiteurs des topoisomères, la bléomycine, l'étoposide ...) et particulièrement par les radiations ionisantes mais aussi indirectement pendant la réplication de cassures simple brin et probablement pendant la réparation de ponts inter-brins (cross-link) (Hoeijmakers, 2001, Olive, 2002). Le test des comètes en condition neutre nous a permis de mettre en évidence, dans les cellules du lavage broncho-alvéolaire, des cassures double brin. Une vérification pourrait être réalisée par le marquage de l'H2A.X phosphorylé. La protéine histone H2A.X est rapidement phosphorylée en réponse à des cassures double brin afin de former des zones de réparation (Rothkamm et Lobrich, 2003). Le nombre de zones d'interaction entre le complexe de réparation contenant la H2A.X phosphorylé et l'ADN endommagé est corrélé avec le nombre de cassures double brin induites par des radiations ionisantes ou l'iode 125 (Rogakou *et al.*, 1999, Sedelnikova *et al.*, 2002).

Cependant des métaux non radioactifs sont aussi capables de provoquer des cassures double brin, tel que le chromate de plomb (Xie *et al.*, 2005). Dans le cas de

l'uranium, la production de cassures double brin permet de supposer l'existence d'une toxicité radiologique mais ne permet pas de l'affirmer.

Des mutations au niveau de ces cassures ainsi qu'une réparation incorrecte peuvent aboutir à des ruptures et des translocations chromosomiques qui sont fréquemment associées à la formation de tumeurs chez les mammifères (Jackson, 2001, 2002, Khanna et Jackson, 2001, Pastink *et al.*, 2001). Il est donc tout de même particulièrement important de mettre en évidence l'existence ou l'absence de ce type de dommages de l'ADN.

Une autre méthode pour tenter de discriminer la toxicité chimique de la toxicité radiologique est de rechercher les aberrations chromosomiques et de déterminer un effet aneugène (anomalie du nombre de chromosome) ou clastogène (anomalie de la structure des chromosomes) (Kirsch-Volders *et al.*, 2002). En effet, les radiations ont majoritairement un effet clastogène, avec une augmentation des taux de chromosomes dicentriques, de délétions interstitielles, d'anneaux centriques ... (Huber *et al.*, 1996, Moore *et al.*, 1996, Thierens *et al.*, 1999). Ceci peut être réalisé par la technique des micronoyaux associée à un marquage des centromères par la technique FISH.

Enfin, une approche complémentaire aurait été d'utiliser de l'uranium enrichi afin de comparer les réponses induites avec celles de l'uranium appauvri.

La toxicité due à l'aspect particulaire pourrait être appréciée par des expériences d'inhalations avec un composé peu toxique comme l'oxyde de titane,  $TiO_2$ , qui est, de plus, un composé insoluble au même titre que l' $UO_2$ . Il est en effet utilisé comme contrôle négatif dans différentes études *in vitro* et *in vivo* de toxicologie (Imrich *et al.*, 1999, Kyono *et al.*, 1999, Wilson *et al.*, 2000). Des exemples de résultats obtenus après inhalation de particules de  $TiO_2$  chez le rat sont présentés dans le tableau suivant. Les études portant sur des particules de  $TiO_2$  ultrafines ou fibreuses ne sont pas rapportées.

Tableau 14 : Expériences d'inhalation de particules de TiO<sub>2</sub> chez le rat

Référence	Conc. en aérosols	Exposition	Incorporation	Effets pulmonaires
(Driscoll <i>et al.</i> , 1991)	50 mg.m <sup>-3</sup>	6 h/j, 5j	1.8-1.9 mg dans le poumon (≈ au groupe RepUO2 n°2)	Aucune modification des paramètres biochimiques ou cellulaires du BALF, ni de l'activité sécrétoire des macrophages, histopathologie : aucune inflammation
(Bellmann <i>et al.</i> , 1991, Muhle <i>et al.</i> , 1991)	5 mg.m <sup>-3</sup>	6h/j, 5j/sem, 2 ans	3 mg dans le poumon (> 3 au groupe RepUO2 n°2)	Pas de modification du poids, pas de tumeur, pas de fibrose, clairance des particules de polystyrène <sup>85</sup> Sr légèrement ralentie
(Warheit <i>et al.</i> , 1997, Warheit <i>et al.</i> , 1996)	5 mg.m <sup>-3</sup>	6h/j, 5j/sem, 4sem	80 µg.g <sup>-1</sup> Poumon (< 6 au groupe RepUO2 n°2)	Pas de réponse inflammatoire, Pas de prolifération cellulaire, Pas de retard de clairance, Pas de défaut de phagocytose, Pas de lésion (faible histiocytose momentané)
	50 mg.m <sup>-3</sup>	6h/j, 5j/sem, 4sem	1000 µg.g <sup>-1</sup> Poumon (> 2 au groupe RepUO2 n°2)	Légère réponse inflammatoire, Pas de prolifération cellulaire, Pas de retard de clairance, Léger défaut de phagocytose, Lésions: hypertrophie, hyperplasia
	250 mg.m <sup>-3</sup>	6h/j, 5j/sem, 4sem	5000 µg.g <sup>-1</sup> Poumon (> 10 au groupe RepUO2 n°2)	Réponse inflammatoire, Prolifération cellulaire, Retard de clairance, Défaut de phagocytose, Lésions: sévère hypertrophie, hyperplasia
(Bermudez <i>et al.</i> , 2002)	10 mg.m <sup>-3</sup>	6h/j, 5j/sem, 13sem	7000 µg.g <sup>-1</sup> Poumon (> 14 au groupe RepUO2 n°2)	Réponse inflammatoire, Pas de prolifération cellulaire, Pas de toxicité pulmonaire, pas de lésion

Seules des quantités incorporées importantes produisent des effets décrits après inhalation. Chez le rat, les tumeurs pulmonaires provoquées par l'inhalation chronique de TiO<sub>2</sub> ne s'observent que pour de fortes incorporations (250 mg.m<sup>-3</sup>, 6h/j, 5j/sem pendant 2 ans, environ 600 mg/poumon) (Lee *et al.*, 1986, Oberdorster, 2002). En revanche, ces tumeurs apparaissent après une inhalation chronique d'uranium naturel moins importante (19 ou 50 mg.m<sup>-3</sup>, 4.2 h/j, 5 j/sem pendant environ 1 an) (Mitchel *et al.*, 1999). Nous pouvons donc supposer que les effets, au niveau pulmonaire, induits par les particules d'uranium, ne sont pas dus uniquement à la toxicité résultant de l'inhalation de particules mais aussi aux toxicités chimique et radiologique de l'uranium.



Notre hypothèse est que la toxicité des particules d'uranium inhalées est la résultante des toxicités particulaire, chimique et radiologique bien que l'uranium utilisé soit un uranium appauvri. Cependant, la difficulté pour distinguer ces toxicités ne nous permet pas de conclure sur ce sujet, en particulier si l'on suppose que des effets combinés apparaissent.

#### IV.2.2.6 Effets des doubles expositions

Une des questions relative à la toxicité des métaux ou des particules inhalées est de savoir quelles sont les conséquences d'une exposition impliquant plusieurs composés. En effet, des expositions impliquant plusieurs composés sont fréquentes sur les lieux de travail et dans l'environnement (Madden, 2003, O'Brien, 2003). Pourtant ce cas de figure est peu étudié.

Dans le cas d'expositions multiples, l'effet combiné peut être bénéfique ou non pour l'organisme. Ainsi, l'utilisation de métaux, dont le rôle biologique est reconnu, peut parfois contrecarrer les effets d'un autre métal toxique. Par exemple, la co-inhalation de zinc et de cadmium chez le rat permet de bloquer la carcinogenèse au niveau pulmonaire induite par le cadmium. De même, le magnésium et le zinc co-administrés avec du nickel chez des rats peuvent réduire l'incidence des tumeurs locales induites par le nickel (Gochfeld, 1997, Kasprzak *et al.*, 2003, Madden, 2003, Oberdorster *et al.*, 1994a).

Les études sur les effets combinés de métaux toxiques sont encore plus rares (Madden, 2003). La co-exposition à du cadmium, du plomb et du cobalt chez des travailleurs induiraient des effets synergiques observés au niveau des cassures de l'ADN dans les lymphocytes (Hengstler *et al.*, 2003). Inversement, une étude sur les effets clastogènes de la co-exposition d'arsenic, de plomb et de dioxyde de soufre, dans des cultures de lymphocytes montre que l'interaction de ces trois composés est antagoniste (Beckman et Nordenson, 1986). De plus, les métaux peuvent également augmenter les effets d'autres agents, comme les radiations UV, les composés alcalins, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Kasprzak *et al.*, 2003).

Les expériences de doubles contaminations réalisées ici ne sont pas facilement comparables aux études précédentes puisque les composés utilisés sont tous les deux issus du même élément, l'uranium. Cependant ils possèdent des propriétés chimiques différentes, en particulier leur solubilité. De plus, la plupart des études analysent des expositions mixtes, avec les deux composés administrés en même temps ; dans notre

cas les composés uranifères sont administrés de manière consécutive. Le premier oxyde, l'UO<sub>2</sub>, peut potentiellement modifier l'effet du second, l'UO<sub>4</sub>. Mais il peut aussi y avoir une interaction directe car l'UO<sub>2</sub>, insoluble, est encore présent dans l'organisme lors de l'administration de l'UO<sub>4</sub>, particulièrement au niveau des poumons.

Un effet synergique entre l'UO<sub>4</sub> et l'UO<sub>2</sub> est, en effet, observé :

- dans l'induction des dommages de l'ADN dans les cellules épithéliales nasales. Ces dommages sont observés après une double exposition impliquant une inhalation répétée d'UO<sub>2</sub> puis aiguë d'UO<sub>4</sub> et non pas après ces mêmes inhalations prises séparément,
- dans le recrutement de cellules inflammatoires dans le poumon. Le nombre de cellules dans le lavage broncho-alvéolaire est augmenté après une double exposition impliquant une inhalation répétée d'UO<sub>2</sub> puis aiguë d'UO<sub>4</sub> et non pas seulement après l'une de ces deux expositions.

Notons tout de même que l'effet synergique entre l'UO<sub>2</sub> et l'UO<sub>4</sub> intervient de manière moins prononcée que l'effet aggravant de la répétition des inhalations d'UO<sub>2</sub>. En effet, les dommages de l'ADN, dans les cellules épithéliales nasales, du lavage broncho-alvéolaire et rénales ainsi que l'augmentation du nombre de cellules dans le lavage broncho-alvéolaire sont mis en évidence après une double exposition impliquant une inhalation répétée d'UO<sub>2</sub> puis aiguë d'UO<sub>4</sub> et non pas après une double exposition impliquant une inhalation aiguë d'UO<sub>2</sub> puis aiguë d'UO<sub>4</sub>.

La différence de solubilité entre les deux composés serait une hypothèse pour expliquer l'effet synergique observé. En effet, dans l'hypothèse où l'UO<sub>2</sub> et l'UO<sub>4</sub> ne se présenteraient pas sous la même forme dans la cellule et au niveau de son noyau, n'interagiraient pas avec les mêmes molécules, n'indui raient pas les mêmes effets ..., des effets combinés pourraient apparaître lors des doubles expositions.

Alors qu'un composé de nickel soluble induit peu facilement des effets mutagènes, il peut avoir un effet synergique avec d'autres composés ce qui conduit à une augmentation des effets cytotoxiques et mutagènes par l'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN (Hartwig *et al.*, 1994, Oller, 2002). Les aérosols générés lors d'une soudure à l'arc sont composés de plusieurs métaux, conduisant à des fractions solubles et insolubles. Leurs études montrent que plusieurs paramètres de la toxicité pulmonaire tels que la production de radicaux libres, de cytokines de l'inflammation, le recrutement de cellules inflammatoires ..., sont dépendants de la solubilité et que l'effet global est produit par un effet additif des différentes fractions (Taylor *et al.*, 2003).

Pendant longtemps, il a été supposé que la forme ionique des métaux était celle qui était active biologiquement et ainsi que leur toxicité pouvait être appréhendée par l'étude des composés solubles (Madden, 2003). Cette supposition était réductrice, principalement dans le cadre de la toxicité de particules au niveau pulmonaire. La solubilité du composé pourrait donc jouer un rôle dans les mécanismes de transport du composé dans la cellule ce qui, finalement, influence sa transformation et son action dans celle-ci.

Des études *in vitro* ont montré que des particules de nickel insoluble sont plus facilement phagocytées que des particules solubles. Cela permettrait au nickel insoluble d'atteindre en plus grande proportion le noyau de la cellule et d'induire un effet génotoxique et l'inhibition de l'expression de gènes (Figure 34) (Abbracchio *et al.*, 1982, Cangul *et al.*, 2002, Costa *et al.*, 2005, Costa *et al.*, 1994, Dunnick *et al.*, 1995, Lee *et al.*, 1993). En revanche, des particules solubles de nickel pénètrent plus difficilement dans la cellule : le toxique est, au final, principalement localisé dans le cytoplasme (Costa *et al.*, 2005). Des concentrations plus importantes d'un composé soluble sont nécessaires pour obtenir *in vitro* le même type d'effet qu'avec un composé insoluble (Oller, 2002). Les études *in vitro* et sur modèle animal montrent donc que les particules de nickel insolubles sont plus carcinogènes que des particules solubles (Cangul *et al.*, 2002, Costa *et al.*, 2005, National Toxicology Program, 1996a, b).

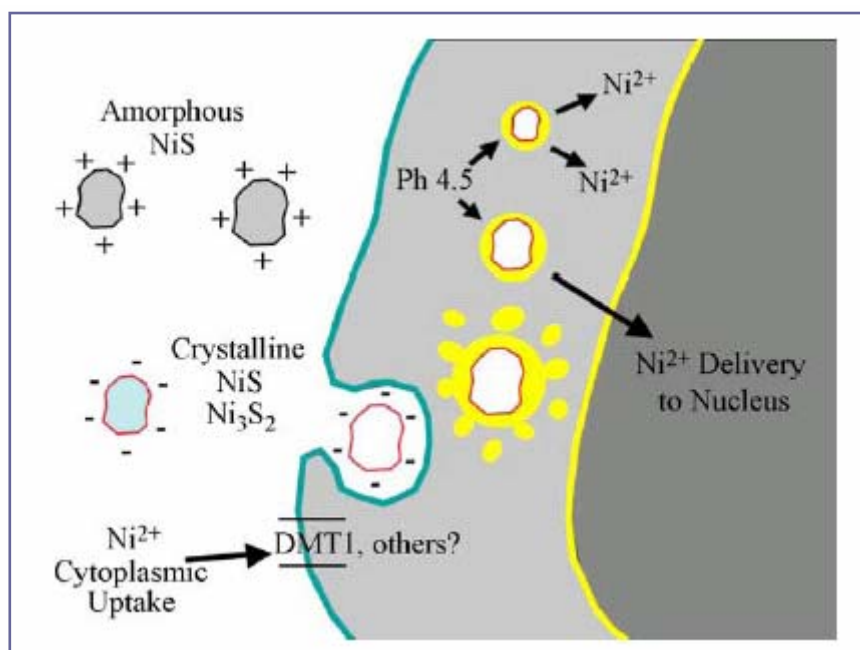


Figure 34 : Modèle d'entrée du nickel dans les cellules (Costa, 2005)

Les particules insolubles sont phagocytées puis l'acidification des vacuoles accélère la dissolution des ions Ni<sup>2+</sup> des particules. En revanche les composés solubles pénètrent peu dans la cellule ainsi que les particules amorphes ayant une charge de surface positive.

Des études sur les particules d'uranium font apparaître que les macrophages phagocytent puis transforment les particules d'uranium, différemment selon leur solubilité. Il a été démontré que les particules solubles ( $\text{UO}_4$ , nitrate d'uranyle) étaient transformées dans les lysosomes par fragmentation ou par dissolution (Ansoborlo *et al.*, 1998, Henge-Napoli *et al.*, 1997, Muller *et al.*, 1989). Elles sont rapidement désagrégées en particules ultrafines puis la composition chimique est modifiée avec l'apparition de précipités insolubles sous forme d'aiguilles de phosphate d'uranyle insolubles (Berry *et al.*, 1997, Henge-Napoli *et al.*, 1998). Après phagocytose, les particules insolubles ( $\text{UO}_2$ ,  $\text{U}_3\text{O}_8$ ), peuvent être modifiées de la même manière que les particules solubles mais également transformées en une forme amorphe et relarguées (Berry *et al.*, 1997). Cependant la phagocytose préférentielle d'un des types de particules ainsi que les événements consécutifs à leur phagocytose ne sont pas connus.

Au niveau pulmonaire, les effets immuno-toxicologiques dépendent également de la solubilité du composé inhalé. Nous avons vu, en introduction (cf. Figure 12), que les particules induisent des dommages de l'ADN par la formation d'espèces radicalaires de l'oxygène par différents mécanismes dépendant de la solubilité des particules (Knaapen *et al.*, 2002). De plus, des inhalations de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  soluble provoquent une augmentation du nombre de cellules dans le lavage broncho-alvéolaire, la production d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  de manière plus importante que des inhalations de  $\text{BaCrO}_4$  insoluble. En revanche, la production de NO et de ROS est plus importante après l'exposition au composé de chrome insoluble (Cohen *et al.*, 1998).

Une fois les particules solubilisées, il existe aussi plusieurs mécanismes de transport des formes ioniques des métaux dans les cellules (Ballatori, 2002). Le transport peut se réaliser *via* le processus de recyclage membranaire. Par exemple, une endocytose *via* les récepteurs de la transferrine permet l'internalisation de la transferrine diferrique. De plus, des canaux spécifiques de métaux, en particulier du zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), pourraient aussi permettre le transport de métaux toxiques dans la cellule (Figure 35) (McMahon et Cousins, 1998). Par exemple, le transporteur DCT1 (aussi appelé NRAMP2 ou DMT1) permet le passage de différents cations métalliques divalents comme le zinc, le fer, le manganèse mais aussi des métaux toxiques comme le cadmium et le plomb (Ballatori, 2002, Himeno *et al.*, 2002).

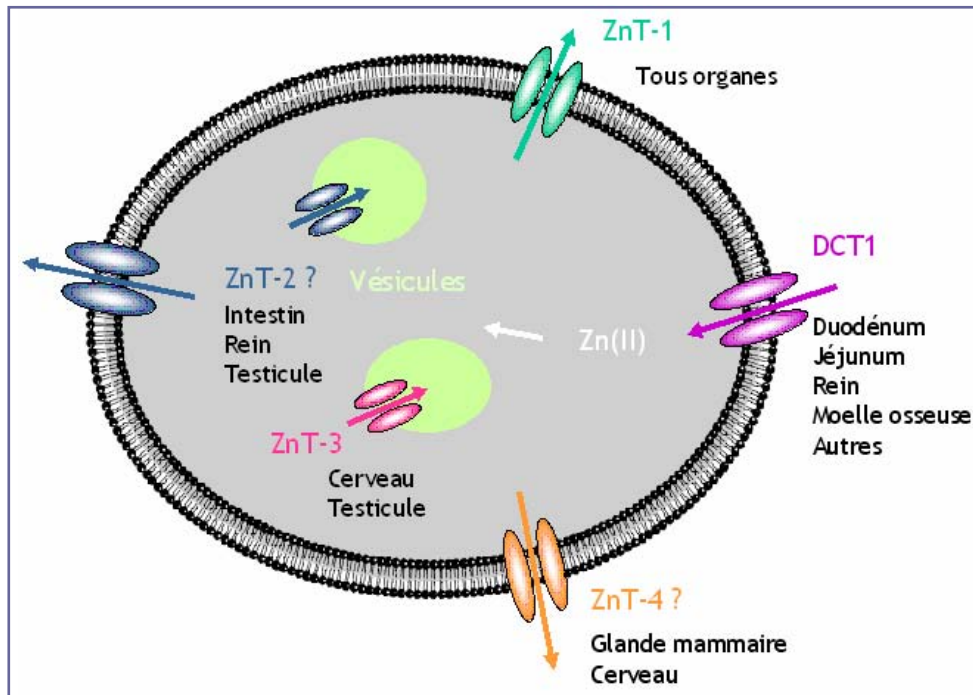


Figure 35 : Spécificité tissulaire et localisation cellulaire des transporteurs du Zinc chez les mammifères (d'après McMahon, 1998)

L'uranium ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) serait capable de se fixer sur les groupements phosphates des lipides et des protéines constituant la membrane cellulaire (Pasquale *et al.*, 1986, Ting-Beall, 1980). Des études *in vitro* ont montré que l'uranium pénètre dans les cellules LLC-PK1 (lignée de cellules rénales) par endocytose clathrine-dépendante et, plus faiblement, par le transporteur NaPi IIa (Muller, 2002). Le premier processus serait à l'origine de l'accumulation de l'uranium au sein des lysosomes sous forme de cristaux insolubles de phosphate d'uranyle. Le second processus serait responsable de la translocation d'une fraction soluble de l'uranium dans le compartiment cytoplasmique. Il semble donc que l'uranium utilise plusieurs voies d'entrée dans les cellules.

Les deux composés uranifères utilisés pour les doubles expositions, présentent des propriétés différentes et induisent, dans certaines conditions, des effets synergiques. Cette synergie pourrait être expliquée en partie par la différence de solubilité entre les deux composés, solubilité qui influencerait le mode d'entrée du toxique dans une cellule, sa biocinétique et finalement sa toxicité.



Conclusion générale -  
General conclusion





L'objet de cette thèse était l'étude des conséquences biocinétiques et toxicologiques d'une exposition répétée d'aérosols d'oxydes d'uranium par inhalation chez le rat.

Dans une première thématique, le modèle chronique de la CIPR a été testé afin d'évaluer expérimentalement le bien-fondé de l'utilisation itérative d'incorporations indépendantes pour rendre compte d'une exposition répétée. La comparaison des biocinétiques expérimentales et théoriques d'une exposition répétée d' $\text{UO}_2$  a montré qu'une contamination chronique pouvait être modélisée par la somme des incorporations aiguës successives et indépendantes, à l'exception du cas de la rétention osseuse. La biocinétique de l' $\text{UO}_4$  dans différents organes semble pouvoir être modifiée par des expositions préalables d' $\text{UO}_2$ , ceci ne validant pas l'hypothèse mathématique de la CIPR, qui suppose qu'une exposition n'a pas d'effet sur la biocinétique des expositions ultérieures. Malgré cela, le modèle dosimétrique actuel, bien que perfectible, reste un outil valable, dans le cadre de la surveillance des travailleurs, pour estimer les quantités incorporées après contamination par inhalation répétée.

Il apparaît cependant nécessaire de tester les modèles décrits par la CIPR avec des temps d'exposition plus longs et des doses administrées plus faibles. En effet, si les écarts entre le modèle et l'expérience deviennent trop importants, ils ne pourront plus être négligés dans le cadre de la surveillance des travailleurs. Dans ce cas, l'élaboration d'un modèle dosimétrique spécifique aux contaminations chroniques serait nécessaire. Des expériences d'exposition par ingestion, plus simples à mettre en œuvre, pourraient servir de modèle général pour tester ces modèles.

Des expositions par inhalation pourraient être réalisées afin d'étudier spécifiquement les transferts à partir du système respiratoire et particulièrement vers le système nerveux central. En effet, les particules d'uranium semblent pouvoir être transportées dans le cerveau par plusieurs voies, l'une traversant la barrière hémato-encéphalique après le passage de l'uranium dans la circulation sanguine, les autres étant spécifiques à l'exposition par inhalation, comme la voie olfactive.

La seconde thématique a abordé les conséquences toxicologiques d'expositions aiguës, d'une exposition répétée et de doubles expositions, impliquant différents composés uranifères appauvris.

Dans un premier temps, des études ont été consacrées à l'organisme pris dans son ensemble. L'analyse des paramètres généraux de santé, suite aux différentes expositions par inhalation d'uranium a montré qu'ils étaient dépendants de la dose, de

la solubilité du composé et du type d'inhalation (aiguë ou répétée) et qu'ils n'étaient pas aggravés lors d'une double exposition impliquant de l' $UO_2$  puis de l' $UO_4$ . De plus, l'analyse des fonctions cognitives a mis en évidence que l'inhalation répétée d' $UO_2$  entraîne des modifications comportementales qui se traduisent par une augmentation de l'activité de locomotion spontanée un jour après contamination et une diminution de la mémoire de travail spatial, six jours après contamination chez les rats exposés comparés aux témoins. Des perturbations de la locomotion ont déjà été observées pour d'autres métaux après inhalation, et pour d'autres voies de contamination, en particulier celle de l'ingestion, avec de l'uranium appauvri. Des perturbations de la mémoire de travail spatial pourraient être corrélées à la présence d'uranium dans l'hippocampe et ont été décrites après exposition par ingestion d'uranium enrichi.

Dans un deuxième temps, la recherche s'est focalisée sur les cellules cibles, principalement les cellules épithéliales nasales, les cellules obtenues après lavage broncho-alvéolaire et les cellules rénales, avec l'analyse de la génotoxicité provoquée par les différentes expositions étudiées.

Après inhalation de particules d'uranium, les rats exposés présentent des dommages de l'ADN. Ces lésions touchent plusieurs types cellulaires et peuvent être induites de façon prolongée dans le temps. L'apparition de dommages de l'ADN semble pouvoir être corrélée avec le déclenchement d'une réponse inflammatoire et d'un stress oxydatif. Il apparaît donc probable, d'après nos résultats et la littérature, qu'une partie des dommages de l'ADN induits suite à l'inhalation de particules d'uranium soit attribuable à une toxicité directe sur l'ADN, à la production d'un stress oxydatif et à l'induction d'une réponse inflammatoire. De plus, dans le cas de l'uranium, l'étalement de la dose semble provoquer un effet aggravant. Par conséquent, les effets génotoxiques consécutifs à une inhalation ne peuvent pas être corrélés uniquement à la quantité d'uranium dosée mais sont également fonction du type d'exposition aiguë ou répétée.

Bien que notre étude n'en apporte pas la preuve tangible, la toxicité des particules d'uranium appauvri inhalées pourrait être la résultante des toxicités particulière, chimique et radiologique, et ce malgré la faible radioactivité de l'uranium appauvri.

Enfin, un effet synergique entre l' $UO_4$  et l' $UO_2$  apparaîtrait lors des doubles expositions. Cette synergie pourrait jouer un rôle dans l'induction des dommages de l'ADN des cellules épithéliales nasales et également dans la réponse inflammatoire.

Cette synergie pourrait être expliquée en partie par la différence de solubilité entre les deux composés.

Afin de compléter nos résultats sur l'induction d'un stress oxydatif et d'une réponse inflammatoire, l'étude des mécanismes de transport de l'uranium dans une cellule et ses différents compartiments ainsi que l'étude des interactions entre l'uranium et les autres métaux divalents semblent particulièrement intéressantes pour poursuivre l'étude de la toxicité de l'uranium.

Des expositions par inhalations aiguës et répétées à des particules d'uranium induisent des effets différents que ce soit en terme biocinétique ou toxicologique. Il apparaît donc important de prendre en compte le type d'exposition à l'uranium.

The subject of this thesis was the study of the biokinetic and toxicological consequences of repeated exposure to uranium oxide aerosols by inhalation by rats.

