

UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

2009

N° attribué par la bibliothèque

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Champ disciplinaire : Neurosciences

Ecole Doctorale de rattachement : Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie

Présentée et soutenue publiquement

par

Hélène BENSOUSSAN

Le 28 septembre 2009

**Effets d'une contamination chronique à l'uranium sur le système
cholinergique : approches *in vivo* et *in vitro***

Directeur de thèse : Pr TAOUIS Mohammed

Tuteur IRSN : Dr LESTAEVEL Philippe

Co-tuteur universitaire : Dr VACHER Claire-Marie

JURY

Président : Pr KANELLOPOULOS Jean

Rapporteur : Dr AMOURETTE Christine

Rapporteur : Pr HAUW Jean-Jacques

Directeur de thèse : Pr TAOUIS Mohammed

Examineur : Dr VACHER Claire-Marie

Examineur : Dr SERVENT Denis

Examineur : Dr LESTAEVEL Philippe

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier chacun des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse :

- le Professeur Jean Kanellopoulos en qualité de président,
- le Docteur Christine Amourette et le Professeur Jean-Jacques Hauw en tant que rapporteurs
- le Docteur Denis Servent en tant qu'examineur

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Mohammed Taouis pour sa présence et ses conseils pratiques et humains qu'il a sus me prodiguer au cours de ces dernières années.

Je tiens à remercier le Docteur Claire-Maire Vacher pour son aide, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à Philippe Lestaevel pour la confiance qu'il a sue m'accorder, son accueil à FAR ou à PIE et pour nos grandes discussions (scientifiques ou non !).

Je remercie les Docteurs Patrick Gourmelon, Philippe Voisin et Patrick Laloi de m'avoir accueillie au sein du Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie, ainsi que le Docteur Isabelle Dublineau pour son accueil au sein du LRTOX.

J'adresse un grand merci au Docteur Maâmar Souidi pour sa chaleur et ses encouragements. Je remercie également le Docteur Yann Guéguen pour son soutien, sa disponibilité et son honnêteté.

Merci aux Docteurs Christine Linard et Jean-Marc Bertho pour leurs petits mots et sourires de tous les jours.

Ce sont bien plus que des remerciements que je voudrais adresser à l'équipe de choc ! Ces trois années m'ont permises de vous connaître et de vous apprécier. Bien plus que de simples collègues, je vous dois beaucoup et suis heureuse de vous avoir en amies. Merci à vous trois : Line Grandcolas, Radjini Racine et Caroline Rouas.

Merci à Carine Darolles pour sa sympathie et son accueil chaleureux lors de mes déplacements à PIE. Bonne continuation à toi et ta petite famille.

Un grand merci à ceux qui m'ont apporté soutien et gaieté au cours de ces 3 années Johanna Stefani, Elise Grignard, Hanaâ Berradi, Stéphane Grison, Cédric Baudelin et Bernadette Dhieux-Lestaevl.

Je souhaite remercier le Docteur Denis Servent pour les cellules IMR-32 bien sûr, mais également pour ses conseils scientifiques et techniques.

Merci également à Elodie Romero et Fabrice Airault pour les fous rires et leur aide pour les manipes (parfois foireuses !), mais également à Grégoire Resve pour son aide et sa patience avec les petits rats.

Je tiens à remercier David Suhard et Christine Tessier pour leur aide technique, leur disponibilité et leur gentillesse.

Ces remerciements s'adressent également à ceux que j'ai rencontrés et appréciés au cours de ces trois années : Rym Abderrahmani, Youssra Ben Salem, Nicholas Synhaeve, Fabienne Billiard, Awatif Lifrani, Karl Blirando et Marco Alves Valente.

Je tiens à remercier Sandrine Quernee et Keltoum Mediana pour leur aide administrative et leur sympathie

Merci aussi à Aurélie, Patricia, Yseult et Audrey.

Je remercie mes amis et ma famille pour leur appui, leurs conseils avisés.

Enfin, je souhaite sincèrement remercier Lubo pour son soutien de tous les jours, ses encouragements et la force qu'il m'a transmis.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS	9
FIGURES	9
TABLEAUX.....	13
ABREVIATIONS	15
RESUME	17
ABSTRACT	18
VALORISATION.....	19
I. PUBLICATIONS.....	21
A. <i>Publiées</i>	21
B. <i>En cours d'écriture</i>	21
II. COMMUNICATIONS	22
A. <i>Affichées</i>	22
B. <i>Orales</i>	22
AVANT-PROPOS	23
INTRODUCTION.....	27
I. URANIUM	29
A. <i>Géologie</i>	29
1) Historique	29
2) Caractéristiques	29
B. <i>Utilisation par l'homme</i>	30
1) Uranium naturel (UN)	30
2) Uranium enrichi (UE)	30
3) Uranium appauvri (UA)	30
C. <i>Risques sanitaires</i>	31
1) Exposition	31
2) Biocinétique	33
3) Toxicité sur les organes.....	36
II. LE SYSTEME CHOLINERGIQUE.....	53
A. <i>Introduction au système nerveux</i>	53
1) Système nerveux central.....	53
2) Système nerveux périphérique : somatique et autonome	57

B.	<i>Système cholinergique</i>	59
1)	Historique	59
2)	Physiologie	59
3)	Répartition cérébrale	59
4)	Répartition périphérique	60
5)	Pharmacologie	60
6)	Métabolisme	61
7)	Rôles	65
8)	Implication dans certaines pathologies	71
III.	PROBLEMATIQUE	77
MATERIEL ET METHODES		79
I.	MATERIELS	81
A.	<i>Uranium</i>	81
1)	Uranium appauvri (UA) :	81
2)	Uranium enrichi (UE) :	81
B.	<i>Plomb</i>	82
C.	<i>Modèle animal</i>	82
1)	Modèle rat adulte	82
2)	Modèle rat juvénile	82
3)	Modèle souris transgénique invalidée pour le gène ApoE (KO ApoE ^{-/-})	83
4)	Modèle cellulaire IMR 32	83
II.	METHODES	85
A.	<i>Contaminations</i>	85
1)	Contamination des modèles rat adulte et souris KO APOE ^{-/-}	85
2)	Contamination du modèle rat juvénile	86
3)	Contamination du modèle cellulaire	86
B.	<i>Techniques d'analyses post mortem</i>	86
1)	Prélèvements du matériel biologique	86
2)	Technique de quantification de l'expression génique	87
3)	Techniques biochimiques	88
4)	Techniques d'analyses <i>in vivo</i>	91
5)	Techniques d'analyses <i>in vitro</i>	95
6)	Analyses statistiques	98
RESULTATS		99
I.	LE SYSTEME CHOLINERGIQUE, UNE CIBLE DE L'URANIUM AU NIVEAU CENTRAL	101
A.	<i>Introduction</i>	101
B.	<i>Résultats</i>	103
1)	Paramètres généraux de santé	103
2)	Dosage d'uranium dans les structures cérébrales	104
3)	Synthèse de l'acétylcholine	105

4)	Transporteurs	107
5)	Récepteurs	109
6)	Acétylcholine et ses enzymes de dégradation	111
7)	Facteur neurotrophique et ses récepteurs	115
8)	Dosage plasmatique des cholinestérases	117
C.	<i>Etude et analyse des résultats</i>	117
D.	<i>Résumé</i>	123
II.	EFFETS DE L'URANIUM SUR DES MODELES SENSIBLES : JEUNES ET AGES	125
A.	<i>Introduction</i>	125
B.	<i>Résultats : Juvéniles</i>	126
1)	Paramètres généraux de santé	126
2)	Dosage d'uranium dans les structures cérébrales	128
3)	Métabolisme cholinergique	129
4)	Tests comportementaux.....	144
C.	<i>Résultats : ApoE^{-/-}</i>	152
1)	Paramètres généraux de santé	152
2)	Dosage d'uranium dans le cortex.....	153
3)	Métabolisme cholinergique	154
4)	Tests comportementaux.....	160
D.	<i>Etude et analyse des résultats</i>	167
E.	<i>Résumé</i>	175
III.	EFFETS DE L'URANIUM SUR UNE LIGNEE CELLULAIRE NEURONALE HUMAINE, LES CELLULES IMR-32.....	177
A.	<i>Caractérisation du modèle pour le récepteur muscarinique de type 1</i>	177
B.	<i>Tests de cytotoxicité</i>	180
C.	<i>Observation microscopique par SIMS et par MET du comportement de l'UA sur les cellules IMR-32</i> 185	
1)	Observations SIMS	185
2)	Observations MET	188
D.	<i>Etude et analyse des résultats</i>	190
E.	<i>Résumé</i>	194
	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	195
I.	ETAT GENERAL DES ANIMAUX	197
II.	ACCUMULATION D'URANIUM DANS LE CERVEAU DES RONGEURS.....	199
III.	COMPARAISON ENTRE LES MODELES	201
A.	<i>Rats : uranium enrichi versus uranium appauvri</i>	201
B.	<i>Rats : juvéniles versus adultes</i>	202
C.	<i>Rats adultes versus souris adultes</i>	204
D.	<i>Modèles dits « sensibles » : rats juvéniles versus souris adultes transgéniques</i>	204
IV.	EFFETS TISSU- ET DOSE-DEPENDANTS DE L'URANIUM.....	204
V.	EFFET DU TEMPS DE CONTAMINATION A L'URANIUM SUR LE SYSTEME CHOLINERGIQUE ET LE COMPORTEMENT	207

VI.	IMPLICATION DU SYSTEME CHOLINERGIQUE DANS LES TROUBLES DU COMPORTEMENT OBSERVES APRES CONTAMINATION A L'URANIUM	208
VII.	EFFETS DE L'UE SUR LE SNC ET IRRADIATION EXTERNE : COMPARAISON	210
VIII.	EFFETS DE L'URANIUM ET D'AUTRES NEUROTOXIQUES SUR LE SYSTEME CHOLINERGIQUE : COMPARAISON	212
IX.	MODES D'ACTION DE L'URANIUM SUR LES NEURONES	214
X.	PERSPECTIVES	217
XI.	CONCLUSION GENERALE	220
ANNEXES.....		223
I.	COMPTE-RENDU - DONNEES PERSONNELLES TRANSMISES PAR MARIE DONNADIEU-CLARAZ.....	225
A.	<i>Etat d'avancement</i>	225
B.	<i>Méthodologie de comptage</i>	225
1)	Résultats.....	226
2)	Perspectives.....	230
II.	PREPARATION DE LA SOLUTION D'UA	231
III.	PREPARATION DE LA SOLUTION D'UE.....	233
IV.	PREPARATION DE LA SOLUTION DE PLOMB.....	235
V.	PREPARATION DU MILIEU CELLULAIRE :.....	237
VI.	PREPARATION DES SOLUTIONS DE NITRATE D'URANYLE POUR LA CULTURE CELLULAIRE.....	239
A.	<i>Préparation de la solution de dissolution de l'uranium</i>	239
B.	<i>Préparation de la solution mère de nitrate d'uranyle</i>	239
VII.	PREPARATION DES MILIEUX CONTENANT L'URANIUM.....	241
VIII.	PREPARATION DES CELLULES POUR LE SIMS ET LE MET	243
A.	<i>PREPARATION DES SOLUTIONS</i>	243
B.	<i>PREPARATION DES SOLUTIONS DE TRAVAIL</i>	244
1)	SOLUTION DE FIXATION PAR IMMERSION	244
2)	SOLUTIONS DE DESHYDRATATION.....	244
C.	<i>PROTOCOLE</i>	245
1)	Préparation des cellules pour le SIMS.....	245
IX.	ARTICLES.....	247
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		285

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

<i>Figure 1 : Principaux sites uranifères dans le monde</i>	32
<i>Figure 2 : Biocinétique de l'uranium et ses principaux organes cibles.</i>	35
<i>Figure 3 : Schéma de l'anatomie du rein</i>	37
<i>Figure 4 : Précipités d'uranium dans des lysosomes d'ostéoblastes</i>	40
<i>Figure 5 : Représentation d'une coupe transversale de méninges</i>	54
<i>Figure 6 : Représentation d'une synapse</i>	55
<i>Figure 7 : Schéma représentatif des différents types cellulaires du SNC</i>	56
<i>Figure 8 : Schéma représentant le système nerveux autonome : les systèmes sympathique et parasympathique</i>	58
<i>Figure 9 : Schéma des principaux groupes cholinergiques et leurs projections sur une coupe sagittale de cerveau humain.</i>	60
<i>Figure 10 : Molécule d'acétylcholine</i>	61
<i>Figure 11 : Schéma d'un récepteur nicotinique neuronal</i>	63
<i>Figure 12 : Schéma d'un récepteur muscarinique</i>	64
<i>Figure 13 : Schéma de la synapse cholinergique</i>	65
<i>Figure 14 : Enregistrements des trois états de vigilance</i>	70
<i>Figure 15 : IRM d'un cerveau atteint de MA et d'un cerveau sain</i>	72
<i>Figure 16: TEP d'un cerveau sain et d'un cerveau atteint de la MP</i>	74
<i>Figure 17 : But du travail de thèse</i>	78
<i>Figure 18 : Différents protocoles réalisés sur les modèles rongeurs</i>	85
<i>Figure 19 : Réactions enzymatiques du dosage de la cholinestérase plasmatique</i>	91
<i>Figure 20 : Implantation de l'émetteur et des électrodes DSI chez le rat</i>	93
<i>Figure 28 : Représentation graphique du dosage des cholinestérases plasmatiques</i>	117
<i>Figure 29 : Récapitulatif des résultats de la partie I : le système cholinergique, une cible de l'uranium au niveau central</i>	122
<i>Figure 30 : Représentation graphique des résultats pour les enzymes de synthèse de la choline et de l'acétylcholine chez les rats juvéniles</i>	130
<i>Figure 31 : Représentation graphique des résultats pour les transporteurs de l'acétylcholine et de la choline chez les rats juvéniles</i>	133
<i>Figure 32 : Représentation graphique des résultats pour les récepteurs cholinergiques chez les rats juvéniles</i>	135
<i>Figure 33: Représentation graphique des résultats du taux d'acétylcholine et des enzymes de dégradation de l'acétylcholine chez les rats juvéniles</i>	139
<i>Figure 34 : Représentation graphique des résultats du facteur neurotrophique et de ses récepteurs chez les rats juvéniles</i>	142

<i>Figure 35: Représentation graphique du dosage des cholinestérases plasmatiques.....</i>	<i>143</i>
<i>Figure 36 : Représentation graphique des résultats de l'EEG des rats juvéniles (2 mois d'exposition).....</i>	<i>144</i>
<i>Figure 37 : Représentation graphique des résultats du test de mémoire à court terme chez les rats juvéniles .</i>	<i>145</i>
<i>Figure 38 : Représentation graphique des résultats du test de mémoire à moyen terme chez les rats juvéniles</i>	<i>146</i>
<i>Figure 39 : Représentation graphique des résultats du test de l'activité locomotrice et exploratoire chez les rats juvéniles</i>	<i>147</i>
<i>Figure 40 : Représentation graphique des résultats du test de coordination motrice chez les rats juvéniles.....</i>	<i>148</i>
<i>Figure 41 : Représentation graphique des résultats du test de mesure de l'état « anxieux » des rats juvéniles</i>	<i>150</i>
<i>Figure 42 : Représentation graphique des résultats du test de mesure de l'état dit de « dépression » chez les rats juvéniles</i>	<i>151</i>
<i>Figure 43 : Représentation graphique des résultats géniques pour les principaux acteurs du système cholinergique chez les souris de génotype sauvage et les souris ApoE^{-/-} non-contaminées.....</i>	<i>154</i>
<i>Figure 44 : Représentation graphique du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE chez les souris de génotype sauvage et les souris ApoE^{-/-} non-contaminées.....</i>	<i>155</i>
<i>Figure 45 : Représentation graphique de l'activité des cholinestérases plasmatiques chez les souris de génotype sauvage et les souris ApoE^{-/-} non-contaminées.....</i>	<i>156</i>
<i>Figure 46 : Représentation graphique des résultats géniques pour les principaux acteurs du système cholinergique chez les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées</i>	<i>157</i>
<i>Figure 47 : Représentation graphique du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE chez les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées</i>	<i>158</i>
<i>Figure 48 : Représentation graphique de l'activité des cholinestérases plasmatiques chez les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées.....</i>	<i>159</i>
<i>Figure 49 : Représentation graphique des résultats du test de mémoire à court terme chez les souris de génotype sauvage non-contaminées, les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées</i>	<i>160</i>
<i>Figure 50 : Représentation graphique des résultats du test de mémoire à moyen terme chez les souris de génotype sauvage non-contaminées, les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées</i>	<i>162</i>
<i>Figure 51 : Représentation graphique des résultats du test de mesure de l'activité locomotrice et exploratoire chez les souris de génotype sauvage non-contaminées, les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées.....</i>	<i>163</i>
<i>Figure 52 : Représentation graphique des résultats du test de mesure de l'état « anxieux » chez les souris de génotype sauvage non-contaminées, les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées</i>	<i>165</i>
<i>Figure 53 : Représentation graphique des résultats du test de mesure de l'état dit de « dépression » chez les souris de génotype sauvage non-contaminées, les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées.....</i>	<i>166</i>
<i>Figure 54 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus chez les rats juvéniles.....</i>	<i>170</i>
<i>Figure 55 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus chez les souris ApoE^{-/-}.....</i>	<i>174</i>
<i>Figure 56 : Représentation graphique de la cinétique d'apparition du m1AChR dans les cellules IMR-32 en fonction du temps de différenciation.....</i>	<i>178</i>
<i>Figure 57 : Photographies des cellules IMR-32 à différents stades de différenciation.....</i>	<i>179</i>

<i>Figure 58 : Représentation graphique de la mortalité cellulaire après incubation de 4, 24 ou 48 h en présence différentes concentrations de nitrate d'uranyle.....</i>	<i>182</i>
<i>Figure 59 : Représentation graphique de la viabilité cellulaire après 24 h d'incubation avec différentes concentrations de nitrate d'uranyle.....</i>	<i>183</i>
<i>Figure 60 : Photographies des cellules IMR-32 incubées en présence de SVF pendant le test de cytotoxicité à 24 h</i>	<i>184</i>
<i>Figure 61 : Observations au microscope et au SIMS de quelques cellules IMR-32 (cellules témoins).....</i>	<i>186</i>
<i>Figure 62 : Observations au microscope et au SIMS de quelques cellules IMR-32 après exposition pendant 24 h au nitrate d'uranyle (100 μM d'UA).....</i>	<i>187</i>
<i>Figure 63 : Photographies d'un neurone en microscopie et en MET.....</i>	<i>188</i>
<i>Figure 64 : Photographies réalisées au MET de précipités d'UA intra- et extracellulaires sur les cellules IMR-32</i>	<i>189</i>
<i>Figure 65 : Comportement de l'UA sur les cellules IMR-32</i>	<i>193</i>
<i>Figure 66 : Représentation de la conclusion générale du travail de thèse.....</i>	<i>221</i>

Tableaux

<i>Tableau 1 : Caractéristiques des isotopes naturels de l'uranium</i>	30
<i>Tableau 2 : Composition et activité des trois types d'uranium</i>	31
<i>Tableau 3: Sources d'UA et d'UE utilisées lors des expérimentations</i>	81
<i>Tableau 4 : Matériel biologique nécessaire pour les extractions de protéines</i>	88
<i>Tableau 5 : Composition des gels de polyacrylamide pour Western-blots.....</i>	89
<i>Tableau 6 : Références des anticorps utilisés pour les Western-blots.....</i>	90
<i>Tableau 7 : Plan type d'une plaque 96 puits pour les tests de cytotoxicité.....</i>	96
<i>Tableau 8 : Relevés du poids des animaux (témoins, UA et UE) ainsi que de leur consommation alimentaire et hydrique au début et à la fin de l'expérimentation (1,5 ou 9 mois)</i>	104
<i>Tableau 9 : Relevés du poids des animaux (témoins et plomb) ainsi que de leur consommation alimentaire et hydrique au début et à la fin de l'expérimentation.....</i>	104
<i>Tableau 10 : Tableau récapitulatif des modifications de la synthèse de choline et d'acétylcholine chez les rats adultes.....</i>	107
<i>Tableau 11 : Récapitulatif des modifications des transporteurs de l'acétylcholine et de la choline chez les rats adultes.....</i>	109
<i>Tableau 12 : Récapitulatif des modifications des récepteurs cholinergiques chez les rats adultes.....</i>	111
<i>Tableau 13 : Récapitulatif des modifications du taux d'acétylcholine et des enzymes de dégradation de l'acétylcholine chez les rats adultes</i>	114
<i>Tableau 14 : Récapitulatif des modifications du facteur neurotrophique et de ses récepteurs chez les rats adultes</i>	116
<i>Tableau 15 : Etudes réalisées sur les rats juvéniles.....</i>	126
<i>Tableau 16 : Relevé des paramètres généraux des rats juvéniles.....</i>	127
<i>Tableau 17 : Dosage d'uranium dans l'hippocampe et le cortex des rats juvéniles contaminés pendant 2mois</i>	128
<i>Tableau 18: Dosage d'uranium dans le cortex des rats juvéniles contaminés pendant 4 mois</i>	129
<i>Tableau 19 : Récapitulatif des modifications des enzymes de synthèse de la choline et de l'acétylcholine chez les rats juvéniles</i>	131
<i>Tableau 20 : Récapitulatif des modifications des transporteurs de l'acétylcholine et de la choline chez les rats juvéniles</i>	133
<i>Tableau 21 : Récapitulatif des modifications des récepteurs cholinergiques chez les rats juvéniles</i>	136
<i>Tableau 22 : Récapitulatif des modifications du taux d'acétylcholine et des enzymes de dégradation de l'acétylcholine chez les rats juvéniles</i>	140
<i>Tableau 23 : Récapitulatif des modifications du facteur neurotrophique et de ses récepteurs chez les rats juvéniles</i>	142
<i>Tableau 24 : Relevé des paramètres généraux de santé des souris de génotype sauvage et des souris ApoE^{-/-}</i>	153
<i>Tableau 25 : Dosage d'uranium dans le cortex des souris de génotype sauvage et des souris ApoE^{-/-}</i>	153
<i>Tableau 26 : Composition des milieux de cultures avec et sans SVF</i>	237
<i>Tableau 27 : Exemple de préparation des milieux contenant le nitrate d'uranyle.....</i>	241

ABREVIATIONS

AChE :	acétylcholinestérase	nAChRβ2:	nicotinic Acetylcholine Receptor beta 2 sub-unit
ACh :	acétylcholine	nBM:	noyau Basal de Meynert
ADNc :	acide désoxyribonucléique complémentaire	PBS:	Phosphate buffered saline
ARNm :	acide ribonucléique messager	PLD1:	Phospholipase D1
ApoE :	Apolipoprotéine E	PLD2:	Phospholipase D2
APS :	ammonium persulfate	PMSF:	phenylmethylsulphonyl fluoride
BuChE:	butyrylcholinestérase	Rpm :	rotations par minute
ChAT:	Choline Acétyl Transférase	SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
CHT:	Choline High affinity Transporter	SIMS :	secondary ion mass spectrometry (spectrométrie de masse à ionisation secondaire)
CYP :	cytochromes P 450	SVF :	sérum de veau foetal
DTT:	dithiothreitol	TEM :	Microscope électronique à transmission
dNTP:	mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxy adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy thymine tri-phosphate).	TGO :	Transaminases glutamique-oxaloacétiques
Gy:	gray	TGP :	Transaminases glutamate-pyruvate
HEPES:	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique	UA :	uranium appauvri
HPRT:	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	UE:	uranium enrichi
HRP:	horseradish peroxidase	UN :	uranium naturel
ICP-MS:	Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry	VACHT :	Vesicular Acetylcholine Transporter
KO:	Knock-out		
m1AChR:	muscarinic type 1 Acetylcholine Receptor		
MET:	Microscope Electronique à Transmission		
MTT:	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium		
nAChRα5:	nicotinic Acetylcholine Receptor alpha 5 sub-unit		

RESUME

L'uranium (U) est un métal lourd présent naturellement dans l'environnement. Il possède une toxicité chimique et radiologique. Le but de ce travail était : (i) d'évaluer les effets d'une ingestion chronique d'U sur le métabolisme cholinergique (synthèse, catabolisme, récepteurs...) et sur le comportement de rongeurs adultes, juvéniles ou prédisposés à une pathologie neurodégénérative (modèle ApoE^{-/-}) ; (ii) d'appréhender l'action neurotoxique de l'uranium sur un modèle cellulaire neuronal. *In vivo*, ces travaux montrent que les effets de l'U sont dépendants de la structure cérébrale (cortex > hippocampe), du modèle animal (juvénile > adulte), du temps d'exposition (sub-chronique > chronique), de la dose et de l'isotopie de l'U. *In vitro*, l'étude souligne le potentiel neurocytotoxique de l'U ainsi que la présence de précipités intracellulaires d'U. Ces résultats montrent que l'U a un impact néfaste sur les cellules neuronales, et qu'il perturbe le système cholinergique et le comportement.

Mots clés

Uranium, métal lourd, contamination chronique, neurotoxicité, système cholinergique, comportement, hippocampe, cortex, cytotoxicité, lignée cellulaire neuronale humaine

ABSTRACT

Uranium (U) is a heavy metal which occurs naturally in the environment. It is both a chemical and a radiological toxicant. The aim of this work was: (i) to assess the effects of U chronic exposure on the cholinergic system (biosynthesis and breakdown enzymes, receptors ...) and on behaviour of adult, young or predisposed to neurodegenerative illness (ApoE KO) rodents; (ii) to grasp the neurotoxic effects of U on human neuronal cells. *In vivo*, this work shows a structure- (cortex more sensitive than hippocampus), rodent model- (young more sensitive than adults), time- (sub-chronic exposure more harmful than chronic exposure), exposure level- and isotope-dependent effect of U. *In vitro*, the study underlined the neurocytotoxic U potential and the presence of uranium precipitates in cells. These results show the deleterious impact of U on neuronal cells, and demonstrate that U induces impairments on the cholinergic system and the behaviour of rodents.