In the first theme, the ICRP chronic model was tested in order to evaluate experimentally the sound nature of the iterative use of independent incorporations to report on repeated exposure. The comparison of the experimental and theoretical biokinetics of repeated exposure to  $\text{UO}_2$  showed that a chronic contamination could be modelled by the sum of acute, successive and independent incorporations, except for the case of bone retention. The biokinetics of  $\text{UO}_4$  in different organs seems to be modifiable by prior exposure to  $\text{UO}_2$ , this is at variance with the mathematical hypothesis of the ICRP, which supposes that an exposure has no effect on the biokinetics of later exposures. In spite of this, the present dosimetric model - albeit perfectible - remains a valid tool, in the framework of monitoring workers, to estimate the quantities incorporated after contamination by repeated inhalation.

However, it would appear necessary to test the models described by the ICRP with longer exposure times and lower doses administered. Indeed, if the differences between the model and the experiment become too large, it will no longer be possible to ignore them in the framework of monitoring workers. In this case, the formulation of a dosimetric model specific for chronic contaminations would be necessary. Experiments on exposure by ingestion, simpler to implement, could be used as a general model to test these models.

Exposures by inhalation could be performed specifically in order to study the transfers from the respiratory system and in particular towards the central nervous system. Indeed, uranium particles seem to be transportable into the brain by various routes, one crossing the blood brain barrier after the uranium has passed into the blood circulation, the others are specific to exposure by inhalation, like the olfactory pathway.

The second theme tackles the toxicological consequences of acute exposures, of a repeated exposure and of double exposures, involving different depleted uraniferous components.

First of all, studies were devoted to the organism as a whole. Analysis of the general health parameters, following the different exposures by uranium inhalation showed that they depended on the dose, the solubility of the component and the type of inhalation (acute or repeated) and that they were not worsened during double exposure involving  $\text{UO}_2$  then  $\text{UO}_4$ . Moreover, the analysis of cognitive functions showed

that repeated inhalation of  $\text{UO}_2$  leads to behavioural modifications evidenced by an increase in spontaneous locomotor activity one day after contamination and a decrease of the spatial working memory, six days after contamination, in rats exposed compared to control animals. Disruptions in locomotion have already been observed for other metals after inhalation, and for other ways of contamination, in particular ingestion, with depleted uranium. Disruptions in the spatial working memory could be correlated with the presence of uranium in the hippocampus and have been described after exposure by ingestion of enriched uranium.

The research then focussed on target cells, mainly epithelial nasal cells, the cells obtained after broncho-alveolar lavage and kidney cells, with analysis of the genotoxicity caused by the different exposures studied.

After inhalation of uranium particles, the rats exposed present DNA damage. These lesions affect several cell types and can be induced over long periods. The appearance of DNA damage seems to be correlated with the onset of an inflammatory response and oxydative stress. It therefore seems probable, according to our results and the literature, that some of the DNA damage induced following the inhalation of uranium particles can be attributed to direct genotoxicity on the DNA, to the production of oxydative stress and to the induction of an inflammatory response. Moreover, in the case of uranium, spreading out the dose seems to cause an aggravating effect. Consequently, the genotoxic effects resulting from inhalation cannot be correlated only to the quantity of the uranium dose but also vary according to the type of exposure, acute or repeated.

Although our study does not provide the tangible proof, depleted uranium particle toxicity could be the result of particle, chemical and radiological toxicities, and this despite the slight radioactivity of depleted uranium.

Finally, a synergic effect between  $\text{UO}_4$  and  $\text{UO}_2$  seems to be evidenced in the double exposures. This synergy could play a role in inducing DNA damage to epithelial nasal cells and also in the inflammatory response. It may be partly explained by the difference in solubility between the two components.

To complete our results on the induction of oxydative stress and an inflammatory response, a study of the uranium transfer mechanisms in a cell and its various compartments, as well as a study of the interactions between uranium and the other divalent metals would seem particularly indicated to continue the study of uranium toxicity.

Exposures to uranium particles by acute or repeated inhalations induce different effects both in biokinetic and toxicological terms. Therefore it appears to be important to take account of the type of uranium exposure.

# REFERENCES





- Abbracchio M. P., Simmons-Hansen J. et Costa M. (1982). Cytoplasmic dissolution of phagocytized crystalline nickel sulfide particles: a prerequisite for nuclear uptake of nickel. *J Toxicol Environ Health*. **9**, 663-76.
- Aigueperse J., Bouvier C., Chanbrette V., Chazel V., Cossonnet C., Claraz M., Franck D., Gourmelon P., Houpert P., Jourdain J. R., Lorthioir S., Paquet F., Rannou A., Telle-Lamberton M. et Tirmarche M. (2001). Etat des connaissances sur les risques potentiels associés à l'uranium appauvri utilisé dans les armes. Rapport IPSN DPHD/2001-01.
- Albrecht C., Borm P. J. et Unfried K. (2004). Signal transduction pathways relevant for neoplastic effects of fibrous and non-fibrous particles. *Mutat Res*. **553**, 23-35.
- Anderson D., Yu T. W. et McGregor D. B. (1998). Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*. **13**, 539-555.
- Ansoborlo E., Chazel V., Houpert P., Henge-Napoli M. H., Paquet F., Hodgson A. et Stradling N. (1998). Assessment of physico-chemical and biokinetic properties of uranium peroxide hydrate UO<sub>4</sub>. *Health Phys*. **75**, 389-397.
- Archer V. E., Renzetti A. D., Doggett R. S., Jarvis J. Q. et Colby T. V. (1998). Chronic diffuse interstitial fibrosis of the lung in uranium miners. *J Occup Environ Med*. **40**, 460-74.
- Arfsten D. P., Still K. R. et Ritchie G. D. (2001). A review of the effects of uranium and depleted uranium exposure on reproduction and fetal development. *Toxicol Ind Health*. **17**, 180-91.
- Aschner M. (2000). Manganese: brain transport and emerging research needs. *Environ Health Perspect*. **108 Suppl 3**, 429-32.
- ATSDR (1999). Toxicological profile for uranium. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of health and human services.
- Averbeck D. (2000). [Mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis in higher eukaryotes]. *Cancer Radiother*. **4**, 335-54.
- Bailey M. R., Ansoborlo E., Guilmette R. A. et Paquet F. (2003). Practical application of the ICRP Human Respiratory Tract Model. *Radiat Prot Dosimetry*. **105**, 71-6.
- Bal W., Schwerdtle T. et Hartwig A. (2003). Mechanism of nickel assault on the zinc finger of DNA repair protein XPA. *Chem Res Toxicol*. **16**, 242-8.
- Ballatori N. (2002). Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ Health Perspect*. **110 Suppl 5**, 689-94.
- Ballou J. E., Gies R. A., Case A. C., Haggard D. L., Buschbom R. L. et Ryan J. L. (1986). Deposition and early disposition of inhaled <sup>233</sup>UO<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and <sup>232</sup>UO<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> in the rat. *Health Phys*. **51**, 755-71.
- Bals R. et Hiemstra P. S. (2004). Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*. **23**, 327-33.
- Barber D. S., Ehrich M. F. et Jortner B. S. (2005). The effect of stress on the temporal and regional distribution of uranium in rat brain after acute uranyl acetate exposure. *J Toxicol Environ Health A*. **68**, 99-111.
- Batchelor A. L., Buckley P., Gore D. J., Jenner T. J., Major I. R. et Bailey M. R. (1980). The carcinogenic effect of localized fission fragment irradiation of rat lung. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. **37**, 249-66.
- Batchelor A. L., Jenner T. J. et Papworth D. G. (1982). Influence of macrophages on microdistribution of inhaled UO<sub>2</sub> aerosol in rat lung. *Phys Med Biol*. **27**, 949-57.
- Bauer E., Recknagel R. D., Fiedler U., Wollweber L., Bock C. et Greulich K. O. (1998). The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (chi<sup>2</sup>) not a gaussian distribution. *Mutat Res*. **398**, 101-10.
- Baysson H., Tirmarche M., Tymen G., Gouva S., Caillaud D., Artus J. C., Vergnenegre A., Ducloy F. et Laurier D. (2004). Indoor radon and lung cancer in France. *Epidemiology*. **15**, 709-16.

- Becker J. S., Zoriy M., Pickhardt C., Damoc E., Juhacz G., Palkovits M. et Przybylski M. (2005). Determination of phosphorus-, copper-, and zinc-containing human brain proteins by LA-ICPMS and MALDI-FTICR-MS. *Anal Chem.* **77**, 5851-60.
- Beckman L. et Nordenson I. (1986). Interaction between some common genotoxic agents. *Hum Hered.* **36**, 397-401.
- Bellés M., Albina M. L., Linares V., Gómez M., Sánchez D. J. et Domingo J. L. (2005). Combined action of uranium and stress in the rat: I. Behavioral effects. *Toxicology Letters.* in press.
- Bellmann B., Muhle H., Creutzenberg O., Dasenbrock C., Kilpper R., MacKenzie J. C., Morrow P. et Mermelstein R. (1991). Lung clearance and retention of toner, utilizing a tracer technique, during chronic inhalation exposure in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* **17**, 300-313.
- Benson J. M., Chang I. Y., Cheng Y. S., Hahn F. F., Kennedy C. H., Barr E. B., Maples K. R. et Snipes M. B. (1995). Particle clearance and histopathology in lungs of F344/N rats and B6C3F1 mice inhaling nickel oxide or nickel sulfate. *Fundam. Appl. Toxicol.* **28**, 232-244.
- Benson J. M., Chang I. Y., Cheng Y. S., Hahn F. F. et Snipes M. B. (1992). Effects of repeated inhalation exposure of F344 rats and B6C3F1 mice to nickel oxide and nickel sulfate hexahydrate on lung clearance. *LRRR report.*
- Bermudez E., Mangum J. B., Asgharian B., Wong B. A., Reverdy E. E., Janszen D. B., Hext P. M., Warheit D. B. et Everitt J. I. (2002). Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci.* **70**, 86-97.
- Berry J. P., Zhang L., Galle P., Ansoborlo E., Henge-Napoli M. H. et Donnadiou-Claraz M. (1997). Role of alveolar macrophage lysosomes in metal detoxification. *Microsc. Res. Tech.* **36**, 313-323.
- Birchall A. et James A. C. (1987). A general algorithm for solving compartmental models with constant coefficients and its implementation on a microcomputer. Dans National Radiological Protection Board, Vol. NRPB-R216. Chilton.
- Blessing H., Kraus S., Heindl P., Bal W. et Hartwig A. (2004). Interaction of selenium compounds with zinc finger proteins involved in DNA repair. *Eur J Biochem.* **271**, 3190-9.
- Bosque M. A., Domingo J. L., Llobet J. M. et Corbella J. (1993). Embryotoxicity and teratogenicity of uranium in mice following subcutaneous administration of uranyl acetate. *Biol Trace Elem Res.* **36**, 109-18.
- Bowden D. H. (1987). Macrophages, dust, and pulmonary diseases. *Exp Lung Res.* **12**, 89-107.
- Brandom W. F., Saccomanno G., Archer V. E., Archer P. G. et Coors M. E. (1972). Chromosome aberrations in uranium miners occupationally exposed to 222 radon. *Radiat Res.* **52**, 204-215.
- Brendler-Schwaab S., Hartmann A., Pfuhrer S. et Speit G. (2005). The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis.* **20**, 245-54.
- Briner W. et Murray J. (2005). Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats. *Neurotoxicol Teratol.* **27**, 135-44.
- Bussy C. (2005). Effets Chimique et Radiologique d'une Ingestion Chronique d'Uranium sur le Cerveau du Rat. Effets sur la Neurotransmission Dopaminergique, Sérotoninergique et Cholinergique. Au LRTOX/IRSN, Pierrelatte. Thèse de l'Université Paris 7.
- Cangul H., Broday L., Salnikow K., Sutherland J., Peng W., Zhang Q., Poltaratsky V., Yee H., Zoroddu M. A. et Costa M. (2002). Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. *Toxicol Lett.* **127**, 69-75.
- Cardis E., Vrijheid M., Blettner M., Gilbert E., Hakama M., Hill C., Howe G., Kaldor J., Muirhead C. R., Schubauer-Berigan M., Yoshimura T., Bermann F., Cowper G.,

- Fix J., Hacker C., Heinmiller B., Marshall M., Thierry-Chef I., Utterback D., Ahn Y.-O., Amoros E., Ashmore P., Auvinen A., Bae J.-M., Bernar Solano J., Biau A., Combalot E., Deboodt P., Diez Sacristan A., Eklof M., Engels H., Engholm G., Gulis G., Habib R., Holan K., Hyvonen H., Kerekes A., Kurtinaitis J., Malker H., Martuzzi M., Mastauskas A., Monnet A., Moser M., Pearce M. S., Richardson D. B., Rodriguez-Artalejo F., Rogel A., Tardy H., Telle-Lamberton M., Turai I., Usel M. et Veress K. (2005). Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries. *Bmj*. in press.
- Chazel V. et Ansoborlo E. (1999). Evaluation du risque d'exposition des travailleurs aux composés uranifères de l'usine de Comurhex de Pierrelatte. Rapport IPSN SDOS/99-22.
- Chazel V., Gerasimo P., Dabouis V., Laroche P. et Paquet F. (2003). Characterisation and dissolution of depleted uranium aerosols produced during impacts of kinetic energy penetrators against a tank. *Radiat Prot Dosimetry*. **105**, 163-6.
- Chazel V., Houpert P. et Ansoborlo E. (1997). Evaluation du risque d'exposition des travailleurs aux composés uranifères dans l'atelier TU2 de l'usine de Cogéma de Pierrelatte. Rapport IPSN SDOS/97-356.
- Chazel V., Houpert P. et Ansoborlo E. (1999). Evaluation du risque d'exposition des travailleurs aux composés uranifères dans l'atelier TU5 de conversion des nitrates de Cogéma Pierrelatte. Rapport IPSN SDOS/99-11.
- Chazel V., Houpert P., Ansoborlo E., Henge-Napoli M. H. et Paquet F. (2000). Variation of solubility, biokinetics and dose coefficient of industrial uranium oxides according to specific surface area. *Radiat.Prot.Dosimetry*. **88**, 223-231.
- Chazel V. et Tournalias E. (2004). Caractérisation physico-chimique et solubilité in vitro de concentrés miniers uranifères de l'usine Comurhex de Malvesi - Etude dosimétrique prédictive. Rapport IRSN SRBE/2004-823.
- Checkoway H., Pearce N., Crawford-Brown D. J. et Cragle D. L. (1988). Radiation doses and cause-specific mortality among workers at a nuclear materials fabrication plant. *Am J Epidemiol*. **127**, 255-266.
- Cheriyen V. D., Kurien C. J., Das B., Ramachandran E. N., Karuppasamy C. V., Thampi M. V., George K. P., Kesavan P. C., Koya P. K. et Chauhan P. S. (1999). Genetic monitoring of the human population from high-level natural radiation areas of Kerala on the southwest coast of India. II. Incidence of numerical and structural chromosomal aberrations in the lymphocytes of newborns. *Radiat.Res*. **152**, S154-S158.
- Chuang C. H. et Hu M. L. (2004). Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay in vivo and white blood cells for in vitro assay. *Mutat Res*. **564**, 75-82.
- Coggle J. E., Lambert B. E. et Moores S. R. (1986). Radiation effects in the lung. *Environ.Health Perspect*. **70**, 261-291.
- Cohen M. D., Zelikoff J. T., Chen L. C. et Schlesinger R. B. (1998). Immunotoxicologic effects of inhaled chromium: role of particle solubility and co-exposure to ozone. *Toxicol Appl Pharmacol*. **152**, 30-40.
- Collins A., Dusinska M., Franklin M., Somorovska M., Petrovska H., Duthie S., Fillion L., Panayiotidis M., Raslova K. et Vaughan N. (1997). Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen*. **30**, 139-46.
- Collins A. R. (2002). The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol*. **203**, 163-77.
- Collins A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. **26**, 249-61.
- Cooper J. R., Stradling G. N., Smith H. et Ham S. E. (1982). The behaviour of uranium-233 oxide and uranyl-233 nitrate in rats. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. **41**, 421-33.

- Copin J. C. et Gasche Y. (2003). [Morphology and physiology of the blood-brain barrier]. *Ann Fr Anesth Reanim.* **22**, 202-14.
- Costa M. (2002). Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. *Biol Chem.* **383**, 961-7.
- Costa M., Davidson T. L., Chen H., Ke Q., Zhang P., Yan Y., Huang C. et Kluz T. (2005). Nickel carcinogenesis: Epigenetics and hypoxia signaling. *Mutat Res.*
- Costa M., Salnikow K., Cosentino S., Klein C. B., Huang X. et Zhuang Z. (1994). Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* **102 Suppl 3**, 127-30.
- Costa M., Sutherland J. E., Peng W., Salnikow K., Broday L. et Kluz T. (2001). Molecular biology of nickel carcinogenesis. *Mol Cell Biochem.* **222**, 205-11.
- Costa M., Yan Y., Zhao D. et Salnikow K. (2003). Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis: gene silencing by nickel delivery to the nucleus and gene activation/inactivation by nickel-induced cell signaling. *J Environ Monit.* **5**, 222-3.
- Craft E., Abu-Qare A., Flaherty M., Garofolo M., Rincavage H. et Abou-Donia M. (2004). Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* **7**, 297-317.
- De Boeck M., Lison D. et Kirsch-Volders M. (1998). Evaluation of the in vitro direct and indirect genotoxic effects of cobalt compounds using the alkaline comet assay. Influence of interdonor and interexperimental variability. *Carcinogenesis.* **19**, 2021-9.
- De Meo M., Laget M., Castegnaro M. et Dumenil G. (1991). Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. *Mutat. Res.* **260**, 295-306.
- Derelanko M. J. et Hollinger M. A., eds. (2002). *Handbook of Toxicology*. CRC Press, Second Edition.
- Diamond G. L., Morrow P. E., Panner B. J., Gelein R. M. et Baggs R. B. (1989). Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundamental and applied toxicology.* **13**, 65-78.
- Diaz Sylvester P. L., Lopez R., Ubios A. M. et Cabrini R. L. (2002). Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation. *Arch Environ Health.* **57**, 320-325.
- Domingo J. L. (2001). Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. *Reprod Toxicol.* **15**, 603-9.
- Dorman D. C., Struve M. F., James R. A., Marshall M. W., Parkinson C. U. et Wong B. A. (2001). Influence of particle solubility on the delivery of inhaled manganese to the rat brain: manganese sulfate and manganese tetroxide pharmacokinetics following repeated (14-day) exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* **170**, 79-87.
- Doyle P., Maconochie N., Roman E., Davies G., Smith P. G. et Beral V. (2000). Fetal death and congenital malformation in babies born to nuclear industry employees: report from the nuclear industry family study. *Lancet.* **356**, 1293-9.
- Driscoll K. E. (2000). TNFalpha and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicol Lett.* **112-113**, 177-83.
- Driscoll K. E., Carter J. M., Hassenbein D. G. et Howard B. (1997). Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ Health Perspect.* **105 Suppl 5**, 1159-64.
- Driscoll K. E., Carter J. M., Howard B. W., Hassenbein D. G., Pepelko W., Baggs R. B. et Oberdorster G. (1996). Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol.* **136**, 372-80.
- Driscoll K. E., Lindenschmidt R. C., Maurer J. K., Perkins L., Perkins M. et Higgins J. (1991). Pulmonary response to inhaled silica or titanium dioxide. *Toxicol Appl Pharmacol.* **111**, 201-10.
- Duez P., Dehon G., Kumps A. et Dubois J. (2003). Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis.* **18**, 159-66.

- Dunnick J. K., Elwell M. R., Radovsky A. E., Benson J. M., Hahn F. F., Nikula K. J., Barr E. B. et Hobbs C. H. (1995). Comparative carcinogenic effects of nickel subsulfide, nickel oxide, or nickel sulfate hexahydrate chronic exposures in the lung. *cancer research*. **15**, 5251-5256.
- Dupree E. A., Cragle D. L., McLain R. W., Crawford-Brown D. J. et Teta M. J. (1987). Mortality among workers at a uranium processing facility, the Linde Air Products Company Ceramics Plant, 1943-1949. *Scand J Work Environ Health*. **13**, 100-7.
- Dygart H. P. (1949). *Pharmacology and Toxicology of Uranium compounds*. McGraw-Hill Book Inc., New York.
- EDP Sciences, ed. (2001). *L'Uranium : de l'environnement à l'Homme*. Coordinateur: Métivier, H., Les Ulis.
- Eidson A. F. (1994). The effect of solubility on inhaled uranium compound clearance: a review. *Health Phys*. **67**, 1-14.
- Ejnik J. W., Carmichael A. J., Hamilton M. M., McDiarmid M., Squibb K., Boyd P. et Tardiff W. (2000a). Determination of the isotopic composition of uranium in urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Health Phys*. **78**, 143-6.
- Ejnik J. W., Hamilton M. M., Adams P. R. et Carmichael A. J. (2000b). Optimal sample preparation conditions for the determination of uranium in biological samples by kinetic phosphorescence analysis (KPA). *J Pharm Biomed Anal*. **24**, 227-235.
- Ejnik J. W., Todorov T. I., Mullick F. G., Squibb K., McDiarmid M. A. et Centeno J. A. (2005). Uranium analysis in urine by inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*.
- Evans B. (2004). Special report of rodents and radiation, chapter 2: from the nose to the brain, experiments with rats find that inhaling dust from depleted uranium weapons can cause genetic mutations. Dans Daily Press, Hampton Roads, VA, USA.
- Evans M. D., Dizdaroglu M. et Cooke M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*. **567**, 1-61.
- Fairbairn D. W., Olive P. L. et O'Neill K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutat.Res*. **339**, 37-59.
- Faust F., Kassie F., Knasmuller S., Boedeker R. H., Mann M. et Mersch-Sundermann V. (2004). The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res*. **566**, 209-29.
- Fechter L. D., Johnson D. L. et Lynch R. A. (2002). The relationship of particle size to olfactory nerve uptake of a non-soluble form of manganese into brain. *Neurotoxicology*. **23**, 177-83.
- Ferin J. et Leach L. J. (1973). The effect of SO<sub>2</sub> on lung clearance of TiO<sub>2</sub> particles in rats. *Am.Ind.Hyg.Assoc.J*. **34**, 260-263.
- Frelon S., Monleau M., Turlonias E., Delissen O., Chazel V. et Paquet F. (2005). L'ICP-MS : un outil pour le suivi des contaminations internes à l'uranium. *CJASS*. in press.
- Fritsch P. et Masse R. (1992). Overview of pulmonary alveolar macrophage renewal in normal rats and during different pathological processes. *Environ Health Perspect*. **97**, 59-67.
- Fulco C. E., Liverman C. T. et Sox H. C. (2000). Depleted Uranium. Dans Gulf War and Health (C. E. Fulco, C. T. Liverman et H. C. Sox), Vol. 1. Depleted uranium, Pyridostigmine bromide, Sarin and Vaccines. pp. 89-168. National Academies press, Washington.
- Galaris D. et Evangelou A. (2002). The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. **42**, 93-103.
- Garaj-Vrhovac V. et Kopjar N. (2003). The alkaline Comet assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation. *Mutagenesis*. **18**, 265-71.

- Garaj-Vrhovac V., Kopjar N., Razem D., Vekic B., Miljanic S. et Ranogajec-Komor M. (2002). Application of the alkaline comet assay in biodosimetry: assessment of in vivo DNA damage in human peripheral leukocytes after a gamma radiation incident. *Radiat Prot Dosimetry*. **98**, 407-16.
- Gazin V., Kerdine S., Grillon G., Pallardy M. et Raoul H. (2004). Uranium induces TNF alpha secretion and MAPK activation in a rat alveolar macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*. **194**, 49-59.
- Gochfeld M. (1997). Factors influencing susceptibility to metals. *Environ Health Perspect*. **105 Suppl 4**, 817-22.
- Guglielmotti M. B., Ubios A. M., De Rey B. M. et Cabrini R. L. (1984). Effects of acute intoxication with uranyl nitrate on bone formation. *Experientia*. **40**, 474-476.
- Guilmette R. A., Parkhurst M. A., Miller G., Hahn F. F., Roszell L. E., Daxon E. G., Little T. T., Whicker J. J., Cheng Y. S., Traub R. J., Lodde G. M., Szrom F., Bihl D. E., Creek K. L. et McKee C. B. (2004). Human Health Risk Assessment of Capstone Depleted Uranium Aerosols. Attachment 3 of Depleted Uranium Aerosol Doses and Risks: Summary of US Assessments (D. PNWD-3442. Prepared for the US Army by Battelle under Chemical and Biological Defense Information Analysis Center Task 241), Aberdeen, Maryland.
- Hahn F. F., Guilmette R. A. et Hoover M. D. (2002). Implanted depleted uranium fragments cause soft tissue sarcomas in the muscles of rats. *Environ Health Perspect*. **110**, 51-9.
- Hamilton M. M., Ejniak J. W. et Carmichael A. J. (1997). Uranium reactions with hydrogen peroxide studied by EPR-spin trapping with DMPO. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2491-2494.
- Hart B. A., Gong Q. et Eneman J. D. (1996). Pulmonary metallothionein expression in rats following single and repeated exposure to cadmium aerosols. *Toxicology*. **112**, 205-18.
- Hart B. A., Potts R. J. et Watkin R. D. (2001). Cadmium adaptation in the lung - a double-edged sword? *Toxicology*. **160**, 65-70.
- Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V. et Tice R. R. (2003a). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. **18**, 45-51.
- Hartmann A., Elhajouji A., Kiskinis E., Poetter F., Martus H., Fjallman A., Frieauff W. et Suter W. (2001). Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem Toxicol*. **39**, 843-58.
- Hartmann A., Plappert U., Poetter F. et Suter W. (2003b). Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutat Res*. **536**, 27-38.
- Hartmann A., Schumacher M., Plappert-Helbig U., Lowe P., Suter W. et Mueller L. (2004). Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*. **19**, 51-9.
- Hartwig A. (1995). Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals*. **8**, 3-11.
- Hartwig A., Asmuss M., Blessing H., Hoffmann S., Jahnke G., Khandelwal S., Pelzer A. et Burkle A. (2002a). Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability. *Food Chem Toxicol*. **40**, 1179-84.
- Hartwig A., Asmuss M., Ehleben I., Herzer U., Kostelac D., Pelzer A., Schwerdtle T. et Burkle A. (2002b). Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environ Health Perspect*. **110 Suppl 5**, 797-9.
- Hartwig A., Kruger I. et Beyersmann D. (1994). Mechanisms in nickel genotoxicity: the significance of interactions with DNA repair. *Toxicol Lett*. **72**, 353-8.
- Hartwig A. et Schwerdtle T. (2002). Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett*. **127**, 47-54.

- Hedaya M. A., Birkenfeld H. P. et Kathren R. L. (1997). A sensitive method for the determination of uranium in biological samples utilizing kinetic phosphorescence analysis (KPA). *J Pharm Biomed Anal.* **15**, 1157-1165.
- Hehir R. M., McNamara B. P., McLaughlin J., Jr., Willigan D. A., Bierbower G. et Hardisty J. F. (1981). Cancer induction following single and multiple exposures to a constant amount of vinyl chloride monomer. *Environ. Health Perspect.* **41**, 63-72.
- Henge-Napoli M. H., Ansoborlo E., Chazel V., Gibert R., Houpert P., Paquet F. et Zhang L. (1997). Interactions uranium - cellule cible : exemple de la transformation de particules d'UO<sub>4</sub> dans le macrophage alvéolaire. *Radioprotection.* **32**, 625-636.
- Henge-Napoli M. H., Ansoborlo E., Claraz M., Berry J. P. et Cheynet M. C. (1996). Role of alveolar macrophages in the dissolution of two different industrial uranium oxides. *Cell Mol. Biol.* **42**, 413-420.
- Henge-Napoli M. H., Zhang L., Gibert R., Ansoborlo E., Pradal B., Galle P., Jeanguillaume C. et Berry J. P. (1998). Chemical transformation of uranium tetroxide particles in rat lungs after intratracheal deposit. *J. Trace and Microprobe Techniques.* **16**, 195-208.
- Hengstler J. G., Bolm-Audorff U., Faldum A., Janssen K., Reifenrath M., Gotte W., Jung D., Mayer-Popken O., Fuchs J., Gebhard S., Bienfait H. G., Schlink K., Dietrich C., Faust D., Epe B. et Oesch F. (2003). Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis.* **24**, 63-73.
- Himeno S., Yanagiya T., Enomoto S., Kondo Y. et Imura N. (2002). Cellular cadmium uptake mediated by the transport system for manganese. *Tohoku J Exp Med.* **196**, 43-50.
- Hindin R., Brugge D. et Panikkar B. (2005). Teratogenicity of depleted uranium aerosols: A review from an epidemiological perspective. *Environ Health.* **4**, 17.
- Ho E. (2004). Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J Nutr Biochem.* **15**, 572-8.
- Hoeijmakers J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* **411**, 366-74.
- Hornung R. W. (2001). Health effects in underground uranium miners. *Occup. Med.* **16**, 331-344.
- Hornung R. W., Deddens J. et Roscoe R. (1995). Modifiers of exposure-response estimates for lung cancer among miners exposed to radon progeny. *Environ Health Perspect.* **103 Suppl 2**, 49-53.
- Houpert P., Chazel V., Paquet F., Henge-Napoli M. H. et Ansoborlo E. (1999). The effects of the initial lung deposit on uranium biokinetics after administration as UF<sub>4</sub> and UO<sub>4</sub>. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 373-377.
- Houpert P., Muller D., Chazel V., Claraz M. et Paquet F. (2003). Effect of DTPA on the nephrotoxicity induced by uranium in rat. *Radiat Prot Dosimetry.* **105**, 517-520.
- Howland J. W. (1949). Studies on human exposures to uranium compounds. Dans *Pharmacology and Toxicology of Uranium* (C. H. Voegtlin, H.C., McGraw-Hill Book Company). pp. 993-1017, New York.
- Hu M. L., Chuang C. H., Sio H. M. et Yeh S. L. (2002). Simple cryoprotection and cell dissociation techniques for application of the comet assay to fresh and frozen rat tissues. *Free Radic. Res.* **36**, 203-209.
- Hu Q. Y. et Zhu S. P. (1990a). Detection of DNA damage in spermiogenic stages of mice treated with enriched uranyl fluoride by alkaline elution. *Radiat Environ Biophys.* **29**, 161-7.
- Hu Q. Y. et Zhu S. P. (1990b). Induction of chromosomal aberrations in male mouse germ cells by uranyl fluoride containing enriched uranium. *Mutat Res.* **244**, 209-14.

- Huber R., Salassidis K., Kulka U., Braselmann H. et Bauchinger M. (1996). Detection of centromeres in vinblastine- and radiation-induced micronuclei of human lymphocytes using FISH with an alpha satellite pancentromeric DNA probe. *Environ Mol Mutagen.* **27**, 105-9.
- ICRP (1979). Limits for intakes of radionuclides by workers, part 1. Dans Publication 30, Vol. 2, 3-4. Pergamon Press, Oxford.
- ICRP (1990). Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Dans Publication 60, Vol. 21, 1-3. Pergamon Press, Oxford.
- ICRP (1994a). Dose coefficients for intakes of radionuclides by workers. Dans Publication 68, Vol. 24, 4. Pergamon Press, Oxford.
- ICRP (1994b). Human respiratory tract model for radiological protection. Dans Publication 66, Vol. 24, 1-3. Pergamon Press, Oxford.
- ICRP (1995a). Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides: Part 3 Ingestion dose coefficients. Dans Publication 69, Vol. 25, 1. Pergamon Press, Oxford.
- ICRP (1995b). Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides: Part 4 Inhalation dose coefficients. Dans Publication 71, Vol. 25, 3-4. Pergamon press, Oxford.
- ICRP (1997a). General principles for the radiation protection of workers. Dans Publication 75, Vol. 27, 1. Pergamon Press, Oxford.
- ICRP (1997b). Individual monitoring for internal exposure of workers. Dans Publication 78, Vol. 27, 3-4. Pergamon Press, Oxford.
- ICRP (2002). Guide for the Practical Application of the ICRP Human Respiratory Tract Model. Dans Supporting Guidance 3, Vol. 32, 1-2. Pergamon Press, Oxford.
- Iffa-Credo (1997). Données biologiques du Rat OFA-Sprague Dawley.
- Iliakis G. (1991). The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *BioEssays.* **13**, 641-648.
- Imrich A., Ning Y. Y., Koziel H., Coull B. et Kobzik L. (1999). Lipopolysaccharide priming amplifies lung macrophage tumor necrosis factor production in response to air particles. *Toxicol Appl.Pharmacol.* **159**, 117-124.
- Jackson S. P. (2001). Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks. *Biochem Soc Trans.* **29**, 655-61.
- Jackson S. P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis.* **23**, 687-96.
- Jean S., De Meo M., Sabatier A. S., Laget M., Hubaud J. C., Verrando P. et Dumenil G. (2001). Evaluation of sunscreen protection in Human melanocytes exposed to UVA or UVB irradiation using the alkaline comet assay. *Photochem. Photobiol.* **74**, 417-423.
- Kalinich J. F., Ramakrishnan N., Villa V. et McClain D. E. (2002). Depleted uranium-uranyl chloride induces apoptosis in mouse J774 macrophages. *Toxicology.* **179**, 105-114.
- Kasprzak K. S., Sunderman F. W., Jr. et Salnikow K. (2003). Nickel carcinogenesis. *Mutat Res.* **533**, 67-97.
- Kassie F., Parzefall W. et Knasmuller S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat.Res.* **463**, 13-31.
- Kathren R. L., McInroy J. F., Moore R. H. et Dietert S. E. (1989). Uranium in the tissues of an occupationally exposed individual. *Health Phys.* **57**, 17-21.
- Kathren R. L. et Moore R. H. (1986). Acute accidental inhalation of U: a 38-year follow-up. *Health Phys.* **51**, 609-619.
- Kawanishi S., Hiraku Y., Murata M. et Oikawa S. (2002). The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* **32**, 822-32.
- Khanna K. K. et Jackson S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* **27**, 247-54.



- Kinetic Imaging (2001). Komet 5.5, User guide.
- Kirsch-Volders M., Aardema M. et Elhajouji A. (2000). Concepts of threshold in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.* **464**, 3-11.
- Kirsch-Volders M., Vanhauwaert A., De Boeck M. et Decordier I. (2002). Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutat Res.* **504**, 137-48.
- Kirsch-Volders M., Vanhauwaert A., Eichenlaub-Ritter U. et Decordier I. (2003). Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol Lett.* **140-141**, 63-74.
- Klaude M., Eriksson S., Nygren J. et Ahnstrom G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res.* **363**, 89-96.
- Klein C. B., Frenkel K. et Costa M. (1991). The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* **4**, 592-604.
- Knaapen A. M., Shi T., Borm P. J. et Schins R. P. (2002). Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol Cell Biochem.* **234-235**, 317-26.
- Knudsen L. E., Gaskell M., Martin E. A., Poole J., Scheepers P. T., Jensen A., Autrup H. et Farmer P. B. (2005). Genotoxic damage in mine workers exposed to diesel exhaust, and the effects of glutathione transferase genotypes. *Mutat Res.* **583**, 120-32.
- Kopera E., Schwerdtle T., Hartwig A. et Bal W. (2004). Co(II) and Cd(II) substitute for Zn(II) in the zinc finger derived from the DNA repair protein XPA, demonstrating a variety of potential mechanisms of toxicity. *Chem Res Toxicol.* **17**, 1452-8.
- Kronic A., Haveric S. et Ibrulj S. (2005). Micronuclei frequencies in peripheral blood lymphocytes of individuals exposed to depleted uranium. *Arh Hig Rada Toksikol.* **56**, 227-32.
- Kurttio P., Auvinen A., Salonen L., Saha H., Pekkanen J., Makelainen I., Vaisanen S. B., Penttila I. M. et Komulainen H. (2002). Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect.* **110**, 337-42.
- Kurttio P., Komulainen H., Leino A., Salonen L., Auvinen A. et Saha H. (2005). Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect.* **113**, 68-72.
- Kwon T. H., Frokiaer J., Han J. S., Knepper M. A. et Nielsen S. (2000). Decreased abundance of major Na(+) transporters in kidneys of rats with ischemia-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* **278**, F925-39.
- Kyono H., Serita F., Toya T., Kubota H., Arito H., Takahashi M., Maruyama R., Homma K., Ohta H., Yamauchi Y., Nakakita M., Seki Y., Ishihara Y. et Kagawa J. (1999). A new model rat with acute bronchiolitis and its application to research on the toxicology of inhaled particulate matter. *Ind. Health.* **37**, 47-54.
- Lang J. D., McArdle P. J., O'Reilly P. J. et Matalon S. (2002). Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest.* **122**, 314S-320S.
- Lasfargues G., Lardot C., Delos M., Lauwerys R. et Lison D. (1995). The delayed lung responses to single and repeated intratracheal administration of pure cobalt and hard metal powder in the rat. *Environ Res.* **69**, 108-121.
- Lasky J. A. et Brody A. R. (2000). Interstitial fibrosis and growth factors. *Environ Health Perspect.* **108 Suppl 4**, 751-62.
- Lataillade G., Verry M., Rateau G., Metivier H. et Masse R. (1995). Translocation of plutonium from rat and monkey lung after inhalation of industrial plutonium oxide and mixed uranium and plutonium oxide. *Int. J. Radiat. Biol.* **67**, 373-380.
- Laurier D., Valenty M. et Tirmarche M. (2001). Radon exposure and the risk of leukemia: a review of epidemiological studies. *Health Phys.* **81**, 272-288.
- Leach L. J., Maynard E. A., Hodge H. C., Scott J. K., Yuile C. L., Sylvester G. E. et Wilson H. B. (1970). A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO<sub>2</sub>) dust. I. Retention and biologic effect in the monkey, dog and rat. *Health Phys.* **18**, 599-612.

- Leach L. J., Yuile C. L., Hodge H. C., Sylvester G. E. et Wilson H. B. (1973). A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO<sub>2</sub>) dust. II. Postexposure retention and biologic effects in the monkey, dog and rat. *Health Phys.* **25**, 239-58.
- Lee K. P., Henry N. W., III, Trochimowicz H. J. et Reinhardt C. F. (1986). Pulmonary response to impaired lung clearance in rats following excessive TiO<sub>2</sub> dust deposition. *Environ.Res.* **41**, 144-167.
- Lee Y. W., Pons C., Tummolo D. M., Klein C. B., Rossman T. G. et Christie N. T. (1993). Mutagenicity of soluble and insoluble nickel compounds at the gpt locus in G12 Chinese hamster cells. *Environ Mol Mutagen.* **21**, 365-71.
- Leggett R. W. (1989). The behaviour and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys.* **57**, 365-383.
- Leggett R. W. (1994). Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium. *Health Phys.* **67**, 589-610.
- Lemercier V., Millot X., Ansoborlo E., Menetrier F., Flury-Herard A., Rousselle C. et Scherrmann J. M. (2003). Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiat Prot Dosimetry.* **105**, 243-5.
- Lestaevel P., Houpert P., Bussy C., Dhieux B., Gourmelon P. et Paquet F. (2005). The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology.* **212**, 219-226.
- Levine S. J. (1995). Bronchial epithelial cell-cytokine interactions in airway inflammation. *J Investig Med.* **43**, 241-9.
- Lewis J., Bench G., Myers O., Tinner B., Staines W., Barr E., Divine K. K., Barrington W. et Karlsson J. (2005). Trigeminal uptake and clearance of inhaled manganese chloride in rats and mice. *Neurotoxicology.* **26**, 113-23.
- Li C., Wang W., Kwon T. H., Knepper M. A., Nielsen S. et Frokiaer J. (2003). Altered expression of major renal Na transporters in rats with unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol.* **284**, F155-66.
- Li J. S., Zhang H., Wang H. R., Yang F. et Chne J. (2005). [Inducible nitric oxide synthase gene expression in the testis of rats instilled with depleted uranium particles]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* **11**, 655-7.
- Lin R. H., Wu L. J., Lee C. H. et Lin-Shiau S. Y. (1993). Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutat.Res.* **319**, 197-203.
- Lippmann M., Yeates D. B. et Albert R. E. (1980). Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br.J.Ind.Med.* **37**, 337-362.
- Lison D., De Boeck M., Verougstraete V. et Kirsch-Volders M. (2001). Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup Environ Med.* **58**, 619-25.
- Lizon C. et Fritsch P. (1999). Chemical toxicity of some actinides and lanthanides towards alveolar macrophages: an in vitro study. *Int J Radiat Biol.* **75**, 1459-1471.
- Madden E. F. (2003). The role of combined metal interactions in metal carcinogenesis: a review. *Rev Environ Health.* **18**, 91-109.
- Malarbet J. L. (1998). Calculations of radionuclide organ retentions from ICRP biokinetic recycling models. *Radiat Prot Dosimetry.* **79**, 379-381.
- Manzo L., Costa L. G., Tonini M., Minoia C. et Sabbioni E. (1992). Metabolic studies as a basis for the interpretation of metal toxicity. *Toxicol Lett.* **64-65 Spec No**, 677-86.
- Martin F., Earl R. et Tawn E. J. (1991). A cytogenetic study of men occupationally exposed to uranium. *Br.J.Ind.Med.* **48**, 98-102.
- Martin L. D., Krunkosky T. M., Dye J. A., Fischer B. M., Jiang N. F., Rochelle L. G., Akley N. J., Dreher K. L. et Adler K. B. (1997). The role of reactive oxygen and nitrogen species in the response of airway epithelium to particulates. *Environ Health Perspect.* **105 Suppl 5**, 1301-7.

- McDiarmid M. A., Engelhardt S., Oliver M., Gucer P., Wilson P. D., Kane R., Kabat M., Kaup B., Anderson L., Hoover D., Brown L., Handwerger B., Albertini R. J., Jacobson-Kram D., Thorne C. D. et Squibb K. S. (2004). Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans: a 10-year follow-up. *J Toxicol Environ Health A*. **67**, 277-96.
- McDiarmid M. A., Engelhardt S. M., Oliver M., Gucer P., Wilson P. D., Kane R., Kabat M., Kaup B., Anderson L., Hoover D., Brown L., Albertini R. J., Gudi R., Jacobson-Kram D., Thorne C. D. et Squibb K. S. (2005). Biological monitoring and surveillance results of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium. *Int Arch Occup Environ Health*. 1-11.
- McDiarmid M. A., Keogh J. P., Hooper F. J., McPhaul K., Squibb K., Kane R., DiPino R., Kabat M., Kaup B., Anderson L., Hoover D., Brown L., Hamilton M., Jacobson-Kram D., Burrows B. et Walsh M. (2000). Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans. *Environ Res*. **82**, 168-80.
- McGeoghegan D. et Binks K. (2000). The mortality and cancer morbidity experience of workers at the Springfields uranium production facility, 1946-95. *J Radiol.Prot*. **20**, 111-137.
- McKelvey-Martin V. J., Green M. H., Schmezer P., Pool-Zobel B. L., De Meo M. P. et Collins A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res*. **288**, 47-63.
- McMahon R. J. et Cousins R. J. (1998). Mammalian zinc transporters. *J Nutr*. **128**, 667-70.
- McQueney M. S. et Markham G. D. (1995). Investigation of monovalent cation activation of S-adenosylmethionine synthetase using mutagenesis and uranyl inhibition. *J Biol Chem*. **270**, 277-284.
- Mensing T., Welge P., Voss B., Fels L. M., Fricke H. H., Bruning T. et Wilhelm M. (2002). Renal toxicity after chronic inhalation exposure of rats to trichloroethylene. *Toxicol Lett*. **128**, 243-7.
- Meszáros G., Bognár G. et Koteles G. J. (2004). Long-term persistence of chromosome aberrations in uranium miners. *J Occup Health*. **46**, 310-5.
- Miller A. C. (2002). Potential late health effects of depleted uranium and tungsten used in armor-piercing munitions : comparison of neoplastic transformation and genotoxicity with the known carcinogen nickel. *Military medicine*. **167**, 120-122.
- Miller A. C., Blakely W. F., Livengood D., Whittaker T., Xu J., Ejniak J. W., Hamilton M. M., Parlette E., John T. S., Gerstenberg H. M. et Hsu H. (1998). Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride. *Environ Health Perspect*. **106**, 465-71.
- Miller A. C., Brooks K., Stewart M., Anderson B., Shi L., McClain D. et Page N. (2003). Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation. *J Environ Radioact*. **64**, 247-59.
- Miller A. C., Stewart M., Brooks A., Shi L. et Page N. (2002a). Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *J Inorganic Biochem*. **91**, 246-252.
- Miller A. C., Xu J., Stewart M., Brooks K., Hodge S., Shi L., Page N. et McClain D. (2002b). Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints. *Radiat Prot Dosimetry*. **99**, 275-8.
- Miller A. C., Xu J., Stewart M. et McClain D. (2001). Suppression of depleted uranium-induced neoplastic transformation of human cells by the phenyl fatty acid, phenyl acetate: chemoprevention by targeting the p21RAS protein pathway. *Radiat Res*. **155**, 163-170.

- Mirto H., Barrouillet M. P., Henge-Napoli M. H., Ansoborlo E., Fournier M. et Cambar J. (1999a). Influence of uranium(VI) speciation for the evaluation of in vitro uranium cytotoxicity on LLC-PK1 cells. *Hum Exp Toxicol.* **18**, 180-7.
- Mirto H., Henge-Napoli M. H., Gibert R., Ansoborlo E., Fournier M. et Cambar J. (1999b). Intracellular behaviour of uranium(VI) on renal epithelial cell in culture (LLC-PK1): influence of uranium speciation. *Toxicol Lett.* **104**, 249-56.
- Mitchel R. E., Jackson J. S. et Heinmiller B. (1999). Inhaled uranium ore dust and lung cancer risk in rats. *Health Phys.* **76**, 145-155.
- Mitchel R. E. et Sunder S. (2004). Depleted uranium dust from fired munitions: physical, chemical and biological properties. *Health Phys.* **87**, 57-67.
- Moller P., Knudsen L. E., Loft S. et Wallin H. (2000). The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **9**, 1005-15.
- Moore L. E., Warner M. L., Smith A. H., Kalman D. et Smith M. T. (1996). Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Environ Mol Mutagen.* **27**, 176-84.
- Morris K. J., Barker C. L., Batchelor A. L. et Khanna P. (1992). Dosimetric implications of pulmonary macrophage clusters observed within lungs of rats that have inhaled enriched UO<sub>2</sub> particles. *Environ. Health Perspect.* **97**, 201-208.
- Morris K. J., Townsend K. M. et Batchelor A. L. (1989). Studies of alveolar cell morphometry and mass clearance in the rat lung following inhalation of an enriched uranium dioxide aerosol. *Radiat. Environ. Biophys.* **28**, 141-154.
- Morrow P., Gelein R., Beiter H., Scott J., Picano J. et Yuile C. (1982). Inhalation and intravenous studies of UF<sub>6</sub>/UO<sub>2</sub>F<sub>2</sub> in dogs. *Health Phys.* **43**, 859-73.
- Morrow P. E., Gibb F. R. et Beiter H. D. (1972). Inhalation studies of uranium trioxide. *Health Phys.* **23**, 273-80.
- Morrow P. E., Gibb F. R. et Leach L. J. (1966). The clearance of uranium dioxide dust from the lungs following single and multiple inhalation exposures. *Health Phys.* **12**, 1217-1223.
- Muhle H., Bellmann B., Creutzenberg O., Dasenbrock C., Ernst H., Kilpper R., MacKenzie J. C., Morrow P., Mohr U., Takenaka S. et . (1991). Pulmonary response to toner upon chronic inhalation exposure in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* **17**, 280-299.
- Muller D. (2002). Etude in vitro de la réabsorption tubulaire proximale de l'uranium - Conséquences fonctionnelles. Au LRTOX/IRSN, Pierrelatte. Thèse de l'Université Bordeaux 2.
- Muller H. L., Taya A., Drosselmeyer E., Hotz G., Pickering S., Ray I. L., Seidel A. et Thiele H. (1989). Cellular aspects of retention and transport of inhaled soluble and insoluble actinide compounds in the rat lung. *Sci. Total Environ.* **83**, 239-251.
- Nathanson J. A. et Bloom F. E. (1976). Heavy metals and adenosine cyclic 3',5'-monophosphate metabolism: possible relevance to heavy metal toxicity. *Mol Pharmacol.* **12**, 390-398.
- National institute of Environmental Health Sciences (2005). Depleted uranium and the brain. Dans EHP Student Edition, <http://www.ehponline.org/science-ed>.
- National Toxicology Program (1996a). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Nickel Subsulfide (CAS No. 12035-72-2) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). Dans Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, Vol. 453. pp. 1-365.
- National Toxicology Program (1996b). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Nickel Sulfate Hexahydrate (CAS No. 10101-97-0) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). Dans Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, Vol. 454. pp. 1-380.
- Nemery B. (1990). Metal toxicity and the respiratory tract. *Eur Respir J.* **3**, 202-19.

- Normandin L., Panisset M. et Zayed J. (2002). Manganese neurotoxicity: behavioral, pathological, and biochemical effects following various routes of exposure. *Rev Environ Health*. **17**, 189-217.
- Oberdorster G. (1995). Lung particle overload: implications for occupational exposures to particles. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **21**, 123-135.
- Oberdorster G. (2002). Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles. *Inhal. Toxicol.* **14**, 29-56.
- Oberdorster G., Cherian M. G. et Baggs R. B. (1994a). Correlation between cadmium-induced pulmonary carcinogenicity, metallothionein expression, and inflammatory processes: a species comparison. *Environ Health Perspect.* **102 Suppl 3**, 257-63.
- Oberdorster G., Ferin J. et Lehnert B. E. (1994b). Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ. Health Perspect.* **102 Suppl 5**, 173-179.
- O'Brien R. S. (2003). Assessment of intakes of mixtures of radionuclides. *Radiat Prot Dosimetry.* **105**, 95-100.
- Ohshima H., Tatemichi M. et Sawa T. (2003). Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys.* **417**, 3-11.
- Olive P. L. (1999). DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol.* **75**, 395-405.
- Olive P. L. (2002). The comet assay. An overview of techniques. *Methods Mol Biol.* **203**, 179-94.
- Olive P. L. et Banath J. P. (1993). Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125I dUrd. *Int J Radiat Biol.* **64**, 349-58.
- Olive P. L., Banath J. P. et Durand R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res.* **122**, 86-94.
- Olive P. L. et Durand R. E. (2005). Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. *Cytometry A.* **66**, 1-8.
- Olive P. L., Durand R. E., Jackson S. M., Le Riche J. C., Luo C., Ma R., McLaren D. B., Aquino-Parsons C., Thomson T. A. et Trotter T. (1999). The comet assay in clinical practice. *Acta Oncol.* **38**, 839-44.
- Olive P. L., Wlodek D. et Banath J. P. (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res.* **51**, 4671-4676.
- Oller A. R. (2002). Respiratory carcinogenicity assessment of soluble nickel compounds. *Environ Health Perspect.* **110 Suppl 5**, 841-4.
- Oller A. R., Costa M. et Oberdorster G. (1997). Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicol Appl Pharmacol.* **143**, 152-66.
- Ostling O. et Johanson K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 291-298.
- Paquet F., Houpert P., Blanchardon E., Delissen O., Maubert C., Dhieux B., Moreels A. M., Frelon S., Voisin P. et Gourmelon P. (2005). Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys.* in press.
- Parkhurst M. A., Daxon E. G., Lodde G. M., Szrom F., Guilmette R. A., Roszell L. M. et Faló G. A. (2004a). Depleted Uranium Aerosol Doses and Risks: Summary of US Assessments, PNWD-3476. Prepared for the US Army by Battelle.
- Parkhurst M. A., Szrom F., Guilmette R. A., Holmes T. D., Cheng Y. S., Kenoyer J. L., Collins J. W., Sanderson T. E., Fliszar R. W., Gold K., Beckman J. C. et Long J. A. (2004b). Capstone Depleted Uranium Aerosols: Generation and Characterization. Dans Volumes 1. Main Text. Attachment 1 of Depleted Uranium Aerosol Doses and Risks: Summary of US Assessments. PNNL-14168, Prepared for the US Army by Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington.

- Pasanen M., Lang S., Kojo A. et Kosma V. M. (1995). Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environ Res.* **70**, 126-33.
- Pasquale L., Winiski A., Oliva C., Vaio G. et McLaughlin S. (1986). An experimental test of new theoretical models for the electrokinetic properties of biological membranes. The effect of UO<sub>2</sub><sup>++</sup> and tetracaine on the electrophoretic mobility of bilayer membranes and human erythrocytes. *J Gen Physiol.* **88**, 697-718.
- Pastink A., Eeken J. C. et Lohman P. H. (2001). Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. *Mutat Res.* **480-481**, 37-50.
- Pellmar T. C., Fuciarelli A. F., Ejniak J. W., Hamilton M., Hogan J., Strocko S., Emond C., Mottaz H. M. et Landauer M. R. (1999a). Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci.* **49**, 29-39.
- Pellmar T. C., Keyser D. O., Emery C. et Hogan J. B. (1999b). Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments. *Neurotoxicology.* **20**, 785-92.
- Pellow P. G., Hodgson S. A., Hodgson A., Rance E., Ellender M., Guilmette R. A. et Stradling G. N. (2003). Comparison of absorption after inhalation and instillation of uranium octoxide. *Radiat Prot Dosimetry.* **105**, 105-8.
- Persson E., Henriksson J., Tallkvist J., Rouleau C. et Tjalve H. (2003a). Transport and subcellular distribution of intranasally administered zinc in the olfactory system of rats and pikes. *Toxicology.* **191**, 97-108.
- Persson E., Henriksson J. et Tjalve H. (2003b). Uptake of cobalt from the nasal mucosa into the brain via olfactory pathways in rats. *Toxicol Lett.* **145**, 19-27.
- Peters T. M. et Leith D. (2003). Concentration measurement and counting efficiency of the aerodynamic particle sizer 3321. *J Aerosol Science.* **34**, 627-634.
- Phalen R. F., Mannix R. C. et Drew R. T. (1984). Inhalation exposure methodology. *Environ Health Perspect.* **Jun;56**, 23-34.
- Popp W., Plappert U., Muller W. U., Rehn B., Schneider J., Braun A., Bauer P. C., Vahrenholz C., Presek P., Brauksiepe A., Enderle G., Wust T., Bruch J., Fliedner T. M., Konietzko N., Streffer C., Weitowitz H. J. et Norpoth K. (2000). Biomarkers of genetic damage and inflammation in blood and bronchoalveolar lavage fluid among former German uranium miners: a pilot study. *Radiat Environ Biophys.* **39**, 275-82.
- Pothion S., Bizot J. C., Trovero F. et Belzung C. (2004). Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res.* **155**, 135-46.
- Poyet M. (2002). Mise au point d'un système d'exposition par inhalation pour la simulation de contaminations chroniques à l'uranium. Au LRTOX/IRSN, Pierrelatte. 3e année GE-ESIGEC, Ecole Supérieure de Chambéry.
- Prabhavathi P. A., Fatima S. K., Padmavathi P., Kumari C. K. et Reddy P. P. (1995). Sister-chromatid exchanges in nuclear fuel workers. *Mutat.Res.* **347**, 31-35.
- Prabhavathi P. A., S.K.Fatima, Rao M. S. et Reddy P. P. (2000). Analysis of chromosomal aberration frequencies in the peripheral blood lymphocytes of smokers exposed to uranyl compounds. *Mutat.Res.* **466**, 37-41.
- Rao D. B., Wong B. A., McManus B. E., McElveen A. M., James A. R. et Dorman D. C. (2003). Inhaled iron, unlike manganese, is not transported to the rat brain via the olfactory pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* **193**, 116-26.
- Ribera D., Labrot F., Tisnerat G. et Narbonne J. F. (1996). Uranium in the environment : occurrence, transfer, and biological effects. *Rev.Environ.Contam.Toxicol.* **146**, 53-89.
- Ritz B. (1999). Radiation exposure and cancer mortality in uranium processing workers. *Epidemiology.* **10**, 531-8.