Key words

Uranium, heavy metal, chronic exposure, neurotoxicity, cholinergic system, behaviour, hippocampus, cortex, cytotoxicity, human neuroblastoma cell line

VALORISATION

I. Publications

A. Publiées

H. Bensoussan, L. Grandcolas, B. Dhieux-Lestaevel, O. Delissen, C-M. Vacher, I. Dublineau, P. Voisin, P. Gourmelon, M. Taouis, P. Lestaevel. Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure. *Toxicology*. (2009) 261(1, 2): 59-67

M. Souidi, E. Tissandie, R. Racine, H. Bensoussan, C. Rouas, E. Grignard, I. Dublineau, P. Gourmelon P, Lestaevel, Y. Gueguen. Uranium : propriétés et effets biologiques après contamination interne. *Annales de biologie clinique* (2009) 67(1) : 23-38 (*Revue en français*)

P. Lestaevel*, E. Romero*, B. Dhieux, H. Bensoussan, H. Berradi, I. Dublineau, P. Voisin, P. Gourmelon. Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats. *Toxicology* (2008) 258(1): 1-9. . Avec * signifie que les deux premiers auteurs ont participé à part égale dans cette publication.

B. En cours d'écriture

H. Bensoussan, G. Resve, L. Grandcolas, B. Dhieux-Lestaevel, O. Delissen, C.M. Vacher, I. Dublineau, P. Voisin, P. Gourmelon, M. Taouis, P. Lestaevel. Memory and cholinergic system impairments after post-natal exposure to uranium. Pour soumission à *Behavioural Brain Research*.

H. Bensoussan*, C. Rouas*, L. Grandcolas, C-M. Vacher, I. Dublineau, P. Voisin, P. Gourmelon, M. Pallardy, M. Taouis, P. Lestaevel, Y. Gueguen. Titre provisoire: Uranium cytotoxicity and cellular accumulation in kidney, liver and human neuronal cells. Pour soumission à *Toxicology*. Avec * signifie que les deux premiers auteurs ont participé à part égale dans cette publication. Pour soumission à *Toxicology*

H. Bensoussan*, R. Racine*, F. Airault, I. Dublineau, P. Gourmelon, M. Souidi, P. Lestaevel. Titre provisoire: Effect on gene expression of acetylcholine and cholesterol metabolisms after exposure to depleted uranium in Alzheimer's disease model. Avec * signifie que les deux premiers auteurs ont participé à part égale dans cette publication. Pour soumission à *Journal of Molecular Neuroscience*.

P. Lestaevel, R. Racine, H. Bensoussan, C. Rouas, Y. Gueguen, J.M. Bertho, P. Gourmelon, I. Dublineau, J.R. Jourdain, M. Souidi. Césium 137 : propriétés et effets biologiques après contamination interne. Pour soumission à *Médecine Nucléaire*.

II. Communications

A. Affichées

H. Bensoussan, G. Resve, C.M. Vacher, I. Dublineau, P. Laloi, P. Voisin, P. Gourmelon, M. Taouis and P. Lestaevel. Memory and cholinergic system impaired by sub-chronic exposure to uranium in young rats. *Congrès International « Eurotox 2009 »*. Septembre 2009, Dresde, Allemagne

H. Bensoussan, C.M. Vacher, I. Dublineau, P. Laloi, P. Voisin, P. Gourmelon, M. Taouis and P. Lestaevel. Effets *in vivo* d'une contamination chronique à l'uranium sur le système cholinergique du rat juvénile. *Journées des thèses de l'IRSN 2008*. Octobre 2008, Voguë, France

H. Bensoussan, C.M. Vacher, I. Dublineau, P. Laloi, P. Voisin, P. Gourmelon, M. Taouis and P. Lestaevel. Cholinergic system: a new target of uranium after chronic exposure. *Journée de l'école doctorale 2008*. Juin 2008, Le Kremlin-Bicêtre, France

H. Bensoussan, C.M. Vacher, I. Dublineau, P. Laloi, P. Voisin, P. Gourmelon, M. Taouis and P. Lestaevel. Cholinergic receptors: a new target of uranium after chronic exposure. *Congrès International « Nicotinic Acetylcholine Receptors 2008 »*. Avril 2008, Cambridge, Grande-Bretagne

H. Bensoussan, C.M. Vacher, I. Dublineau, P. Laloi, P. Voisin, P. Gourmelon, M. Taouis and P. Lestaevel. Effets *in vivo* d'une contamination chronique à l'uranium sur le système cholinergique du rat. *Journée de l'école doctorale 2007*. Juin 2007, Le Kremlin-Bicêtre, France

B. Orales

H. Bensoussan, C.M. Vacher, I. Dublineau, P. Laloi, P. Voisin, P. Gourmelon, M. Taouis and P. Lestaevel. Effets d'une contamination chronique à l'uranium sur le système cholinergique : approches *in vivo* et *in vitro*. *Journées des thèses de l'IRSN 2009*. Septembre 2009, Aussois, France

H. Bensoussan, C.M. Vacher, I. Dublineau, P. Laloi, P. Voisin, P. Gourmelon, M. Taouis and P. Lestaevel. Cholinergic system: a new target of uranium after chronic exposure. *Congrès International « European Radiation Research society »*. Septembre 2008, Tours, France

H. Bensoussan, C.M. Vacher, I. Dublineau, P. Laloi, P. Voisin, P. Gourmelon, M. Taouis and P. Lestaevel. Effets *in vivo* d'une contamination chronique à l'uranium sur le système cholinergique du rat. *Journées des thèses de l'IRSN 2007*. Octobre 2007, Aussois, France

H. Bensoussan, C. Baudelin, C.M. Vacher, M. Taouis, F. Paquet, P. Voisin, P. Gourmelon et P. Lestaevel. Effets *in vivo* d'une contamination chronique à l'uranium sur le métabolisme du système cholinergique. *Congrès de la Société Internationale de Radiobiologie de Langue Française (SIRLaF)*. Septembre 2007, La Londe les Maures, France

AVANT-PROPOS

Il existe de nombreuses sources de pollution. Elles sont, de part l'essor démographique et industriel, majoritairement anthropiques (émissions de CO₂, pesticides, déchets ménagers, etc.) mais une partie reste d'origine naturelle (éruptions volcaniques, feux de forêts, dissolution de minerais dans l'eau). Ainsi, la diversité des polluants conduit à une exposition permanente de la population.

De plus, l'opinion publique est de plus en plus sensibilisée aux risques sanitaires et écologiques liés à la pollution environnementale. Pourtant, il existe un manque de données scientifiques permettant de répondre aux inquiétudes de la population.

Dans cette optique, l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire a mis en place en 2001 le programme Envirohom. Son objectif est de décrire les phénomènes de contamination chronique à faible dose des radionucléides et leur incorporation sur les organismes vivants. L'un des axes de ce programme est d'évaluer les effets d'une ingestion chronique d'un radionucléide : l'uranium, sur les grandes fonctions physiologiques (système nerveux central, reproducteur, immunitaire, etc.) de l'Homme.

L'uranium est un métal lourd présent naturellement dans l'environnement. Il est retrouvé dans le sol, l'eau et par voie de conséquence dans l'alimentation. Par ailleurs, son utilisation à des fins civiles ou militaires peut accroître sa dispersion et la contamination des sols. Les cibles majeures de la toxicité de l'uranium sont connues pour être, à court terme : le rein et à plus long terme : l'os. Toutefois, des études plus récentes ont montré que, lors d'ingestion chronique chez le rat, l'uranium pouvait traverser la barrière-hémato-encéphalique et provoquer des troubles neurologiques. Ces perturbations sont d'ordre moléculaire (augmentation du stress oxydant, modification du turn-over des monoamines et de l'activité de l'ACHÉ) et comportemental (augmentation d'anxiété, diminution des capacités mnésiques).

Dans ce contexte, l'objet de cette thèse est l'étude des effets de l'uranium sur le système cholinergique. Ce système a été choisi de part son interaction avec d'autres neurotransmetteurs et sa forte implication dans de nombreuses fonctions cognitives. Ce mémoire s'articulera en trois grandes parties. Premièrement, un modèle « rat adulte » a été étudié afin d'évaluer l'impact de l'uranium sur le système cholinergique. Deuxièmement, dans un souci de modéliser la population générale et notamment les sujets plus « fragiles », deux modèles rongeurs ont été abordés : un modèle rat juvénile (contaminé depuis la naissance) et un modèle souris prédisposé à une pathologie neurodégénérative (souris ApoE^{-/-}). Pour ces deux modèles, une analyse du système cholinergique, mais également du comportement, a été réalisée. Troisièmement, dans le but de comprendre les mécanismes d'action de l'uranium sur les neurones, un modèle cellulaire (IMR-32) a été initié.

Une présentation de l'uranium et du système cholinergique ouvriront ce manuscrit. Puis les résultats expérimentaux seront détaillés et discutés. Enfin, le bilan général, ainsi que quelques ouvertures inspirées par ce travail, seront présentées.

INTRODUCTION

I. Uranium

A. Géologie

1) Historique

Les premières traces d'utilisation de l'uranium remontent à l'époque romaine. Certaines villas de la baie de Naples étaient alors ornées de céramiques ou de peintures dont les pigments jaunes, oranges ou verts étaient extraits du minerai d'uranium. L'utilisation de ce minerai a perduré puisqu'il était employé au moyen âge comme colorant dans l'industrie du verre. D'après les historiens, l'uranium proviendrait des mines de pechblende de République-Tchèque.

En 1789 à Berlin, un chimiste allemand du nom de Martin Heinrich Klaproth, analysa pour la première fois la pechblende. Il donna à la roche le nom d'« urane », en rapport avec la récente découverte de la planète Uranus. Ce n'est que 52 ans plus tard à Paris qu'Eugène-Melchior Péligot, professeur de chimie analytique au Conservatoire National des Arts et Métiers, découvrit que l'urane était composé de 2 atomes d'oxygène et d'un atome de métal, qu'il nomma « uranium ». L'aspect radiologique de l'uranium a fortuitement été révélé par Henry Becquerel, physicien à Paris, en 1896 par l'impression d'un film photographique mis en contact de sels d'uranium. Il découvrit ainsi la radioactivité naturelle de l'uranium.

2) Caractéristiques

L'uranium, présent naturellement dans l'environnement, est un métal lourd gris-argenté appartenant à la famille des actinides, de symbole U, et de numéro atomique 92. Il peut se présenter selon les valences suivantes : II, III, IV, V ou VI, toutefois, dans la nature, il est généralement hexavalent et complexé à l'oxygène sous forme d'ion uranyle (UO_2^{2+}).

L'uranium possède 17 isotopes de masse atomique comprise entre 227 et 242. Seuls trois d'entre eux composent l'uranium naturel : ^{238}U , ^{235}U et ^{234}U . Ces isotopes, tous radioactifs, se désintègrent principalement par émission de particules α , mais également par de faibles rayonnements γ (Tableau 1).

Isotope	Période de décroissance	Energie émise par désintégration	Echelle de radioactivité
^{238}U	4,5 milliards d'années	4,15 MeV α	+
^{235}U	710 millions d'années	4,29 MeV α + 0,19 γ	++
^{234}U	244 mille ans	4,78 MeV α	+++

Tableau 1 : Caractéristiques des isotopes naturels de l'uranium

B. Utilisation par l'homme

1) Uranium naturel (UN)

L'uranium naturel a pendant longtemps été exploité uniquement pour ses pigments jaunes, oranges ou verts. La découverte de la radioactivité de cet élément a provoqué un tournant dans l'exploitation minière uranifère avec les débuts de l'enrichissement de l'uranium.

2) Uranium enrichi (UE)

L'uranium 235 est le seul noyau aisément fissible d'origine naturel, il présente donc un intérêt énergétique et militaire. L'uranium peut être enrichi en isotope 235 à hauteur de 4% en vue d'obtenir un combustible pour les centrales nucléaires. Il est ainsi à l'origine d'une production à grande échelle d'électricité. L'enrichissement de l'uranium peut également être plus important, atteignant jusqu'à 90% d'isotope 235, dans ce cas son utilisation reste militaire afin d'obtenir une arme nucléaire, telle que la bombe atomique, ou une amorce pour les bombes à hydrogène.

L'enrichissement de l'UE en isotope 235 lui confère une radioactivité plus importante que celle observée dans l'UN.

3) Uranium appauvri (UA)

L'UA est un sous-produit de l'enrichissement de l'UE. Il est employé à des fins civiles ou militaires. Ses propriétés lui octroient des utilisations spécifiques. Sa densité (70% plus dense que le plomb) est exploitée pour le lestage d'ailes d'avion ou de quilles de bateaux, ainsi que pour la fabrication de boucliers de protection utilisés dans la médecine nucléaire. Sa dureté sert au blindage des chars. Enfin son caractère pyrophorique (capacité de s'enflammer spontanément à l'air à température élevée) contribue à l'efficacité des ogives.

L'appauvrissement de l'UA en isotope ^{235}U lui confère une radioactivité moins importante que celle observée dans l'UN mais avec les mêmes propriétés chimiques (Tableau 2).

	Composition isotopique			Activité spécifique	Echelle de radioactivité
	^{238}U	^{235}U	^{234}U		
Uranium naturel	99,27%	0,72%	0,01%	$2,5 \cdot 10^4 \text{Bq/g}$	++
Uranium enrichi	95,74%	4,25%	0,01%	$4,2 \cdot 10^4 \text{Bq/g}$	+++
Uranium appauvri	99,73%	0,26%	0,01%	$1,4 \cdot 10^4 \text{Bq/g}$	+

Tableau 2 : Composition et activité des trois types d'uranium

C. Risques sanitaires

1) Exposition

L'uranium est un radionucléide tellurique. Ubiquitaire, il peut donc être retrouvé aussi bien dans le sol, l'eau, l'air que dans l'ensemble de la chaîne alimentaire en raison de ce dépôt naturel mais aussi de son exploitation par l'homme.

La concentration moyenne d'uranium dans la croûte terrestre est évaluée à 2 mg/Kg (ATSDR, 1999). Cette concentration varie en fonction de la constitution des roches. Ainsi, les principaux sites uranifères du globe sont exploités pour l'extraction d'uranium (figure 1). La différence de teneur des sols en minerai uranium est à l'origine de variations importantes de la concentration d'uranium dans les eaux souterraines et par conséquent dans les eaux de boisson. L'apport quotidien par l'eau est très variable en fonction des habitudes individuelles : eau d'adduction publique (eau du robinet), eau de sources ou de puits privés ou encore, eau embouteillée (minérale ou de source). L'OMS recommande de ne pas dépasser une concentration de 15 $\mu\text{g/L}$ en uranium dans l'eau de boisson (WHO, 2001). Pourtant, dans certaines régions aux sols granitiques tels que le Canada ou la Finlande, des eaux destinées à la consommation peuvent contenir jusqu'à 700 $\mu\text{g/L}$ (Moss, 1983a) voire 20 mg/L (Juntunen, 1991), respectivement.



Figure 1 : Principaux sites uranifères dans le monde

L'alimentation est également à l'origine d'une exposition importante à l'uranium. Comme pour l'eau, l'apport quotidien est dépendant des habitudes alimentaires, toutefois une consommation quotidienne moyenne a été estimée à $1,6 \mu\text{g}$ (ATSDR, 1999).

L'air est également porteur de particules d'uranium avec des valeurs moyennes estimées à $0,05 \text{ ng/m}^3$ d'air urbain (ATSDR, 1999). Ces valeurs sont très faibles et quasi négligeables.

En regroupant toutes ces informations, l'exposition quotidienne à l'uranium pour un homme de 70 Kg est d'environ $2,6 \mu\text{g}$ dont l'alimentation représente les 2/3 et l'apport en eau presque tout le reste (ATSDR, 1999).

A cette exposition naturelle vient s'ajouter l'exposition à l'UN, UE et UA induite par les activités humaines. Le traitement du minerai ainsi que l'utilisation d'UA dans les têtes d'obus perforants lors des conflits récents (Golfe, Kosovo, Afghanistan...) participent à la dissémination du radionucléide (Paschoa, 1998; Cantaluppi and Degetto, 2000; Shawky *et al.*, 2002; Di Lella *et al.*, 2005). De plus, un aspect indirect, non négligeable, est

l'utilisation d'engrais phosphatés (Paschoa, 1998; Cantaluppi and Degetto, 2000; Saueia and Mazzilli, 2006). Ces derniers ont une forte affinité avec les ions uranyle, ce qui conduit à leur concentration et à la contamination en cascade des sols et nappes phréatiques.

2) Biocinétique

L'uranium est considéré comme un élément non essentiel à l'organisme puisqu'il n'assure aucune fonction métabolique ou physiologique connue.

a) Absorption

L'absorption de l'uranium peut se faire par trois voies d'entrée : digestive, respiratoire ou percutanée (Craft et al., 2004).

L'ingestion de l'uranium est le mode de contamination le plus fréquent, puisque véhiculé par la consommation de nourriture et d'eau de boisson. Il touche ainsi la population dans sa globalité. L'absorption de l'uranium dépend de nombreux facteurs avec notamment une hétérogénéité inter-espèces. Par exemple, chez le rat le taux absorption est de 0,4% contre 2% chez l'homme (Berlin and Rudell, 1979; Sullivan, 1980b; Wrenn *et al.*, 1985; Leggett and Harrison, 1995; Frelon *et al.*, 2005). La dose et/ou la spéciation (forme chimique sous laquelle se présente le composé) de l'uranium ingéré (Sullivan *et al.*, 1986; La Touche *et al.*, 1987; Leggett and Harrison, 1995; Frelon *et al.*, 2005) ainsi que la consommation antérieure d'aliments et/ou la présence concomitante d'agents oxydants, tels que l'ion fer³⁺ ou la quinhydrone, (Sullivan *et al.*, 1986) sont les autres facteurs connus. Néanmoins, lors d'ingestion d'uranium dissout dans l'eau, l'équipe de Frelon a montré que la forme chimique de l'uranium n'influence pas son absorption corporelle chez le rat (Frelon *et al.*, 2005). Il a récemment été montré chez le rat que le transfert d'uranium du bol alimentaire au compartiment sanguin a exclusivement lieu dans l'intestin grêle (Dublineau *et al.*, 2005). Il est important de noter que ce transfert semble être plus important chez le nouveau-né que chez l'adulte (Sullivan, 1980a; Leggett, 1994).

L'inhalation et la contamination interne par blessure sont les modes d'absorption les plus fréquents chez les travailleurs du cycle du combustible du nucléaire. En raison des systèmes de protection respiratoire individuelle des travailleurs, la contamination est rare et en très faibles doses. La contamination percutanée est rare car une peau saine est une barrière efficace. Cette barrière perd son efficacité lors de lésions de la peau, ce qui permettrait à l'uranium de rejoindre la circulation sanguine (Ubios *et al.*, 1997; Tymen *et al.*, 2000; Petitot *et al.*, 2004).

Le passage materno-fœtal n'est pas à exclure puisque des études ont montrées que des souris soumises à une exposition à l'uranium pouvait transférer *in utero* une partie de la quantité d'uranium absorbée (Sikov and Mahlum, 1966). Ceci a été confirmé chez le rat par une publication démontrant une corrélation entre la quantité d'uranium retrouvé dans le fœtus et le nombre de pastilles d'UA implantées chez la mère (Benson, 1997). Cette contamination des petits continue pendant la phase de lactation. Chez l'homme, environ 1/20^{ème} de l'uranium absorbé dans l'alimentation passe dans le lait maternel. Les auteurs précisent que ce facteur est soumis à une grande variabilité interindividuelle (Wappelhorst et al., 2002).

b) Distribution et Rétention

Une fois la circulation sanguine atteinte, la pharmacocinétique de l'uranium semble être la même quelle que soit la forme incorporée ou la voie d'absorption (Fisenne and Perry, 1985; La Touche *et al.*, 1987; Leggett and Harrison, 1995). En raison de leur grande affinité avec les groupes phosphates, carboxyles et hydroxyles, les composés uranyles se lient facilement aux protéines du sang (transferrine, albumine ou lipoprotéines des hématies) pour former des complexes stables (Cooper *et al.*, 1982; Moss, 1983a; Pellmar, 1998). La clairance de la circulation sanguine s'effectue rapidement et l'uranium s'accumule dans ses organes cibles. Quelques jours après l'absorption, 90% de la charge systémique se retrouve dans l'os et le cortex rénal, et une fraction beaucoup plus faible dans les tissus mous (cerveau, foie, poumons, rate, etc.) (La Touche et al., 1987) (Figure 2).

L'os est l'organe de stockage à long terme de l'uranium (Wrenn et al., 1985), avec une concentration plus importante dans les zones de vascularisation et de calcification active (Hamilton, 1971). Le comportement de l'uranium dans le squelette est comparable à celui des alcalino-terreux (Priest, 2001). Des échanges d'ions uranyles UO_2^{2+} avec les ions calciums Ca^{2+} présents dans les cristaux d'hydroxyapatite sont à l'origine de sa fixation à la surface de l'os (Leggett, 1994; Priest, 2001).

Dans le rein, l'uranium est retrouvé dans les cellules tubulaires proximales (voir figure 3). A fortes concentrations, il se concentre dans les lysosomes et précipite sous forme de fines aiguilles insolubles de phosphate d'uranyle. Les micro-précipités sont excrétés dans la lumière du néphron et éliminés dans les urines sous forme de grains submicroscopiques (Galle, 1998).

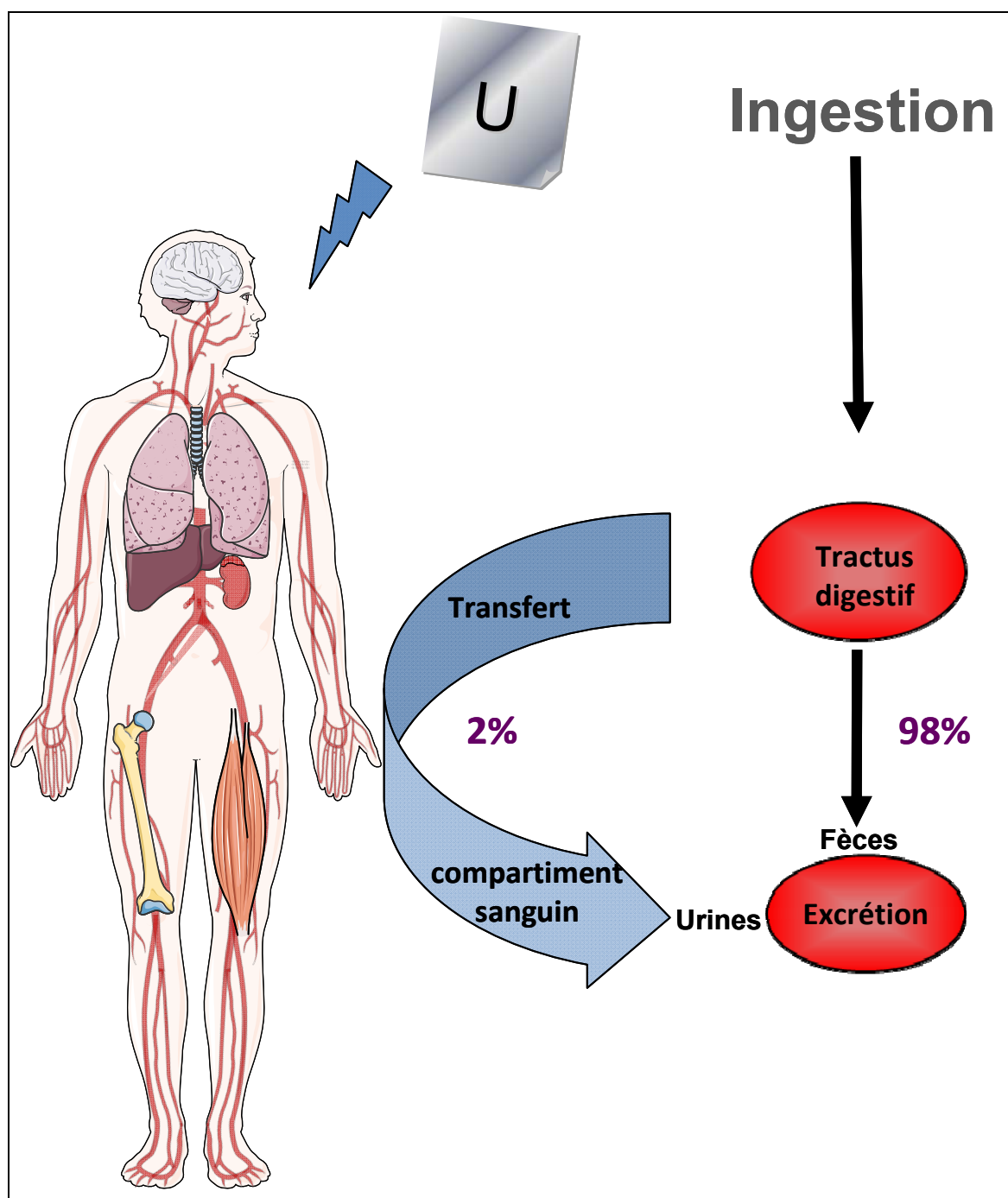


Figure 2 : Biocinétique de l'uranium et ses principaux organes cibles.

Seulement 2% de l'uranium ingéré est transféré dans le compartiment sanguin. Ses organes cibles sont les os, le rein, le SNC, le foie, les muscles lors d'ingestion, mais également les poumons lors d'inhalation. Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

c) Excrétion et élimination

Lors d'ingestions, 98% de l'uranium n'est pas absorbé, il est directement éliminé dans les fèces (WHO, 2001).

L'uranium contenu dans le compartiment sanguin est essentiellement éliminé par voie urinaire. Le pH est un facteur important puisque les faibles pH diminuent l'excrétion de l'uranium en augmentant son affinité pour les protéines de la paroi tubulaire (Berlin and Rudell, 1979). Chez l'homme la cinétique d'élimination est la suivante : 50% de l'uranium absorbé est éliminé dans les tout premiers jours, 70% au bout de 10 jours et 85% en 3 mois (Leggett and Pellmar, 2003). Cependant, du fait de la rétention importante et de l'excrétion lente et faible de l'uranium par l'os, la demi-vie de l'uranium dans l'organisme est comprise entre 300 et 5000 jours (WHO, 2001).

3) Toxicité sur les organes

En tant que métal lourd et radioélément, l'uranium possède une double toxicité : chimique et radiologique. L'uranium naturel et appauvri présentent avant tout une toxicité chimique (Leggett, 1989; Taylor and Taylor, 1997) en raison de leur faible activité spécifique. Par contre, l'UE possède une activité spécifique plus importante, ce qui lui confère à la fois une toxicité chimique et radiologique.