- Ritz B., Morgenstern H., Crawford-Brown D. et Young B. (2000). The effects of internal radiation exposure on cancer mortality in nuclear workers at Rocketdyne/Atomics International. *Environ Health Perspect.* **108**, 743-51.
- Robbiano L., Mereto E., Corbu C. et Brambilla G. (1996). DNA damage induced by seven *N*-nitroso compounds in primary cultures of human and rat kidney cells. *Mutat Res.* **368**, 41-47.
- Robbins M. E. et Zhao W. (2004). Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review. *Int J Radiat Biol.* **80**, 251-9.
- Roberts E. (1949). Uranyl nitrate. Dans *Pharmacology and Toxicology of uranium compounds* (McGraw-Hill), 561-585. New York.
- Rogakou E. P., Boon C., Redon C. et Bonner W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol.* **146**, 905-16.
- Rogel A., Carre N., Amoros E., Bonnet-Belfais M., Goldberg M., Imbernon E., Calvez T. et Hill C. (2005). Mortality of workers exposed to ionizing radiation at the French National Electricity Company. *Am J Ind Med.* **47**, 72-82.
- Roth J. A. et Garrick M. D. (2003). Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochem Pharmacol.* **66**, 1-13.
- Rothkamm K. et Loblrich M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 5057-62.
- Rydberg B. et Johanson K. J. (1978). Estimation of single strand breaks in mammalian cells. Dans *DNA Repair Mechanisms* (P. C. Hanawalt, E. C. Friedberg et C. F. Fox). pp. 465-468. Academic Press, New York, .
- Sardas S., Karabiyik L., Aygun N. et Karakaya A. E. (1998). DNA damage evaluated by the alkaline comet assay in lymphocytes of humans anaesthetized with isoflurane. *Mutat Res.* **418**, 1-6.
- Sasaki Y. F., Sekihashi K., Izumiyama F., Nishidate E., Saga A., Ishida K. et Tsuda S. (2000). The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. *Crit Rev. Toxicol.* **30**, 629-799.
- Sasaki Y. F., Tsuda S., Izumiyama F. et Nishidate E. (1997). Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutat. Res.* **388**, 33-44.
- Schins R. P. (2002). Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhal Toxicol.* **14**, 57-78.
- Schins R. P. et Borm P. J. (1999). Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Ann Occup Hyg.* **43**, 7-33.
- Sedelnikova O. A., Rogakou E. P., Panyutin I. G. et Bonner W. M. (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res.* **158**, 486-92.
- Shacter E. et Weitzman S. A. (2002). Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park).* **16**, 217-26, 229; discussion 230-2.
- Silbergeld E. K. (2003). Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen. *Mutat Res.* **533**, 121-33.
- Singh N. P. (2000). Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res.* **455**, 111-27.
- Singh N. P., Bennett D. D., Wrenn M. E. et Saccomanno G. (1987). Concentrations of alpha-emitting isotopes of U and Th in uranium miners' and millers' tissues. *Health Phys.* **53**, 261-5.

- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R. et Schneider E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184-191.
- Singh N. P., Muller C. H. et Berger R. E. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril.* **80**, 1420-30.
- Snipes M. B., Olson T. R. et Yeh H. C. (1988). Deposition and retention patterns for 3-, 9-, and 15-micron latex microspheres inhaled by rats and guinea pigs. *Exp. Lung Res.* **14**, 37-50.
- Souidi M., Gueguen Y., Linard C., Dudoignon N., Grison S., Baudelin C., Marquette C., Gourmelon P., Aigueperse J. et Dublineau I. (2005). In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology*. in press.
- Speit G. et Hartmann A. (2005). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol.* **291**, 85-95.
- Speit G., Witton-Davies T., Heepchantree W., Trenz K. et Hoffmann H. (2003). Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutat Res.* **542**, 33-42.
- Stearns D. M., Yazzie M., Bradley A. S., Coryell V. H., Shelley J. T., Ashby A., Asplund C. S. et Lantz R. C. (2005). Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis*.
- Steele V. E. et Arnold J. T. (1985). Isolation and long-term culture of rat, rabbit, and human nasal turbinate epithelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **21**, 681-687.
- Sul D., Oh E., Im H., Yang M., Kim C. W. et Lee E. (2003). DNA damage in T- and B-lymphocytes and granulocytes in emission inspection and incineration workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* **538**, 109-19.
- Sunderman F. W., Jr. (2001). Nasal toxicity, carcinogenicity, and olfactory uptake of metals. *Ann Clin Lab Sci.* **31**, 3-24.
- Svanborg C., Agace W., Hedges S., Linder H. et Svensson M. (1993). Bacterial adherence and epithelial cell cytokine production. *Zentralbl Bakteriol.* **278**, 359-64.
- Sztajnkrzyca M. D. et Otten E. J. (2004). Chemical and radiological toxicity of depleted uranium. *Mil Med.* **169**, 212-6.
- Tasat D. R. et De Rey B. M. (1987). Cytotoxic effect of uranium dioxide on rat alveolar macrophages. *Environ. Res.* **44**, 71-81.
- Taulan M. (2004). Conséquences moléculaires des expositions aiguë et chronique à l'uranium sur le transcriptome murin. Au LRTOX/IRSN, Pierrelatte. Thèse de l'Université Montpellier I.
- Taulan M., Paquet F., Maubert C., Delissen O., Demaille J. et Romey M. C. (2004). Renal Toxicogenomic Response to Chronic Uranyl Nitrate Insult in Mice. *Environ Health Perspect.* **112**, 1628-1635.
- Taylor D. M. et Taylor S. K. (1997). Environmental uranium and human health. *Rev. Environ. Health.* **12**, 147-157.
- Taylor M. D., Roberts J. R., Leonard S. S., Shi X. et Antonini J. M. (2003). Effects of welding fumes of differing composition and solubility on free radical production and acute lung injury and inflammation in rats. *Toxicol Sci.* **75**, 181-91.
- Telle-Lamberton M., Bergot D., Gagneau M., Samson E., Giraud J. M., Neron M. O. et Hubert P. (2004). Cancer mortality among French Atomic Energy Commission workers. *Am J Ind Med.* **45**, 34-44.
- The royal society (2001). The health hazards of depleted uranium munitions, Part I. Science Advice Section, London.
- The royal society (2002). The health hazards of depleted uranium munitions, Part II. Science Advice Section, London.
- Theophanides T. et Anastassopoulou J. (2002). Copper and carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* **42**, 57-64.



- Thierens H., Vral A., de Ridder L., Touil N., Kirsch-Volders M., Lambert V. et Laurent C. (1999). Inter-laboratory comparison of cytogenetic endpoints for the biomonitoring of radiological workers. *Int J Radiat Biol.* **75**, 23-34.
- Thun M. J., Baker D. B., Steenland K., Smith A. B., Halperin W. et Berl T. (1985). Renal toxicity in uranium mill workers. *Scand J Work Environ Health.* **11**, 83-90.
- Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C. et Sasaki Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* **35**, 206-21.
- Tice R. R. et Strauss G. H. (1995). The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells.* **13 Suppl 1**, 207-14.
- Ting-Beall H. P. (1980). Interactions of uranyl ions with lipid bilayer membranes. *J Microsc.* **118**, 221-7.
- Tirmarche M., Baysson H. et Telle-Lamberton M. (2004). [Uranium exposure and cancer risk: a review of epidemiological studies]. *Rev Epidemiol Sante Publique.* **52**, 81-90.
- Tjalve H. et Henriksson J. (1999). Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *Neurotoxicology.* **20**, 181-95.
- Tjalve H., Henriksson J., Tallkvist J., Larsson B. S. et Lindquist N. G. (1996). Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathways in rats. *Pharmacol Toxicol.* **79**, 347-56.
- Tokarskaya Z. B., Okladnikova N. D., Belyaeva Z. D. et Drozhko E. G. (1997). Multifactorial analysis of lung cancer dose-response relationships for workers at the Mayak nuclear enterprise. *Health Phys.* **73**, 899-905.
- Touil N., Aka P. V., Buchet J. P., Thierens H. et Kirsch-Volders M. (2002). Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionizing radiation using biomarkers for DNA damage and repair. *Mutagenesis.* **17**, 223-32.
- Ubios A. M., Guglielmotti M. B., Steimetz T. et Cabrini R. L. (1991). Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ Res.* **54**, 17-23.
- Valverde M., Fortoul T. I., Diaz-Barriga F., Mejia J. et del Castillo E. R. (2000). Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice. *Mutagenesis.* **15**, 109-14.
- Valverde M., Fortoul T. I., Diaz-Barriga F., Mejia J. et del Castillo E. R. (2002). Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead : differential organ response. *Mutagenesis.* **17**, 55-61.
- Van Goethem F., Lison D. et Kirsch-Volders M. (1997). Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutat Res.* **392**, 31-43.
- Vidaud C., Dedieu A., Basset C., Plantevin S., Dany I., Pible O. et Quemeneur E. (2005). Screening of human serum proteins for uranium binding. *Chem Res Toxicol.* **18**, 946-53.
- Wang Z. Y., Boice J. D., Jr., Wei L. X., Beebe G. W., Zha Y. R., Kaplan M. M., Tao Z. F., Maxon H. R., III, Zhang S. Z., Schneider A. B. et . (1990). Thyroid nodularity and chromosome aberrations among women in areas of high background radiation in China. *J Natl. Cancer Inst.* **82**, 478-485.
- Warheit D. B., Hansen J. F., Yuen I. S., Kelly D. P., Snajdr S. I. et Hartsy M. A. (1997). Inhalation of high concentrations of low toxicity dusts in rats results in impaired pulmonary clearance mechanisms and persistent inflammation. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **145**, 10-22.
- Warheit D. B., Yuen I. S., Kelly D. P., Snajdr S. et Hartsy M. A. (1996). Subchronic inhalation of high concentrations of low toxicity, low solubility particulates

- produces sustained pulmonary inflammation and cellular proliferation. *Toxicol Lett.* **88**, 249-53.
- Wiklund S. J. et Agurell E. (2003). Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis.* **18**, 167-75.
- Wilson M. R., Stone V., Cullen R. T., Searl A., Maynard R. L. et Donaldson K. (2000). In vitro toxicology of respirable Montserrat volcanic ash. *Occup. Environ. Med.* **57**, 727-733.
- Xie H., Wise S. S., Holmes A. L., Xu B., Wakeman T. P., Pelsue S. C., Singh N. P. et Wise J. P., Sr. (2005). Carcinogenic lead chromate induces DNA double-strand breaks in human lung cells. *Mutat Res.* **586**, 160-72.
- Yang Z. H., Fan B. X., Lu Y., Cao Z. S., Yu S., Fan F. Y. et Zhu M. X. (2002). [Malignant transformation of human bronchial epithelial cell (BEAS-2B) induced by depleted uranium]. *Ai Zheng.* **21**, 944-8.
- Yazzie M., Gamble S. L., Civitello E. R. et Stearns D. M. (2003). Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chem Res Toxicol.* **16**, 524-30.
- Zhao S. et Zhao F. (1990). Nephrotoxic limit and annual limit of intake for natural U. *Health Phys.* **58**, 619-623.
- Zhou J., Zhou L. et Yang J. (1998). [Studies on effects of cytokine released from alveolar macrophage induced by mineral dust on lung fibroblast]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* **32**, 336-9.

# ANNEXES



## Sommaire

	Annexe p
Liste des figures	1
Liste des tableaux	2
Annexe 1 - Mécanismes moléculaires de réparation de l'ADN	3
Annexe 1.1 - L'excision de base	3
Annexe 1.2 - La recombinaison homologe et la religation non-homologue	5
Annexe 2 - Comparaison des techniques de dosage de l'uranium, cas des doubles expositions	9
Annexe 3 - Protocole du test des comètes réalisé <i>in vivo</i> sur les différents types cellulaires	25
Annexe 3.1 - Isolement des cellules épithéliales nasales	25
Annexe 3.2 - Isolement des cellules du lavage broncho-alvéolaire (BAL)	27
Annexe 3.3 - Isolement des cellules rénales	27
Annexe 3.4 - Test des comètes après exposition <i>in vivo</i>	28
Annexe 4 - Biocinétiques expérimentales de l'uranium	31
Annexe 5 - Test des comètes, Article 4, valeurs brutes des OTM	35
Annexe 6 - Test des comètes, Article 5, valeurs brutes des OTM	41
Annexe 7 - Communications	45
Annexe - Références	46

## Liste des figures

	Annexe p
Annexe - Figure 1 : Mécanismes d'excision de bases (BER, base-excision repair) (Hoeijmakers, 2001)	4
Annexe - Figure 2 : Mécanismes de recombinaison homologe (homologous recombinaison) et de religation non homologue (end joining) (Hoeijmakers, 2001)	7
Annexe - Figure 3 : Pourcentage d'uranium provenant de l' $UO_4$ (% $UO_4$ ) versus uranium total dans l'ensemble poumons/trachée (1a), les urines (1b) et le TGI (1c)	20
Annexe - Figure 4 : Evaluation du pourcentage d'uranium provenant de l' $UO_2$ (% $UO_2$ ) et de l'uranium naturel (% $U_{naturel}$ ) versus uranium total dans le TGI	21
Annexe - Figure 5 : Schéma des techniques de prélèvements des cellules épithéliales nasales (Steele, 1985)	25
Annexe - Figure 6 : Comparaison de la biocinétique de l'uranium entre les groupes exposés à l' $UO_2$ par inhalation aiguë	32
Annexe - Figure 7 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition alcaline sur les cellules épithéliales nasales des groupes Control, Ac $UO_4$ , Ac $UO_2$ et Rep $UO_2$	36
Annexe - Figure 8 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition alcaline sur les cellules du BAL des groupes Control, Ac $UO_4$ , Ac $UO_2$ et Rep $UO_2$	37
Annexe - Figure 9 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition neutre sur les cellules du BAL des groupes Control, Ac $UO_2$ -3 et Rep $UO_2$	38
Annexe - Figure 10 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition alcaline sur les cellules rénales des groupes Control, Ac $UO_4$ , Ac $UO_2$ -3 et Rep $UO_2$	39

Annexe - Figure 11 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition alcaline sur les cellules épithéliales nasales des groupes Control, AcUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub> et RepUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub>	41
Annexe - Figure 12 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition alcaline sur les cellules du BAL des groupes Control, AcUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub> et RepUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub>	42
Annexe - Figure 13 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition neutre sur les cellules du BAL des groupes Control, AcUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub> et RepUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub>	43
Annexe - Figure 14 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition alcaline sur les cellules rénales des groupes Control, AcUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub> et RepUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub>	44

## Liste des tableaux

### Annexe p

Annexe - Tableau 1 : Comparaison des dosages de l'uranium total réalisés par ICP-MS, KPA et spectrométrie $\alpha$	17
Annexe - Tableau 2a : Tests statistiques relatifs au Tableau 1, comparaison des méthodes d'analyse deux à deux	18
Annexe - Tableau 3 : Comparaison des pourcentages d'uranium provenant de l'UO <sub>4</sub> (% UO <sub>4</sub> ) par rapport à l'uranium total mesurés par ICP-MS et spectrométrie $\alpha$	19
Annexe - Tableau 2b : Tests statistiques relatifs au Tableau 3 (%UO <sub>4</sub> ), comparaison ICP-MS / Spectrométrie $\alpha$	19
Annexe - Tableau 4 : Composition du HBSS sans Ca <sup>2+</sup> et Mg <sup>2+</sup> (HBSS free)	27
Annexe - Tableau 5 : Quantités d'uranium dans les organes ( $\mu\text{gU.g}^{-1}$ de tissu) et les excréta ( $\mu\text{gU}$ ) du groupe AcUO <sub>2</sub> -1 en fonction des jours après exposition	31
Annexe - Tableau 6 : Quantités d'uranium dans les organes ( $\mu\text{gU.g}^{-1}$ de tissu) et les excréta ( $\mu\text{gU}$ ) du groupe AcUO <sub>2</sub> -2 en fonction des jours après exposition (Article 1 - Figure 5)	31
Annexe - Tableau 7 : Quantités d'uranium dans les excréta ( $\mu\text{gU}$ ) du groupe AcUO <sub>2</sub> -3 en fonction des jours après exposition	32
Annexe - Tableau 8 : Quantités d'uranium dans les organes ( $\mu\text{gU.g}^{-1}$ de tissu) et les excréta ( $\mu\text{gU}$ ) du groupe AcUO <sub>4</sub> en fonction des jours après exposition	33
Annexe - Tableau 9 : Quantités d'uranium dans les organes ( $\mu\text{gU.g}^{-1}$ de tissu) et les excréta ( $\mu\text{gU}$ ) du groupe RepUO <sub>2</sub> -1 en fonction des jours après exposition (Article 1 - Figure 6)	33
Annexe - Tableau 10 : Quantités d'uranium dans les organes ( $\mu\text{gU.g}^{-1}$ de tissu) et les excréta ( $\mu\text{gU}$ ) du groupe RepUO <sub>2</sub> -2 en fonction des jours après exposition (Article 1 - Figure 7)	33
Annexe - Tableau 11 : Quantités d'uranium total et d'UO <sub>4</sub> dans les organes ( $\mu\text{gU.g}^{-1}$ de tissu) et les excréta ( $\mu\text{gU}$ ) du groupe RepUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub> en fonction des jours après l'exposition d'UO <sub>4</sub>	34
Annexe - Tableau 12 : Quantités d'uranium total et d'UO <sub>4</sub> dans les organes ( $\mu\text{gU.g}^{-1}$ de tissu) et les excréta ( $\mu\text{gU}$ ) du groupe AcUO <sub>2</sub> +UO <sub>4</sub> en fonction des jours après l'exposition d'UO <sub>4</sub>	34

## Annexe 1 - Mécanismes moléculaires de réparation de l'ADN

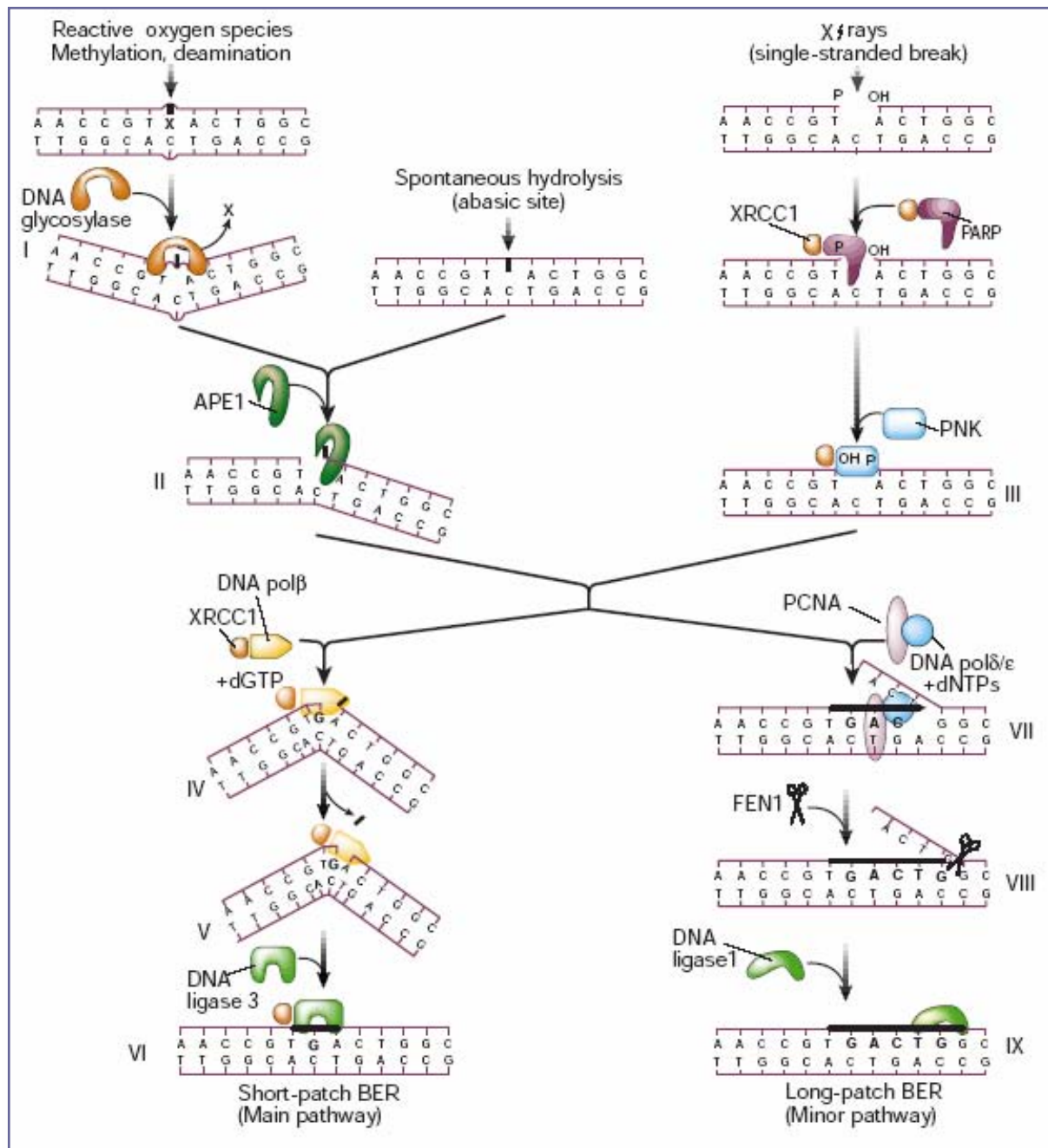
Les deux principaux mécanismes impliqués dans la réparation des lésions de l'ADN d'origine endogène et induites par les radiations ionisantes sont décrits ci-dessous (Averbeck, 2000, Hoeijmakers, 2001, Rothkamm et Lobrich, 2003).

### Annexe 1.1 - L'excision de base

Le mécanisme d'excision de base permet de réparer des lésions d'origine endogène portant sur un brin de l'ADN.

Généralement, les bases modifiées de l'ADN sont excisées à l'aide d'ADN glycosylases spécialisées (Annexe - Figure 1, étape I, à gauche), comme hNth et hOgg1, qui produisent des sites abasique (AP). Il existe huit ADN glycosylases qui se caractérisent, chez l'homme, par diverses activités et spécificités de substrat. Normalement, il s'agit d'enzymes de petite taille qui n'ont pas besoin de cofacteurs pour exercer leur activité. Elles sont en permanence présentes dans le noyau cellulaire et ne sont pas induites par des lésions génotoxiques de l'ADN. Par exemple, la 8-oxoguanine ADN glycosylase hOgg1 (homologue de la protéine Fpg de *E. coli*) excise, entre autres, la 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) de l'ADN. Les sites AP formés sont des substrats pour les AP endonucléases (étape II). Elles incisent le brin d'ADN en 3' et 5' du site abasique. Une phosphodiesterase enlève les parties sucre-phosphate restantes.

Dans le cas des cassures simple brin, la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP) détecte les cassures simple brin (étape I, à droite). La protéine XRCC1 détecte aussi des cassures indépendamment de la PARP (étape I, à droite). La PARP jouerait un rôle d'initiation et de régulation de la réparation par sa liaison rapide mais intermittente aux cassures simple brin. La protéine XRCC1 pourrait jouer un rôle de régulation négative de l'activité PARP en se liant préférentiellement à la forme oligo (ADP-ribosylée) de la PARP lorsque celle-ci est fixée aux cassures simple brin. La polynucléotide kinase (PNK) serait aussi importante pour la réparation des cassures simple brin (étape III).



Annexe - Figure 1 : Mécanismes d'excision de bases (BER, base-excision repair)  
(Hoeijmakers, 2001)

Ensuite, la voie impliquant l'enlèvement de un ou deux nucléotides est appelée « *short patch repair* » et donne de petites brèches ; c'est la voie principale chez les mammifères. Celle impliquant plusieurs nucléotides est appelée « *long patch repair* » et donne de plus grandes brèches simple brin dans l'ADN.

Lors de la voie « *short patch repair* », l'ADN polymérase  $\beta$  remplit la brèche avec un à deux nucléotides en utilisant le brin complémentaire non endommagé comme



matrice (étapes IV et V). L'ADN polymérase  $\beta$  est inductible par les dommages de l'ADN. Ensuite, le complexe ADN ligase III/ XRCC1 effectue la jonction des brins d'ADN (étape VI). Le fait que XRCC1 interagisse également avec Pol $\beta$  et l'ADN ligase III suggère qu'elle pourrait agir comme coordinateur de l'excision de bases et de la réparation des cassures simple brin.

Lors de la voie « *long patch repair* », les ADN polymérases  $\delta$  et  $\delta/\epsilon$  associées aux facteurs protéiques PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (étape VII) et l'endonucléase FEN1 (étape VIII) remplissent la brèche avec cinq à six nucléotides en utilisant le brin complémentaire non endommagé comme matrice. L'ADN ligase I effectue la jonction des brins d'ADN (étape IX).

## Annexe 1.2 - La recombinaison homologue et la religation non-homologue

Les dommages très sévères impliquant les deux brins de l'ADN, tels que les cassures double brin radio-induites ou les pontages inter-brins peuvent être réparés par un processus de recombinaison génétique entre deux molécules homologues d'ADN. Pour effectuer la réparation, ce processus utilise l'identité de séquences entre les chromatides sœurs.

Le modèle actuel pour la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue implique la formation d'un hétéroduplex suite au couplage du brin endommagé à une région double brin homologue et intacte de l'ADN. Une resynthèse de l'ADN sur cette matrice intacte reconstitue le brin endommagé. La séparation des produits de la réaction nécessite l'action d'enzymes qui effectuent la jonction des brins d'ADN nouvellement synthétisés. Ce processus comporte l'action de plusieurs protéines du groupe d'épistasie RAD52.

D'abord, les cassures double brin sont reconnues par le complexe protéinique RAD50/MRE11/NBS1 qui se fixe à deux terminaisons de brins opposés situées de part et d'autre de la cassure double brin pour exciser quelques nucléotides (Annexe - Figure 2, étape I). Puis, la protéine RAD52 se lie aux deux autres terminaisons 3' des brins opposés situées de part et d'autre de la cassure double brin afin de les protéger contre la digestion par les endonucléases cellulaires. En présence de la protéine RAD51 et d'autres protéines comme RAD54, XRCC2, XRCC3, les deux brins portant RAD52 se couplent aux deux brins intacts (duplex) d'une chromatide sœur ou d'un chromosome homologue, en formant un hétéroduplex (étape II). Les brins intacts servent de matrice

pour les prolonger par une synthèse d'ADN réparatrice grâce à une ADN polymérase (étape II). Enfin, les deux brins se séparent ensuite du duplex homologue (résolution de jonctions de Holliday). Leur jonction et leur ligation aux terminaisons des brins façonnés sont assurées par l'ADN ligase I sans perte d'information génétique (étape IV).