Pour les risques chimiques et radiologiques, deux types d'effets sont distingués : les effets de toxicité aiguë, correspondant à une exposition sur un temps court, et les effets de toxicité chronique, correspondant à une exposition sur un temps long.

a) Reins

L'ensemble de l'organisme est susceptible d'être touché par la toxicité de l'uranium, cependant les reins (figure 3) constituent une cible privilégiée, comme l'indique l'abondante littérature relative aux effets rénaux de l'uranium (Hursh *et al.*, 1969; Diamond *et al.*, 1989; Leggett, 1989; Leggett and Harrison, 1995; Hodges *et al.*, 1998; Kurtio *et al.*, 2002; Albina *et al.*, 2005; Taulan *et al.*, 2006).

La dose létale 50 (DL₅₀) *per os* de l'acétate d'uranyle est de 204 mg/Kg chez le rat et de 242 mg/Kg chez la souris. Même si de nombreux troubles tels qu'une piloérection généralisée, des hémorragies des yeux, des pattes et du museau apparaissent, le décès des animaux est attribué à la toxicité rénale causée par une néphrite tubulaire aiguë (Albina *et al.*, 2005). Le seuil morbide d'exposition à l'uranium est estimé entre 0,7 et 1,4 µg/g de rein (Diamond *et al.*, 1989).

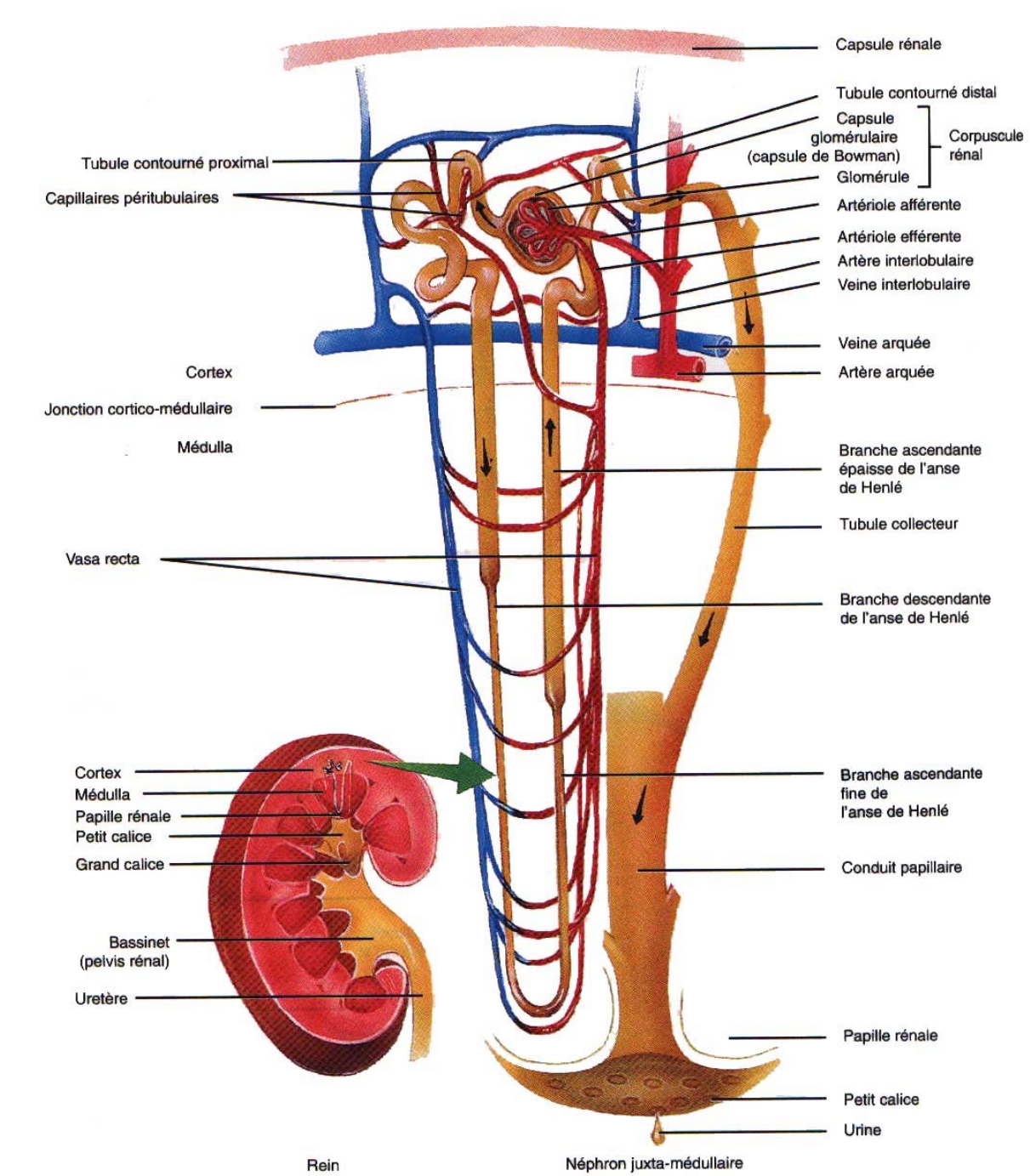


Figure 3 : Schéma de l'anatomie du rein

Après expositions aiguës chez le rongeur, quelles soient intramusculaires (acétate d'uranyle : 0,1 à 1 mg/Kg), subcutanées (acétate d'uranyle : 2,5 à 5 mg/Kg) ou intra-péritonéales (fluorure d'uranyle : 0,66 à 1,32 mg/Kg), les lésions rénales induites sont majoritairement localisées dans les deux tiers distaux du tube contourné proximal (Diamond *et al.*, 1989; Anthony *et al.*, 1994; Albina *et al.*, 2005; Jortner, 2008). Après contamination au fluorure d'uranium, l'anse de Henlé ainsi que les tubes collecteurs

apparaissent également affectés. L'intensité des lésions varie en fonction de la dose d'uranium (Leggett, 1989). Lors de faibles expositions, l'effet délétère de l'uranium semble réversible. Un renouvellement cellulaire s'opère. Toutefois, sur un plan histologique, ce renouvellement est imparfait avec des zones présentant des cellules aplaties dépourvues de microvillosités sur la surface intracavitaire et un nombre de mitochondries restreint (Leggett, 1989). De plus, l'exposition répétée à l'uranium est à l'origine d'une pseudo-tolérance à la toxicité (Durbin, 1976). Toutefois, celle-ci ne prévient pas pour autant des dommages chroniques au rein puisque les cellules régénérées sont très différentes. En outre, l'accumulation d'uranium dans le rein induit un épaississement de la membrane basale glomérulaire provoquant des dommages permanents (McDonald-Taylor et al., 1997).

En cas d'expositions chroniques au nitrate d'uranyle *via* l'eau de boisson, l'atteinte rénale reste essentiellement tubulaire (Diamond et al., 1989; Gilman et al., 1998a; Gilman et al., 1998b; Zamora et al., 1998; Kurttio et al., 2002; Donnadieu-Claraz et al., 2007). Cette atteinte semble corrélée à une augmentation tubulaire des vésicules d'inclusion d'oxyde de fer d'après une étude menée chez le rat (concentration d'uranium dans l'eau : 40 mg/L) (Donnadieu-Claraz et al., 2007). Toujours chez le rat, des altérations glomérulaires ont été relevées après 91 jours de contamination à 96 mg U/L (Gilman et al., 1998b). Chez l'homme, des études épidémiologiques ont été réalisées sur plusieurs années auprès de populations consommant l'eau de puits privés contenant des concentrations d'uranium supérieures aux recommandations. Une vacuolisation et dilatation cytoplasmique ainsi qu'une vésiculation tubulaire ont été observées sur les reins d'une cohorte de Nouvelle Ecosse (concentrations d'uranium dans l'eau comprises entre 2 et 781 µg/L) (Zamora et al., 1998). Une autre étude, basée sur une population consommant en moyenne une eau à 28 µg/L, souligne une corrélation entre l'excrétion d'uranium et la phosphaturie, calciurie et polyurie (Kurttio et al., 2002). Cependant, aucune atteinte glomérulaire n'a été mise en évidence au cours de ces relevés épidémiologiques. Par ailleurs, un suivi des vétérans de la guerre du Golfe souligne une tendance non significative à l'inhibition de la réabsorption de protéines dans les cellules rénales du tube contourné proximal (McDiarmid et al., 2006) et une tendance à l'émergence de dysfonction tubulaire rénale (McDiarmid et al., 2009), respectivement 12 et 16 ans après le retour des troupes. Ainsi, la cinétique d'apparition des perturbations rénales induites par l'uranium est très lente.

Des travaux de toxicogénomique menés sur le rein murin lors d'exposition aiguë (IP unique de 5mg/kg) ou chronique (4 mois, *via* l'eau de boisson à 80 ou 160 mg/L) de nitrate d'uranium montrent des perturbations géniques de plus de 200 gènes, parmi 14 000, impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme le stress oxydant, la transduction

du signal, le métabolisme, le catabolisme ou encore les transporteurs cellulaires (Taulan, 2004). Ces profils d'expression génique donnent une ouverture pour une meilleure compréhension de la physiopathologie rénale liée à une intoxication à l'uranium. D'autres études tentent d'éclaircir les mécanismes d'action de l'uranium sur les cellules rénales. Par exemple, l'inhibition de l'utilisation de l'ATP dépendante ou non du sodium ou de la phosphorylation oxydative des mitochondries, peuvent expliquer en partie les atteintes tubulaires (Leggett, 1989; Albina *et al.*, 2005). Des expérimentations *in vitro* décrivent quant à elle une diminution du transport du glucose sur des cellules apicales isolées de rein (à une dose de 140 mg U/g de protéine) (Hankin *et al.*, 1993). Au niveau intracellulaire, 5 min après une injection d'uranium sur des rats ($[\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2]$: 20 mg/kg en intra-péritonéale), les mitochondries de cellules rénales voient leur concentration calcique significativement augmentée (Carafoli *et al.*, 1971). Enfin, une accumulation de précipités intracellulaires d'uranium a pu être observée sur une lignée cellulaire rénale humaine (concentrations comprises entre 650 et 850 μM de bicarbonate d'uranium) (Milgram, 2007). Même si les effets de l'uranium sur le rein sont largement décrits, son mode d'action reste encore peu expliqué. Cependant, un travail effectué sur une lignée cellulaire d'origine tubulaire proximale (LLC-PK₁) montre que l'absorption cellulaire de l'uranium semble suivre deux mécanismes distincts :

- d'une part, la majeure partie de l'uranium est absorbée par endocytose selon un processus clathrine-dépendant. Ce processus serait à l'origine du transfert de l'uranium dans les lysosomes, où il précipiterait ;

- d'autre part, une fraction plus faible de l'uranium entre dans la cellule grâce aux co-transporteurs NaPi de type IIa. La forte affinité de l'uranium pour le phosphate lui permettrait d'emprunter ces transporteurs, responsables de la réabsorption tubulaire proximale du phosphate. Cette fraction soluble de l'uranium dans le compartiment intracellulaire serait à l'origine de sa cytotoxicité (Muller, 2002).

b) Os

L'uranium se substitue au calcium à la surface de l'os (Neuman *et al.*, 1949). Ce dernier est le site d'accumulation à long terme de l'uranium (Pellmar *et al.*, 1999a).

Des études menées sur des rats après contaminations aiguës (0,2 à 2 mg/Kg en IM ou 0,8 mg/Kg en IP) s'accordent à dire que l'uranium provoque une inhibition de la formation osseuse ainsi qu'une augmentation de la résorption osseuse (Ubios *et al.*, 1991; Fukuda *et al.*, 2006). Ghosh *et al.* ajoutent qu'une dose néphrotoxique d'uranium (576 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en IP) induit une augmentation de la peroxydation lipidique osseuse (Ghosh *et al.*, 2007).

Les expositions chroniques à l'uranium altèrent également le tissu osseux. La croissance et la formation osseuse, ainsi que l'ossification sont diminuées chez des rats implantés pendant 30 jours avec 0,125 mg/kg d'uranium (Diaz Sylvester et al., 2002). Ce résultat est conforté par une étude récente montrant que 9 mois de contamination (eau de boisson à 40 mg/L) diminuent la forme active de la vitamine D présente dans le plasma (Tissandie et al., 2006). Or cette dernière a un rôle essentiel dans l'homéostasie et la minéralisation osseuse. Chez l'homme, une augmentation de l'ostéocalcine et une diminution du Télopeptide C-terminal du Collagène type-1 (CTx) (marqueurs de résorption et formation osseuse, respectivement) ont été relevées sur une cohorte de 288 personnes (homme et femmes confondus) consommant depuis 13 ans une eau contenant 27 µg U/L (Kurttio et al., 2005). De plus, les dépôts d'uranium dans l'os sont dose-dépendants (Arruda-Neto et al., 2004) et âge-spécifiques avec un profil du taux de renouvellement équivalent à celui du calcium (Lariviere et al., 2007). Ces différentes données laissent penser que l'uranium pourrait contribuer à l'ostéoporose chez les personnes exposées. Ceci est appuyé par le suivi des vétérans de la guerre du Golfe, 16 ans après leur retour, qui met en évidence l'émergence de problèmes de formation osseuse (McDiarmid et al., 2009).

Sur des cellules ostéoblastiques humaines, l'uranium (24 h à 10 µM de chlorure d'uranyle) semble avoir un effet tumorigène (Miller et al., 1996). Par ailleurs, à des concentrations comprises entre 1 et 100 µM de nitrate d'uranyle, Tasat et al observent une augmentation des espèces réactives à l'oxygène (stress oxydant) et une diminution des phosphatases alcalines de manière dose-dépendante (Tasat et al., 2007).

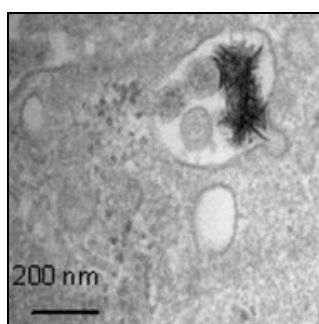


Figure 4 : Précipités d'uranium dans des lysosomes d'ostéoblastes
(selon Milgram et al, 2008a)

Enfin, plusieurs études menées sur des ostéoblastes par l'équipe de Milgram et al ont permis de déterminer le seuil de cytotoxicité (300 µM de nitrate d'uranyle à 24 h), le lieu d'accumulation intracellulaire (précipités d'uranium dans les lysosomes, Figure 4) ainsi que des effets différentiels de l'uranium sur les marqueurs de formation et de minéralisation osseuse. Ces marqueurs sont inhibés par des concentrations toxiques d'uranium dans le

milieu, alors qu'ils sont activés à des doses non-toxiques (Milgram, 2007; Milgram et al., 2008a; Milgram et al., 2008b).

c) Poumons

Le système respiratoire est la cible de contaminations par inhalation. Seules les plus petites particules peuvent atteindre les cellules épithéliales pulmonaires. Ces cellules, ainsi que les macrophages alvéolaires, sont les cibles de la toxicité pulmonaire (Leach et al., 1973). Si le composé d'uranium est insoluble, les particules persistent dans l'arbre respiratoire où elles peuvent être à l'origine d'irradiations locales ou d'effets chimiques. S'il est soluble, l'uranium peut rejoindre la circulation sanguine avant d'être éliminé par le rein.

Des expositions chroniques d'hexafluorure d'uranium (13 mg/m^{-3}), à raison de 6 heures par jours pendant 30 jours peuvent induire, chez différentes espèces animales, des œdèmes pulmonaires, une inflammation des bronches, et des alvéoles ainsi que des emphysèmes (ATSDR, 1999). De plus, l'exposition chronique à long-terme de poussières de minerai d'uranium (oxydes d'uranium), provoque une prolifération cellulaire (carcinomes et adénomes) et des zones de fibroses et/ou nécroses (Leach et al., 1970; Leach et al., 1973; Mitchel et al., 1999).

Chez l'homme, des études épidémiologiques sur des mineurs d'uranium montrent une augmentation du nombre de fibroses pulmonaires (Harold et al., 2003). Toutefois, la plupart des études ne soulignent pas d'augmentation de la mortalité par maladies respiratoires ou pneumonie chez les travailleurs par rapport aux sujets non-exposés (Dupree et al., 1987; McGeoghegan and Binks, 2000; Tirmarche et al., 2004; Rogel et al., 2005).

L'action de l'uranium sur les poumons passerait par une réaction inflammatoire avec l'induction de cytokines pro (IL-8 et TNF α) et anti-inflammatoires (IL-10) (Lang et al., 1994; Pasanen et al., 1995; Monleau et al., 2006). Des études *in vitro* réalisées sur des macrophages pulmonaires retracent la cinétique du processus inflammatoire. L'incorporation de l'uranium par les macrophages est effectuée dans les 2 heures post-exposition, puis en 6 heures, l'apoptose cellulaire débute. La voie JNK activée est à l'origine de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Kalinich et al., 2002; Gazin et al., 2004; Tsai et al., 2007).

L'uranium conduit également à un stress oxydant. *In vitro*, des cellules épithéliales de rat exposées à l'uranium montrent, en 30 minutes, une induction de stress oxydant suivi par une diminution des défenses anti-oxydantes. Vingt-quatre heures après, la prolifération

cellulaire est fortement diminuée, résultat attribué à la diminution des défenses anti-oxydantes (Periyakaruppan et al., 2007).

d) Foie

Le foie n'est pas une cible majeure de la toxicité de l'uranium.

Cependant, l'acétate d'uranyle en administration intradermique (10 mg/Kg) ou *per os* (210 mg/Kg) provoque des modifications histologiques et des lésions tissulaires hépatiques (Albina et al., 2005). Au niveau moléculaire, l'inhalation de 9,3 KBq de dioxyde d'uranium induit une modification de l'activité de certaines enzymes hépatiques. Ces enzymes, de type cytochromes P450 (CYPs), sont impliquées dans le catabolisme du cholestérol (Pasanen et al., 1995). D'autre part, une dose unique *per os* de nitrate d'uranyle (204 mg/Kg) perturbe le métabolisme de la vitamine D₃ par modulation des CYP et récepteurs nucléaires associés (Tissandie et al., 2006). En plus du métabolisme des endobiotiques, une exposition aiguë au nitrate d'uranyle affecte le métabolisme des acides biliaires (sous-cutanée: 11,5 mg/Kg) et des xénobiotiques (sous-cutanée: 11,5 mg/Kg (Gueguen et al., 2006) et intraveineuse 5 mg/kg (Moon et al., 2003)).

L'exposition chronique au nitrate d'uranyle altère également le métabolisme des xénobiotiques (contamination 9 mois, par eau de boisson à 40 mg U/L) par une augmentation d'expression des enzymes de phase I (CYP3A) (Souidi et al., 2005). Une seconde étude, menée dans les mêmes conditions expérimentales, confirme que l'uranium perturbe la pharmacocinétique du médicament puisqu'une élimination plus lente du paracétamol plasmatique a été observée chez les animaux contaminés à l'uranium (Gueguen et al., 2007). Chez ces animaux, une augmentation du taux protéique de la CYP3A2, enzyme de phase I assurant la métabolisation des composés endogènes, a également été notée (Rouas, 2008). De plus, une augmentation des marqueurs biochimiques d'une atteinte hépatique a été constatée plus fréquemment chez les animaux contaminés (Gueguen et al., 2007). En outre, l'équipe d'Ortega et al a observé une augmentation des transaminases glutamique-oxaloacétiques (TGO) et des transaminases glutamate-pyruvate (TGP) après une exposition de 4 semaines à de l'acétate d'uranyle dilué dans l'eau de boisson (4, 8 ou 16 mg/Kg/jour) (Ortega et al., 1989). Sur le plan macroscopique, l'inhalation au tétrafluorure d'uranium (0,4 mg U/m³ pendant 30 jours) est à l'origine de nécroses des certaines régions du foie (Dygert, 1949).

Peu de données sont disponibles sur les effets de l'uranium sur les modèles cellulaires hépatiques. Toutefois, une étude préliminaire a noté une augmentation dose-dépendante de l'expression de nombreux promoteurs de gènes impliqués dans diverses voies de

signalisation (hMTIIA FOS, p53RE, Gadd153, Gadd45, NFkappaBRE, CRE, HSP70, RARE, et GRP70) après exposition conjuguée à l'uranium et au tungstène (métal lourd souvent allié à l'uranium) (Miller *et al.*, 1996).

e) Système reproducteur et développement

Le système reproducteur est une cible privilégiée des polluants environnementaux, l'uranium n'échappe pas à cette règle.

Chez les rats mâles, 18 mois après l'implantation sous cutanée de billes d'uranium appauvri, Pellmar *et al.* notent une accumulation du minerai dans les testicules (Pellmar *et al.*, 1999a). D'autres études ont été menées après ingestion chronique d'uranium. Il en résulte une diminution du poids des testicules (nitrate d'uranyle : 0,07 mg/kg/jour pendant 16 semaines) (Malenchenko *et al.*, 1978). Sur le plan histologique, des lésions du tissu interstitiel et une vacuolisation des cellules de Leydig (acétate d'uranyle: 10, 20, 40 et 80 mg/kg/jour pendant 64 jours) ont été observées chez la souris. Toutefois, ces lésions ne semblent pas altérer la spermatogenèse (Llobet *et al.*, 1991). Une chute de la fertilité des mâles, traduite par une diminution du nombre de spermatozoïdes, a également été décrite par l'équipe de Linares après 3 mois de contamination à 10, 20 et 40 mg/kg/jour d'acétate d'uranyle *via* l'eau de boisson (Albina *et al.*, 2005). Enfin, une étude récente relève une augmentation du taux de testostérone circulante après 9 mois de contamination (*via* l'eau de boisson : 40 mg/L de nitrate d'uranium enrichi à 4%) (Grignard *et al.*, 2008).

Chez la souris gestante, la plupart des études s'accordent à dire que l'exposition chronique à l'uranium, *per os* ou intradermique, induit une toxicité maternelle chez la souris (du 6^{ème} au 15^{ème} jour de gestation ; acétate d'uranyle : *per os* 5, 10, 25 et 50 mg/kg/jour ou en intradermique : 0,5, 1 et 2 mg/kg/jour) (Bosque *et al.*, 1993; Albina *et al.*, 2005). Dans cette étude, Bosque *et al.* soulignent également une diminution du poids des mères. Quant aux cellules germinales, la qualité des ovocytes est altérée par 49 jours de contamination au nitrate d'uranyle (eau de boisson : 10, 20 et 40 mg/L) (Feugier *et al.*, 2008). Dans le cadre de cette étude une dose sans effet néfaste (NOAEL pour non-observed adverse effects level), estimée à 10 mg/L, a été déterminée pour les oocytes (Feugier *et al.*, 2008). D'un point de vue hormonal, l'équipe de Raymond-Whish a pu observer de nombreuses perturbations endocriniennes chez les souris lors de contaminations au nitrate d'uranyle (eau de boisson : 0,5 µg/L à 28 mg/L, pendant 30 jours). Les souris présentent notamment une réduction du nombre de follicules primaires ainsi qu'une augmentation du poids utérin et de la taille des cellules épithéliales de la lumière vaginale. Ces perturbations disparaissent sous l'action concomitante d'un anti-oestrogénique (ICI 18,

780). Les auteurs suggèrent que, comme le cadmium, l'uranium agirait comme agoniste des récepteurs oestrogéniques (Raymond-Whish et al., 2007).

Le stade embryo-fœtal est sans aucun doute le plus sensible à la contamination par l'uranium. Les études de Domingo et al et de Bosque et al suscitées soulignent également une nette embryo/foetotoxicité et tératogénicité. Domingo et al ajoutent même la description de nombreuses malformations des fœtus (Bosque et al., 1993; Albina et al., 2005). Des administrations sous-cutanées d'acétate d'uranyle à 0,415 et 0,830 mg/kg/jour du 6^{ème} au 15^{ème} jour de gestation provoquent chez le rat des diminutions de poids, ainsi que des retardements de l'ossification des fœtus (Albina et al., 2005). Paternain et al ont également observé un fort taux de létalité embryonnaire et une croissance plus lente des nouveau-nés (5, 10 et 25 mg/kg/jour d'acétate d'uranyle *per os*, pendant 60 jour avant l'accouplement pour les mâles et 14 jours avant pour les femelles) (Paternain et al., 1989). Quant aux portées, leur taille, viabilité et indice de lactation sont amoindris lors de contamination *per os* débutant au 13^{ème} jour de gestation et s'achevant au 21^{ème} jour *post-partum*, jour d'euthanasie des souriceaux (5, 10 et 25 mg/kg/jour d'acétate d'uranyle) (Albina et al., 2005). Le comportement et le développement des jeunes rats ne sont quant à eux, pas perturbés par une contamination à l'acétate d'uranyle de 0, 40 ou 80 mg/kg/jour par eau de boisson, initiée 4 semaines avant l'accouplement et finalisée à la fin de la lactation (Albina et al., 2005).

Chez l'homme, une étude épidémiologique a montré une diminution du taux de testostérone chez les mineurs de Namibie (Zaire et al., 1997). Toutefois les études menées sur les vétérans de la guerre du Golfe ne soulignent aucun effet de l'uranium sur le système reproducteur (Squibb and McDiarmid, 2006). Chez le personnel féminin du nucléaire, une augmentation des 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 chez l'homme (Hindin et al., 2005).

f) Effets mutagènes et génotoxiques

Chez le rongeur, une augmentation des cassures double-brin d'ADN des cellules issues d'un lavage broncho-alvéolaire a été observée après inhalations chroniques ou aiguës de particules de dioxyde d'uranium (UO₂) (Monleau et al., 2006). Par ailleurs, l'injection de fluorure d'uranium enrichi (UO₂F₂) provoque une augmentation des aberrations chromosomiques des spermatogonies et des cassures d'ADN dans les spermatozoïdes (Greig et al., 2001).

Chez l'homme, une augmentation des aberrations chromosomiques des lymphocytes circulants a été relevée chez les mineurs d'uranium de Namibie, ainsi que chez les travailleurs du cycle du combustible (Martin et al., 1991; Zaire et al., 1996). Milacic a également mis en évidence une élévation des atteintes de l'ADN chez les ouvriers en charge du nettoyage du territoire serbo-monténégrin, souillé par l'uranium appauvri lors du conflit des Balkans (Milacic, 2008). La méthylation de certains gènes, retrouvée chez les mineurs d'uranium en Chine, pourrait être un marqueur précoce de détection des lésions de l'ADN selon l'équipe de Su et al (Su et al., 2006). Un suivi des vétérans de la guerre du Golfe souligne une tendance à l'augmentation de la fréquence des mutations géniques chez les sujets les plus exposés à l'uranium, toutefois cette augmentation n'apparaît pas comme significative (McDiarmid et al., 2006; Squibb and McDiarmid, 2006).

In vitro, Miller et al ont démontré que l'uranium appauvri augmentait le taux d'aberrations chromosomiques et le nombre de micronoyaux dans des cellules d'ostéoblastes humains immortalisés (exposition de 24h, à 50µM d'UA) (Miller et al., 1996). La génotoxicité à 24h de l'UA a également été rapportée sur d'autres lignées cellulaires, comme les cellules ovariennes de Hamster (CHO, dès 200µM d'U), les cellules rénales immortalisées de rat (NRK-52E, dès 300 µM d'U) ou les cellules de culture primaires ou immortalisées (LT97) de colon humain dès 500 µM d'U (Stearns et al., 2005; Knobel et al., 2006; Thiebault et al., 2007). L'équipe de Miller a également montré, dans les publications suscitées, que l'augmentation de l'activité spécifique de l'uranium (à quantité d'uranium égale mais en faisant varier la composition isotopique) était corrélée à une augmentation de la fréquence de transformations néoplasiques, suggérant un rôle possible de la faible radioactivité de l'uranium appauvri dans l'apparition des effets biologiques et génotoxiques, au moins *in vitro* (Miller et al., 1996).

g) Effets cancérogènes

A l'heure actuelle, des effets tumorigènes de l'uranium ont été décrits, sans pouvoir en expliciter les processus.

L'implantation de fragments d'uranium appauvri sous la peau de rat provoque une augmentation de tumeurs malignes des tissus mous adjacents de l'implant (Hahn et al., 2009). Miller et al ont supposé que l'implantation d'uranium serait à l'origine d'une altération de l'environnement *in vivo*, favorisant l'apparition de cancers. Chez la souris, après implantation, les auteurs ont injecté des cellules progénitrices de cellules cancéreuses hématopoïétiques. Leur hypothèse semble validée puisque 72% des souris implantée avec l'UA ont développé une leucémie, contre 12% pour les souris témoins (Miller et al., 1996).

In vitro, l'équipe de Miller a également mis en évidence la transformation de cellules ostéoblastiques humaines en cellules cancéreuses lors de contacts de 24 h avec 10 μM d'UA (Miller *et al.*, 1996).

Chez l'homme des études épidémiologiques ont été effectuées sur les populations de mineurs d'uranium. Ces travaux montrent une augmentation du nombre de cancers du poumon, du foie, de la vessie, de l'estomac, du rectum, ainsi que du nombre de lymphomes non-hodgkinien et de myélomes (Tomasek *et al.*, 1993; Hornung *et al.*, 1995; Laurier *et al.*, 2001; Schubauer-Berigan *et al.*, 2009; Vacquier *et al.*, 2009). Ces cancers seraient *a priori* causés par le radon, gaz omniprésent dans les mines uranifères issu de la désintégration de l'uranium. Aux Etats-Unis, un suivi des populations résidant aux alentours des installations de traitement d'uranium ne montre aucune augmentation du risque de cancer (Boice *et al.*, 2003; Boice *et al.*, 2007; Boice *et al.*, 2009). Enfin, chez les travailleurs(es) du nucléaire, une augmentation du nombre de mélanomes et de cancers du sein a été relevée (Telle-Lamberton *et al.*, 2004).

h) Autres effets

Chez le rat, au niveau intestinal, l'UA sous forme insoluble n'est pas absorbé par les cellules épithéliales (Lang and Raunemaa, 1991). Toutefois, une exposition chronique à l'uranium appauvri *via* l'eau de boisson (40 mg/L pendant 3, 6 ou 9 mois) est à l'origine d'une inflammation des cellules intestinales, et ce de manière dépendante du temps de contamination. Les auteurs suggèrent que l'uranium provoquerait une hypersensibilité ou une diminution des mécanismes de défense de ces cellules (Dublineau *et al.*, 2007).

Le système immunitaire semble également affecté par l'uranium. Après inhalation aiguë ou chronique d'UA (UO_2), une augmentation des cytokines inflammatoires et du stress oxydant a été relevée chez le rat (Monleau *et al.*, 2006). *In vitro* sur une lignée murine de macrophage exposée 24 h à 1, 10 ou 100 μM d'UA, Kalinich *et al.* ont montré que l'uranium, après avoir été capté puis concentré dans les cellules, provoquait la mise en apoptose de ces dernières (Kalinich *et al.*, 2002). Enfin, chez l'homme, des modifications de la formule sanguine ont été observées chez les mineurs d'uranium de Namibie (Zaire *et al.*, 1997) et chez les nettoyeurs de territoires serbes et monténégrins après la guerre des Balkans (Milacic, 2008).

Chez le rat, l'exposition chronique à l'uranium provoque également des perturbations du métabolisme de la vitamine D (Tissandie *et al.*, 2006; Tissandie *et al.*, 2007), du cholestérol cérébral (Racine *et al.*, 2009); ainsi que des atteintes de la thyroïde, atteintes semblables à celle observée lors de réaction auto-immune (Malenchenko *et al.*, 1978).

i) Système nerveux central (SNC)

i) Passage de l'uranium dans le SNC

L'équipe de Lemerrier a prouvé qu'il existait un passage hémato-méningé de l'uranium lors d'une expérience de perfusion *in situ* chez le rat (Lemerrier et al., 2003). En exposition aiguë, une étude montre que l'accumulation de l'uranium est différente suivant les structures cérébrales en fonction du temps post-exposition et suit un gradient de « migration » rostro-caudal (IP unique chez le rat de 1 mg/kg d'acétate d'uranyle) (Barber et al., 2005). En exposition chronique, après implantation de pastilles d'uranium sous la peau, l'accumulation de l'uranium est dose-dépendante (Pellmar et al., 1999a) et hétérogène suivant les structures (Fitsanakis et al., 2006). Par ailleurs, Houpert et al ont observé que l'accumulation de l'uranium dépend également du mode de contamination. En effet, lors d'inhalation, une forte quantité d'uranium est détecté dans le cerveau, notamment dans les régions antérieures, alors que l'ingestion d'uranium ne provoque qu'une légère accumulation d'uranium dans des régions centrales du cerveau (hippocampe et striatum) (Houpert et al., 2007c).

Il est maintenant clair que l'uranium traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE) et s'accumule dans le cerveau de manière dépendante de la dose reçue, du mode de contamination et du temps d'exposition à l'uranium. Par contre, ce passage hémato-méningé reste inexpliqué. Un travail, mené par Lemerrier et al, démontre que l'uranium n'altère pas la BHE, ceci incite les auteurs à discuter d'un éventuel passage vasculaire et parenchymateux (Lemerrier et al., 2003). La publication de Fitsanakis soutient l'hypothèse de Pellmar selon laquelle l'uranium passerait la BHE grâce à des transporteurs tels que le TfR (Transferrine récepteur) ou le DMT1 (divalent metal transporter 1) (Pellmar et al., 1999a; Fitsanakis et al., 2006). Cette hypothèse n'a pas, à l'heure actuelle, été confirmée. Par ailleurs, une équipe a récemment démontré qu'il existait, en plus de la contamination par voie systémique, un transfert direct de l'uranium (UE) par les voies nasales vers les bulbes olfactifs lors d'inhalations chroniques. Selon les auteurs, les récepteurs des neurones olfactifs pourraient assurer ce passage (Tournier et al., 2009). Ceci ouvre de nouvelles voies quant à la compréhension du transfert de l'uranium au niveau cérébral.

ii) Processus cognitifs

Sur le plan cognitif, les effets de l'uranium sont multiples. En exposition aiguë, Barber *et al.* ont également montré une atteinte de la mémoire chez le rat (1 mg/kg d'UA en IM), toutefois cette perte de mémoire n'apparaît que transitoirement (Barber *et al.*, 2007). Des expositions chroniques à l'UE de 1,5 ou 9 mois (contamination par eau de boisson à 40 mg/L) ont une action délétère sur la mémoire à court terme (Houpert *et al.*, 2005; Houpert *et al.*, 2007a). Des atteintes similaires ont été observées après inhalation chronique (30 minutes à 197 mg/m³) (Monleau *et al.*, 2006). Les profils d'apprentissage semblent également perturbés chez les jeunes rats exposés à l'UA pendant les périodes néonatale et de lactation (mères contaminées *via* l'eau de boisson à 80 mg d'UA/kg) (Albina *et al.*, 2005).

Lors de contaminations chroniques à 40 mg/L *via* l'eau de boisson, l'UE contrairement à l'UA, provoque un dérèglement du cycle veille-sommeil. Une augmentation du sommeil paradoxal après des contaminations de 1, 1,5 ou 2 mois a été observée, mais celle-ci disparaît lorsque la contamination est prolongée à 3 mois (Houpert *et al.*, 2005; Lestavel *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'état anxieux des rats est augmenté par une contamination d'1,5 mois à l'UE, alors que la contamination à l'UA n'a pas d'effet (Houpert *et al.*, 2005).

Sur le plan neuromoteur, des expériences montrent que l'inhalation ou ingestion d'UA provoque une modification de l'activité locomotrice (inhalations de 30 minutes à 197 mg/m³, 4 jours par semaine pendant 3 semaines ou ingestion d'eau supplémentée en uranium à 75 ou 150 mg/L pendant 2 semaines ou 6 mois) (Briner and Murray, 2005; Monleau *et al.*, 2005). La coordination motrice des rats est également altérée par l'injection répétée de 0,1 ou 1 mg/kg d'acétate d'uranyle pendant 7 jours (Abou-Donia *et al.*, 2001).

Malgré les différentes publications démontrant un effet certain de l'uranium sur le comportement, une étude tend à prouver le contraire. L'équipe d'Arfsten a chirurgicalement implanté 4 à 20 pastilles d'uranium (1 X 20 mm) chez des rats. Au bout de 150 jours, les auteurs ont effectué trois tests parmi la batterie de tests comportementaux d'évaluation de la toxicité de la marine américaine (the Navy Behavioural Toxicity Assessment Battery, NTAB). Le premier permet de mesurer l'activité locomotrice spontanée et les mouvements stéréotypiques, le second mesure l'intégrité des centres réflexes de l'audition du tronc cérébral ainsi que le contrôle inhibiteur au-delà de l'arc réflexe, et le troisième test estime les interactions sociales entre les rats. Sur ces trois tests, aucun changement comportemental des animaux n'a pu être observé. Selon les auteurs, des études complémentaires sont nécessaires, en augmentant le nombre

d'implants et la durée d'exposition, afin de pouvoir conclure sur l'impact de fragments d'UA implantés en intramusculaire sur le comportement des rats (Arfsten et al., 2007).

Chez l'homme, certaines études ont révélé des perturbations comportementales chez des travailleurs exposés à de fortes concentrations d'uranium inhalé. Ces hommes présentaient des états de dépression ou d'agitation (Howland, 1949), mais également des troubles d'ordre cognitif (Kathren and Moore, 1986). Le suivi des vétérans de la guerre du Golfe a permis de noter une réduction des capacités cognitives 7 ans après l'exposition des sujets à l'uranium. Cette baisse était corrélée à la concentration d'uranium excrétée dans les urines (McDiarmid et al., 2002). Néanmoins, des études complémentaires réalisées 12, 13, 14 ou 16 ans après l'exposition ne confirment pas cet effet (McDiarmid et al., 2006; Squibb and McDiarmid, 2006; McDiarmid et al., 2007; McDiarmid et al., 2009). Par ailleurs, Goasguen rapporte le cas d'un homme de 50 ans souffrant depuis 6 ans de nombreux troubles neurologiques. Ces troubles se manifestaient par des pertes d'équilibre, un déficit moteur et une amyotrophie des 4 membres. Lors d'examens cliniques approfondis, la présence d'uranium en quantité notable dans les selles a été décelée. Sans aucune autre cause apparente, les déficits neurologiques ont été attribués à l'uranium, provenant d'un presse-papier que le patient eut manipulé quotidiennement pendant 3 ans (Goasguen et al., 1982). Le suivi médical de ce patient n'a pas fait l'objet de communications ultérieures. Par ailleurs, une étude sur des travailleurs exposés à 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).

iii) Neurotransmetteurs

Un travail, sur les effets d'une exposition aiguë à l'UA chez le rat, montre une diminution du taux de dopamine (DA) dans le striatum, les taux de GABA et sérotonine (5-HT), quant à eux, restent constants dans l'hippocampe, le striatum, le cervelet et le cortex (contamination par injection intramusculaire de 1 mg/kg) (Barber et al., 2007).

Chez le rat, lors de contaminations chroniques à l'UA *via* l'eau de boisson (40 mg/L), l'équipe de Houpert et al a observé un taux stable de DA et 5-HT dans le striatum, l'hippocampe, le cortex, le thalamus et le cervelet (exposition pendant 1 mois) (Houpert et al., 2004). Par contre, après 1,5 mois d'exposition à l'UA, le taux de DA hypothalamique est diminué. De plus, le turn-over de la DA est perturbé dans le cortex frontal et le striatum respectivement après 6 et 9 mois de contamination à l'UA (40 mg/L). Concernant la 5-HT son turn-over cortical est modifié après 6 mois d'exposition à l'UA (40 mg/L). Ainsi, lors d'ingestions chroniques de plus d'1,5 mois, l'UA semble perturber le métabolisme des monoamines (Bussy et al., 2006). Dans les mêmes conditions expérimentales, l'activité de

l'acétylcholinestérase cérébelleuse (AChE) est également altérée par 6 mois d'exposition (Bussy et al., 2006). L'activité de l'AChE est également modifiée par des injections intramusculaires répétées pendant 7 jours (1 mg/kg) (Abou-Donia et al., 2001).

iv) Stress oxydant

Ghosh et al ont démontré qu'une injection intra-péritonéale d'UA (576 µg/kg) induit une élévation de l'oxydation lipidique cérébrale chez le rat (Ghosh et al., 2007). Ce résultat est confirmé lors d'expositions chroniques *via* l'eau de boisson de 2 semaines ou 6 mois (UA : 150 mg/L) (Briner and Murray, 2005) ou 9 mois (UA ou UE 4% à 40 mg d'U/L) (Lestaevel et al., 2009).

L'induction des marqueurs du stress oxydant a également été notée dans différentes structures cérébrales. Après 3 mois d'ingestion (eau de boisson) d'UA à 10, 20 et 40 mg/kg, l'induction des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) sont positivement corrélées à la concentration d'uranium ingéré dans le cortex et le cervelet. Le cervelet montre aussi une induction du glutathion oxydé et réduit en fonction de la dose d'uranium ingérée, induction positive et négative respectivement. Enfin, dans l'hippocampe, les auteurs ont observé une augmentation de la catalase (CAT) et de la superoxyde dismutase (SOD), proportionnellement à la dose ingérée d'uranium. (Albina et al., 2005). La publication de Lestaevel et al a mis en évidence des effets opposés entre la contamination chronique à l'UA et à l'UE (40 mg/L, *via* l'eau de boisson). L'UA augmente l'induction des marqueurs de stress oxydant (augmentation de la CAT) alors que l'UE semble la diminuer (diminution de la SOD et de la peroxydase du glutathion) (Lestaevel et al., 2009). L'exposition sub-chronique par voie intramusculaire (1 mg/kg d'UA pendant 7 jours) est également à l'origine de l'élévation d'un marqueur de stress oxydant : l'oxyde nitrique (Abou-Donia et al., 2001).

v) Action sur la synapse

Le mécanisme d'action synaptique de l'uranium est encore énigmatique. Cependant, quelques travaux tentent d'apporter des réponses.

Une hypothèse suppose que les perturbations mnésiques observées chez le rat après exposition chronique à l'UA ou l'UE pourraient résulter d'une dégénérescence neuronale hippocampique. Au sein du laboratoire, des rats ont été exposés pendant 1,5 ou 9 mois à l'UA ou l'UE 40 mg/L. L'observation microscopique ne montre aucune différence significative du nombre de neurones hippocampiques chez les animaux contaminés (toutes contaminations confondues) par rapport aux animaux témoins, ce qui invalide l'hypothèse initiale (communication personnelle du Dr Donnadieu-Claraz) (Annexe I). Par ailleurs,

l'électrophysiologie des neurones hippocampiques de rat est modifiée par l'implantation de pastilles d'UA en sous-cutané. En effet, après 6 et 12 mois d'implantation, une augmentation du potentiel synaptique a été observée (Pellmar et al., 1999b). De plus, une publication montre une diminution de la libération de glutamate lors de potentiels évoqués *ex vivo* sur des synaptosomes hippocampiques de rats après 30 minutes de perfusion avec des ions uranyles (UO_2^{2+}). Les auteurs ont déterminé la concentration d' UO_2^{2+} pour laquelle la libération du glutamate était 2 fois plus faible que chez les témoins : $\text{IC}_{50} = 1,92 \mu\text{M}$. L'équipe de Vietti suggère que l' UO_2^{2+} pourrait se lier aux sites d'exocytose en bloquant, par exemple, les canaux calciques voltage-dépendants. Dans ce travail, les auteurs montrent également que cette réponse n'influence pas la libération d'un autre neurotransmetteur, le GABA (Vietti and Lasley, 2007). Sur des membranes artificielles composées de protéines d'anguille (*Electrophorus electricus*), l'uranium permet d'augmenter la conductivité membranaire et de potentialiser les effets de l'acétylcholine (ACh) (la concentration et composition de l'uranium ne sont pas décrites) (Reader et al., 1973). L'équipe de Lin et al. confirme l'effet synergique de l'uranium avec l'ACh. *Ex vivo*, des concentrations d'uranium [$\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$] allant de 0,2 à 0,8 mM potentialise la contraction du muscle diaphragmatique de la souris (Lin et al., 1988). Cette potentialisation de l'uranium sur l'ACh pourrait, en partie, être expliquée par les travaux de Lin-Shiau et al. Par deux fois, ils ont démontré que l'uranium (UO_2^{2+}) induit une libération plus importante de neurotransmetteurs (ACh) dans la fente synaptique (expériences menées *ex vivo* sur le muscle diaphragmatique de souris et sur un nerf périphérique de poulet). Les auteurs supposent que cette réaction serait due à une substitution quasi-irréversible de l'uranium (sous forme UO_2^{2+}) aux ions Ca^{2+} au niveau de la synapse de la jonction neuromusculaire (Lin-Shiau et al., 1979; Lin-Shiau and Fu, 1986).

De plus, Nastuk et al. rappelle que l'uranium (UO_2^{2+}) se lie de manière spécifique aux groupements phosphates, or un groupement phosphate est présent au niveau cytoplasmique des récepteurs nicotiques. En cas d'entrée de l'uranium dans la cellule, la liaison « uranium-groupe phosphate » pourrait provoquer un encombrement stérique et ainsi gêner le fonctionnement des récepteurs ; ceci pourrait être à l'origine de perturbations de la transmission synaptique (Nastuk, 1967).

D'autre part, sur un nerf isolé de muscle intercostal de souris, l' UO_2^{2+} apparaît comme un antagoniste de la β -bungarotoxine en interagissant avec les canaux potassiques du nerf moteur (Chao and Lin-Shiau, 1995).

II. Le système cholinergique

A. Introduction au système nerveux

Le système nerveux coordonne les mouvements musculaires, contrôle le fonctionnement des organes, véhicule les informations sensorielles et motrices vers les effecteurs. Deux systèmes travaillent de concert pour remplir cette mission : les systèmes nerveux central et périphérique.

1) Système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) est constitué du cerveau, du tronc cérébral, du cervelet et de la moelle épinière. Il a un rôle de réception, de traitement, d'intégration et d'émission des messages nerveux. L'ensemble du système nerveux central est protégé par une enveloppe osseuse : la boîte crânienne pour l'encéphale et la colonne vertébrale pour la moelle épinière, ainsi que par d'autres enveloppes de tissu protecteur : les méninges. Celles-ci se composent de la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère (figure 5). Le SNC est caractérisé par une structure cavitaire contenant le liquide céphalo-rachidien (LCR) s'étendant de la moelle aux ventricules cérébraux. Le LCR, synthétisé par les plexus choroïdes, circule entre l'arachnoïde et la pie-mère. Son rôle est de protéger le SNC contre les infections, puisqu'il contient des médiateurs de l'immunité, et les chocs mécaniques. Il permet également la circulation de nombreuses molécules à travers le SNC.

La fonctionnalité de ce système repose sur un type cellulaire hautement spécialisé : le neurone. Il est composé d'un péricaryon (ou corps cellulaire, soma) lui assurant la synthèse de ses constituants (protéines, enzymes, etc.). Son soma mesure entre 5 et 120 μm selon le type neuronal. La particularité de ces cellules est leur faible capacité de division. En effet, seule une faible proportion neuronale est capable de rentrer en mitose. Ces précurseurs neuronaux sont regroupés dans deux zones cérébrales : la zone sub-ventriculaire et la zone sub-granulaire du gyrus dentelé de l'hippocampe. Par la suite, ces nouvelles cellules nerveuses migrent vers d'autres structures cérébrales. Leur migration dépend de multiples facteurs neurotrophiques. Ces facteurs permettent également une différenciation des cellules nerveuses nouvellement générées en différents types cellulaires.

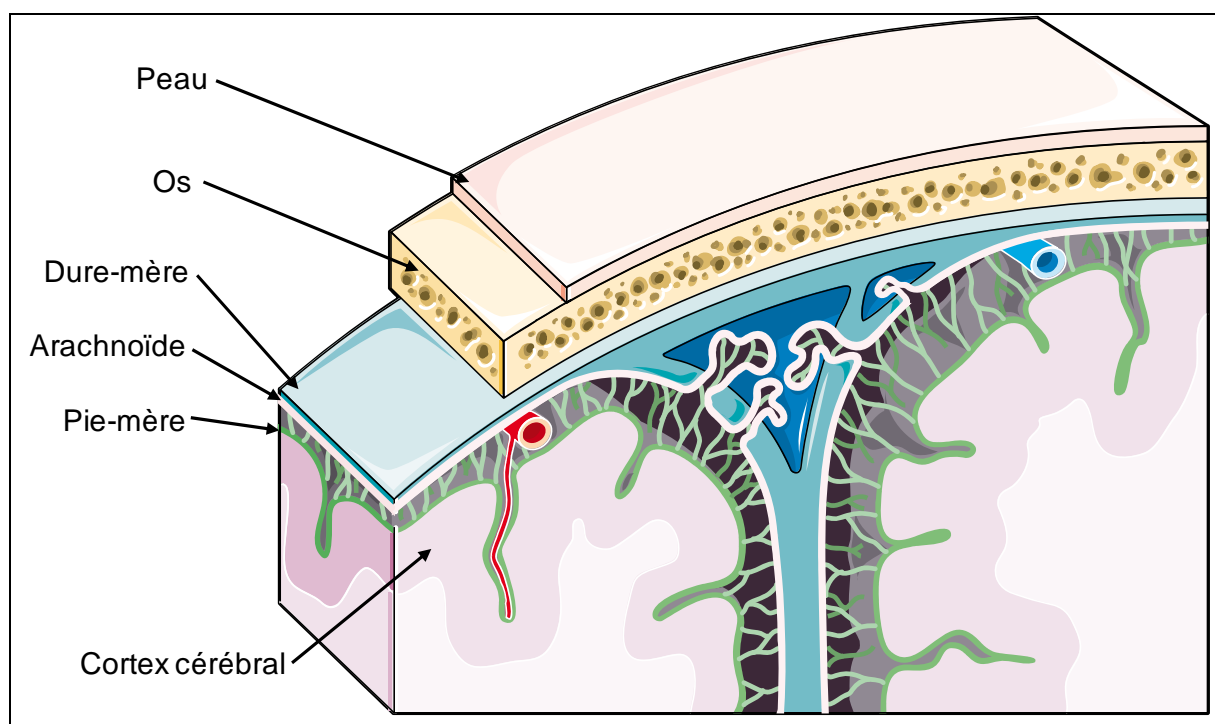


Figure 5 : Représentation d'une coupe transversale de méninges.

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

Des excroissances du péricaryon donnent naissance aux dendrites et à l'axone. Les dendrites sont très nombreuses, courtes et ramifiées dès leur origine. Elles peuvent être recouvertes d'épines dendritiques. Ces prolongements ne contiennent pas de microvésicules permettant la transmission de l'information à l'extérieur du neurone. La dendrite conduit l'influx nerveux, induit à son extrémité, jusqu'au péricaryon : c'est un prolongement afférent. Quant à l'axone, prolongement unique de chaque neurone, son diamètre est compris entre 1 et 15 μm et sa longueur varie d'un millimètre à plus d'un mètre (au niveau périphérique). Le cône d'émergence, région extrêmement riche en microtubules, constitue l'origine de l'axone. Il est également appelé zone gâchette car il participe à la genèse du potentiel d'action. Il décrit un trajet plus ou moins long avant de se terminer en se ramifiant (c'est l'arborisation terminale). Chaque ramification se termine par un renflement, le bouton terminal ou bouton synaptique. La membrane de l'axone, l'axolemme, contient l'axoplasme. L'axoplasme est le prolongement du cytoplasme du péricaryon. Il est constitué de neurofilaments, de microtubules et de microvésicules (celles-ci sont produites par le réticulum endoplasmique rugueux et les appareils de Golgi). Certains axones sont recouverts d'une gaine de myéline, formée par des cellules gliales : les oligodendrocytes. On estime qu'environ un axone sur trois est recouvert de myéline (le recouvrement est discontinu, séparé par les nœuds de Ranvier). Ce recouvrement permet une plus grande vitesse de passage de l'information nerveuse.

L'influx nerveux circule par transmission synaptique. Cette transmission est le plus souvent de nature chimique avec l'intervention de neurotransmetteurs et de leurs récepteurs associés. Toutefois, le message nerveux peut également être conduit sous forme d'un influx électrique qui se propage d'un neurone à l'autre sans l'intermédiaire d'un relais chimique. Ce type de synapse est essentiellement retrouvé chez les invertébrés et les vertébrés inférieurs, rarement chez les mammifères. La synapse est constituée de 3 éléments mettant en relation deux neurones: (Figure 6)



Figure 6 : Représentation d'une synapse

- L'élément présynaptique, représenté par la membrane du bouton terminal de l'axone, est le lieu de synthèse et d'accumulation des neurotransmetteurs (vésicules synaptiques). Il assure la libération des neurotransmetteurs sous l'influence d'un potentiel d'action. Des autorécepteurs localisés sur sa membrane permettent la régulation de la libération de ces neurotransmetteurs ;
- La fente synaptique, mesurant environ 20 nm de large et riche en enzymes de dégradations des neurotransmetteurs, est le lieu de libération de ces derniers ;
- L'élément postsynaptique, représenté par la membrane d'un axone, d'une dendrite ou d'un soma, est le lieu de liaison des neurotransmetteurs. Il

possède à sa surface des récepteurs aux neurotransmetteurs. La fixation de ses derniers aux récepteurs permet le passage de l'information nerveuse.