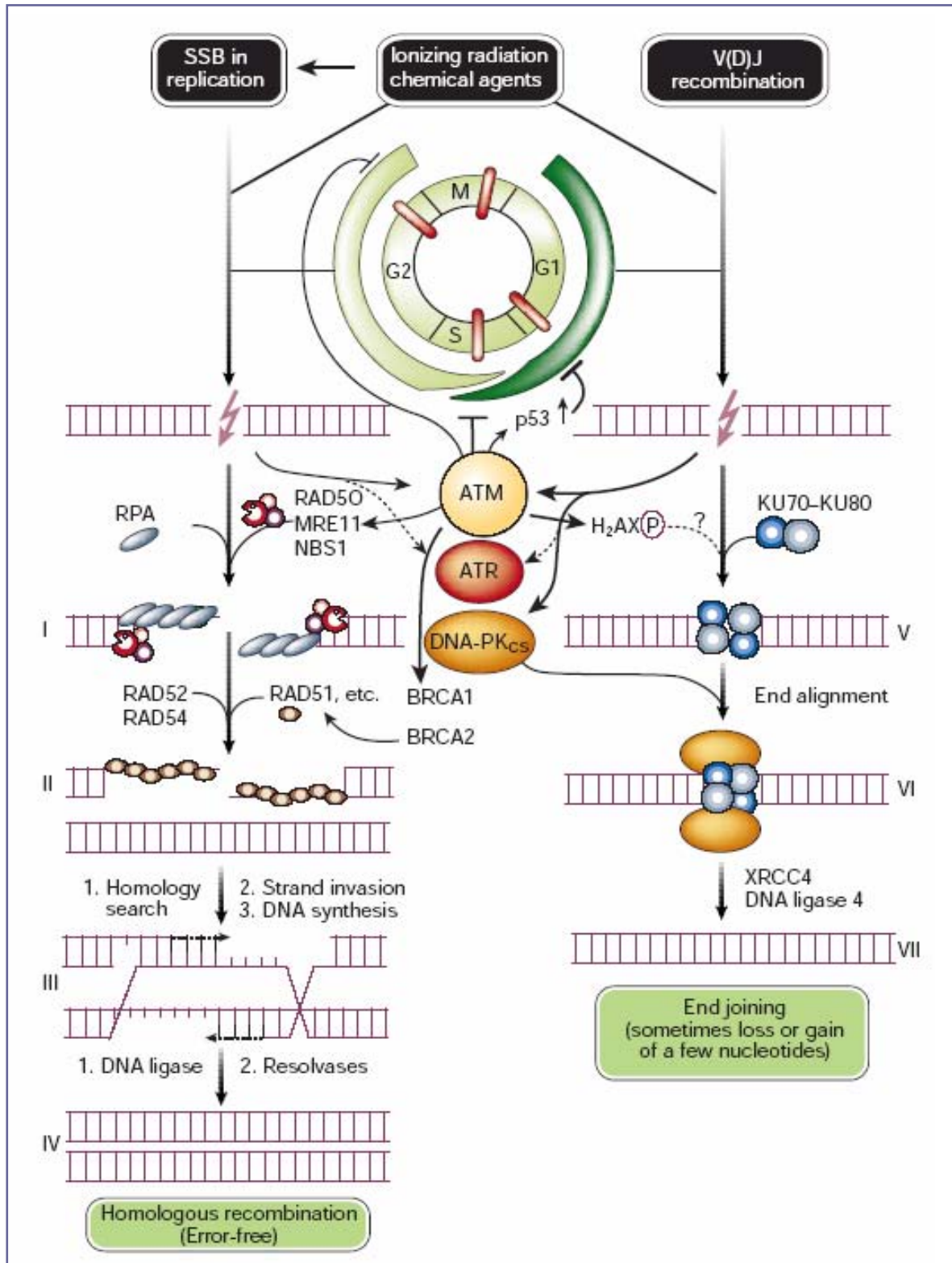
Ce mécanisme de recombinaison homologue implique bien d'autres molécules et interactions. La protéine ATM, une protéine kinase de la famille des phosphoinositidyle 3-kinases, et la tyrosine kinase c-Abl interviennent dans ce processus. La protéine RAD51 est phosphorylée par l'ensemble ATM/c-Abl, ce qui active l'interaction entre RAD51 et RAD52. Ces protéines participent donc à la régulation de la recombinaison homologue. En réponse aux radiations ionisantes, la protéine ATM phosphoryle la protéine BRCA1 qui stimule la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue en coopération avec les protéines BRCA2 et RAD51. La protéine BRCA1 est également impliquée dans la réparation des bases oxydées de l'ADN (thymine glycol) radioinduites et leur élimination sélective dans les brins activement transcrits.

La réparation par religation non-homologue est préférentiellement utilisée par les cellules de mammifères (donc chez l'Homme) pour réparer les cassures double brin. Elle joue en même temps un rôle fondamental dans la recombinaison V(D)J qui assure la diversité des immunoglobulines. La réparation par religation non homologue des cassures double brin ne nécessite pas d'homologie avec un autre duplex de l'ADN et n'utilise pas, ou très peu, de paires de bases homologues entre les extrémités de l'ADN cassé.

Deux hétérodimères de deux protéines KU (KU70 et KU80) se fixent aux extrémités des brins d'ADN cassés (étape V) et se complexent aux sous-unités catalytiques de la protéine kinase ADN dépendante (DNA-PKcs) (étape VI). La plupart des cassures double brin ne sont pas des coupures franches mais comportent des terminaisons simple brin modifiées qui doivent être coupées. Ainsi, le complexe de protéines MRE11/RAD50/NBS1, ayant une activité endo et/ou exonucléasique, intervient également dans ce processus, avant la religation. La voie de régulation ATM/p53 induit l'expression de la protéine KU70. La protéine histone H2A.X serait également rapidement phosphorylée en réponse à des cassures doubles brins afin de former des zones de réparation.

Enfin, les brèches sont probablement comblées par une ADN polymérase, qui n'est pas encore spécifiée. Puis, après alignement des brins, ceux-ci sont reliés par l'ADN ligase IV en présence de la protéine XRCC4 (X-ray cross complementing 4) (étape VII). Quand la protéine XRCC4 est absente, les cellules sont incapables d'effectuer

correctement la recombinaison V(D)J et elles deviennent hypersensibles aux radiations ionisantes dans toutes les phases du cycle cellulaire sauf la phase S.



Annexe - Figure 2 : Mécanismes de recombinaison homologue (homologous recombinaison) et de religation non homologue (end joining) (Hoeijmakers, 2001)



## Annexe 2 - Comparaison des techniques de dosage de l'uranium, cas des doubles expositions

### L'ICP-MS, un outil pour le suivi des contaminations internes à l'uranium

Article accepté dans « *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy* »

Sandrine Frelon, Marjorie Monleau, Elie Turlonias, Olivia Delissen, Valérie Chazel,  
François Paquet

IRSN, Direction de la Radioprotection de l'Homme, Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie, Laboratoire de Radiotoxicologie. BP 166, F-26702 Pierrelatte Cedex, France

Running title : ICP-MS et uranium post-inhalation.

Mots Clés : ICP-MS - Uranium - Inhalation - Biocinétiques différentielles

#### Abréviations

q.s.p. : quantité suffisante pour.

mBq : millibecquerel

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry

## Résumé

L'utilisation de l'ICP-MS pour le mesurage de radionucléides dans le secteur du nucléaire est particulièrement bien adaptée en raison de l'importante sensibilité, de la précision et de la large gamme de masse analysable avec cette technique de dosage.

Afin d'étudier chez le rat les biocinétiques différentielles après inhalation successives de deux oxydes d'uranium de solubilité et d'origine distinctes,  $UO_2$  et  $UO_4$ , le développement d'une méthode de mesurage de l'uranium provenant de chacun de ces deux oxydes a été mis en oeuvre. Les matrices biologiques étudiées ont été limitées à trois dans cette étude : l'ensemble poumons/trachée et le tractus gastro-intestinal, d'une part, et les urines d'autre part, étant respectivement les voies d'entrées et d'excrétion des contaminants après inhalation.

Après contaminations multiples, le mesurage de l'uranium dans les trois matrices choisies a été entrepris par KPA, ICP-MS et spectrométrie  $\alpha$ . Parallèlement, la répartition de l'uranium provenant de l' $UO_4$ , de l' $UO_2$  ou de l'uranium naturel est étudiée en ICP-MS et en spectrométrie  $\alpha$ . La concordance de l'ensemble des résultats valide la méthode développée en ICP-MS pour le suivi de contaminations internes multiples à l'uranium.

## Abstract

ICP-MS for radionuclide measurement in the nuclear field is considered as a very convenient technique owing to its high sensitivity and accuracy and to the possibility of a measurement of a large range of mass.

To study the different biokinetic behaviours of two different uranium oxides, insoluble  $UO_2$  and soluble  $UO_4$ , in rats after successive inhalations, an analytical procedure to measure the quantity of uranium coming from each oxide was developed. The number of biological matrix studied was limited: two ways of the airborne uranium entry, *i.e.* the set lung/trachea and the gastro-intestinal tract, and one way of excretion with urines.

After repeated inhalations of  $UO_2$  followed by one acute inhalation of  $UO_4$ , total uranium measurement in the different matrices was performed either with KPA, ICP-MS or with  $\alpha$ -spectrometry. In addition, the amount of uranium coming from  $UO_4$ ,  $UO_2$  or natural uranium, respectively, was calculated by ICP-MS and  $\alpha$ -spectrometry. All the results were compared and found to be similar. As a conclusion, the analytical procedure developed with ICP-MS was validated and ICP-MS was confirmed to be an efficient tool for the study of successive internal contaminations with uranium.

## Introduction

L'ICP-MS, très utilisé pour la mesure d'éléments stables tels le sélénium, l'arsenic et le zinc (1, 2), l'est également de plus en plus pour le dosage des radionucléides dans le secteur du nucléaire (3, 4) et de l'environnement (5-7).

L'utilisation de l'ICP-MS pour le mesurage de radionucléides dans le cadre d'un suivi médical du public (8) ou des travailleurs du nucléaire est particulièrement bien adaptée en raison de son importante sensibilité et de sa précision (9). Chez les travailleurs du cycle du combustible, l'inhalation est une des principales voies de contamination interne. De nombreux aérosols radioactifs sont concernés par cette voie d'entrée dans l'organisme et notamment des oxydes d'uranium tels que  $UO_2$  et  $UO_4$ . Cependant, la distribution systémique et, par conséquent la dose reçue après contamination, ne peut être évaluée qu'à partir des quantités retrouvées dans les excréta en utilisant des modèles biocinétiques adaptés aux modes de contamination et aux radioéléments considérés (10, 11). Ces modèles étant principalement établis à partir de données obtenues après contaminations accidentelles, il est important de les compléter et de les valider par des études *in vitro* (12) et surtout par des expériences *in vivo* de contamination par inhalation (13).

Dans ce contexte, une étude des biocinétiques différentielles de deux oxydes d'uranium de solubilités distinctes,  $UO_2$  et  $UO_4$ , a été effectuée chez le rat après inhalations successives. L'objectif était de déterminer si l' $UO_2$  insoluble, inhalé de façon répétée, avait une influence sur les biocinétiques d'un  $UO_4$  de retraitement, soluble, inhalé postérieurement de façon aiguë. Dans le cadre de ces recherches, le développement d'une méthode de mesurage de l'uranium provenant de chacun de ces deux oxydes a été mis en oeuvre. Le travail s'est focalisé dans un premier temps sur trois matrices biologiques. Les deux premières correspondent aux voies d'entrées des particules à savoir le tractus gastro-intestinal (TGI) et l'ensemble poumons/trachée, les poumons étant également considérés pour d'autres radioéléments comme une des principales cibles biologiques après inhalation (14, 15). La troisième matrice correspond à une des voies d'excrétion à savoir les urines.

Après contaminations multiples, les résultats des analyses de l'uranium total par KPA, ICP-MS et spectrométrie  $\alpha$  ont été comparés dans les trois matrices choisies. Parallèlement, la répartition de l'uranium provenant de l' $UO_4$ , de l' $UO_2$  ou de l'uranium naturel a été étudiée comparativement en ICP-MS et en spectrométrie  $\alpha$ .

## Matériel et Méthodes

### Produits Chimiques

UO<sub>2</sub> et UO<sub>4</sub> - Les deux composés uranifères, UO<sub>2</sub> et UO<sub>4</sub> utilisés pour la génération d'aérosols dans le cadre de cette étude ont été fournis par la Compagnie Générale des Matières Nucléaires (COGEMA, Pierrelatte, France). L'UO<sub>2</sub> est un oxyde d'uranium insoluble ; dans cette étude, sa composition isotopique en masse, correspond à <sup>238</sup>U = 99,755 %, <sup>235</sup>U = 0,244 %, <sup>234</sup>U = 0,001 %, <sup>236</sup>U < 0,0003 %, <sup>232</sup>U < 0,00001 % et sa densité est de 11,44. L'UO<sub>4</sub> utilisé, oxyde d'uranium soluble, est un produit issu du retraitement. Sa composition isotopique en masse, correspond à <sup>238</sup>U = 99,544 %, <sup>235</sup>U = 0,39 %, <sup>234</sup>U : 0,0047 %, <sup>236</sup>U : 0,061 %, <sup>232</sup>U : < 0,00001 % et sa densité est de 4,57.

Autres -L'acide nitrique 70% JT Baker (BAKER Instra-Analyzed, pour analyses de traces de métaux) ainsi que le peroxyde d'hydrogène 30% proviennent de chez Prolabo (France). L'eau purifiée (18,2 MΩ.cm) est produite par un système Milli-Q (Millipore, France).

### Animaux

Les rats Sprague Dawley mâles adultes âgés de 16 semaines et pesant 493 g ± 44 g proviennent de chez Charles River (Laboratoires Charles River, France). Les paramètres généraux de santé des animaux (poids, consommation d'eau et de nourriture) ont été suivis pendant toute la durée des expériences. L'étude a été réalisée en accord avec la législation française sur la protection des animaux de laboratoire (Ministère de l'Agriculture).

### Génération d'aérosols, inhalation et prélèvement des échantillons

Les conditions opératoires concernant la génération d'aérosols, l'inhalation et enfin la collecte des échantillons, ont été précédemment décrites par Monleau et al. (13). L'exposition des animaux âgés de 19 semaines au début de la période de contamination est réalisée en deux étapes. Une première série d'inhalations répétées d'UO<sub>2</sub> est réalisée pendant 3 semaines : 12 inhalations de 30 minutes à 197 mg.m<sup>-3</sup>. La deuxième série de contamination consiste en une inhalation aiguë d'UO<sub>4</sub>, 30 minutes à 116 mg.m<sup>-3</sup> (= t<sub>0</sub>), 11 jours après l'exposition répétée d'UO<sub>2</sub>. Les animaux sont ensuite placés en cage à métabolisme afin de collecter quotidiennement les urines et les féces.

Aux temps t<sub>0</sub> + 4h / + 1 jour / + 3 jours / + 7 jours / + 16 jours, les animaux sont euthanasiés pour prélever les organes d'intérêt, en particulier le tractus gastro-intestinal (TGI) et l'ensemble poumons/trachée. Ces organes sont minéralisés, après



calcination à 600°C, par ajouts répétés de HNO<sub>3</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suivis d'une évaporation à 110°C, comme décrit par Ejniak et al. (16). Les minéralisés sont ensuite repris dans un volume précis de HNO<sub>3</sub> 2.5N ultra pur de 5 mL pour l'ensemble poumons/trachée, 30 mL pour le TGI et 5 mL pour les urines minéralisées qui ne seront analysées qu'au KPA et en spectrométrie  $\alpha$ .

### Mesurage de l'Uranium

#### *Kinetic Phosphorescence Analyzer*

Un KPA (Chemchek, Richland, USA) est utilisé pour déterminer la quantité d'uranium pondéral. La méthode de dosage est basée sur la mesure de la cinétique de décroissance de la phosphorescence de l'uranium après excitation LASER (17). Les échantillons de poumons/trachée, de TGI et d'urines minéralisées sont dilués dans de l'acide nitrique 1,25N respectivement au 1/100 000<sup>ème</sup>, 1/10 000<sup>ème</sup> et 1/200<sup>ème</sup>. La mesure est ensuite réalisée après étalonnage de l'appareil sur une gamme de [0-10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ] d'uranium dans de l'acide nitrique 1,25N.

#### *Spectrométrie $\alpha$*

L'ensemble des conditions opératoires de préparation de l'échantillon, d'électrodéposition et de comptage en spectrométrie  $\alpha$  a été préalablement décrit et optimisé par Gillier *et al.* (18). Cette optimisation a conduit à un dépôt maximum de 500 mBq pour éviter le chevauchement ou le recouvrement des pics d'<sup>235</sup>U et d'<sup>236</sup>U, peu intenses et d'énergies intermédiaires, par les pics d'<sup>238</sup>U et d'<sup>234</sup>U, les plus intenses. A un volume précis d'échantillon, respectivement 100  $\mu\text{L}$ , 4 mL et 3,5 mL pour l'ensemble poumons/trachée, le TGI et les urines, sont ajoutés 100  $\mu\text{L}$  d'une solution d'<sup>232</sup>U (761 mBq/mL) qui sert de traceur de dilution isotopique. L'ensemble est complété par de l'acide nitrique 2N (q.s.p 5 mL) puis déposé sur colonne de résine TRU (EICHROM, France), 100-150  $\mu\text{m}$ , ayant comme principe extractant l'oxyde d'octylphenyl-((N,N)-diisobutylcarbamoyl)-phosphine (CMPO). La rétention puis l'élution de l'uranium se fait par ajouts successifs d'acide nitrique 2N (5 mL), d'acide nitrique 1N (2x5 mL) et d'oxalate d'ammonium 0,1M (12 mL). 4 mL d'une solution de sulfate d'ammonium 4N sont ensuite ajoutés avant électrodéposition (EDP 7000 - 1.25A - 50 tours/min pendant 2h30). 1 mL d'ammoniaque pure est ajouté dans chaque échantillon à la fin de l'électrodéposition, les pastilles sont ensuite rincées à l'eau milliQ. La spectrométrie  $\alpha$  des échantillons est effectuée pendant 300000s sur un spectromètre  $\alpha$  EG&G ORTEC, chaque chambre de comptage étant munie de détecteurs ULTRA<sup>TM</sup> (Perkin Elmer Instruments, USA). Le logiciel d'exploitation est le logiciel VISU Alpha (A&M, France).

Après comptage, l'activité de chaque isotope dans l'échantillon est obtenue et ramenée à une concentration massique en utilisant l'activité spécifique de chaque isotope et le volume précis d'échantillon électrodéposé. L'activité spécifique des isotopes étudiés est la suivante :  $^{234}\text{U} = 2,3 \times 10^5 \text{ kBq.g}^{-1}$ ,  $^{235}\text{U} = 79.5 \text{ kBq.g}^{-1}$ ,  $^{236}\text{U} = 2,4 \times 10^3 \text{ kBq.g}^{-1}$ ,  $^{238}\text{U} = 12.3 \text{ kBq.g}^{-1}$ .

### ICP-MS

*Appareillage* - Un ICP-MS quadripolaire VG Plasma Quad EXCEL (ThermoElectron, France) équipé de l'option S a été utilisé pour le développement de la méthode et son application. L'introduction de l'échantillon s'effectue avec un nébuliseur de type concentrique (Glass Expansion, ThermoElectron, France) et une chambre de nébulisation à bille d'impact (ThermoElectron, France). La chambre de nébulisation est refroidie à 4°C par effet Peltier pour assurer notamment une stabilité de la température. Le système d'injection est composé d'une pompe péristaltique SPETEC Perimax 12 (ThermoElectron, France) avec, en série, un passeur d'échantillons CETAC Technologies ASX 500 (ThermoElectron, France).

*Optimisation* - Une solution standard multi-élémentaire (Analab, France) a été utilisée pour optimiser les conditions opératoires et obtenir le meilleur rapport signal/bruit pour  $^{238}\text{U}$ .

*Etalonnage* - Dans toutes les solutions préparées, échantillons ou calibrage, un étalon interne de  $^{209}\text{Bi}$  (Analab, France) est présent à une concentration de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Cet étalon interne permet notamment de corriger la dérive potentielle du signal au cours de l'analyse. Six solutions étalons à 0, 0,01, 0,1, 0,5, 1 et  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$  ont été préparées par dilutions d'une solution d' $\text{UO}_4$   $1 \text{ mg.L}^{-1}$  dans de l'acide nitrique Ultra pur 2% et ont permis l'étalonnage de l'appareil pour les différents isotopes étudiés,  $^{235}\text{U}$ ,  $^{236}\text{U}$  et  $^{238}\text{U}$ . Une relation linéaire Nombre de coups ( $i\text{U}$ ) =  $f([i\text{U}])$  a ainsi pu être établie pour chaque isotope,  $i = [235 ; 236 ; 238]$  et  $[i\text{U}]$  étant la concentration de l'isotope en  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Cette solution d' $\text{UO}_4$  précisément caractérisée par le fournisseur est utilisée comme matériau de référence pour toutes les analyses effectuées.

De même, des solutions de contrôle à  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  dans les trois matrices biologiques étudiées ont été préparées avec cette solution d' $\text{UO}_4$  en « spikant » un ensemble de matrices témoins. Ces solutions ont été analysées régulièrement pour assurer la justesse des résultats fournis par l'ICP-MS.

Enfin, il a été vérifié que le taux d'hydrures était négligeable et que donc le nombre de coups en  $^{235}\text{U}$  n'influait pas le dosage de l' $^{236}\text{U}$ .

*Echantillons* - Les échantillons d'urines ont été directement analysés, sans minéralisation préalable. Après agitation, les échantillons sont dilués au 1/500<sup>ème</sup> dans de l'acide nitrique Ultra pur 2%. Les échantillons de poumons/trachée et de TGI ont été respectivement dilués au 1/200000<sup>ème</sup> et au 1/1000<sup>ème</sup> dans de l'acide nitrique Ultra pur 2%.

#### Calcul du pourcentage d'U venant de l'UO<sub>4</sub> par rapport à l'U<sub>total</sub>

Ce calcul ne peut se faire qu'après les mesures réalisées en spectrométrie  $\alpha$  et en ICP-MS. Sachant que l'<sup>236</sup>U n'est présent que dans l'UO<sub>4</sub> de retraitement, la quantité d'uranium venant de cet oxyde sera calculée, pour chaque échantillon analysé, à partir de l'isotopie en masse de l'UO<sub>4</sub> de départ, à savoir 0,061 % de <sup>236</sup>U ; les équations (1) à (3) résument le calcul effectué.

$$[U_{total}] \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = ([^{234}\text{U}] + [^{235}\text{U}] + [^{236}\text{U}] + [^{238}\text{U}]) \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} \quad (1)$$

$$[UO_4] \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = [^{236}\text{U}] / 0,00061 \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} \quad (2)$$

$$\%UO_4 = 100 * [UO_4] / [U_{total}] \quad (3)$$

L'équation (2) ainsi que la composition isotopique de l'UO<sub>4</sub> permettent le calcul de [<sup>235</sup>U<sub>UO4</sub>] et [<sup>238</sup>U<sub>UO4</sub>] (mg.L<sup>-1</sup>). Enfin par la résolution du système d'équations (4) et (5) après analyse ICP-MS, une estimation de la quantité d'U provenant de l'UO<sub>2</sub> de départ et de l'uranium naturel peut être effectuée. L'isotopie en masse de l'uranium naturel est la suivante : 99,28 % <sup>238</sup>U, 0,72 % <sup>235</sup>U et 0,0055 % <sup>234</sup>U.

$$[^{235}\text{U}_{total}] - [^{235}\text{U}_{UO_4}] \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = 0,00244 * [UO_2] + 0,0072 * [U_{Naturel}] \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} \quad (4)$$

$$[^{238}\text{U}_{total}] - [^{238}\text{U}_{UO_4}] \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = 0,99755 * [UO_2] + 0,9928 * [U_{Naturel}] \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} \quad (5)$$

Par contre, en spectrométrie  $\alpha$ , étant donnée la faible sensibilité de l'isotope <sup>236</sup>U, deux méthodes de calcul ont été envisagées : résoudre le système d'équations (6) à (8), l'ensemble des concentrations étant exprimées en mg.L<sup>-1</sup>, ou déterminer [UO<sub>4</sub>] (mg.L<sup>-1</sup>) avec l'équation (2) puis résoudre le système d'équations (6) et (8).

$$[^{234}\text{U}_{total}] = 0,0047 \% * [UO_4] + 0,001 \% * [UO_2] + 0,0055 \% * [U_{Naturel}] \quad (6)$$

$$[^{235}\text{U}_{total}] = 0,0039 * [UO_4] + 0,00244 * [UO_2] + 0,0072 * [U_{Naturel}] \quad (7)$$

$$[^{238}\text{U}_{total}] = 0,99544 * [UO_4] + 0,99755 * [UO_2] + 0,9928 * [U_{Naturel}] \quad (8)$$

#### Calcul des incertitudes de mesurage

Le calcul d'incertitude dans cette étude ne se veut pas exhaustif mais a pour but de comparer les incertitudes de mesurage introduites par chaque méthode d'analyse. Le traitement de l'échantillon, *i.e.* dilution et minéralisation, étape commune aux trois techniques, n'a donc pas été pris en compte, au contraire de l'étape d'électrodéposition, propre à la spectrométrie  $\alpha$ . L'incertitude absolue composée

( $\Delta U_{\text{total}}$ ) considérée ici a été calculée comme suit, sans appliquer de facteur d'élargissement :

$$\Delta U_{\text{total}} = \sqrt{(\sigma_{\text{répétabilité}}^2 + \sigma_{\text{justesse}}^2)},$$

$\sigma_{\text{répétabilité}}$  étant l'écart-type calculé après analyse de 5 répliquas et  $\sigma_{\text{justesse}}$  étant l'incertitude calculée après analyse du matériau de référence et en tenant compte de la courbe d'étalonnage.

En ICP-MS et spectrométrie  $\alpha$ , l'incertitude absolue sur la concentration totale d'uranium ( $\Delta U_{\text{total}}$ ) s'écrit :

$$\Delta U_{\text{total}} = \Delta^{234}\text{U} + \Delta^{235}\text{U} + \Delta^{236}\text{U} + \Delta^{238}\text{U},$$

où  $\Delta^{234}\text{U}$ ,  $\Delta^{235}\text{U}$ ,  $\Delta^{236}\text{U}$  et  $\Delta^{238}\text{U}$  correspondent respectivement aux incertitudes absolues sur les concentrations d' $^{234}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$ ,  $^{236}\text{U}$  et  $^{238}\text{U}$ .