Les neurones ne constituent pas tout le tissu cérébral ; il existe un autre type cellulaire : les cellules gliales (la glie). L'ensemble de ces cellules participe à la protection et la régulation de la fonction neuronale. La glie est constituée de 4 types cellulaires (Figure 7) :

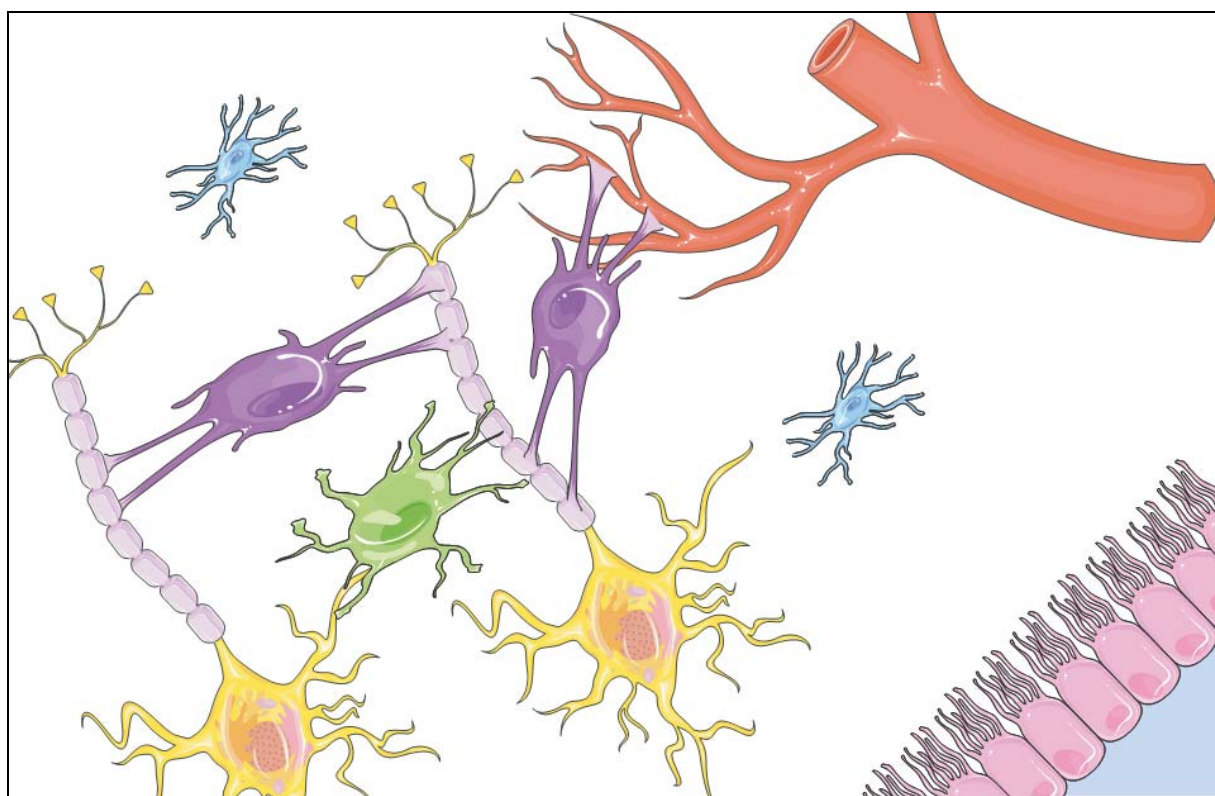


Figure 7 : Schéma représentatif des différents types cellulaires du SNC

(code couleur : jaune = neurone, mauve = astrocytes, vert = oligodendrocyte, bleu = microglies, rose = épendymocytes, rouge = vaisseaux sanguins). Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

- les astrocytes (en mauve), en liaison étroite avec les neurones et les capillaires sanguins ; ils assurent une fonction nourricière (apport de glucose) et ont pour rôle de réguler l'homéostasie du milieu extracellulaire en eau, en ions, et en neuromédiateurs grâce à des systèmes de transport et de recapture. Egalement équipés de récepteurs membranaires aux neurotransmetteurs, ils seraient par ce biais des partenaires actifs des neurones dans la transmission synaptique ;
- les oligodendrocytes (en vert), en contact avec les prolongements axonaux ; ils assurent la conduction de l'influx nerveux ;

- les microglies (en bleu), sont des cellules apparentées à des macrophages du SNC,
- les épendymocytes (en rose), cellules de sécrétion du LCR, elles constituent l'épithélium des cavités liquidiennes cérébrales.

2) Système nerveux périphérique : somatique et autonome

A la périphérie, bien que le système nerveux soit responsable du bon fonctionnement des activités végétatives et motrices, le schéma de fonctionnement est plus simple. Il est constitué des nerfs sensitifs et moteurs issus de la moelle et du tronc cérébral. Les systèmes somatique (SNS) et autonome (SNA) le composent. Les informations reçues par ces systèmes transitent par la moelle. De là, ils peuvent : soit donner lieu à un message nerveux ayant pour but d'informer le SNC, soit provoquer un mouvement réflexe.

Le SNS reçoit des fibres sensorielles de la peau, des muscles et des articulations et regroupe les fibres motrices primaires des muscles. Il permet d'interagir avec le monde extérieur en participant à l'équilibre et la motricité. Pour cela l'innervation somatique commande le tonus et la contraction des muscles du squelette.

Le SNA dirige les fonctions des informations dites « involontaires ». Il innerve essentiellement les organes internes : les neurones sensoriels de ce système transportent les informations des fonctions viscérales au système nerveux central et les motoneurones innervent les muscles lisses des viscères et du muscle cardiaque. Il comprend deux sous-systèmes : le système parasympathique et le système orthosympathique. Le système parasympathique est responsable du ralentissement de la fréquence cardiaque (cardio-modérateur), de l'augmentation des sécrétions digestives et de la mobilité du tractus gastro-intestinal. Son médiateur est l'acétylcholine. Le système orthosympathique est globalement opposé au système parasympathique, son rôle est de préparer l'organisme à la fuite. Il est activé lors de stress. Son médiateur est la noradrénaline (Figure 8)

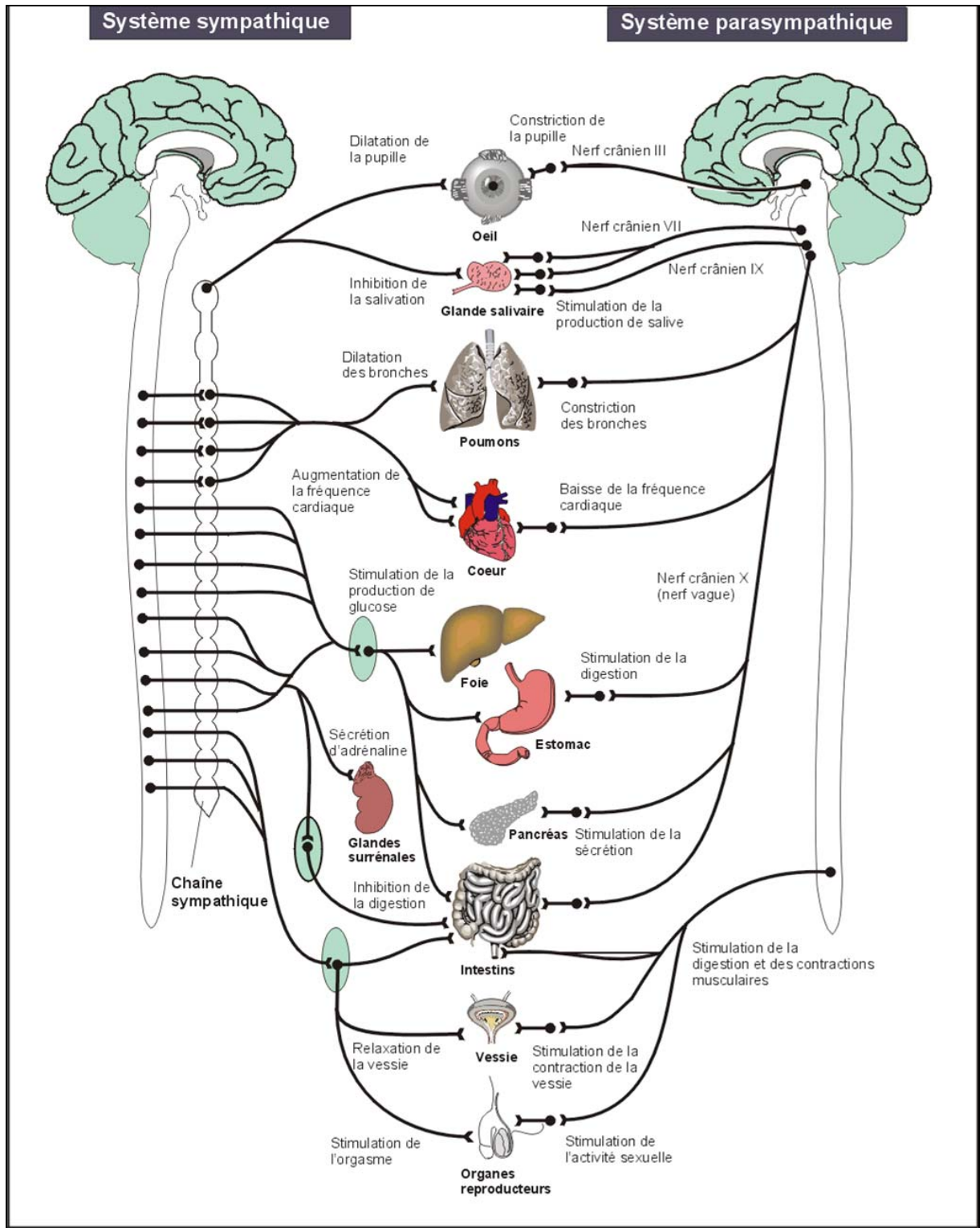


Figure 8 : Schéma représentant le système nerveux autonome : les systèmes sympathique et parasympathique

B. Système cholinergique

1) Historique

L'acétylcholine (ACh) fut le premier neurotransmetteur découvert. C'est JM Gheysen, en 1907, qui en décela la présence dans l'ergot du seigle. Puis, en 1914, le physiologiste anglais Henry Hallett Dale parvint à isoler cette molécule et démontra, en collaboration avec le pharmacologiste allemand Otto Loewi en 1921, que l'acétylcholine est un médiateur libéré par le système nerveux parasymphatique.

2) Physiologie

L'ACh joue un rôle important aussi bien dans le système nerveux central, où elle est impliquée dans la mémoire et l'apprentissage, que dans le système nerveux périphérique. Toutefois, il existe des particularités propres à chacun de ces systèmes. Lors de ce travail le versant périphérique ne sera que brièvement abordé.

3) Répartition cérébrale

Le site le plus important de synthèse de l'ACh est le noyau interpedonculaire (situé à proximité de la substance noire). La totalité des inter-neurones peuplant le striatum (noyau caudé et putamen) et le noyau accumbens sont cholinergiques. D'autre part, le septum envoie ses prolongements cholinergiques jusqu'à l'hippocampe. La voie cholinergique primaire d'entrée dans le cortex cérébral provient du noyau basal de Meynert. Cette structure innerve également l'amygdale, les ganglions de la base et le thalamus (Figure 9).

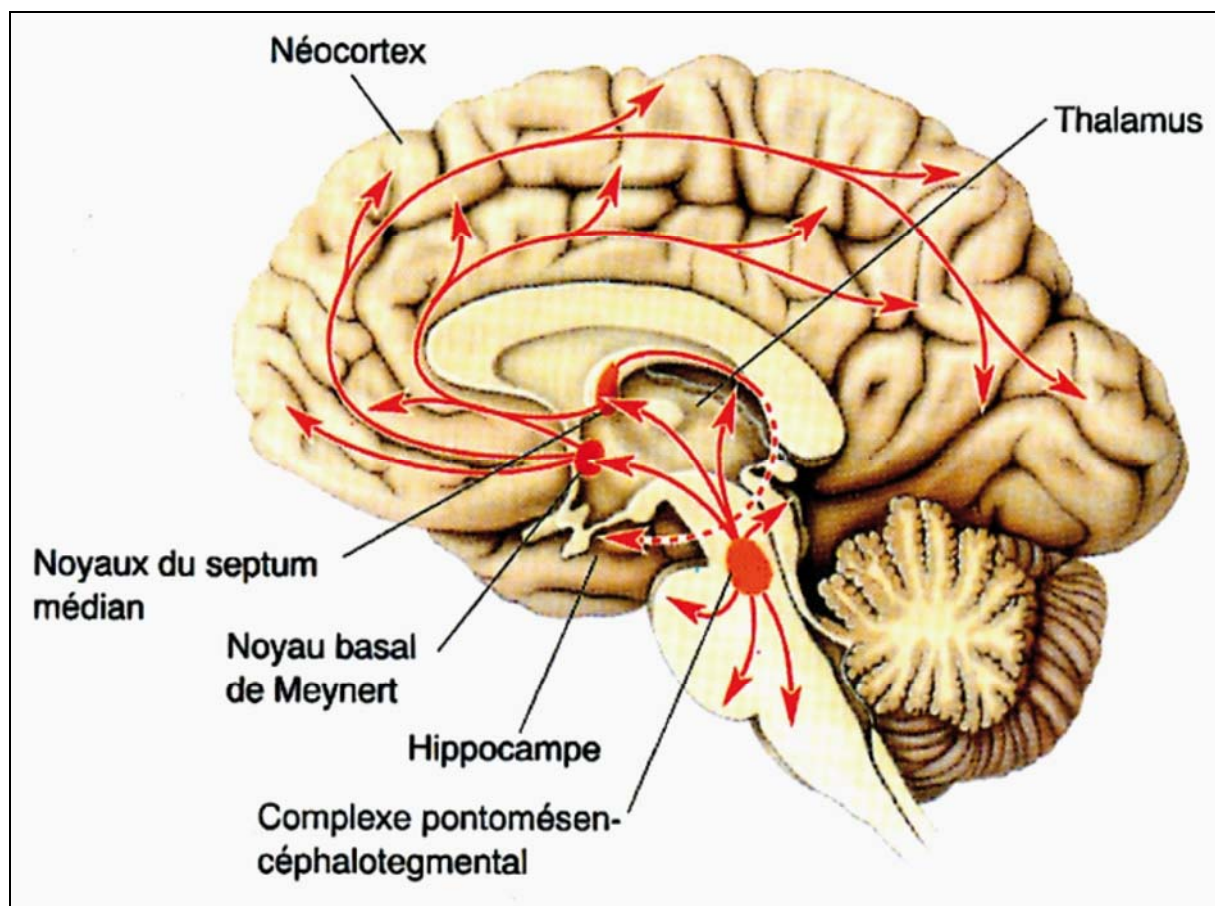


Figure 9 : Schéma des principaux groupes cholinergiques et leurs projections sur une coupe sagittale de cerveau humain.

Entre le noyau du septum médian et du noyau basal de Meynert, il existe un autre noyau cholinergique possédant des projections corticales et hippocampiques : le noyau de la Bandelette de Broca (ou noyau de la bande diagonale de Broca).

4) Répartition périphérique

L'acétylcholine est le neurotransmetteur majoritaire du système nerveux périphérique autonome. Dans le système nerveux parasympathique, l'acétylcholine est libérée aux sites pré- et post-ganglionnaires. Dans le système nerveux orthosympathique, elle n'est libérée qu'en position pré-ganglionnaire, sauf pour les glandes sudoripares où une libération post-ganglionnaire permet l'activation du sudomoto-neurone.

Les récepteurs nicotiques sont localisés au niveau de la jonction neuromusculaire et des ganglions autonomes. Les récepteurs muscariniques, sont présents sur les muscles lisses et sur certaines glandes endocrines.

5) Pharmacologie

Cet ester de l'acide acétique et de la choline a une masse molaire de 146,2 g/mol et pour formule chimique $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. L'acétylcholine est une molécule flexible,

c'est-à-dire susceptible d'adopter un certain nombre de conformations privilégiées et de stimuler plusieurs types de récepteurs. Elle porte une charge positive au niveau de son extrémité avec un ammonium quaternaire, les charges négatives partielles sont situées sur les atomes d'oxygène (Figure 10).

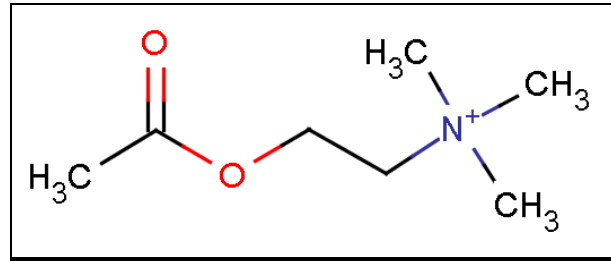


Figure 10 : Molécule d'acétylcholine

6) Métabolisme

a) Synthèse

L'acétylcholine est synthétisée dans le cytoplasme des neurones présynaptiques par la choline acétyltransférase (ChAT) à partir de choline et d'acétyl-coenzyme A (Acétyl CoA). L'acétyl CoA est issue de la transformation du pyruvate par la pyruvate déshydrogénase. Le pyruvate, quant à lui, provient de la glycolyse mitochondriale. La choline est l'élément limitant de la synthèse d'acétylcholine. Sa présence dans les tissus a deux origines : exogène, par l'alimentation, et endogène par biosynthèse à partir de la glycine (en passant par les étapes sérine, éthanolamine, phosphatidyl-éthanolamine, phosphatidyl-choline et choline). Elle est également captée par le neurone présynaptique dans le milieu extracellulaire par un transporteur actif Na^+/Cl^- -dépendant (transporteur de haute affinité de la choline ou CHT). La ChAT est synthétisée dans le corps cellulaire du neurone présynaptique et suit un transport antérograde rapide le menant à l'extrémité de l'axone, lieu de synthèse du neurotransmetteur. Cette enzyme est utilisée comme marqueur spécifique de la présence de neurones cholinergiques.

b) Exocytose

L'arrivée d'un potentiel d'action provoque une brusque augmentation de la concentration intracellulaire d'ions calcium (Ca^{2+}). Ceci déclenche le processus d'exocytose d'un transporteur vésiculaire de l'ACh (VAcHT). Un nombre important de synapses convergent en un même point, ainsi ce sont des centaines de vésicules d'ACh qui sont libérées dans l'espace inter-synaptique. L'acétylcholine ainsi libérée se fixe sur les récepteurs présents à la surface des neurones post-et pré-synaptiques.

La toxine botulique, sécrétée par la bactérie *Clostridium botulium*, empêche les vésicules d'ACh de fusionner avec la membrane. Elle inhibe ainsi la libération d'acétylcholine ce qui induit une paralysie musculaire.

c) Récepteurs

i) Récepteurs nicotiniques

Le récepteur nicotinique (nAChR) est un récepteur ionotrope perméable aux ions sodium et sensible à l'acétylcholine. Les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine sont des hétéropentamères transmembranaires de poids moléculaire 350 KDaltons. Ils sont constitués de 5 sous-unités (α , β ou γ), dont systématiquement 2α , formant un canal permettant le passage des ions sodium, potassium ou calcium. Les sous-unités neuronales sont uniquement composées de sous-unités α ou α et β . La fixation de deux molécules d'acétylcholine par récepteur (une par sous-unité α) entraîne un changement conformationnel de ce complexe protéique qui passe d'un diamètre de 80 angströms à un diamètre ouvert de 125 angströms, permettant l'entrée d'ions sodium (Na^+) et la sortie d'ions potassium (K^+). Cette entrée de cations entraîne une dépolarisation à l'origine de l'excitation de la cellule. La propagation de dépolarisation membranaire aboutit à la libération d'ACh et à la transmission de l'influx nerveux. Les récepteurs canaux sont à l'origine d'une réponse extrêmement rapide avec une diffusion de l'information neuronale point par point (Figure 11).

Les agonistes des récepteurs nicotiniques sont l'acétylcholine et la nicotine.

Les curarisants bloquent l'activité de ces récepteurs, ce qui entraîne une paralysie. Les nAChR sont également la cible de venins de serpent (α -bungarotoxine).

ii) Récepteur muscariniques

Les récepteurs muscariniques (mAChR) sont des récepteurs couplés aux protéines G. Ils font partie de la famille des récepteurs métabotropes à sept domaines transmembranaires. Cinq classes (M1 à M5) ont été définies en fonction de leur sélectivité pour leurs agonistes ou antagonistes (Figure 12).

Les types M1, M3 et M5 sont excitateurs puisque couplés positivement à la phospholipase C (PLC). L'activation de la PLC est à l'origine d'une augmentation de la concentration intracellulaire de diacylglycérol et d'inositol triphosphate. Ces deux seconds messagers peuvent activer des canaux ioniques et influencer le potentiel de membrane (libération du Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires). Ainsi l'activation de ces types de récepteurs permet la propagation l'influx nerveux.

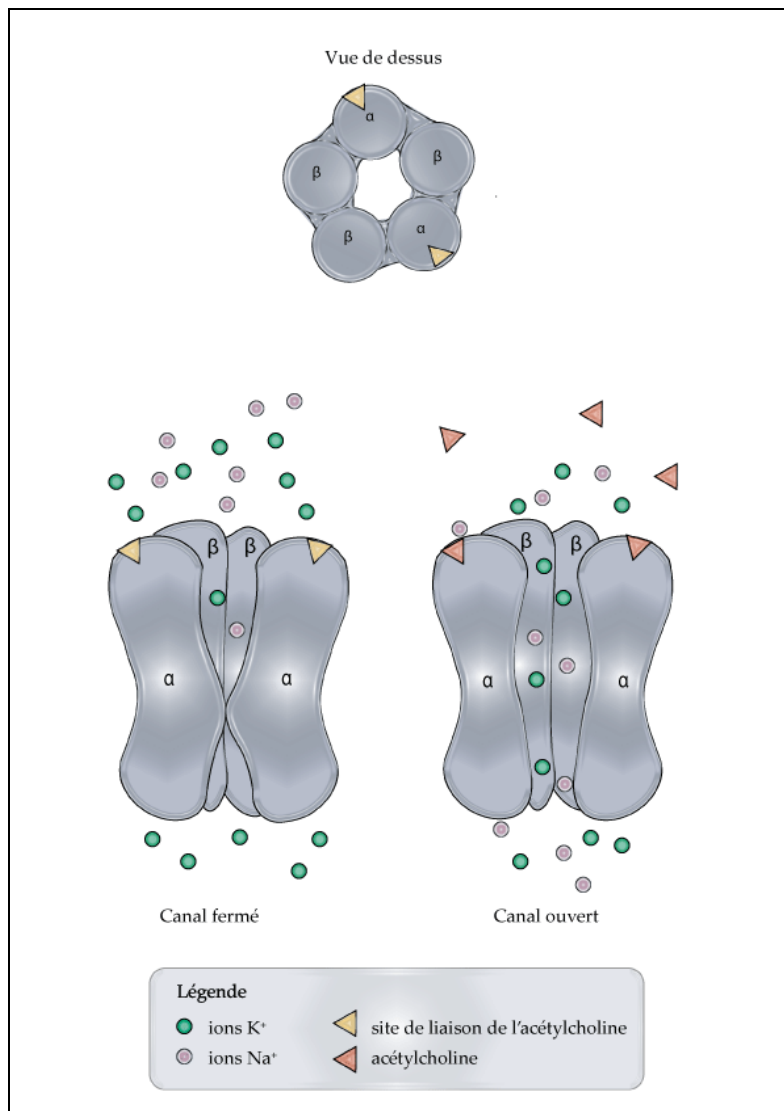


Figure 11 : Schéma d'un récepteur nicotinique neuronal

Quant aux récepteurs M2 et M4, ils sont inhibiteurs. Couplés négativement à l'adénylate cyclase, ils induisent la baisse de la concentration intracellulaire en AMP cyclique (régulation de l'expression génique) et une diminution du messenger secondaire : la protéine-kinase A (action sur des enzymes de synthèse et de dégradation intracellulaires). Ainsi l'activation de ces récepteurs atténue la propagation de l'influx nerveux. De plus, la stimulation de récepteurs muscariniques présynaptiques (ou autorécepteurs) inhibe la libération d'acétylcholine et, inversement, leur inhibition l'augmente.

Du fait des nombreuses réactions enzymatiques à l'origine de la réponse aux stimuli, la réponse est longue et diffuse ; les récepteurs couplés aux protéines G sont qualifiés de neuromodulateurs. En effet, ils ont pour but de moduler l'excitabilité neuronale et non de transmettre point par point l'information nerveuse.

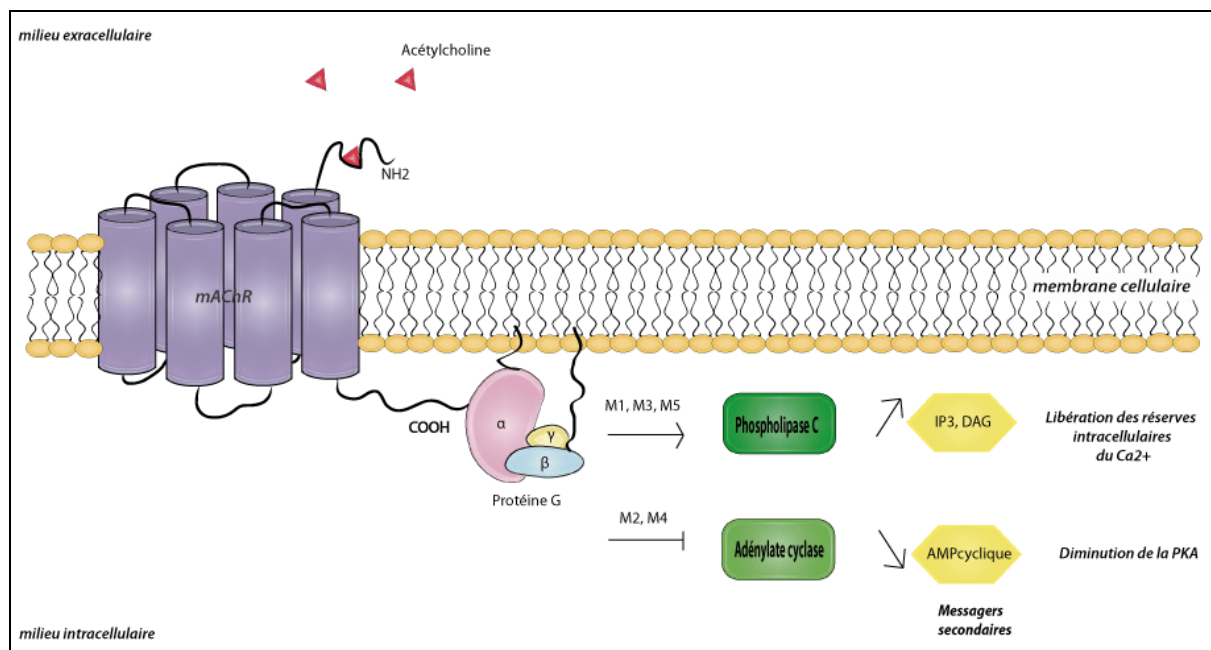


Figure 12 : Schéma d'un récepteur muscarinique

Ces 5 types sont largement distribués dans tout l'organisme. Toutefois certains récepteurs (M1, M3 et M4) sont plus particulièrement représentés dans le SNC.

Les agonistes principaux des récepteurs muscariniques sont la muscarine, la pilocarpine, l'arécoline.

Les deux principaux antagonistes sont l'atropine et la pirenzépine.

d) Dégradation

Contrairement à de nombreux neuromédiateurs qui sont recapturés par le neurone présynaptique, l'acétylcholine, libérée dans la fente synaptique après exocytose, est essentiellement hydrolysée en choline et en acétate par son enzyme de dégradation spécifique : l'acétylcholinestérase (AChE) ou la butyrylcholinestérase (BuChE), enzyme capable de dégrader de nombreux esters. L'AChE serait synthétisée par les neurones alors que la BuChE serait le produit des cellules gliales (Mesulam et al., 2002b). La BuChE et l'AChE sont bien présentes dans les mêmes structures mais leur distribution cellulaire est différente. La capacité de dégradation de l'ACh par la BuChE est 2,5 fois plus importante que celle observée pour l'AChE, par contre elle est moins représentée que cette dernière dans le SNC. Toutefois, le rôle de la BuChE s'amplifie avec l'âge puisqu'elle prend le relais de l'AChE, dont l'activité diminue, afin de maintenir une neurotransmission normale (Perry et al., 1978a; Perry et al., 1978b; Greig et al., 2001; Mesulam et al., 2002a) (Figure 13).

La demi-vie de l'acétylcholine dans la fente synaptique est de 50 μ s pour un kcat de $1,36 \cdot 10^8$ M/s. Cinquante pour cent de la choline issue de la dégradation de l'ACh est recapturée par le neurone présynaptique.

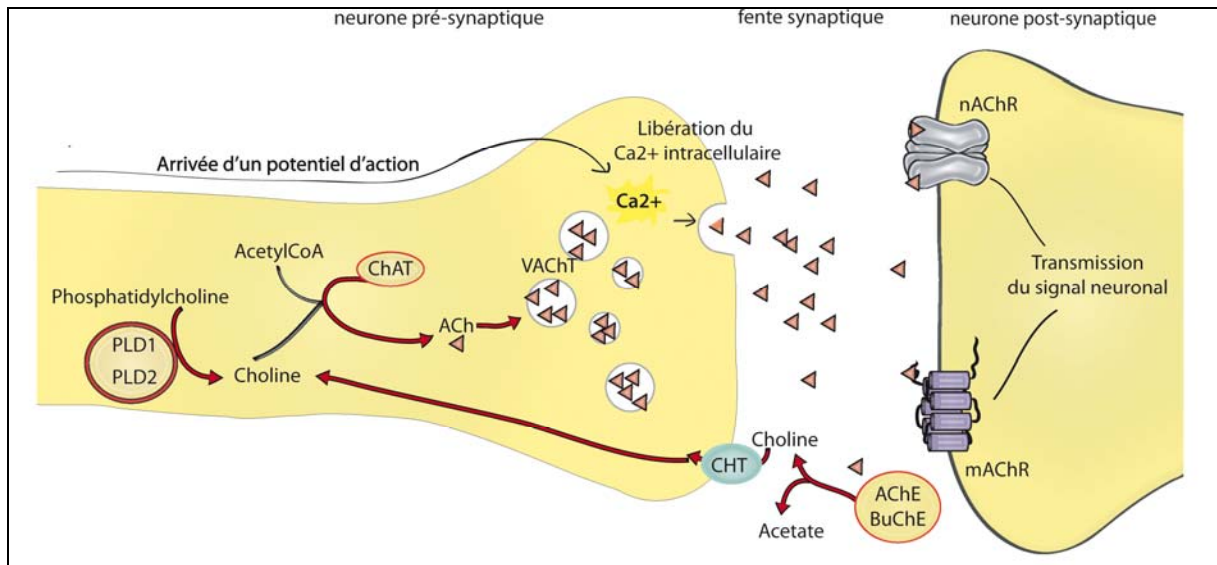


Figure 13 : Schéma de la synapse cholinergique

7) Rôles

Il a clairement été démontré que l'acétylcholine joue un rôle important dans la croissance, la différenciation et la plasticité des neurones en développement.

a) Interaction avec les autres neurotransmetteurs

Certains neurones cholinergiques occupent une position d'interneurones, ceci leur confère une capacité de régulation d'activité des neurones adjacents et donc de régulation de libérations de neurotransmetteurs tels que la dopamine, la sérotonine, la noradrénaline ou le glutamate. De plus, les récepteurs cholinergiques, souvent localisés en position présynaptique des neurones, aident à la régulation de la libération de ces neurotransmetteurs (Mason and Fibiger, 1979; Atzori *et al.*, 2003). Cette capacité d'interaction, voire de régulation, sur d'autres neurotransmetteurs est à l'origine de la forte implication du système cholinergique dans de nombreuses fonctions.

***b)* Développement**

***i)* Noyau basal de Meynert**

Chez la souris, des lésions néonatales (entre 12 et 24 h après la naissance) du noyau basal de Meynert (nBM) provoquent un développement cortical anormal se manifestant par une croissance dendritique ainsi qu'un positionnement des cellules pyramidales aberrant (Hohmann *et al.*, 1988; Hohmann *et al.*, 1991a; Hohmann *et al.*, 1991b; Bachman *et al.*, 1994; Hohmann and Berger-Sweeney, 1998). En suivant le même protocole, Bachman *et al.* rapportent qu'à 8 semaines d'âge les souris présentent des déficits mnésiques aux tests de rétention et de mémoire spatiale (Bachman *et al.*, 1994). D'après les auteurs, ces modifications neuronales occasionnent une altération des connexions corticales. Par ailleurs, une expérimentation sur des co-cultures de cellules primaires de rat (neurones corticaux et neurones cholinergiques du nBM) démontre l'indispensable présence des neurones cholinergiques pour la différenciation et la croissance des neurones corticaux. Cette expérience souligne l'importance des neurones cholinergiques dans le développement cortical (Ha *et al.*, 1998). En outre, plusieurs études tendent à montrer que les effets dus aux lésions du nBM sont médiés par les récepteurs muscariniques, notamment par les types M1, M2 et M4. Ces trois types de récepteur expriment différents profils d'expression lors du développement cortical. De plus, celui des types M1 et M4 est transitoire dans certaines structures dont le cortex primaire somato-sensoriel. Les auteurs suggèrent que ces types de récepteurs pourraient être impliqués dans la croissance axonale et le réarrangement cellulaire du cortex primaire somato-sensoriel (Hohmann *et al.*, 1985; Juliano *et al.*, 1990; Hohmann *et al.*, 1995; Hohmann and Berger-Sweeney, 1998).

***ii)* Dominance oculaire**

Lors du développement du cortex visuel, une compétition entre les afférences thalamo-corticales, provenant de chaque œil et conduisant à des réarrangements synaptiques, est à l'origine de la formation de la dominance oculaire (ou œil directeur).

Chez le chaton, Bear *et al.* ont pu empêcher la mise en place de cette dominance oculaire par une lésion des afférences corticales cholinergiques et noradrénergiques (Bear and Singer, 1986). Un travail postérieur a mimé les mêmes effets lors d'infusions d'antagonistes des récepteurs muscariniques de type 1 (m1AChR). Les auteurs ont ainsi démontré que les m1AChR sont les médiateurs des afférences cholinergiques dans le cortex visuel (Gu and Singer, 1993).

Par ailleurs, des expériences de privation monoculaire chez le rat ont induit des changements dans la régulation développementale des récepteurs muscariniques de type M1, M2, M3 et M4 (Kumar and Schliebs, 1992; Rossner *et al.*, 1993; Rossner *et al.*, 1994). Ces travaux attestent des implications de l'activation des récepteurs muscariniques dans la plasticité néonatale du cortex visuel.

En outre, chez le poulet, des sous-unités non- α des récepteurs nicotiques sont exprimées de manière transitoire dans le tectum optique pendant l'innervation par les fibres optiques. Cette innervation transitoire est inexistante sur les embryons de poulet dont les vésicules optiques ont été retirées. Les auteurs suggèrent une implication possible des récepteurs nicotiques dans le développement des projections rétino-tectales (Matter *et al.*, 1990).

c) Comportement

i) Mémoire

Le système cholinergique est clairement impliqué dans les processus mnésiques. Chez le rat, des lésions du nBM provoquent des troubles de la mémoire équivalents à ceux induits par injection d'atropine (Whishaw *et al.*, 1985). De plus, des tests réalisés en piscine de Morris ont mis en évidence l'effet d'injections de scopolamine sur la mémoire épisodique spatiale. Ainsi les auteurs démontrent le rôle spécifique du récepteur muscarinique de type 1 sur ce type de mémoire (von Linstow Roloff *et al.*, 2007). Ce résultat est conforté par l'étude d'Andrews *et al.* rapportant une efficacité accrue des antagonistes des récepteurs muscariniques par rapport à ceux des récepteurs nicotiques sur la perturbation des performances mnésiques (Andrews *et al.*, 1994). Un travail mené par l'équipe de Loullis *et al.* a permis de distinguer les effets chroniques des effets aigus d'injections d'activateurs ou inhibiteurs du système cholinergique. En effet, les injections chroniques de scopolamine et de physostigmine (respectivement antagoniste et agoniste des récepteurs cholinergiques) ont respectivement augmenté et diminué les performances mnésiques des rats ; résultats opposés à ceux obtenus lors d'injections aiguës (Loullis *et al.*, 1983). Par ailleurs, un déficit de l'activité de la ChAT serait corrélé à des troubles de la mémoire chez le rat (Flicker *et al.*, 1983). Des altérations similaires de la mémoire ont été observées chez les souris invalidées pour le gène du VAcHT (de Castro *et al.*, 2009).

Concernant la régionalisation de la mémoire, l'augmentation de la libération d'ACh dans le cortex préfrontal et l'hippocampe améliorerait la mémoire de travail (Hironaka *et al.*, 2001). Miller *et al.* ont d'ailleurs prouvé, chez le macaque, que le cortex préfrontal

régissait la mémoire visuelle épisodique et que le cortex temporal inférieur permettait le maintien et/ou l'intégration des informations visuelles (Miller et al., 1996).

En outre, les processus mnésiques sont médiés par des systèmes neuronaux parallèles ou en compétitions et parfois indépendants ou interdépendants (White and McDonald, 2002). Il a récemment été démontré que la libération d'ACh dans l'hippocampe augmente à la fois lors de tâches mnésiques hippocampo-dépendantes (alternance spontanée) mais aussi lors de tâches amygdalo-dépendantes (test conditionné de préférence de place) (McIntyre et al., 2002). Cependant, l'amplitude de cette réponse hippocampique est inversement corrélée à la réussite obtenue lors du test amygdalo-dépendant. Ceci indiquerait, qu'en plus d'une compétition entre ces deux structures pour ce type de mémoire, l'activation du système cholinergique hippocampique affecterait l'expression de la mémoire de type amygdalo-dépendante (McIntyre et al., 2002). Toutefois, l'activation cholinergique amygdalienne renforcerait les performances lors de tests de mémoire spatiale épisodique (mémoire hippocampique) (McIntyre et al., 2002). Ces deux structures semblent avoir des interactions non-réciproques. L'hippocampe rentrant en compétition avec l'amygdale, alors que cette dernière coopérerait avec l'hippocampe pendant l'apprentissage.

Par ailleurs, lors de tests de labyrinthe en croix, la cinétique de libération d'ACh est différente dans l'hippocampe et le striatum (Chang and Gold, 2003). Tout d'abord, le système cholinergique hippocampique est activé pendant la phase d'entraînement avec l'implication de la mémoire spatiale ; puis l'activation du striatum vient s'ajouter à celle de l'hippocampe lors de la phase de résolution du problème (Chang and Gold, 2003). Les auteurs suggèrent que le changement d'activation cholinergique de l'hippocampe vers le striatum serait le marqueur de transition entre la forme déclarative et procédurale de l'apprentissage.

Ces études démontrent que l'enregistrement simultané de l'activation cholinergique de différentes structures cérébrales permettrait de dégager les rôles spécifiques des composants du système cholinergique.

ii) Apprentissage

Un travail montre que la présence d'un antagoniste cholinergique (scopolamine) induit un déficit de l'apprentissage (Spangler et al., 1990). De plus, chez des rats soumis à un contexte nouveau, le taux d'ACh hippocampique extracellulaire est augmenté. Cette augmentation est exacerbée lors du rappel de ce contexte (phase d'habituation) (Thiel et al., 1998). L'apprentissage d'une tâche spatiale chez le rat provoque également une augmentation du taux d'ACh libéré dans l'hippocampe (Stancampiano et al., 1999; Fadda

et al., 2000). D'autre part, des lésions du nBM, à l'origine d'une chute de l'activité de la ChAT, seraient corrélées à des difficultés d'apprentissage (Flicker et al., 1983). Enfin, chez les souris invalidées pour le gène de la VAcHT, la latence d'apprentissage est plus importante que chez les souris témoins (de Castro et al., 2009). Ces résultats soutiennent une implication du système cholinergique dans les processus d'apprentissage. Néanmoins, l'équipe de Dunnett et al a démontré que l'apprentissage d'une tâche spatiale n'était pas uniquement médiée par le système cholinergique puisque des toxiques spécifiques du système cholinergique n'enrayaient pas complètement ce processus (Dunnett et al., 1987).

iii) Attention

Des études menées sur rongeurs et primates non-humains indiquent que les projections cholinergiques ne seraient pas impliquées dans l'apprentissage mais plutôt dans l'attention nécessaire à cet apprentissage (Blokland, 1995; Sarter and Bruno, 2000). Lors de tests opérants simples, des expériences de microdialyse montrent que l'augmentation d'ACh corticale est limitée aux premiers stades de l'acquisition, lorsque les besoins attentionnels sont importants (Muir, 1996). Orsetti et al ont également observé une importante libération d'ACh au niveau cortical et hippocampique lors de l'apprentissage d'une tâche récompensée mais pas lors de ses rappels (Orsetti et al., 1996). De plus, le taux d'ACh cortical extracellulaire augmente chez le rat lors de tests d'attention visuelle (Dalley et al., 2001); et ceci est directement corrélé avec l'effort attentionnel fourni (Himmelheber et al., 2000). Enfin, des lésions du nBM chez le rat semblent perturber les processus attentionnels des animaux (Muir et al., 1994; Stoehr et al., 1997). Toutefois, une corrélation entre le taux d'ACh extracellulaire et l'effort attentionnel demandé n'a pas toujours été démontrée (Passetti et al., 2000).

iv) Sommeil paradoxal

On distingue trois états de vigilance (Figure 14) :

- la veille ; état actif caractérisé par des ondes cérébrales désynchronisées et rapides, peu de mouvements oculaires et une forte tonicité musculaire. Elle est provoquée par l'activation de la formation réticulaire du mésencéphale (FRA) par le cortex. L'acétylcholine est un des acteurs de cette activation ;
- le sommeil à ondes lentes (SOL) ; caractérisé par la synchronisation et le ralentissement des ondes cérébrales, peu de mouvements oculaires et un maintien de la tonicité musculaire. Cet état résulte de l'inhibition de la

FRA et l'activation du Raphé. La sérotonine et la noradrénaline régissent cet état ;

- le sommeil paradoxal (SP) ; caractérisé par un état électrophysiologique semblable à celui de la veille mais où le sujet est dans un état inconscient, une forte activité oculaire et un relâchement complet de la tonicité musculaire. Il ne peut apparaître qu'à la suite de SOL. Le système cholinergique joue un rôle très important dans cet état de vigilance.

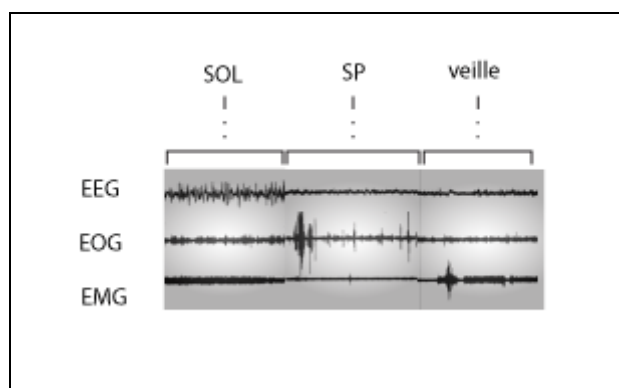


Figure 14 : Enregistrements des trois états de vigilance

Electro-encéphalogramme (EEG), électro-oculogramme (EOG) et électromyogramme (EMG) pendant le sommeil à ondes lentes (SOL), le sommeil paradoxal (SP) et la veille

Etant donné l'importance du système cholinergique dans l'initiation du SP, de nombreuses études tentent d'en expliquer le mécanisme.

Il semble qu'il y aurait deux types opposés de neurones : les neurones SP-on et les neurones SP-off. Usuellement, il a été admis que les neurones SP-on étaient de type cholinergique, alors que les neurones SP-off étaient sérotoninergiques et noradrénergiques (McCarley, 2007). Une interaction directe entre les catécholamines et l'acétylcholine permettrait le passage d'un état de SOL à un état de SP (Shiromani et al., 1988). Plus exactement, l'activation tonique des neurones cholinergiques provoquerait la désynchronisation des ondes et l'entrée en SP (Steriade et al., 1990; McCarley, 2007).

Cependant, depuis quelques années, le rôle primordial du système cholinergique dans l'initiation du SP est controversé. Des équipes ont montré que les populations neuronales SP-on et SP-off seraient de type glutamatergiques et GABAergiques. Cette découverte remplacerait l'idée d'une interaction amino-cholinergique dans la régulation du SP. (Fuller et al., 2007; Luppi et al., 2007). Toutefois, l'implication du système cholinergique reste d'actualité, mais l'importance de son implication est revue à la baisse (Verret et al., 2005).

Le SP aurait pour rôle de faciliter la mémorisation par retour de la trace mnésique pour consolidation.

Il est à noter que ces 4 fonctions (mémoire, apprentissage, attention et sommeil paradoxal) sont interdépendantes les unes des autres au sein du processus de mémorisation.

v) Locomotion

Au niveau périphérique, le système cholinergique joue un rôle important dans la contractilité musculaire et donc dans la locomotion. Par exemple, des modifications géniques du récepteur nicotinique peuvent être à l'origine du syndrome myasthénique congénital, pathologie caractérisée par une faiblesse musculaire et une fatigue à l'effort (Beeson, 2008).

Au niveau central, le taux d'ACh libérée dans le striatum, le cortex ou l'hippocampe est corrélé avec l'activité locomotrice (Day et al., 1991; Mizuno et al., 1991). Par ailleurs les souris invalidées pour le gène du VAcHT présentent des déficits locomoteurs qui ont pu être décelés lors de performances réduites au test de Rotarod par rapport aux souris témoins (de Castro et al., 2009).

8) Implication dans certaines pathologies

a) Cas de la maladie d'Alzheimer

Découverte en 1906 par Aloïs Alzheimer, la maladie éponyme est une maladie, neurodégénérative progressive et incurable, se déclarant généralement entre 60 et 65 ans. Elle se manifeste par la perte progressive et irréversible des fonctions mentales. Le premier symptôme est la perte du souvenir des événements récents (amnésie) ; tandis que les souvenirs plus anciens sont relativement préservés. Par la suite, les déficits cognitifs s'étendent aux domaines du langage (aphasie), de l'organisation des mouvements (apraxie), de la reconnaissance visuelle (agnosie) et des fonctions exécutives (telles que la prise de décision et la planification).

L'étiologie de la maladie d'Alzheimer (MA) est encore inconnue, même si l'on suppose que des facteurs environnementaux et génétiques sont en jeu. Des mutations dans au moins quatre gènes prédisposant à la MA ont été identifiées. Elles sont particulièrement en cause dans les cas familiaux à début précoce, qui représentent moins de 5% des patients atteints par la MA. Pour la forme dite sporadique, plusieurs gènes de susceptibilité, tel que l'ApoE (Berr et al., 2001), ont été identifiés.

Le processus neurodégénératif responsable de la maladie serait dû à l'apparition de 2 facteurs :

- les plaques amyloïdes (ou plaques séniles), essentiellement localisées dans le néocortex et l'hippocampe, proviendraient de l'accumulation du peptide neurotoxique AB42 issu d'un mauvais clivage de la protéine APP (Amyloid Protein Precursor). Ces derniers, entourant les neurones, entraîneraient la mort du neurone par nécrose ou par apoptose ;
- les dégénérescences neurofibrillaires, issues de l'hyperphosphorylation de la protéine *tau* suivie de son agrégation, sont responsables de la mort neuronale. En effet, elles vont empêcher l'acheminement des nutriments aux neurones.

Ces 2 facteurs neurodégénératifs vont être à l'origine de l'atrophie corticale caractérisant les patients atteints de la MA. Cette atrophie s'accompagne d'une dilatation des ventricules cérébraux et des sillons corticaux ainsi que d'une perte neuronale affectant particulièrement le système cholinergique (noyau basal de Meynert, septum, cortex entorhinal, amygdale et hippocampe) (Figure 15).

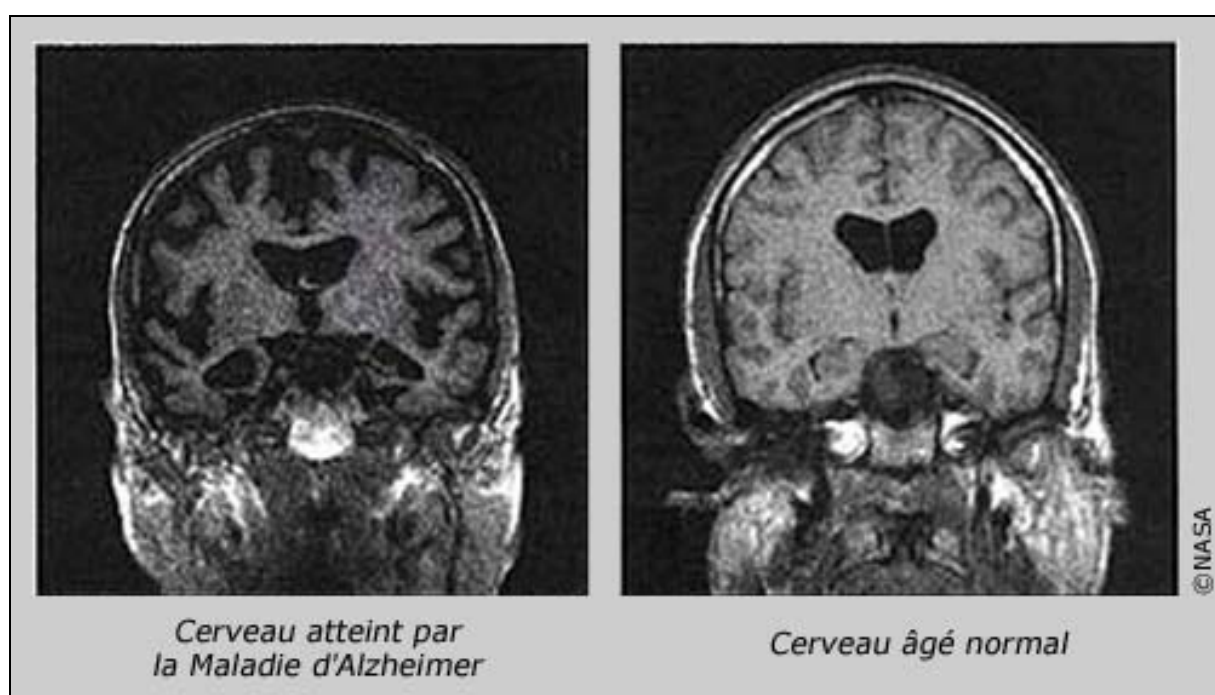


Figure 15 : IRM d'un cerveau atteint de MA et d'un cerveau sain

Images par résonance magnétique d'un cerveau de patient atteint de la MA (à gauche) et d'un patient sain (à droite)

Ce dysfonctionnement cholinergique est ainsi marqué par une diminution du nombre de récepteurs nicotiques (Araujo et al., 1988; Banerjee et al., 2000; Burghaus et al., 2000; Guan et al., 2000), une diminution de l'activité de la ChAT (Perry et al., 1978a; Araujo et al., 1988; Araujo et al., 1990; Lawrence and Sahakian, 1998) et une perturbation globale du système cholinergique (Gottfries, 1990; Ikarashi et al., 2004). De plus, une étude américaine a récemment montré une interaction entre le peptide amyloïde B et les sous-unités $\alpha 7$ du récepteur nicotinique *in vivo*. La délétion de cette sous-unité chez un modèle de souris KO provoque une neurodégénération hippocampique accompagnée de troubles mnésiques. Les auteurs montrent également que cette sous-unité $\alpha 7$ aurait une propriété neuroprotectrice puisqu'elle atténuerait la toxicité de l'amyloïde B (Dineley, 2008).