Ces incertitudes de mesure sont soit données par le logiciel de traitement des spectres en spectrométrie  $\alpha$ , soit calculées comme précédemment décrit :

$$(\Delta^i\text{U} = \sqrt{(\sigma_{\text{répétabilité}}^2(i\text{U}) + \sigma_{\text{justesse}}^2(i\text{U}))}).$$

L'incertitude résultant de la détermination du pourcentage d' $\text{UO}_4$  ( $\Delta\%\text{UO}_4$ ) se calcule comme suit :

$$\Delta(\%\text{UO}_4)/(\%\text{UO}_4) = (\Delta[\text{UO}_4] / [\text{UO}_4]) + (\Delta[\text{U}_{\text{total}}]/[\text{U}_{\text{total}}]),$$

où  $\Delta[\text{UO}_4]$  et  $\Delta[\text{U}_{\text{total}}]$  sont les incertitudes absolues sur les concentrations d' $\text{UO}_4$  et d' $\text{U}_{\text{total}}$ .

Les incertitudes relatives correspondent au quotient de l'incertitude absolue par la valeur mesurée et sont indiquées en %.

### Tests statistiques

Les tests statistiques (Student apparié et Wilcoxon) ont été effectués à l'aide du logiciel Statview

## Résultats et Discussion

### Uranium total

Les données obtenues par la comparaison des trois techniques de mesurage de l'uranium total sont résumées dans Annexe - Tableau 1. Les trois méthodes donnent des résultats concordants malgré des principes de dosage totalement différents et un traitement chimique nécessaire pour la préparation de l'échantillon en spectrométrie  $\alpha$ .

*Annexe - Tableau 1 : Comparaison des dosages de l'uranium total réalisés par ICP-MS, KPA et spectrométrie  $\alpha$*

Organe	Date	ICP-MS (U <sub>total</sub> mg.L <sup>-1</sup> )	+/- (%)	KPA (U <sub>total</sub> mg.L <sup>-1</sup> )	+/- (%)	Spectrométrie $\alpha$ (U <sub>total</sub> mg.L <sup>-1</sup> )	+/- (%)
Poumons / Trachée <sup>a</sup>	4h	318,5	2,3	354,4	6,2	341,7	2,6
	1 jour	442,3	2,1	378	6,2	358,8	2,7
	3 jours	242,9	1,9	258,3	6,2	239,3	2,6
	7 jours	226,9	2,0	346,6	6,2	264,5	2,6
	16 jours	292,5	2,0	389,6	8,0	414,6	2,6
Urines <sup>b</sup>	1 jour	0,72	3,0	0,43	4,2	0,61	4,0
	2 jours	3,28	2,2	2,48	4,4	3,37	2,9
	3 jours	0,81	4,1	0,84	4,3	1,08	3,7
	4 jours	0,195	2,0	0,176	4,0	0,23	5,7
	9 jours	0,125	2,0	0,305	4,3	0,43	4,4
TGI <sup>a</sup>	4h	32,4	2,0	20,31	7,9	30,83	2,7
	1 jour	2,66	2,0	2,2	10,5	2,72	1,7
	3 jours	1,02	2,1	0,91	7,7	0,99	3,4
	7 jours	0,47	2,3	0,41	4,9	0,74	3,6

<sup>a</sup> Les concentrations rapportées ici correspondent à celles des solutions de reprise des minéralisats dans HNO<sub>3</sub> 2% utilisées pour les trois méthodes, une fois la dilution prise en compte. <sup>b</sup> Les concentrations rapportées ici correspondent soit, à la concentration des urines non minéralisées (ICP-MS), soit, à celles des solutions de reprise dans 5 mL de HNO<sub>3</sub> 2%, après minéralisation de 5mL d'urine. Les incertitudes relatives associées aux calculs sont notées (+/-) et données en %.

Pour asseoir ces résultats, deux tests statistiques différents (Student apparié et Wilcoxon) ont été effectués, soit par matrices étudiées soit sur l'ensemble des données. Les valeurs de p obtenues par ces tests sont rassemblées dans Annexe - Tableau 2a. Supérieures à 30% dans leur ensemble, elles montrent que les résultats obtenus par ICP-MS / KPA et spectrométrie  $\alpha$  ne présentent aucune différence significative. Cependant,

la moyenne des incertitudes relatives regroupées dans Annexe - Tableau 1 est de 6,2 % au KPA, de seulement 3.2% en spectrométrie  $\alpha$  et 2.3% en ICP-MS. L'ICP-MS apparaît donc comme la technique la plus précise des trois.

De plus, une légère sous-estimation des résultats obtenus au KPA pour les deux maxima des matrices TGI et urines est observée. Cette différence peut s'expliquer par l'absence d'étalon interne pour cette technique de dosage ainsi que par l'application d'un facteur de dilution important.

Cette mesure de la concentration de l'uranium total nous permet ainsi de tracer un profil biocinétique global. Cependant, dans le cadre de contaminations multiples, l'intérêt de développer une méthode d'analyse réside dans la possibilité de discriminer les deux oxydes d'uranium utilisés pour les contaminations.

*Annexe - Tableau 2a : Tests statistiques relatifs au Tableau 1, comparaison des méthodes d'analyse deux à deux*

	ICP-MS / KPA	ICP-MS / SA	KPA / SA
<b>Ensemble des données</b>	<b>Test de Wilcoxon</b>		
Valeurs de p	0,73	0,33	0,73
<b>Organes Différenciés</b>	<b>Test Student apparié</b>		
Poumons/Trachées - Valeurs de p	0,28	0,59	0,28
Urines - Valeurs de p	0,36	0,51	0,34
TGI - Valeurs de p	0,45	0,11	0,12

SA, spectrométrie  $\alpha$

#### Pourcentage d'uranium provenant de l' $\text{UO}_4$ dans l'échantillon

Après analyse en ICP-MS et en spectrométrie  $\alpha$ , le pourcentage d'uranium venant de l' $\text{UO}_4$  a été calculé, dans un premier temps, à partir de l'abondance isotopique de  $^{236}\text{U}$  dans l' $\text{UO}_4$ . L'Annexe - Tableau 3 résume les résultats obtenus par les deux techniques d'analyse, pour les trois structures étudiées, aux différents temps. Les données issues des analyses en ICP-MS et en spectrométrie  $\alpha$  sont similaires dans leur ensemble. Deux tests statistiques, regroupés dans Annexe - Tableau 2b, attestent de ce résultat par des valeurs de  $p > 0,2$ . De plus, les incertitudes relatives associées aux résultats des deux techniques sont assez homogènes et leur moyenne est respectivement de 16,7 et 17,4 en ICP-MS et en spectrométrie alpha.

*Annexe - Tableau 3 : Comparaison des pourcentages d'uranium provenant de l' $UO_4$  (%  $UO_4$ ) par rapport à l'uranium total mesurés par ICP-MS et spectrométrie  $\alpha$*

Organe	Date	ICP-MS % $UO_4^{(a)}$	+/- (%)	Spectrométrie $\alpha$ % $UO_4^{(a)}$	+/- (%)
Poumons/Trachée	4h	7,4	9,8	7,18	28,4
	1 jour	4,5	22,3	7,17	24,3
	3 jours	1,39	33,7	3,56	28,3
	7 jours	0,66	39,5	ND	-
	16 jours	0,8	40,9	ND	-
Urines	1 jour	102,1	7,7	93,2	13,2
	2 jours	96,9	6,4	96,3	7,2
	3 jours	92,5	10,1	81	11,0
	4 jours	87,6	8,4	54,1	25,2
	9 jours	57,97	8,5	79,9	27,3
TGI	4h	90,4	6,2	81,1	6,2
	1 jour	66,4	6,7	58,4	7,0
	3 jours	37,2	7,6	35,4	13,5
	7 jours	2,42	25,9	ND	-

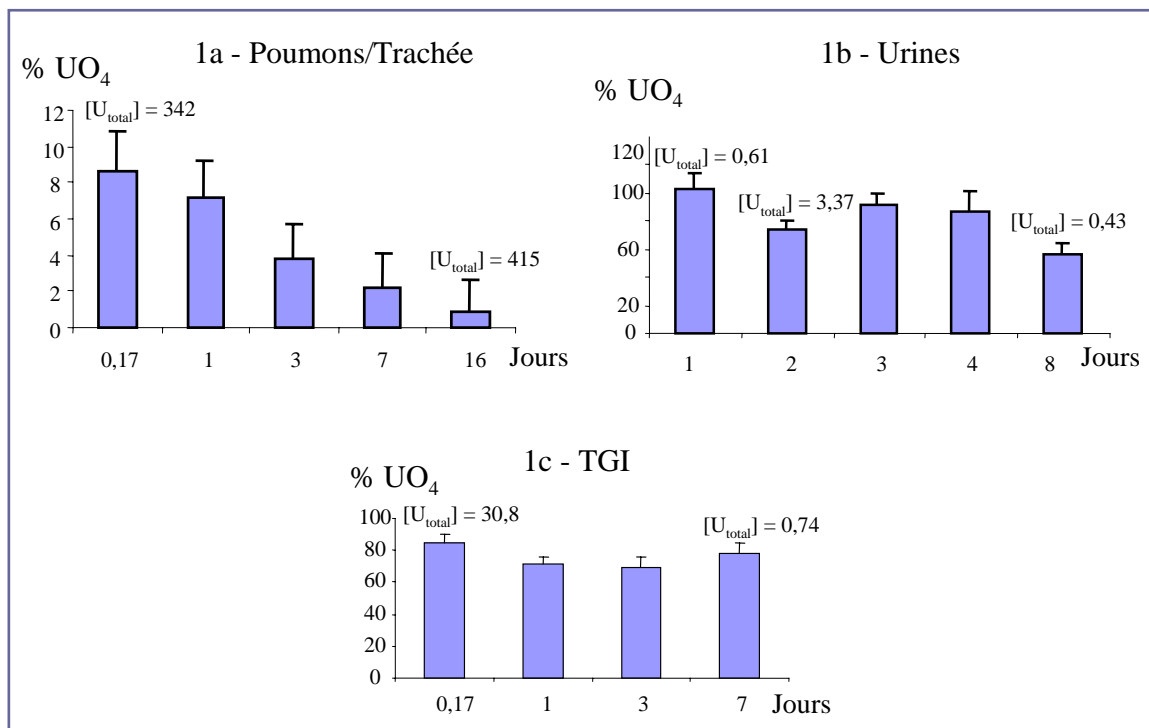
<sup>(a)</sup> %  $UO_4$  = % d'uranium provenant de l' $UO_4$  de départ. Les incertitudes relatives associées aux calculs sont notées (+/-) et données en %.

*Annexe - Tableau 2b : Tests statistiques relatifs au Tableau 3 (% $UO_4$ ), comparaison ICP-MS / Spectrométrie  $\alpha$*

Ensemble des données	Test de Wilcoxon
Valeur de p	0,21
Organes Différenciés	Test Student apparié
Poumons/Trachées - Valeurs de p	0,23
Urines - Valeurs de p	0,51
TGI - Valeurs de p	0,11

Cependant, en spectrométrie  $\alpha$  des incertitudes relatives plus élevées dans le cas des urines 4 et 9 jours sont observées. La faible activité du dépôt analysé pour ces urines, ~20 mBq, ainsi que le manque de sensibilité de l'isotope  $^{236}U$  peuvent expliquer ces chiffres. De même, les % $UO_4$  pour l'ensemble poumons/trachée à 7 et 16 jours ainsi que pour le TGI à 7 jours n'ont pu être calculés à cause du manque de sensibilité de ce même isotope. Afin de s'affranchir de ces imprécisions en spectrométrie  $\alpha$ , un autre mode de calcul a été mis en œuvre. Il implique de négliger la contribution potentielle de l'uranium naturel dans les échantillons et de vérifier ensuite que cette hypothèse

n'est pas erronée. Le bilan en masse ne se fait alors que sur les isotopes  $^{234}\text{U}$  et  $^{238}\text{U}$ , les plus sensibles en spectrométrie  $\alpha$ . Les résultats sont donnés dans Annexe - Figures 3, pour l'ensemble poumons/trachée, les urines et le TGI, respectivement.



*Annexe - Figure 3 : Pourcentage d'uranium provenant de l' $\text{UO}_4$  (%  $\text{UO}_4$ ) versus uranium total dans l'ensemble poumons/trachée (1a), les urines (1b) et le TGI (1c)*

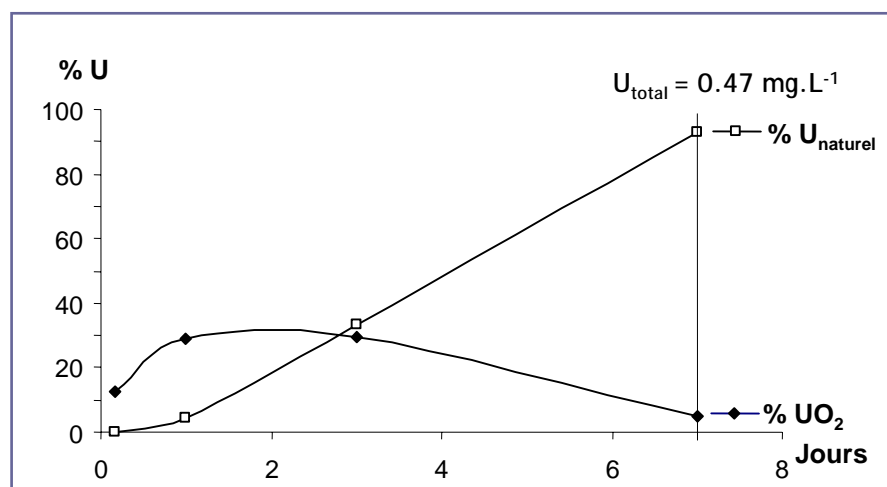
Résultats obtenus en spectrométrie  $\alpha$ , en négligeant la contribution de l'uranium naturel. La concentration d'uranium total  $[\text{U}_{\text{total}}]$  est exprimée en  $\text{mg.L}^{-1}$ .

En ce qui concerne l'ensemble poumons/trachée et les urines, les tendances sont identiques à celles observées dans Annexe - Tableau 3. Ceci tend à montrer que l'hypothèse de négliger la contribution de l'uranium naturel n'est pas erronée dans nos conditions. Ces deux organes étant respectivement voie d'entrée et voie d'excrétion du contaminant, il paraît logique d'avoir peu d'uranium naturel proportionnellement aux deux oxydes d'uranium de contamination : l' $\text{UO}_4$ , soluble donc rapidement éliminé, et l' $\text{UO}_2$ , insoluble dont la proportion dans les poumons d'après les données ICP-MS passe de 90 à 100% sur la période d'étude. Cette approximation permet alors le calcul des deux derniers points pour l'ensemble poumons/trachée à 7 et 16 jours, respectivement 2,2 et 0,8%. En tenant compte des incertitudes associées, ces deux derniers résultats concordent avec ceux trouvés en ICP-MS et présentés dans Annexe - Tableau 2.

Par contre, dans le cas du TGI, les tendances diffèrent de celles observées dans Annexe - Tableau 3. Dans le TGI, qui sert principalement de voie de passage des



contaminants vers l'excrétion par les fèces, il est compréhensible que la concentration des oxydes d'uranium utilisés pour les contaminations diminue rapidement. Le pourcentage d'uranium naturel ne peut donc pas être considéré comme négligeable pour cette matrice étudiée et le calcul ne peut donc pas se faire sur les seuls isotopes  $^{234}\text{U}$  et  $^{238}\text{U}$ . Cette hypothèse est vérifiée par l'évaluation des pourcentages d'uranium provenant de l' $\text{UO}_2$  et de l' $\text{U}_{\text{naturel}}$  (Annexe - Figure 4). Ces données, calculées après analyses ICP-MS, montrent que sur l'ensemble de la période d'étude, le pourcentage d'uranium naturel varie dans le TGI de 0 à 100%.



*Annexe - Figure 4 : Evaluation du pourcentage d'uranium provenant de l' $\text{UO}_2$  (%  $\text{UO}_2$ ) et de l'uranium naturel (%  $\text{U}_{\text{naturel}}$ ) versus uranium total dans le TGI*

Résultats obtenus en ICP-MS après calcul du %  $\text{UO}_4$  avec l'isotope  $^{236}\text{U}$  suivi d'un bilan en masse sur les isotopes  $^{235}\text{U}$  et  $^{238}\text{U}$ .

Dans ce dernier cas, il a été vérifié qu'un calcul fait à partir du bilan en masse sur les isotopes  $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  et  $^{234}\text{U}$  n'amenait pas plus de précisions dans la détermination des différentes quantités d'uranium venant de l' $\text{UO}_4$ , de l' $\text{UO}_2$  et de l'uranium naturel. Par conséquent, le % $\text{UO}_4$  pour le TGI à 7 jours n'a pas pu être calculé en spectrométrie  $\alpha$  dans nos conditions.

## Conclusion

Dans ce travail, l'ICP-MS, de par sa précision et la possibilité de détection des différents isotopes de l'uranium, apparaît comme un outil de mesure fiable, adapté et performant permettant l'étude, après inhalation, de biocinétiques différentielles entre un oxyde d'uranium insoluble ( $\text{UO}_2$ ) et un composé soluble  $\text{UO}_4$ . En effet, la comparaison des résultats issus des différentes méthodes de mesure donne des résultats concordants. De plus, en ICP-MS, les incertitudes sur les mesures sont un peu plus faibles, la sensibilité sur l' $^{236}\text{U}$ , isotope clé pour le calcul, est plus grande et la préparation des échantillons moins fastidieuse qu'en spectrométrie  $\alpha$  où le traitement chimique et l'électrodéposition de chaque échantillon sont nécessaires. Dans un second temps, même si *in vivo* la variabilité inter-individu reste l'incertitude la plus importante, il serait intéressant de pouvoir analyser ces échantillons avec un ICP-MS multi-collection, permettant ainsi de réduire à quelques  $10^{-3}\%$  l'incertitude sur l'isotopie des échantillons.

Pour conclure, la discrimination entre l'uranium naturel et les deux oxydes d'uranium venant de la contamination permet de déterminer la quantité réellement intégrée par l'organisme contaminé, ses organes cibles et la dose reçue. Ainsi, le dosage permet, tout d'abord, d'évaluer la quantité d'uranium par matrice et de compléter les données biocinétiques permettant d'établir les modèles CIPR, mais aussi de comprendre et d'argumenter l'origine d'effets biologiques potentiels.

## Remerciements

Les auteurs souhaitent remercier C. Gillier du LRTOX et le personnel du Service d'Hygiène Industrielle (IRSN), pour la mise au point et l'optimisation des conditions opératoires en spectrométrie  $\alpha$ . Cette méthode a été développée dans le cadre d'un programme en partie financé par COGEMA (Programme DOSINTER).

## Références

- (1) A. Stenberg, H. Andrén, D. Malinovsky, E. Engström, I. Rodushkin and D. C. Baxter, *76*, 14 (2004).
- (2) S. Stürup, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *378*, 2 (2004).
- (3) N. Baglan, C. Cossonnet, F. Tromprier, J. Ritt and P. Berard, *Health Phys.*, *77*, 4 (1999).
- (4) D. Schaumlöffel, P. Giusti, M. V. Zoriy, C. Pickhardt, J. Szpunar, R. Lobiskinski and J. S. Becker, *J. Anal. At. Spectrom.*, *20*, 1 (2005).
- (5) M. E. Ketterer, K. M. Hafer, C. L. Link, C. S. Royden and W. J. Hartsock, *J Environ Radioact*, *67*, 3 (2003).
- (6) U. Nygren, I. Rodushkin, C. Nilsson and D. C. Baxter, *J. Anal. At. Spectrom.*, *18*, (2003).
- (7) J. Twining, P. McGlenn and K. Hart. *Radiation Protection in Australia*, *11*, 4 (1993).
- (8) Z. Karpas, A. Lorber, E. Elish, R. Kol, Y. Roiz, R. Marko, E. Katorza, L. Halicz, J. Riondato, F. Vanhaecke and L. Moens, *Health Phys.*, *74*, 3 (1998).
- (9) J. W. Ejnik, A. J. Carmichael, M. Hamilton, M. McDiarmid, K. Squibb, P. Boyd and W. Tardiff, *Health Phys.*, *78*, 2 (2000).
- (10) ICRP, Eds ICRP. "Publication 66", Pergamon Press, Oxford, 1994.
- (11) ICRP, Eds ICRP, In "Publication 69", Pergamon Press, Oxford, 1995, p 57.
- (12) E. Ansoborlo, V. Chazel, P. Houpert, M. H. Henge-Napoli, F. Paquet, A. Hodgson and N. Stradling, *Health Phys.*, *75*, 4 (1998).
- (13) M. Monleau, E. Blanchardon, M. Claraz, F. Paquet and V. Chazel, *Radioprotection*, (2005) Soumis.
- (14) P. Boffetta, E. Cardis, H. Vainio, M. P. Coleman, M. Kogevinas, G. Nordberg, D. M. Parkin, C. Partensky, D. Shuker and L. Tomatis, *Eur J Cancer.*, *27*, 11 (1991).
- (15) J. H. Lubin, *Am. J. Epidemiol.*, *140*, 4 (1994).
- (16) J. W. Ejnik, M. M. Hamilton, P. R. Adams and A. J. Carmichael, *J Pharm Biomed Anal.*, *24*, 2 (2000).
- (17) M. A. Hedaya, H. P. Birkenfeld and R. L. Kathren, *J Pharm Biomed Anal.*, *15*, 8 (1997).
- (18) C. Gillier and V. Chazel, *Communication Personnelle*, (2003).

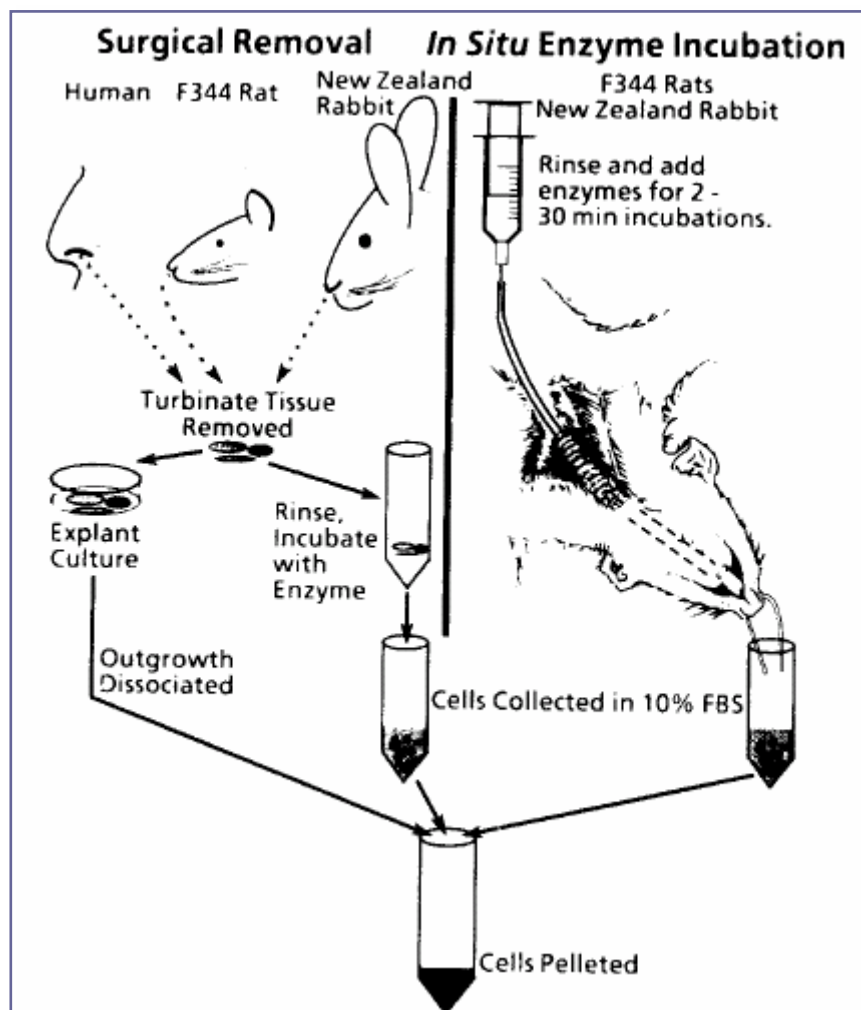


## Annexe 3 - Protocole du test des comètes réalisé *in vivo* sur les différents types cellulaires

Les animaux sont anesthésiés par injection de pentobarbital puis euthanasiés par exsanguination par l'artère abdominale. Une partie du sang est récoltée dans un tube de prélèvement sanguin (sans héparine).

### Annexe 3.1 - Isolement des cellules épithéliales nasales

La technique d'isolement des cellules épithéliales nasales est tirée du protocole d'incubation enzymatique *in situ* décrit par Steele en 1985 (Steele et Arnold, 1985) (Annexe - Figure 5).



Annexe - Figure 5 : Schéma des techniques de prélèvements des cellules épithéliales nasales (Steele, 1985)

Ce protocole est le suivant :

Couper et suturer la trachée, dégager le poumon afin de réaliser en parallèle le protocole décrit en Annexe 3.2.

Faire une incision entre les anneaux de la trachée près du larynx.

Insérer un cathéter dans la trachée qui servira à mettre et enlever le liquide de lavage et le milieu enzymatique.

Faire une suture bien serrée autour de la trachée pour sécuriser le cathéter, une suture à l'œsophage et une suture au niveau de la cavité pharyngienne ; cela permet d'éviter que le milieu injecté via le cathéter ne ressorte par la bouche.

Rincer la cavité nasale avec 10 ml de milieu MEM + 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de gentamicine (à 37°C) en utilisant une seringue adaptée au cathéter.

Remplir la cavité nasale avec 1 mL de mélange enzymatique (à 37°C). Laisser incubé 30 min à t° ambiante.

Injecter 20 mL de MEM (+ gentamicine) à 37°C : récupérer ce milieu qui contient les cellules dissociées en plaçant un tube Falcon 50 mL au niveau des narines.

Mettre le tube Falcon sur la glace et ajouter du FBS à 10% pour inhiber l'activité des enzymes.

Refaire une incubation enzymatique de 30 min.

Cumuler les cellules des 2 incubations.

Centrifuger à 2000 g pendant 15 min.

Reprendre dans 250  $\mu\text{L}$  de PBS.

Ce protocole permet de récupérer entre 0,5 à 1,10<sup>6</sup> cellules / rat.

Composition du mélange enzymatique (à préparer dans du tampon MEM au dernier moment) :

- protéase type XIV (Sigma, P5147) à 0.5%,
- collagenase type IV (Sigma, C5138) à 0.1%,
- hyaluronidase type IV-S (Sigma, H3884) à 0.1%.

### Annexe 3.2 - Isolement des cellules du lavage broncho-alvéolaire (BAL)

Réaliser un lavage pulmonaire :

Utiliser une pipette de 10 mL en ajoutant comme embout un cône plastique coupé.

Injecter le sérum physiologique par la trachée, ré-aspirer et déposer le sérum, qui contient alors les cellules non adhérentes contenues dans le poumon, dans un tube Falcon 50 mL.

Laver ainsi le poumon avec un volume total de 45 mL de sérum physiologique à 37°C.

Commencer les lavages avec 2 mL puis augmenter progressivement à 5 mL.

Débuter le lavage avec massage des poumons après les premiers 20 mL de sérum, cela permet de récupérer un maximum de cellules.

Garder le tube Falcon sur la glace autant que possible.

Centrifuger à 4°C à 900 g pendant 10 min.

Re-suspendre dans 2-3 mL de PBS pour le comptage des cellules.

### Annexe 3.3 - Isolement des cellules rénales

Le protocole est tiré de (Robbiano *et al.*, 1996) et (Sasaki *et al.*, 1997a, Sasaki *et al.*, 1997b). Ce protocole a aussi été utilisé pour isoler les cellules pulmonaires.