Les traitements de la MA ont pour but essentiel d'augmenter l'activité cholinergique centrale. Ce sont généralement des inhibiteurs ou des précurseurs des inhibiteurs de l'AChE. De plus, les agonistes des récepteurs nicotiques sont en stade III d'essai clinique. En parallèle, des traitements visant à diminuer l'activité des neurones glutamatergiques peuvent être administrés (inhibiteurs des récepteurs NMDA).

b) Cas de la maladie de Parkinson

Maladie neurodégénérative qui se manifeste par un tremblement de repos, rigidité musculaire, une akinésie et parfois des atteintes cognitives avec une détérioration de la mémoire et des difficultés d'adaptation comportementales. A des stades plus avancés, la maladie peut s'accompagner de dépression, de confusion mentale ou de démence. D'autres symptômes tels qu'un amaigrissement, une hypersalivation, des troubles du sommeil, de la parole et de l'écriture peuvent apparaître. Comme beaucoup d'autres troubles neurologiques, la maladie de Parkinson est chronique, évolutive et pour le moment incurable. Son étiologie demeure inconnue.

Le système dopaminergique est la cible principale de la maladie, avec une dégénérescence des neurones dopaminergiques du striatum de la voie nigro-striée (Figure 16).

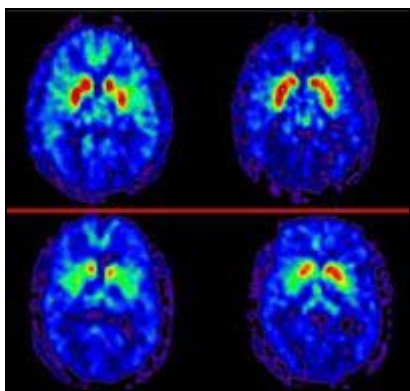


Figure 16: TEP d'un cerveau sain et d'un cerveau atteint de la MP

Images de tomographie par émission de positron, localisation des sites dopaminergiques chez un sujet sain (en haut) et chez un sujet atteint de la MP (en bas)

Par ailleurs, une implication du système cholinergique est avancée. Nombreuses sont les publications mettant en avant une diminution du nombre de récepteurs nicotiques (Lange *et al.*, 1993; Perry *et al.*, 1995; Burghaus *et al.*, 2003; Fujita *et al.*, 2006; Gotti *et al.*, 2006; Quik and McIntosh, 2006; Oishi *et al.*, 2007) ou muscariniques (Lange *et al.*, 1993; Colloby *et al.*, 2006) dans différentes structures cérébrales des malades. Cette diminution des récepteurs nicotiques serait directement corrélée à la perte des neurones dopaminergiques. En effet, en position présynaptique des neurones dopaminergiques, les récepteurs nicotiques ont pour rôle de réguler la libération de dopamine (Calabresi *et al.*, 2006; Quik and McIntosh, 2006). Une perte massive de neurones cholinergiques dans le nBM a également été observée chez les patients atteints de la MP, notamment dans la forme associée à une démence (Bosboom *et al.*, 2003; Hilker *et al.*, 2005).

Le traitement de la MP passe par une action directe sur le système dopaminergique. Des précurseurs de la dopamine (L-Dopa) ou des agonistes dopaminergiques sont généralement prescrits. Par ailleurs, lorsque les traitements pharmacologiques sont inefficaces, et lorsque le stade de la maladie est avancé, une intervention neurochirurgicale pour stimuler le noyau central intermédiaire du thalamus peut être envisagée. Outre cette intervention extrêmement lourde, une stimulation de la moelle épinière apporte de nombreux espoirs, les essais cliniques sont en cours. Cette intervention permettrait de soulager les symptômes moteurs d'un plus grand nombre de malades.

c) Cas de la Chorée de Huntington

Maladie héréditaire due à une mutation autosomique dominante du gène IT15 situé sur le locus p16.3 du Chromosome 4. Cette mutation consiste en une expansion de la séquence du trinuécléotidique CAG ou extension polyglutamique.

La Chorée de Huntington (CH) est responsable d'une neurodégénérescence corticale et des ganglions de la base. Elle se caractérise par le développement progressif de mouvements de type choréique et d'une détérioration des fonctions cognitives. On constate d'autre part l'apparition de troubles psychiques sévères tels que l'anxiété, la dépression ou l'irritabilité. La neurodégénération progresse le plus souvent vers la démence.

Comme pour la maladie de Parkinson, une implication cholinergique striatale est suspectée dans la CH. Il semblerait qu'une diminution des récepteurs cholinergiques (Cha et al., 1999) et de la plasticité des interneurons cholinergiques (Picconi et al., 2006) soient responsables des premiers symptômes de la CH. De plus, des troubles du système cholinergiques (chutes de l'expression génique du VAcHT et de la ChAT et de l'activité de l'AChE) seraient décrits dans cette maladie, avant même les premiers signes de perte neuronale. Ceci laisse suggérer aux auteurs une possible utilisation de traitements à base de pro-cholinergiques (Smith et al., 2006); car à l'heure actuelle aucun traitement n'est disponible, seuls certains symptômes associés à la maladie peuvent être soignés (dépression, anxiété).

d) Cas de la schizophrénie

Maladie mentale caractérisée par 5 symptômes majeurs: des troubles d'association des idées; des troubles de l'affectivité; une perte de contact avec la réalité; un comportement de repli sur soi et un syndrome dissociatif (forme de désorganisation psychique).

L'étiologie reste discutée mais il semblerait qu'un terrain génétique prédisposerait à la déclaration de la pathologie. D'autre part, l'implication du système cholinergique n'est plus à prouver puisque des études montrent un polymorphisme génétique des récepteurs nicotiques chez les malades (Steinlein and Bertrand, 2008; Stephens et al., 2009).

Les moyens de traitement actuel de la schizophrénie se limitent à un suivi thérapeutique accompagné par une prise de neuroleptiques. Toutefois, les neuroleptiques ont souvent une action anti-cholinergique, or l'activation des récepteurs nicotiques et muscariniques améliorerait l'état des patients (Friedman, 2004; Sellin et al., 2008; Conn et al., 2009; Scarr and Dean, 2009). D'ailleurs une forme d'automédication a pu être observée puisque la proportion de fumeur est bien plus élevée chez les schizophrènes que dans la population générale. D'après Conn et al, la prise d'activateurs des récepteurs cholinergiques, notamment M1 et M4, pourrait donner des résultats prometteurs (Conn et al., 2009).

e) Cas du syndrome de Rett

Encéphalopathie (atteinte globale de l'encéphale), d'origine inconnue, elle est caractérisée par une régression comportementale du patient, des mouvements stéréotypés des mains, des anomalies respiratoires et un retard mental sévère accompagné d'une micro-encéphalie et de crises d'épilepsie. Ces symptômes apparaissent progressivement, chez l'enfant de sexe féminin, entre le 6^{ème} et le 18^{ème} mois.

Une diminution du nombre de neurones cholinergiques dans le nBM associée à une chute du développement des neuropils dans le cortex et l'hippocampe caractérisent également le syndrome de Rett. (Johnston et al., 1995). La gravité de ce syndrome souligne l'importance de l'acétylcholine dans le développement post-natal ainsi que dans le comportement conséquent.

Il n'existe pas de traitement pour ce syndrome, mais la prise en charge de certains symptômes existe (notamment contre les crises d'épilepsie).

f) Cas de l'autisme

Maladie qui est caractérisée par un retard mental menant à des troubles importants du développement social, du langage et du comportement.

Le système sérotoninergique serait fortement impliqué dans cette pathologie (Lam et al., 2006). Toutefois, de nombreuses publications font état de perturbations du système cholinergique, notamment de l'expression des récepteurs nicotiques (notamment les sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 7$ et $\beta 2$) (Lee et al., 2002; Martin-Ruiz et al., 2004; Ray et al., 2005). Par ailleurs, la prise d'inhibiteurs d'AChE a un effet positif sur le langage et le comportement des patients. Ainsi l'activation du système cholinergique (par inhibition de l'AChE ou par activation des récepteurs nicotiques) semble être une piste thérapeutique pour améliorer le quotidien des autistes (Lee et al., 2002; Chez et al., 2004).

Ce panel de maladies, où l'implication du système cholinergique n'est plus à démontrer, n'est pas exhaustif mais permet de mieux apprécier l'importance de ce système au sein du SNC.

III. Problématique

Les études bibliographiques réalisées en amont de ce travail de thèse nous ont amenées à deux grandes constatations. Premièrement, l'uranium affecte le SNC alors que les populations sont exposées quotidiennement à de faibles doses (exposition chronique). Deuxièmement, de part sa forte implication dans de nombreux processus comportementaux, le système cholinergique est impliqué dans la majorité des comportements affectés lors d'expositions à l'uranium.

Ainsi, nous avons tout d'abord essayé de répondre à la question suivante : « L'uranium a-t-il un impact neurotoxique sur le métabolisme du système cholinergique ? ». Pour cela, nous avons considéré l'UA (40 mg/L) comme modèle de contamination sub-chronique et chronique chez le rat adulte. Cependant, l'uranium possède une double toxicité (chimique et radiologique), ceci nous a conduit à effectuer en parallèle une contamination au plomb (métal lourd) et à l'UE (dont l'activité spécifique est 3 fois plus importante que celle de l'UA). La contamination au plomb (5 mg/L pendant 9 mois) nous permet de comparer les effets chimiotoxiques de l'UA avec ceux d'un neurotoxique avéré. La contamination à l'UE (40 mg/L pendant 1,5 ou 9 mois) nous permet d'aborder l'aspect radiotoxique de l'uranium. Lors de ces différentes expositions à l'UA, l'UE ou le plomb, une étude du métabolisme du système cholinergique a été réalisée.

Toujours dans un souci de modéliser la population globale et en vue des résultats obtenus chez les adultes, une seconde question a été soulevée: « Les effets observés chez les adultes sont-ils exacerbés chez une population plus sensible ? ». Deux modèles ont été sélectionnés afin d'illustrer la population jeune et vieillissante. Le premier, le modèle juvénile, a pour but de déceler une sensibilité accrue et/ ou une capacité adaptative du système cholinergique face à la contamination par l'UA. Ainsi, des ratons, dont la sensibilité aux polluants est importante puisqu'il s'agit d'un modèle en croissance et donc en plein développement cérébral, ont été contaminés depuis la naissance à l'UA (10 ou 40 mg/L) pendant 2, 4 ou 9 mois. Le second, le modèle ApoE^{-/-}, nous permet de déterminer un éventuel effet potentialisateur de l'uranium sur l'apparition de troubles neurodégénératifs. Les souris invalidées pour le gène de l'ApoE (KO ApoE^{-/-}) sont fragilisées par une prédisposition à l'apparition précoce et notable de troubles neurodégénératifs. Elles ont été soumises à une contamination de 3 mois à l'UA (20 mg/L). Sur ces animaux, une analyse de différents protagonistes du système cholinergique ainsi que des tests comportementaux ont été mis en œuvre.

Puisque l'uranium a clairement un impact sur le système cholinergique, nous avons tenté de répondre à une troisième question d'ordre mécanistique : « Quels sont les mécanismes d'action mis en jeu dans la toxicité de l'uranium au niveau cellulaire ? ». Pour ce faire, des expérimentations ont été menées sur des cellules neuronales humaines (IMR-32) mises en contact avec l'uranium appauvri (Figure17).

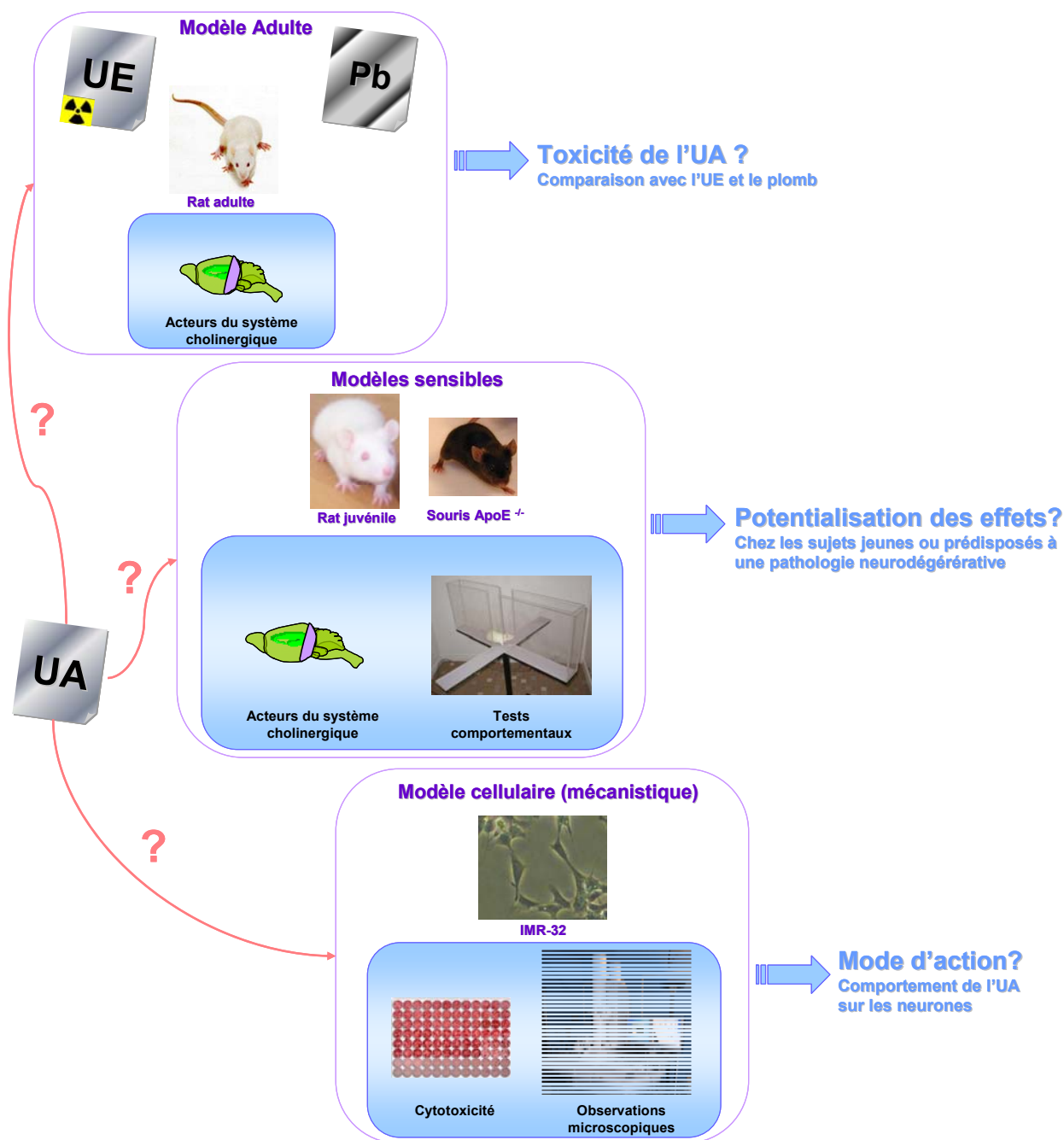


Figure 17 : But du travail de thèse

MATERIEL ET METHODES

I. Matériels

A. Uranium

1) Uranium appauvri (UA) :

La solution d'UA est réalisée par dissolution de cristaux de nitrate d'uranyle hexahydraté, de formule chimique: $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [PM= 502,13 g/mol] provenant de pastilles d' UO_2 (AREVA-COGEMA, Pierrelatte, France). Lors des contaminations d'animaux, les cristaux sont dissous dans de l'eau d'Evian® (Danone, Paris, France) afin d'obtenir des solutions à 10, 20 ou 40 mg/L d'UA (Annexe II), avec 20 mg/L correspondant à la concentration la plus importante en uranium retrouvée dans des eaux souterraines de Finlande (Juntunen, 1991).

Lors des contaminations cellulaires, les cristaux de nitrate d'uranyle sont dissous dans une solution de bicarbonate de sodium à 100 mM. Par la suite, l'uranium est dissous dans le milieu de culture pour obtenir des concentrations finales de 1, 5, 10, 100, 300, 500, 700 ou 1000 μM de nitrate d'uranyle (Annexe VII).

2) Uranium enrichi (UE) :

La solution d'UE est réalisée par dilution d'une solution mère de nitrate d'uranyle hexahydraté, de formule chimique: $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [PM= 502,13 g/mol] (AREVA-COGEMA, Pierrelatte, France). Lors des contaminations d'animaux, la dilution est effectuée dans de l'eau d'Evian® (Danone, Paris, France) afin d'obtenir une solution à 40 mg/L d'UE (Annexe III).

type d'uranium	concentration d'uranium	Composition isotopique			activité spécifique	source
		% ^{234}U	% ^{235}U	% ^{238}U		
poudre d'UA	474 $\mu\text{g/g}$	0,01	0,255	99,73	$1,4 \cdot 10^4$ Bq/g	AREVA-COGEMA
solution d'UE	100g/L	0,01	4,25	95,74	$4,2 \cdot 10^4$ Bq/g	AREVA-COGEMA

Tableau 3: Sources d'UA et d'UE utilisées lors des expérimentations

Chaque préparation de solution d'uranium est suivie d'une prise de pH pour s'assurer du maintien physico-chimique de l'uranium. Entre pH 7 et pH 10, le nitrate d'uranyle hexahydraté utilisé [$\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] se décompose en oxyde d'uranium et se stabilise en majorité sous forme de complexes carbonates d' UO_2^{2+} [$\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ ou $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$] (White, 1983; Frelon *et al.*, 2005).

B. Plomb

La solution de plomb est réalisée à partir de la dissolution de cristaux de nitrate de plomb, de formule chimique : $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (PM= 331 g/mol) dans de l'eau d'Evian® (Danone, Paris, France) afin d'obtenir une solution à 5 mg/L de plomb ([Annexe IV](#)). Cette concentration en plomb correspond à une dose absorbée équivalente à celle de l'uranium chez le rat (coefficient d'absorption intestinal 8 fois plus important pour le plomb que pour l'uranium chez le rat).

C. Modèle animal

Les expérimentations menées sur les animaux sont effectuées en accord avec les directives gouvernementales (réglementations pour l'expérimentation animale définies par le ministère français de l'agriculture ; N°2001-464, mai 2001) imposant d'obtenir l'autorisation d'expérimenter sur les animaux vivants (autorisation n° 92-324) et en respect des recommandations du comité d'éthique de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire.

Une phase d'une semaine d'acclimatation des animaux est respectée avant de commencer les études.

Pour le suivi des animaux, un relevé hebdomadaire du poids, de la consommation hydrique et de la prise alimentaire est réalisé.

1) Modèle rat adulte

Les 140 rats mâles adultes Sprague-Dawley de souche OFA, pesant entre 220 et 250 g et âgés de 6 semaines au début des expérimentations, sont issus de l'élevage Charles River (L'Arbresle, France). Les animaux sont placés deux par cage avec un libre accès à l'eau de boisson et à la nourriture. La pièce d'hébergement est maintenue à hygrométrie et température stables où un cycle lumière/obscurité de 12/12h est observé (jour de 8 h à 20 h, nuit de 20 h à 8 h).

2) Modèle rat juvénile

Les 40 rats femelles adultes, âgées de 10 semaines et au 16^{ème} jour de gestation, sont issues de l'élevage Charles River. Les femelles gestantes sont placées une par cage. Les ratons restent auprès de leur mère de la naissance jusqu'à leur sevrage (soit jusqu'à l'âge de 4 semaines). Puis les 120 ratons mâles sont répartis deux par cage avec un libre accès à

l'eau de boisson et à la nourriture. Le sevrage et la répartition des 120 rats s'effectuent le même jour puisque les animaux sont nés à la même date ± 1 jour. Les femelles sont mises à disposition pour d'autres expérimentations au sein du laboratoire. Dans le cas échéant, les femelles sont euthanasiées. La pièce d'hébergement est maintenue à hygrométrie et température stables où un cycle lumière/obscurité de 12/12h est observé (jour de 8 h à 20 h, nuit de 20 h à 8 h).

3) Modèle souris transgénique invalidée pour le gène ApoE (KO ApoE^{-/-})

Les souris homozygotes portant la mutation ApoE^{tm1unc} / ApoE^{tm1unc} sont invalidées pour le gène de l'apolipoprotéine E. Elles présentent un phénotype hypercholestérolémique dès les premiers mois. Des troubles du fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique, des lésions cérébrales, ainsi que des troubles de l'apprentissage et de la mémoire spatiale apparaissent avec l'âge. Dans cette étude ce modèle est utilisé pour son phénotype neurodégénératif entraînant des altérations de la mémoire.

Les 30 souris mâles adultes, âgées de 6 semaines, sont issues de l'élevage mis en place au laboratoire de Fontenay-aux-Roses. Les couples fondateurs de notre élevage proviennent du Jackson Laboratory (JAX[®] Mice and Services, Maine, Etats-unis). Quinze souris de phénotype sauvage (C57-Black/6) sont également hébergées en parallèle des ApoE^{-/-}. Les souris sont placées 5 par cages avec un libre accès à l'eau de boisson et à la nourriture. La pièce d'hébergement est maintenue à hygrométrie et température stables où un cycle lumière/obscurité de 12/12h est observé (jour de 8 h à 20 h, nuit de 20 h à 8 h).

4) Modèle cellulaire IMR 32

Les cellules IMR-32 proviennent d'un don du Docteur Denis Servent du laboratoire de Toxines, récepteurs et canaux ioniques (CEA, DSV, Saclay, France). Ces cellules sont issues d'un neuroblastome localisé dans l'abdomen d'un jeune garçon de 13 mois. Ces cellules tumorales sont composées d'un mélange de deux types cellulaires morphologiquement distincts : des neuroblastes (précurseurs de cellules nerveuses) et des fibroblastes (cellules de soutien du tissu conjonctif) (Tumilowicz et al., 1970). Les cellules IMR-32 ont pour particularité d'être adhérentes, de ne contenir que peu de vésicules de neurotransmission et d'exprimer naturellement les récepteurs du système cholinergique (muscariniques et nicotiniques). Cette propriété en fait un modèle couramment utilisé pour l'étude de ces récepteurs (Clementi et al., 1986). L'expression des récepteurs cholinergiques est dépendante de la différenciation cellulaire, ainsi il est préconisé de les cultiver en

présence de facteurs de différenciation tels que l'acide rétinoïque ou le BrdU ([Poongodi et al., 2002](#)).

II. Méthodes

A. Contaminations

L'eau de boisson des lots d'animaux témoins est de l'eau d'Evian®. Les animaux sont répartis aléatoirement entre lots témoins et lots contaminés avec un nombre équivalent d'animaux pour chaque groupe.

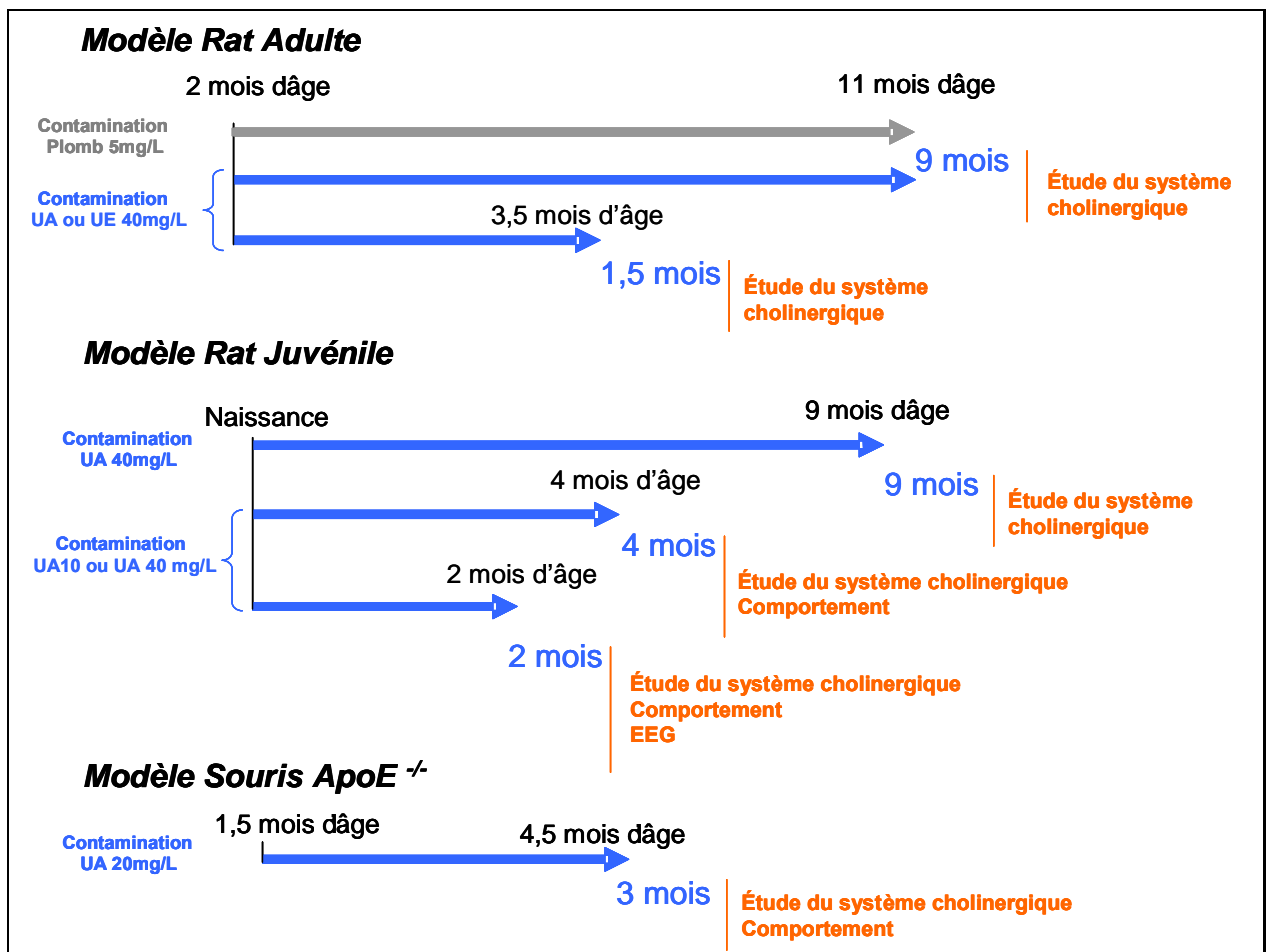


Figure 18 : Différents protocoles réalisés sur les modèles rongeurs

1) Contamination des modèles rat adulte et souris KO APOE^{-/-}

Une semaine après l'arrivée des animaux à l'animalerie, la contamination débute *via* l'eau de boisson. Les rats adultes sont contaminés pendant 1,5 ou 9 mois avec de l'UA ou de l'UE à 4% à 40 mg/L pour chaque temps. Quant aux souris transgéniques, 3 mois de contamination à l'UA à 20 mg/L ont été réalisés.