Prélever les reins, les couper en petits dés et laver environ 500 mg dans du HBSS free + 20 mM HEPES (Sigma H1016) + 0,8 mM EDTA (Sigma E5134).

Incuber les morceaux de tissus dans 5 mL de milieu enzymatique : HBSS free + 0,25 % trypsine (Sigma H9136) + 0,05 % EDTA à 37°C pendant 10 min.

Centrifuger le surnageant à 700g pendant 10 min : le culot contient les cellules isolées.

Resuspendre le culot dans 1 mL de PBS pour le comptage des cellules.

Garder les cellules sur la glace autant que possible.

*Annexe - Tableau 4 : Composition du HBSS sans Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> (HBSS free)*

Produit	Quantité (mM)	Référence Sigma
NaCl	137	S7653
KCl	5,37	P4504
D-glucose	5	G7021
NaHCO <sub>3</sub>	4,17	S5761
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,34	S0876 S5136
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,44	P5655

### Annexe 3.4 - Test des comètes après exposition *in vivo*

Les lames sont préparées à l'avance : déposer 600 µL d'agarose medium dilué dans de l'eau distillée à 0,5 % sur une lame superfrost, laisser sécher à température ambiante toute la nuit. Ranger dans une boîte au sec.

L'ensemble de la manipulation se réalise, autant que possible, sur glace et dans l'obscurité.

#### Nombre de cellules par lame :

Sang total : prendre 15 µL de sang total (environ  $3 \cdot 10^5$  cellules).

Cellules du BAL :  $3 \cdot 10^4$  cellules.

Cellules dissociées d'organes (rein, poumon) :  $3 \cdot 10^5$  cellules.

Cellules épithéliales nasales : prendre 85 µL (entre 1 et  $4 \cdot 10^5$  cellules).

Re-suspendre le nombre de cellules nécessaires dans 85 µL de PBS.

Préparer de l'agarose Low Melting Point (LMP) dilué à 1% dans du PBS et le maintenir à 37°C.

Mélanger à volume égal la suspension cellulaire (85 µL) et l'agarose LMP 1 % (85 µL) pour l'obtention d'une concentration finale de 0,5% d'agarose LMP.

Déposer le mélange (170 µL) sur une lame posée sur de la glace.

Recouvrir d'une lamelle et la retirer après refroidissement.

#### Lyse des cellules

Préparer le tampon de lyse, le garder à 4°C.

Tremper les lames dans le tampon de lyse pendant 1 heure.

Rincer avec du tampon TAE (Tris acétate EDTA) pendant 5 min.

#### Electrophorèse

Préparer les tampons d'électrophorèse, les garder à 4°C.

Déposer les lames dans la cuve en les orientant dans le sens du passage du courant.

Verser le tampon d'électrophorèse.

Incuber pendant au moins pendant 30 min pour le test en condition alcaline et 20 min pour le test en condition neutre.

Puis faire migrer, toujours à 4°C, avec comme conditions pour l'électrophorèse :

- pour test en condition alcaline : 25 V et 350 mA ( $0,84 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) pendant 20 min,
- pour test en condition neutre : 12 V et 100 mA ( $0,4 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) pendant 1 h.



### Neutralisation

Rincer dans du tampon de neutralisation Tris-HCl (0,4 M) pendant 10 min puis 5 min dans de l'eau.

### Conservation des lames

Sécher les lames sur un block à 40-45°C.

Fixer les lames en les trempant dans de l'éthanol absolu.

Laisser sécher la nuit et ranger dans une boîte au sec.

### Coloration

Iodure de propidium à  $2,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  dans du PBS, déposer 50  $\mu\text{L}$  par lame, recouvrir d'une lamelle et lire immédiatement la lame.

### Test de viabilité au bleu trypan

Dans 85  $\mu\text{L}$  de PBS, ajouter aux cellules 15  $\mu\text{L}$  d'une solution de bleu trypan.

Laisser en contact 10 min à température ambiante.

Observer au microscope optique à l'objectif 40.

Compter, à l'aide d'une cellule de Malassez, 100 cellules (cellules mortes en bleu, cellules vivantes incolores).

% viabilité = Nbre de cellules vivantes / 100 cellules observées

### Tampons utilisés pour le test des comètes

#### *Tampon de lyse (test en condition alcaline ou neutre)*

Solution mère dans de l'eau distillée : 2,5 M NaCl + 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA + 10 mM Tris.

Ajuster à pH 10 avec NaOH.

Conserver à température ambiante.

Ajouter au dernier moment dans la solution mère, 1% Triton X-100 + 10% DMSO.

#### *Tampon d'électrophorèse pour le test des comètes en condition alcaline*

300 mM NaOH et 1mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH>13.

#### *Tampon d'électrophorèse pour le test des comètes en condition neutre*

100 mM Tris et 300 mM d'acétate de sodium, pH 9 (ajusté avec de l'acide acétique).



## Annexe 4 - Biocinétiques expérimentales de l'uranium

Les tableaux 6, 9 et 10 contiennent les valeurs correspondantes aux figures 5, 6 et 7 de l'article 1, c'est-à-dire les biocinétiques des groupes AcUO2-2, RepUO2 n°1 et RepUO2 n°2.

Le dosage de l'uranium a également été réalisé pour le groupe AcUO2-1 (Annexe - Tableau 5), mais ces résultats ne sont pas réellement utilisés dans un article. La biocinétique du groupe AcUO2-3 ne concernent que les excréta (Annexe - Tableau 7). Enfin, le tableau 8 représente la biocinétique (valeurs brutes) du groupe AcUO4 et les tableaux 11 et 12 celles des groupes doublement contaminés.

*Annexe - Tableau 5 : Quantités d'uranium dans les organes ( $\mu\text{gU.g}^{-1}$  de tissu) et les excréta ( $\mu\text{gU}$ ) du groupe AcUO2-1 en fonction des jours après exposition*

	Poumon	TGI	Reins	Fémurs	Urine	Fèces
1	46 ± 14	1,99 ± 0,18	0,046 ± 0,018	0,006 ± 0,003	5,73 ± 3,75	2181 ± 591
3	53 ± 21	1,39 ± 0,84	0,064 ± 0,021	0,005 ± 0,001	0,34 ± 0,12	94 ± 41
8	40 ± 7	0,35 ± 0,16	0,057 ± 0,030	0,006 ± 0,003	0,17 ± 0,05	43 ± 37
28	37 ± 3	0,36 ± 0,04	0,023 ± 0,013	0,006 ± 0,003	0,07 ± 0,01	27 ± 6

Dosages réalisés au KPA. Moyenne ± SD, n = 3 pour les organes et n ≥ 5 pour les excréta. (TGI : tractus gastro-intestinal)

*Annexe - Tableau 6 : Quantités d'uranium dans les organes ( $\mu\text{gU.g}^{-1}$  de tissu) et les excréta ( $\mu\text{gU}$ ) du groupe AcUO2-2 en fonction des jours après exposition (Article 1 - Figure 5)*

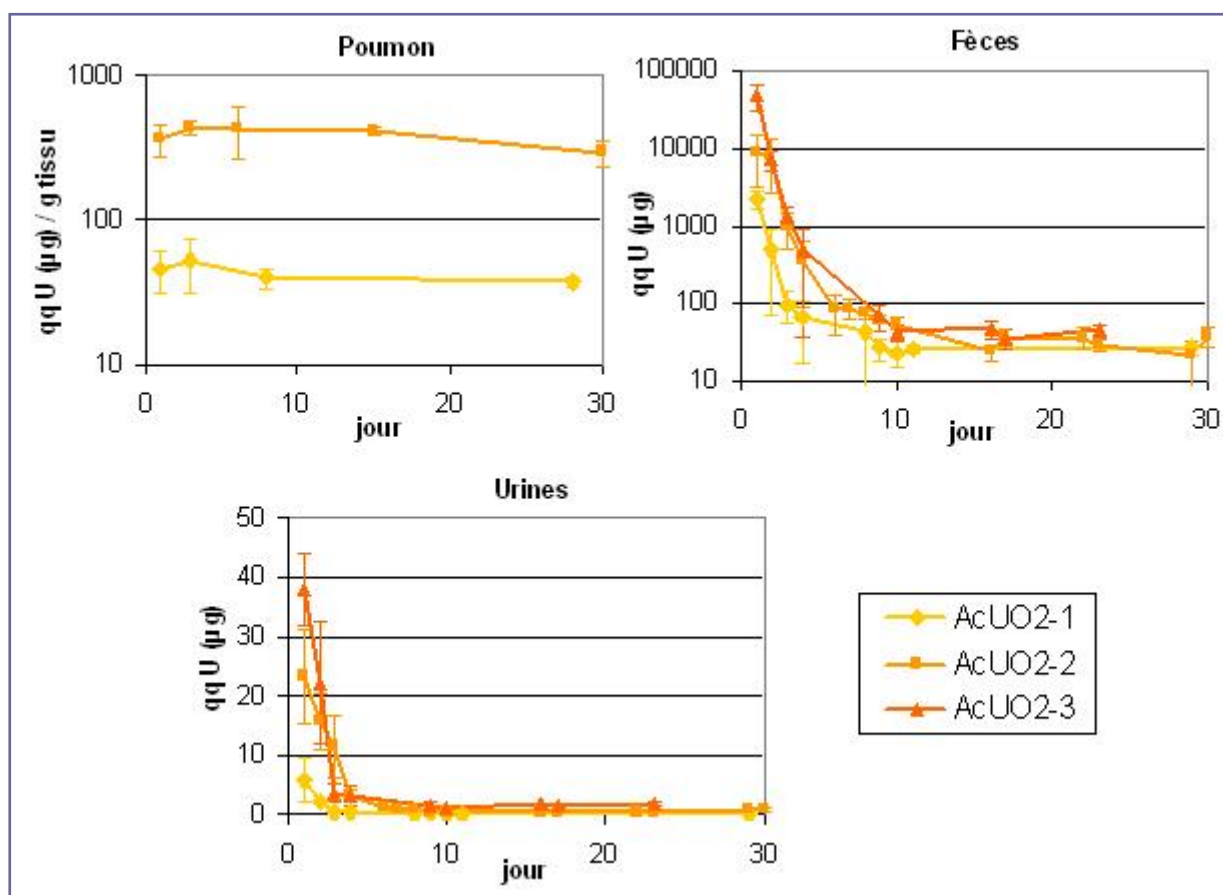
	Poumon	TGI	Reins	Fémurs	Urine	Fèces
1	368 ± 96	52,17 ± 19,33	0,77 ± 0,48	0,93 ± 1,44	23,12 ± 7,89	8942 ± 5667
3	433 ± 51	4,86 ± 5,27	2,04 ± 1,10	0,07 ± 0,02	11,53 ± 5,41	959 ± 478
6	433 ± 162	1,03 ± 0,50	1,55 ± 0,54	0,24 ± 0,19	1,15 ± 0,36	85 ± 44
15	410 ± 29	0,61 ± 0,29	0,81 ± 0,28	0,11 ± 0,06	0,37 ± 0,08	23,5 ± 5,7
30	456 ± 286	0,29 ± 0,13	0,43 ± 0,25	0,10 ± 0,02	0,66 ± 0,36	37,8 ± 11,1
90	301 ± 67	0,39 ± 0,03	0,41 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,51 ± 0,03	

Dosages réalisés au KPA. Moyenne ± SD, n = 3 pour les organes et n ≥ 4 pour les excréta. (TGI : tractus gastro-intestinal)

*Annexe - Tableau 7 : Quantités d'uranium dans les excréta ( $\mu\text{gU}$ ) du groupe AcUO2-3 en fonction des jours après exposition*

	Urine	Fèces
1	$38 \pm 6,2$	$46953 \pm 16062$
3	$3,6 \pm 1,7$	$1356 \pm 362$
9	$1,5 \pm 0,6$	$68 \pm 26$
16	$1,6 \pm 0,2$	$47 \pm 11$
23	$1,8 \pm 0,3$	$44 \pm 9$

Dosages réalisés au KPA. Moyenne  $\pm$  SD,  $n \geq 4$ .



*Annexe - Figure 6 : Comparaison de la biocinétique de l'uranium entre les groupes exposés à l' $\text{UO}_2$  par inhalation aiguë*

L'allure des biocinétiques de l'uranium dans les poumons et les fèces est comparable entre les expositions AcUO2-1 et -2 par inhalation aiguë. La disparition très lente de l'uranium des poumons pourrait s'expliquer par le fait que l' $\text{UO}_2$  est très insoluble et/ou par une altération du mécanisme de clairance pulmonaire qui apparaîtrait dès l'exposition AcUO2-1.

*Annexe - Tableau 8 : Quantités d'uranium dans les organes ( $\mu\text{gU.g}^{-1}$  de tissu) et les excréta ( $\mu\text{gU}$ ) du groupe AcUO4 en fonction des jours après exposition*

	Poumon	TGI	Reins	Fémurs	Urine	Fèces
4 h	95 ± 24	54 ± 2,6	1,6 ± 0,6	0,06 ± 0,03		
1	65 ± 4	5,6 ± 5,3	7,8 ± 1,4	0,17 ± 0,07	19 ± 8	1111 ± 799
3	29 ± 8	5,4 ± 7,1	18,2 ± 5,4	0,72 ± 0,17	21 ± 7	58 ± 24
8-9	7 ± 0,9	1,2 ± 0,8	10 ± 5,2	0,44 ± 0,16	3,7 ± 2	5,1 ± 0,2
16	5 ± 2	0,07 ± 0,07	2,1 ± 0,2	0,3 ± 0,14	1,2 ± 0,7	4,6 ± 0,2

Dosages réalisés par ICP-MS. Moyenne ± SD, n = 4 pour les organes et n ≥ 4 pour les excréta. (TGI : tractus gastro-intestinal)

*Annexe - Tableau 9 : Quantités d'uranium dans les organes ( $\mu\text{gU.g}^{-1}$  de tissu) et les excréta ( $\mu\text{gU}$ ) du groupe RepUO2-1 en fonction des jours après exposition (Article 1 - Figure 6)*

	Poumon	TGI	Reins	Fémurs	Urine	Fèces
1	496 ± 162	16,45 ± 7,34	1,42 ± 0,78	0,15 ± 0,05	15,10 ± 7,44	3866 ± 2104
3	667 ± 235	1,32 ± 0,57	1,39 ± 0,65	0,14 ± 0,06	6,89 ± 2,49	346 ± 279
6	721 ± 46	0,56 ± 0,13	1,38 ± 0,70	0,14 ± 0,03	1,11 ± 0,22	38 ± 13
15	554 ± 106	0,41 ± 0,02	1,73 ± 0,92	0,12 ± 0,02	0,96 ± 0,31	24 ± 9
30	518 ± 88	0,38 ± 0,02	0,97 ± 0,33	0,10 ± 0,03	1,03 ± 0,53	37 ± 5

Dosages réalisés au KPA. Moyenne ± SD, n = 3 pour les organes et n ≥ 5 pour les excréta. (TGI : tractus gastro-intestinal)

*Annexe - Tableau 10 : Quantités d'uranium dans les organes ( $\mu\text{gU.g}^{-1}$  de tissu) et les excréta ( $\mu\text{gU}$ ) du groupe RepUO2-2 en fonction des jours après exposition (Article 1 - Figure 7)*

	Poumon	TGI	Reins	Fémurs	Urine	Fèces
1	504 ± 17	9,66 ± 5,38	0,92 ± 0,23	0,10 ± 0,02	5,32 ± 2,62	2661 ± 1031
3	404 ± 19	1,28 ± 0,39	1,18 ± 0,32	0,09 ± 0,04	0,96 ± 0,11	334 ± 313
8	532 ± 30	0,69 ± 0,08	1,09 ± 0,18	0,08 ± 0,01	0,85 ± 0,14	46 ± 6
14	459 ± 37	0,54 ± 0,08	0,89 ± 0,40	0,08 ± 0,02	0,42 ± 0,31	34 ± 20
28	523 ± 180	0,56 ± 0,11	0,50 ± 0,19	0,09 ± 0,03	0,57 ± 0,13	34 ± 11

Dosages réalisés au KPA. Moyenne ± SD, n = 3 pour les organes et n ≥ 5 pour les excréta. (TGI : tractus gastro-intestinal)

*Annexe - Tableau 11 : Quantités d'uranium total et d'UO<sub>4</sub> dans les organes (µgU.g<sup>-1</sup> de tissu) et les excréta (µgU) du groupe RepUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> en fonction des jours après l'exposition d'UO<sub>4</sub>*

	Poumon	TGI	Reins	Fémurs	Urine	Fèces
<b>Uranium total</b>						
<b>4 h</b>	507 ± 111	32 ± 8	2,9 ± 0,4			
<b>1</b>	555 ± 119	5,5 ± 2,3	5,9 ± 1,1	0,36 ± 0,03	19 ± 7	727 ± 230
<b>3</b>	582 ± 175	2,1 ± 0,5	7,7 ± 3,2		6,3 ± 3,1	97 ± 48
<b>8</b>	573 ± 150	0,5 ± 0,1	3,9 ± 0,8	0,36 ± 0,13	2,2 ± 1,1	93 ± 22
<b>16</b>	484 ± 69	0,5 ± 0,05	0,7 ± 0,3	0,31 ± 0,06	1,2 ± 0,7	42 ± 12
<b>Uranium provenant de l'UO<sub>4</sub></b>						
<b>4 h</b>	37 ± 15	28 ± 6	2 ± 0,4			
<b>1</b>	31 ± 3	4,1 ± 2,1	5 ± 0,9	0,27 ± 0,03	19 ± 7	599 ± 195
<b>3</b>	9 ± 4	0,9 ± 0,3	6,3 ± 2,7		5,6 ± 2,7	66 ± 46
<b>8</b>	2,9 ± 1	0,03 ± 0,02	2,9 ± 0,5	0,26 ± 0,1	1,7 ± 0,8	8,7 ± 7,2
<b>16</b>	2,2 ± 1,3	0,009 ± 0,007	0,7 ± 0,3	0,21 ± 0,04	0,5 ± 0,4	0,4 ± 0,2

Dosages réalisés par ICP-MS. Moyenne ± SD, n = 5 pour les organes et n = 5 pour les excréta. (TGI : tractus gastro-intestinal)

*Annexe - Tableau 12 : Quantités d'uranium total et d'UO<sub>4</sub> dans les organes (µgU.g<sup>-1</sup> de tissu) et les excréta (µgU) du groupe AcUO<sub>2</sub>+UO<sub>4</sub> en fonction des jours après l'exposition d'UO<sub>4</sub>*

	Poumon	TGI	Reins	Fémurs	Urine	Fèces
<b>Uranium total</b>						
<b>4 h</b>	549 ± 90	106 ± 37	4,6 ± 0,6			
<b>1</b>	506 ± 79	23 ± 21	10,6 ± 5,9	0,53 ± 0,22	16 ± 3	1067 ± 798
<b>3</b>	602 ± 228	2,5 ± 2	19,8 ± 5,2		8 ± 2,6	142 ± 67
<b>8</b>	438 ± 155	0,4 ± 0,06	4,2 ± 0,5	0,34 ± 0,1	4,1 ± 0,4	109 ± 19
<b>16</b>	533 ± 97	0,4 ± 0,06	3,9 ± 0,4	0,73 ± 0,29	2,2	24 ± 22
<b>Uranium provenant de l'UO<sub>4</sub></b>						
<b>4 h</b>	87 ± 33	95 ± 33	3,7 ± 0,8			
<b>1</b>	55 ± 18	18 ± 18	9,8 ± 5,5	0,45 ± 0,2	16 ± 3	1031 ± 801
<b>3</b>	14 ± 1,4	1,5 ± 1,5	18,9 ± 5,4		8,2 ± 2,8	123 ± 63
<b>8</b>	4,2 ± 0,5	0,02 ± 0,009	3,9 ± 0,5	0,3 ± 0,09	4 ± 0,5	30 ± 17
<b>16</b>	6,2 ± 1,9	0,03 ± 0,03	3,3 ± 0,3	0,64 ± 0,27	1,4	0,6 ± 0,4

Dosages réalisés par ICP-MS. Moyenne ± SD, n = 3 pour les organes et n = 3 pour les excréta. (TGI : tractus gastro-intestinal)

## Annexe 5 - Test des comètes, Article 4, valeurs brutes des OTM

Les valeurs brutes des OTM, utilisées pour les articles 4 et 5, sont présentées dans les figures suivantes (Annexes 5 et 6), sous la forme de boîte à moustaches. Les boîtes à moustaches, traduction de Box & Whiskers Plot, sont une invention de TUKEY (1977) pour représenter schématiquement une distribution.

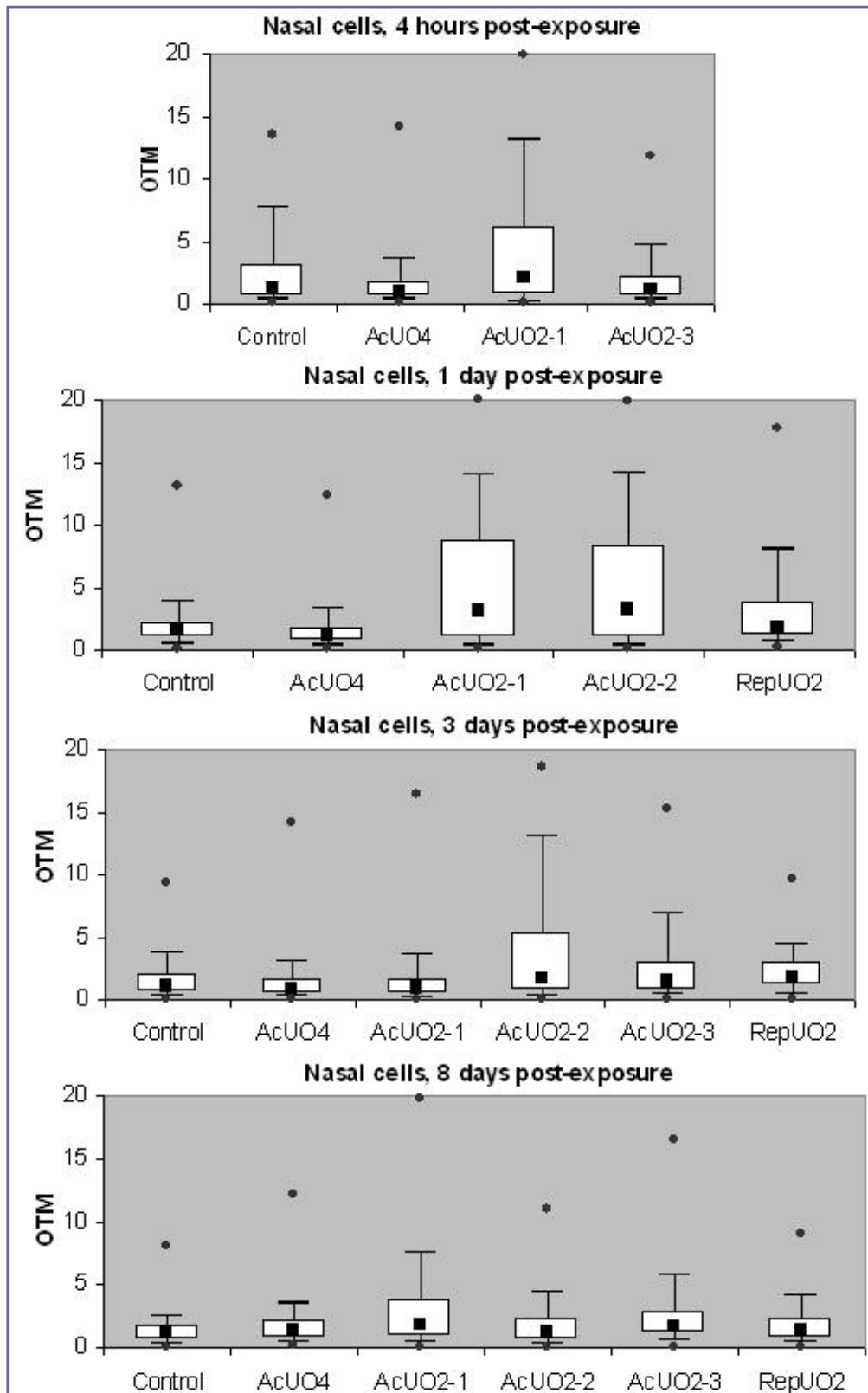
Chaque boîte représente les 300 valeurs d'OTM par type cellulaire, par temps d'euthanasie et par type d'exposition. En effet, 100 OTM ont été comptés par condition et 3 rats ont été utilisés par condition.

Une boîte à moustaches fait figurer les valeurs suivantes :

- la médiane qui est représentée par le carré noir,
- le premier et le troisième quartile, le rectangle blanc s'étend du premier quartile au troisième quartile,
- le premier et neuvième décile, qui sont représentés par les traits noirs,
- le maximum et le minimum de la série, qui sont représentés par les points gris foncés.

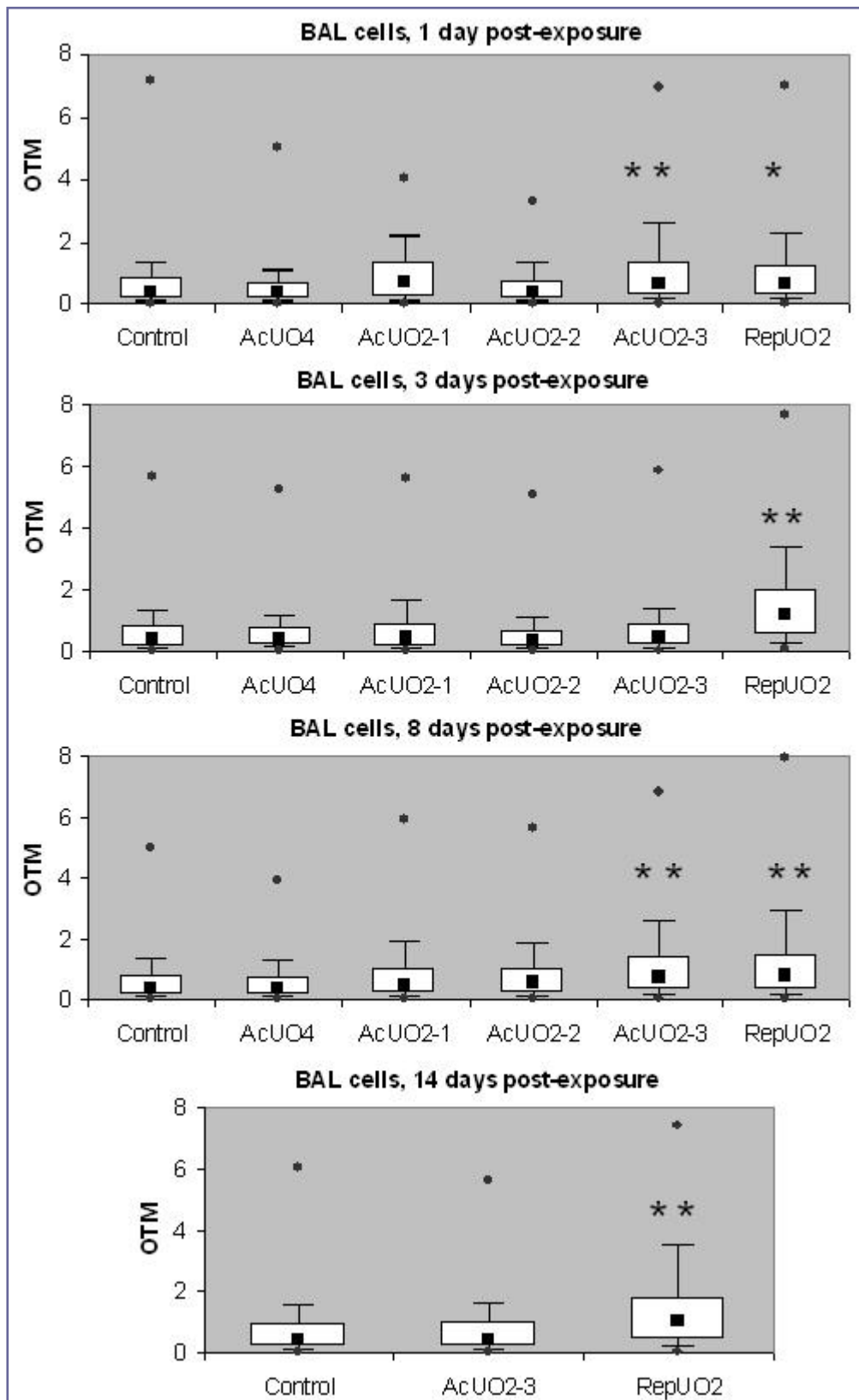
(Macro pour représenter les boites à moustache de Jean Véronis, 2002

<http://www.up.univ-mrs.fr/veronis/cours/INFZ16/macros/gboiteamoustaches.html>)

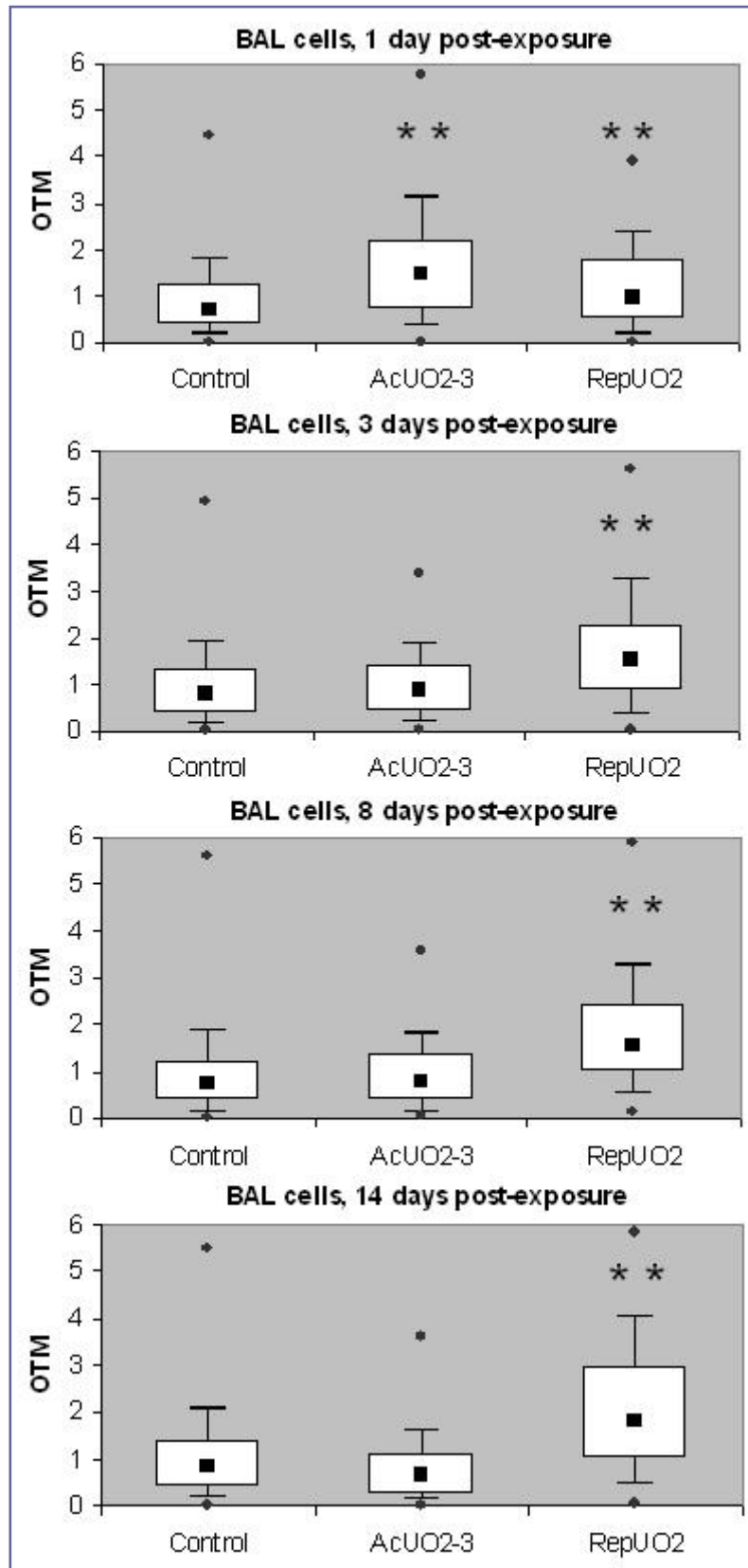


Annexe - Figure 7 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition alcaline sur les cellules épithéliales nasales des groupes Control, AcUO4, AcUO2 et RepUO2

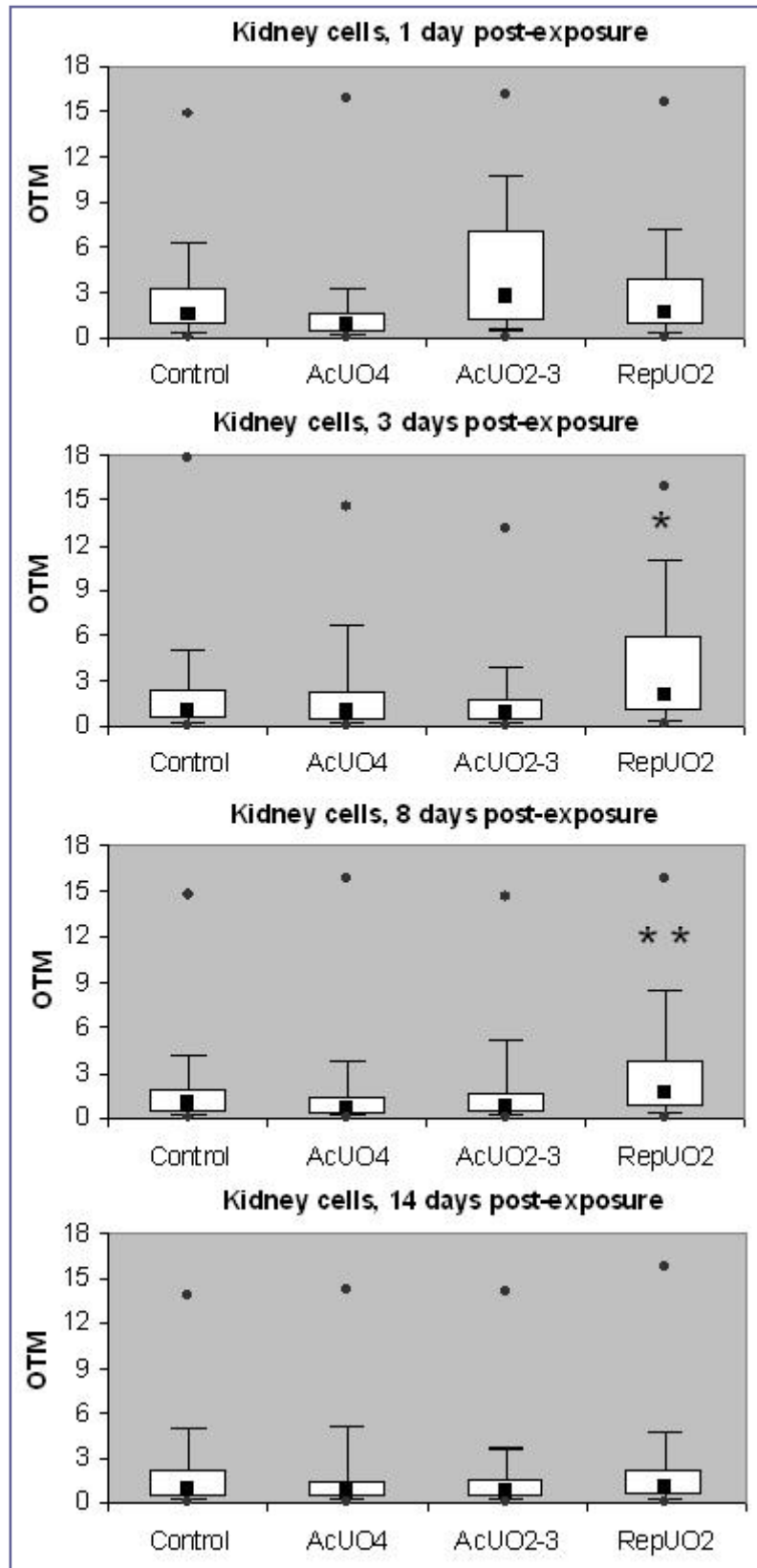




Annexe - Figure 8 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition alcaline sur les cellules du BAL des groupes Control, AcUO4, AcUO2 et RepUO2



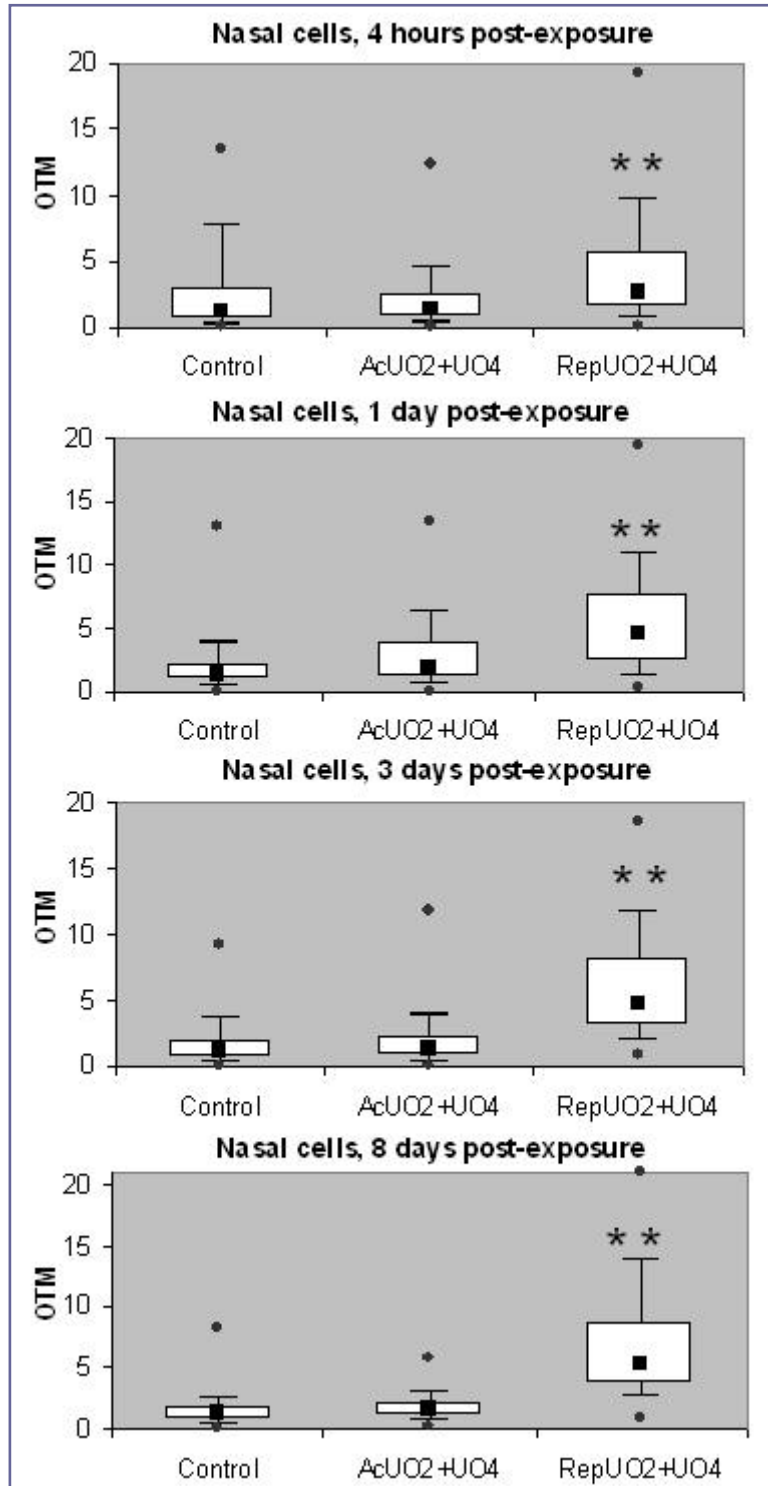
Annexe - Figure 9 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition neutre sur les cellules du BAL des groupes Control, AcUO2-3 et RepUO2



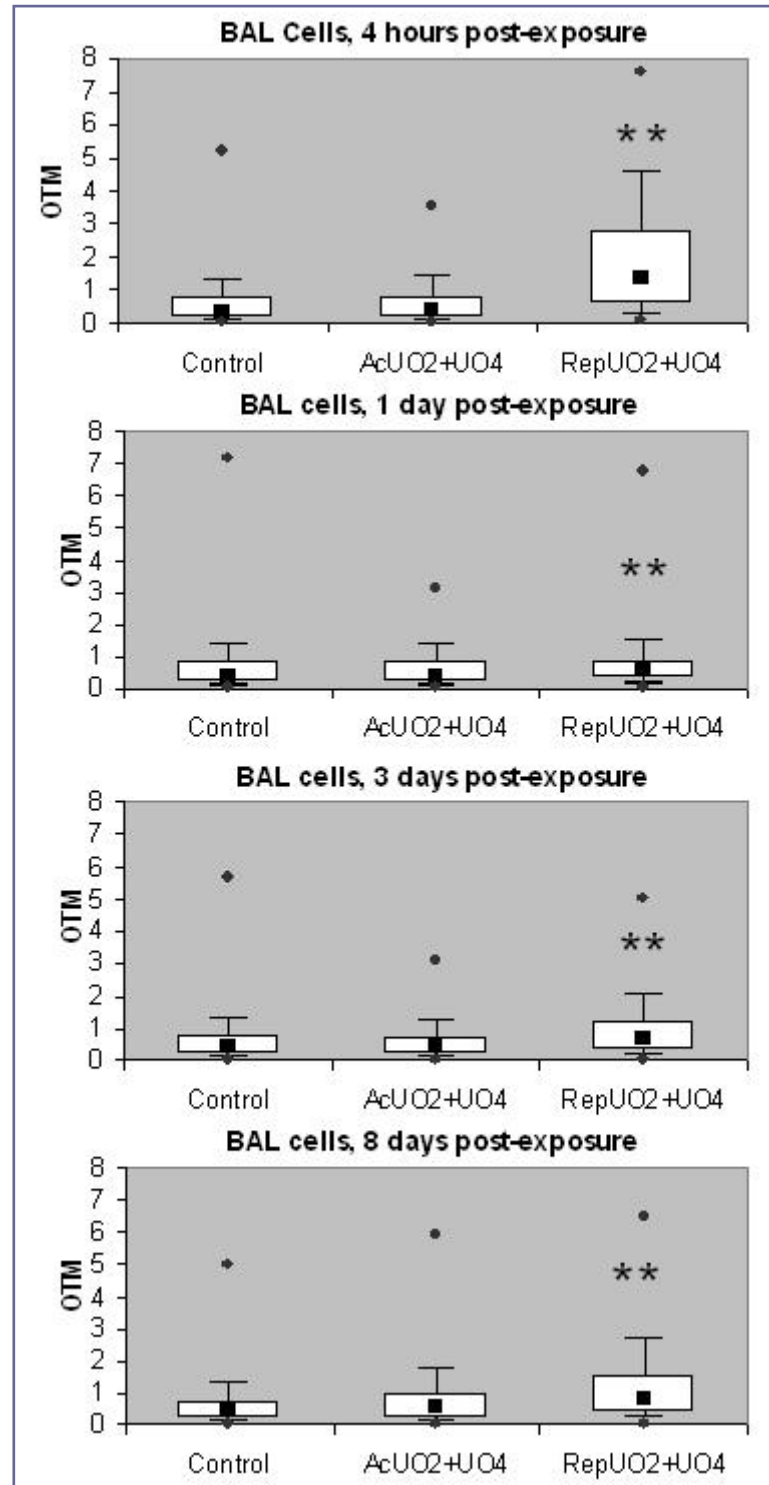
Annexe - Figure 10 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition alcaline sur les cellules rénales des groupes Control, AcUO4, AcUO2-3 et RepUO2



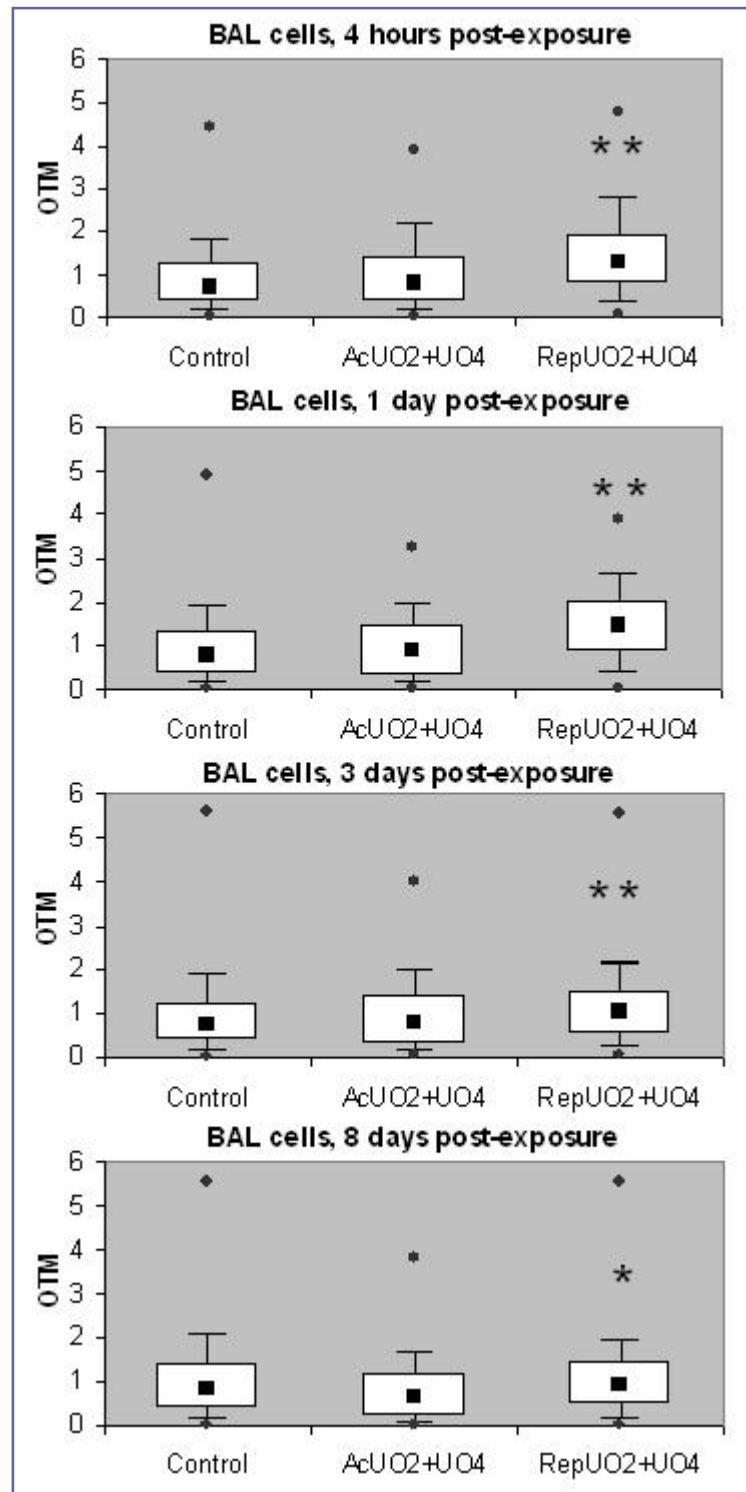
## Annexe 6 - Test des comètes, Article 5, valeurs brutes des OTM



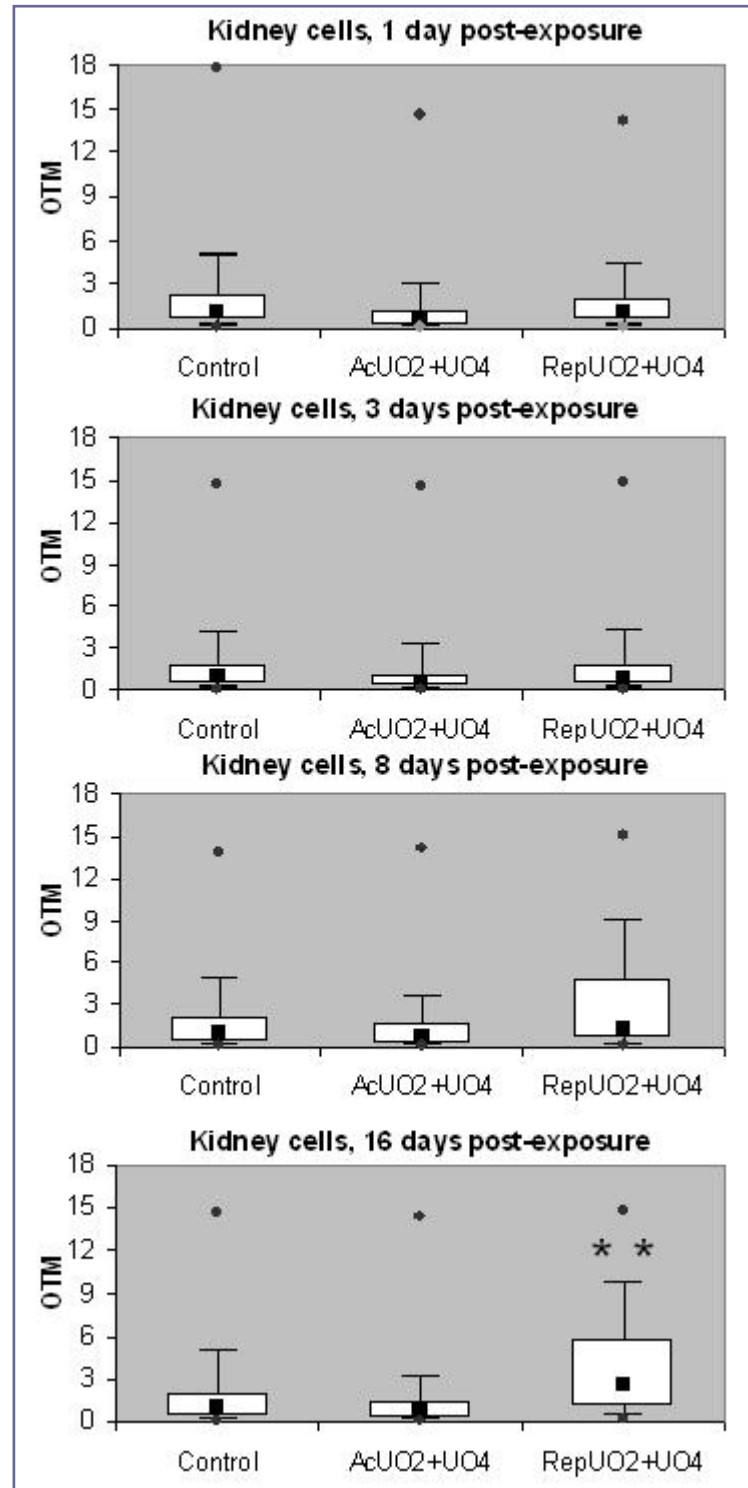
Annexe - Figure 11 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition alcaline sur les cellules épithéliales nasales des groupes Control, AcUO2+UO4 et RepUO2+UO4



Annexe - Figure 12 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition alcaline sur les cellules du BAL des groupes Control, AcUO2+UO4 et RepUO2+UO4



Annexe - Figure 13 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition neutre sur les cellules du BAL des groupes Control, AcUO2+UO4 et RepUO2+UO4



Annexe - Figure 14 : Valeurs des OTM du test des comètes en condition alcaline sur les cellules rénales des groupes Control, AcUO2+UO4 et RepUO2+UO4



## Annexe 7 - Communications

Cette thèse a fait l'objet de participation à des congrès.

### Conférences internationales

**Eurotox** : Septembre 2005, Cracovie, Pologne. Poster. Résumé publié dans Toxicological Letters, 2005, 158(1), suppl 1, pS158.

M. Monleau, M. De Méo, V. Chazel, F. Paquet, G. Duménil, M. Claraz, "Genotoxic and inflammatory responses in rats exposed to inhalations of uranium compounds".

**European Radiation Research** : Septembre 2005, Leicester, Angleterre. Poster.

M. Monleau, M. De Méo, V. Chazel, F. Paquet, G. Duménil, M. Claraz, "Genotoxic and inflammatory responses in rats exposed to inhalations of uranium compounds".

**SETAC Europe** : Mai 2005, Lille, France. Poster. Résumé disponible sur <http://www.setaceumeeting.org/lille/>.

M. Monleau, M. De Meo, S. Frelon, M. Claraz, G. Duménil, F. Paquet, V. Chazel, "Biokinetic and biological effects of uranium in rats after inhalation with different compounds".

**European Radiation Research** : Août 2004, Budapest, Hongrie. Oral et poster.

M. Monleau, E. Blanchardon, M. Claraz, F. Paquet, V. Chazel, "Biokinetics of uranium in rats exposed by repeated inhalations: Implications for the monitoring of nuclear workers". Résumé p160.

### Autres conférences

**Spectratom** : 2005, Pau, France. Poster.

S. Frelon, M. Monleau, V. Chazel, O. Delissen, E. Tourlonias, F. Paquet, "L'ICP-MS : un outil pour le suivi de contaminations internes à l'uranium".

**First European University on Chemical and biological approaches in Environment**, Collaboration entre l'Université d'Aix-Marseille et l'Université Adam Mickiewicz de Pologne. Septembre 2004, Hyères, FRANCE. Oral.

M. Monleau, E. Blanchardon, M. Claraz, F. Paquet, V. Chazel, "Biokinetics of uranium in rats exposed by repeated inhalations".

## Annexe - Références

- Averbeck D. (2000). [Mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis in higher eukaryotes]. *Cancer Radiother.* **4**, 335-54.
- Hoeijmakers J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* **411**, 366-74.
- Robbiano L., Mereto E., Corbu C. et Brambilla G. (1996). DNA damage induced by seven *N*-nitroso compounds in primary cultures of human and rat kidney cells. *Mutat Res.* **368**, 41-47.
- Rothkamm K. et Lobrich M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 5057-62.
- Sasaki Y. F., Izumiyama F., Nishidate E., Matsusaka N. et Tsuda S. (1997a). Detection of rodent liver carcinogen genotoxicity by the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow). *Mutat.Res.* **391**, 201-214.
- Sasaki Y. F., Nishidate E., Izumiyama F., Matsusaka N. et Tsuda S. (1997b). Simple detection of chemical mutagens by the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow). *Mutat.Res.* **391**, 215-231.
- Steele V. E. et Arnold J. T. (1985). Isolation and long-term culture of rat, rabbit, and human nasal turbinate epithelial cells. *In Vitro Cell Dev.Biol.* **21**, 681-687.