2) Contamination du modèle rat juvénile

De la naissance jusqu'au sevrage, les ratons sont contaminés à l'UA *via* le lait maternel. Après le sevrage, les jeunes rats boivent de l'eau supplémentée en UA à des concentrations de 10 ou 40 mg/L jusqu'à l'âge de 2, 4 ou 9 mois. La concentration de 40 mg/L correspond à deux fois la concentration la plus importante retrouvée dans des eaux souterraines (Finlande, [\(Juntunen, 1991\)](#)). La comparaison des résultats obtenus avec la deuxième concentration d'UA choisie, 10 mg/L, permettra de déterminer s'il existe une relation de dose-dépendance des effets de l'UA observés chez le rat juvénile.

3) Contamination du modèle cellulaire

Lors des tests de cytotoxicité, les cellules sont mises en contact avec le nitrate d'uranyle à des concentrations en UA de 1, 5, 10, 50, 100, 300, 500, 700 ou 1000 μM pendant 4, 24 ou 48 h *via* le milieu de culture ([Annexe VI](#)).

Lors des préparations cellulaires pour les observations au TEM ou au SIMS, les cellules ont été incubées dans 100 μM d'UA (sous forme de nitrate d'uranyle) pendant 24 h.

B. Techniques d'analyses post mortem

1) Prélèvements du matériel biologique

Les prélèvements tissulaires se font en parallèle et sur glace afin d'atténuer les dégradations. Les tissus sont ensuite conservés à -80°C .

Le sang est prélevé par ponction intracardiaque sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane 5% (Florène[®], Abbott France, Rungis, France). Après coagulation dans le tube collecteur (tube sec), les prélèvements sont centrifugés (10 min, 1000 rpm, 4°C). Le sérum (surnageant) est ensuite récupéré puis aliquoté.

Après décapitation, le cerveau est extrait de la boîte crânienne et posé immédiatement sur une plaque refroidie par de la glace. L'hippocampe et le cortex entorhinal sont microdisséqués selon la méthode de Glowinski et Iversen ([Glowinski and Iversen, 1966](#)).

Les deux reins sont prélevés.

2) Technique de quantification de l'expression génique

a) Extraction des ARN messagers tissulaires

Trente mg de tissu sont lysés en présence de billes de précession et de 1 ml de Quiazol (réactif de lyse), à l'aide d'un broyeur-homogénéisateur (Fastprep™ ; BIO101 ; QBIogene). L'ARN total est extrait du broyat tissulaire grâce au kit RNeasy® Lipid Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant les recommandations du fournisseur. Le spectrophotomètre (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000, ND-1000 spectrophotometer, logiciel : ND-1000 V3.5.1, Labtech, Palaiseau, France) détermine la quantité d'ARN par une lecture à 230 nm ainsi que la qualité des ARN grâce au rapport 260 /280 nm.

b) Rétro-transcription (RT)

La transcription inverse est réalisée avec le kit « DyNAmo™ Cdna Synthesis Kit » (FINNZYMES, Saint-Quentin-En-Yvelines, France). Elle est effectuée avec une quantité d'ARNm de 0,5 µg. La synthèse d'ADNc s'effectue pendant 60 minutes à 42°C avec 200 U de transcriptase inverse (M-MuLV RNase H+ reverse transcriptase) dans 20 µl de tampon de réaction (RT buffer 2 X, Random hexamer 20 ng, RNase-free H₂O). Quinze minutes à 70°C terminent la réaction par dénaturation des ADNc. Les échantillons d'ADNc sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

c) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel

Les séquences d'amorces utilisées pour l'amplification des ADNc sont déterminées à partir du logiciel « Primer Express » (Applied Biosystems, Villebon, France), puis commandées chez Invitrogen-Life technologies (Cergy Pontoise, France).

L'expression des gènes est mesurée par PCR en temps réel. La PCR est réalisée avec 8 µl d'ADNc dilué au 1/50^{ème} auxquels sont ajoutés 12 µl de réactifs SYBR (polymérase, dNTP, sels, intercalant fluorescent, fluorophore de contrôle interne, Power SYBR® Green - Applied Biosystems, Villebon, France) contenant les amorces sens et antisens spécifiques du gène d'intérêt. L'amplification et la détection des produits de PCR sont effectuées à l'aide de l'appareil AbiPrism 7000 (Applied Biosystem, Villebon, France), selon le programme suivant : 50°C pendant 2 minutes, 95°C pendant 10 minutes pour activer l'AmpliTaq Gold® DNA Polymerase puis 40 cycles d'amplification comprenant 15 secondes de dénaturation à 95°C et 1 minute d'hybridation-élongation à 60°C. Le SYBR Green® a la

propriété de s'incorporer de manière non spécifique au sein d'un ADN double brin en émettant une fluorescence à 530 nm.

La méthode comparative des $\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen, 2001) est employée pour la quantification relative de l'expression des transcrits des gènes d'intérêts. Chaque échantillon est normalisé par le taux d'expression d'un gène endogène de référence, l'HPRT (Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyl Transférase), dont le taux d'expression est constant et proche de ceux des gènes étudiés (Ropenga et al., 2004).

3) Techniques biochimiques

a) Dosage de l'uranium tissulaire

Après digestion des échantillons par adjonction de 8 mL d'acide nitrique à 70% ultrapur et 2 mL de peroxyde d'hydrogène, la minéralisation est réalisée dans un four à microondes de 1000W (Ethos Touch, Milestone Microwaves Laboratory Systems, Bergamo, Italy) selon le programme suivant : 20 min de montée en température puis 10 min à 180°C. L'uranium est dosé par un spectromètre de masse de type ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrophotometer, ICPMS-VGPQ, EXCELL, ThermoElectron, France) avec pour témoin interne le bismuth (1 µg/L). La limite de détection de l'ICPMS est de $1,07 \cdot 10^{-4}$ µg/L.

b) Extraction de protéines totales tissulaires ou cellulaires

Les protéines totales sont extraites grâce au tampon de lyse fourni par le kit « Mammalian Cell Lysis Kit » de chez Sigma-Aldrich dans les proportions suivantes (Tableau 4):

	Pour western-blot		Pour dosages ACh/AChE	
	Quantité de matériel biologique	Volume de tampon de lyse	Quantité de matériel biologique	Volume de tampon de lyse
Tissu (tube à billes)	20 mg	200 µl	15 mg	360 µl
Cellules (tube classique)	2 millions	200 µl	XXXXXXXXXX	

Tableau 4 : Matériel biologique nécessaire pour les extractions de protéines

Composition du tampon de lyse : 10 mM HEPES pH 7,9 ; 10 mM KCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 1 mM DTT ; 0,5 mM PMSF ; 1% de cocktail d'inhibiteurs de protéases.

Le matériel biologique est homogénéisé sur roue (40 min à 4°C), la lyse des tissus est affinée grâce à un passage de 10 secondes au broyeur-homogénéisateur (FastPrep™ ;

BIO101 ; QBIogene). Après une centrifugation (20 min, 13200 rpm, 4°C), le surnageant est récupéré, aliquoté et stocké à -80°C.

c) Mesure de la concentration protéique

La concentration protéique des échantillons est déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976), avec pour référence une courbe étalon d'albumine de sérum bovin. Cette méthode s'appuie sur une propriété du bleu de Coomassie (Protein Assay ; BioRad) dont l'absorbance passe de 465 nm à 595 nm lorsqu'il est lié aux protéines.

d) Analyse protéique par la technique de western-immunoblotting

Les protéines sont dénaturées (5 min, 95°C) dans du laemmli (125 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 20% glycérol ; 4 % SDS ; 0,02 % bleu de bromophénol ; 10 % β -mercaptoéthanol). Cent μ g ou 25 μ g de protéines, pour tissu ou cellules respectivement, sont déposés sur un gel d'acrylamide en conditions dénaturantes.

Composition d'un gel à 7,5% d'acrylamide (Tableau 5):

	gel de séparation	gel de concentration	fournisseur
Eau distillée	2,850 ml	800 μ l	
Tris 1,5M pH 8,8	2,250 ml		
Tris 0,5 M pH 6,6		2,000 ml	
Acrylamide	2,300 ml	900 μ l	BioRad
Glycérol	900 μ l		Invitrogen
SDS 10%	90 μ l	40 μ l	Invitrogen
APS	600 μ l	300 μ l	BioRad
Temed	8 μ l	5 μ l	BioRad

Tableau 5 : Composition des gels de polyacrylamide pour Western-blots

Après séparation, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (LC-2001 ; Invitrogen) sous l'action d'un courant de 150 mA appliqué pendant 1 h 30. Les sites aspécifiques de la membrane sont bloqués par un bain de TBS à 5 % de lait écrémé (1 h, température ambiante). La membrane est ensuite incubée dans l'anticorps primaire (1 nuit, 4°C) puis dans l'anticorps secondaire approprié, couplé à une peroxydase (1 h, température ambiante). Après chaque incubation d'anticorps, une série de rinçages au TSB 0,025 % tween 20 est réalisée (5 X 10 min, température ambiante). Un kit de détection par électro-chimioluminescence (Immobilon Western ; WBKLS0500 ; Millipore) révèle un signal, par la suite détecté par une caméra CCD (Las-3000 ; Fujifilm) et quantifié *via* le logiciel MultiGauge.

Liste et référence des anticorps (Tableau 6):

Antigène	Poids moléculaire	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
ChAT	72 kDa	ab50412 de abcam	036sc-2768 Anti-IgG de chèvre de Santa Cruz
VAcHT	doube bande 67-70 kDa	V 5387 de Sigma	sc-2004 Anti-IgG de lapin de Santa Cruz
m1AChR	64 kDa	SP5119P de Acris Antibodies	sc-2004 Anti-IgG de lapin de Santa Cruz
nAChRβ2	57 kDa	AVARP13020_T100 de AVIVA Systems Biology	sc-2004 Anti-IgG de lapin de Santa Cruz
GAPDH	37 kDa	sc-25778 de Santa Cruz	sc-2004 Anti-IgG de lapin de Santa Cruz

Tableau 6 : Références des anticorps utilisés pour les Western-blots

e) Dosage de l'acétylcholine et de l'activité de l'acétylcholinestérase dans les tissus

Le taux d'acétylcholine (ACh) ainsi que l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) dans l'hippocampe et le cortex sont mesurés grâce au kit colorimétrique, Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit (A12217, Molecular Probes, Invitrogen, Cergy pontoise, France).

Les échantillons sont dilués au demi dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,8 pour un volume final de 100 µl déposé par puits. Tous les dépôts se font en doublon sur plaque 96 puits. Un contrôle positif est réalisé avec 100 µl de H₂O₂ à 3 % (20 mM).

Mesure du taux d'ACh : Le réactif est composé de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,8 auquel est ajouté 2 U/ml de HRP (horseradish peroxidase), 0,2 U/ml de choline oxydase, 1 U/ml d'acétylcholinestérase et 400 µM d'Amplex Red. Cent µl de ce mix sont ajoutés à chaque échantillon. Après 45 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la fluorescence est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm. Une courbe standard d'ACh (de 0 à 100 µM) sert de référence au calcul d'obtention du taux d'ACh.

Mesure de l'activité de l'AChE : Le réactif est composé de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,8 auquel est ajouté 2 U/ml de HRP (horseradish peroxidase), 0,2 U/ml de choline oxydase, 100 µM d'acétylcholine et 200 µM de réactif Amplex Red. Cent µl de ce mix sont ajoutés à chaque échantillon. Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la fluorescence est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm. L'activité est calculée à partir de la valeur d'activité contrôle d'AChE à 0,2 U/mL.

Mesure de l'activité de la BuChE : Le réactif est composé de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,8 auquel est ajouté 2 U/ml de HRP (horseradish peroxidase), 0,2 U/ml de choline oxydase et

100 μM de butyrylcholine. Cent μl de ce mix sont ajoutés à chaque échantillon. Après 25 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la fluorescence est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm. L'activité est calculée à partir de la valeur d'activité contrôle d'BuChE à 0,2 U/mL.

f) Dosage l'activité de la cholinestérase plasmatique

Afin de mesurer l'activité de cholinestérase plasmatique, les échantillons de sérum sont placés dans l'automate Konelab™ 20 (Thermo Electron Corporation) en présence du kit de révélation de cholinestérase (100 mmol/l tampon phosphate ; 10 mmol/l phénol ; 1 mmol/l benzoylcholine ; 0,4 mmol 4-aminophnazone (4-AAP) ; 1300 U/l choline oxydase ; 150 U/l peroxydase; Thermo Electron Corporation). Trois réactions enzymatiques permettent la lecture à 510 nm du produit final (Figure 19).

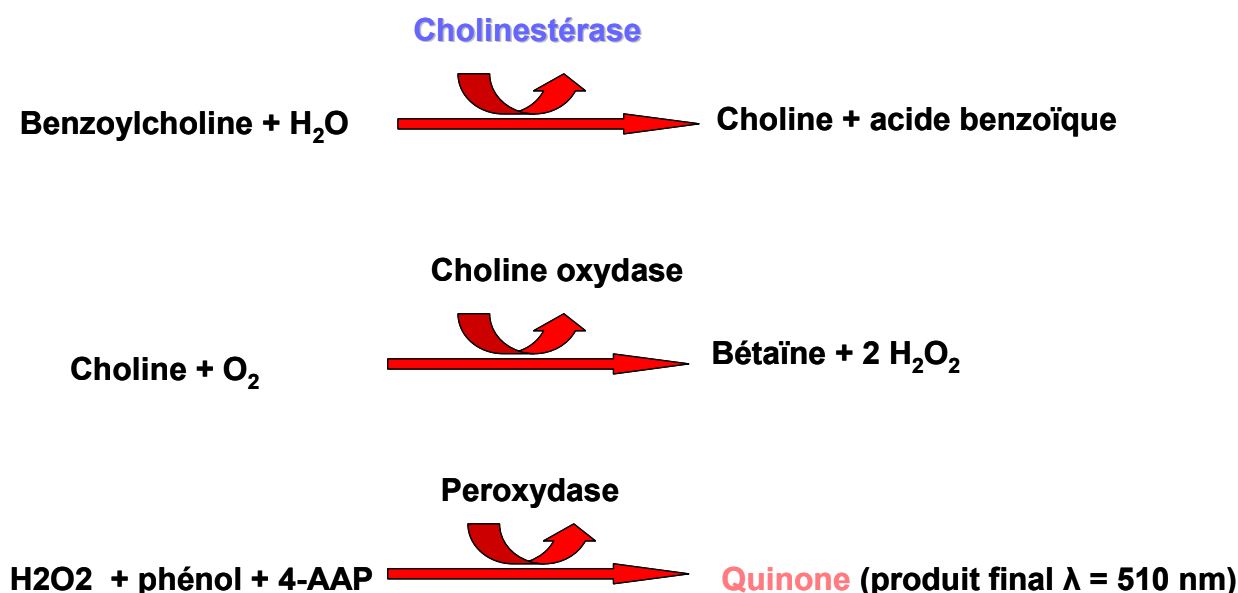


Figure 19 : Réactions enzymatiques du dosage de la cholinestérase plasmatique

4) Techniques d'analyses *in vivo*

a) Chirurgie : Mesures de l'activité électro-encéphalographique (EEG)

Les implants (Data Sciences International, Saint Paul, Etats-Unis) peuvent être utilisés deux fois au maximum (batterie non rechargeable). Entre deux utilisations, les implants sont nettoyés à grande eau, trempés 12h dans du glutaraldéhyde 2%, rincés 2 fois 1h dans du NaCl 0,9%, puis conservés dans des falcons contenant du NaCl 0,9%. Si les implants sont neufs, aucune préparation n'est nécessaire.

Préparation de l'animal. Après injection intramusculaire d'un mélange kétamine/xylazine (Calmivet : aller-retour du piston + Imalgène 100 à 150 mg/kg), le rat est préparé (rasage et lavages à l'alcool et à la Bétadine des parties à inciser : abdomen, gorge, dessus du crâne) puis installé sur une couverture chauffante avec contrôle et régulateur de la température ($37,0 \pm 0,5$ °C) par sonde rectale (Harvard, Edenbridge, Grande Bretagne). Toute l'opération est réalisée dans des conditions stériles (matériel de dissection, compresses, gants etc...). Un champ fenêtré est disposé sur l'animal.

Implantation et fixation de l'émetteur. L'opération commence par l'incision au scalpel de l'abdomen sur 2-3 cm. Peau et muscle sont séparés aux ciseaux, la peau est ensuite maintenue écartée par des pinces-clamp. Les muscles sont incisés au scalpel après avoir effectué une boutonnière aux ciseaux dans laquelle a été glissée une sonde cannelée. L'implant est glissé dans le péritoine du rat, puis cousu (nœuds de chirurgien) en 2 points, avec du fil non-résorbable (Vicryl ®), à la paroi musculaire.

Passage des électrodes jusqu'à leur lieu de fixation. Les 7 électrodes (3 dipôles + 1 fil de Terre) sont passées au travers du côté droit de la paroi musculaire abdominale à l'aide d'un trocart (14x1 ½ Inter). La longueur d'électrode ainsi sortie doit être égale à la longueur menant jusqu'au crâne. L'excès de longueur est replié en boucle dans l'abdomen où il ne gênera pas l'animal. Des clamps sont apposés sur chaque électrodes afin de les différencier (3, 2, 1 pour les dipôles et C pour la Terre). La paroi musculaire est ensuite recousue (nœuds en croix) avec du fil résorbable (Vicryl ®). A l'aide d'un guide (tige en métal + paille autour), les électrodes sont passées par dipôle en sous cutané jusqu'à la gorge. La peau de l'abdomen est ensuite recousue avec des agrafes, puis les électrodes sont à nouveau passées avec le guide jusqu'au crâne (entre les deux oreilles). L'ouverture à la gorge est refermée en un ou deux points avec du fil non résorbable.

Fixation des électrodes. L'animal est fixé sur un appareil de stéréotaxie (également équipé d'une couverture chauffante). Les barres d'oreilles sont placées en premier (le réflexe de clignement des yeux atteste de son bon positionnement), puis les dents sont « crochetées » et la langue délicatement sortie avec une pince. La tête de l'animal doit être horizontale et ne doit pas pouvoir bouger. Après avoir coupé la peau du crâne au scalpel, les couches musculaires sont enlevées avec des cotons tiges humides (NaCl 0,9%). Le crâne est perforé en 5 points à l'aide d'une perceuse de dentiste. Les 2 dipôles d'EEG et la terre sont placés dans chacun des trous ; le troisième dipôle est logé autour de l'œil droit de l'animal (en sous-cutané) (Figure 20). Avant de positionner et de coller (colle Vetbond, 3M santé, Polytrans, Pouancé, France) les électrodes sur environ 1 cm, elles sont préalablement dénudées sur 0,6mm avec le scalpel. L'ensemble est scellé au crâne avec

du ciment dentaire (Hésadon n°31, IMPORT Dentaire, Paris, France), ce qui permet d'individualiser les électrodes et ainsi éviter les faux contacts. La peau du crâne est ensuite recousue avec du fil non résorbable (nœuds de chirurgien).

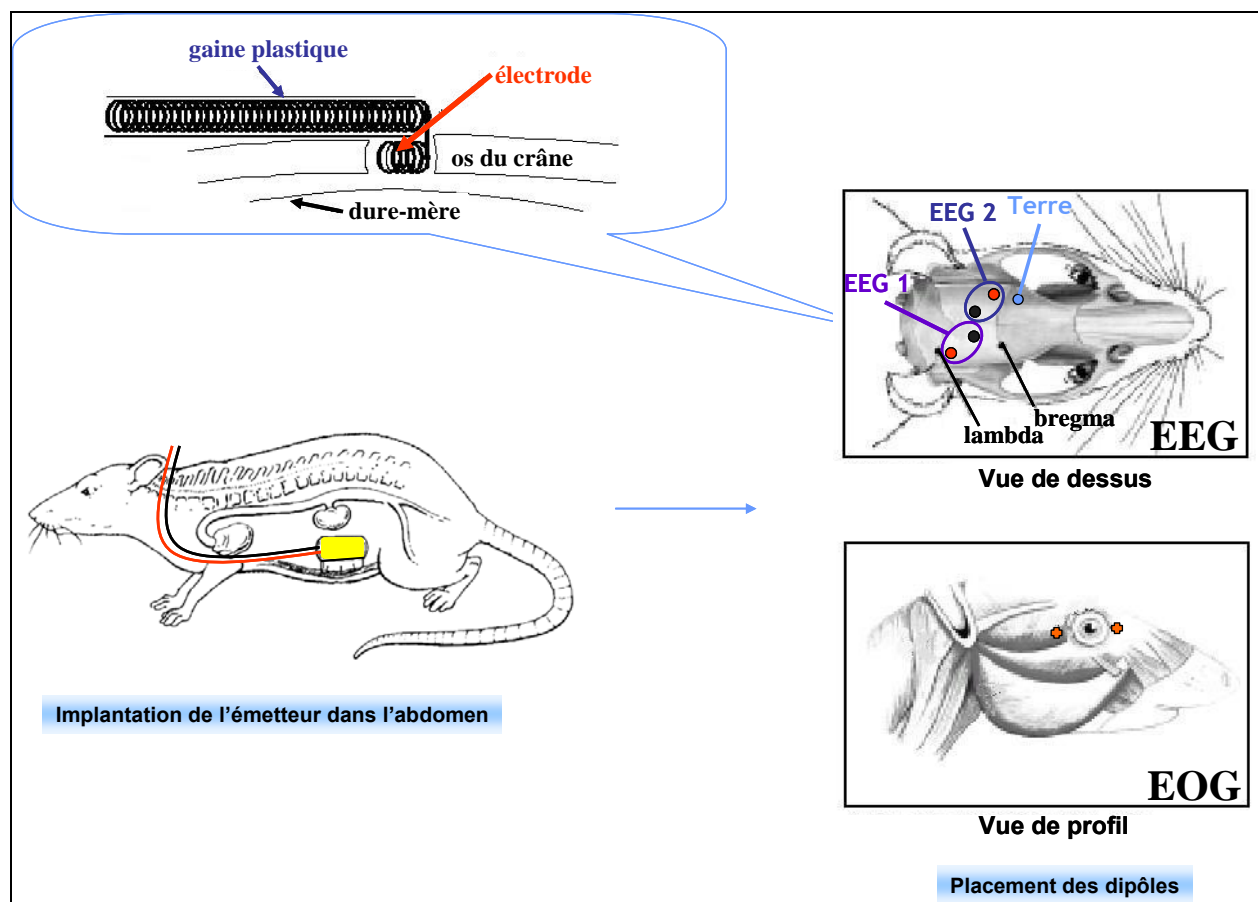


Figure 20 : Implantation de l'émetteur et des électrodes DSI chez le rat

Réveil de l'animal. Jusqu'à son réveil, l'animal est mis dans une cage sous une lampe chauffante. Du paracétamol est dissous dans le biberon pendant la première semaine post-chirurgie. La cicatrisation ainsi que l'état général sont étroitement surveillés. Les animaux restent isolés (1 par cage) jusqu'à cicatrisation complète, puis rejoignent leurs compagnons jusqu'à la fin de l'étude.

Enregistrement des animaux. Après 15 jours de convalescence, chaque rat opéré est placé (dans sa cage) sur un récepteur relié à un ordinateur. Les ensembles cages-récepteurs sont assez éloignés les uns des autres pour éviter les interférences entre émetteurs. Le protocole d'enregistrement se déroule comme suit : 24h d'enregistrement (continu) par semaine, durant 4 semaines. Les résultats sont analysés grâce au logiciel Somnologia software (Resmed, France).

b) Test comportementaux

Le transfert de salle, l'habituation aux manipulateurs ainsi que la mise en groupe des animaux (4 par cage) s'effectuent 5 jours avant le début des tests. L'intégralité des tests est placée sous enregistrement vidéo.

i) Test de l'activité locomotrice

L'activité locomotrice est observée à l'aide d'un actimètre. Il s'agit d'une boîte en plexiglas de 40 à 50 cm de côté équipée de deux rangées de caméras infrarouges à 5 cm et 9 cm de hauteur. Cet appareillage permet de mesurer toutes les minutes, et ce pendant 20 min, les déplacements ainsi que les redressements effectués par les animaux. Le test s'effectue sur deux jours, les animaux passant une fois chaque jour.

ii) Tests de mémoire

(i) Mémoire à court terme

La mémoire à court terme est mesurée dans un labyrinthe en Y où les trois branches sont recouvertes de motifs distincts (ronds, triangles ou carrés). Pendant les 10 min où l'animal est placé dans le labyrinthe, les branches visitées sont répertoriées. Un pourcentage d'alternances est calculé : $100 \times \text{nombre d'alternances positives} / \text{nombre d'alternances possibles}$.

Avec : une alternance positive représentant une visites des 3 branches distinctes successivement (ronds, triangles puis carrés, par exemple) et une alternance possible représentant la visite de trois branches.

(ii) Mémoire à moyen terme

Ce test s'effectue dans l'actimètre au moyen de trois objets dont deux identiques. Après avoir été habitué à l'enceinte pendant deux jours consécutifs (test de l'activité locomotrice), les animaux sont placés 3 min en présence des deux objets identiques. A l'issue d'une heure passée dans leur cage, les animaux sont remis 3 min dans l'actimètre en présence d'un des deux objets déjà rencontrés et d'un objet nouveau. Lors de chaque session de 3 min, le temps d'exploration de chaque objet (= temps pendant lequel l'animal a le museau à moins de 5 mm de l'objet) est mesuré. Les animaux « sains » doivent spontanément passer plus de temps à examiner le nouvel objet.

iii) Test de mesure de l'état d'anxiété

Ce test est réalisé à l'aide d'un labyrinthe en croix surélevé (deux branches ouvertes, deux branches fermées) situé à 70 cm du sol. Les animaux sont déposés la tête dirigée vers une branche ouverte. Toutes les minutes, pendant 5 minutes, le temps passé dans chaque branche, ainsi que le nombre d'entrées dans les différentes branches est noté. Les sujets les plus anxieux passeront spontanément plus de temps dans les branches fermées.

iv) Test de coordination motrice

Ce test s'effectue sur 2 jours, les animaux passent 3 fois par jour pendant 3 minutes sur une roue tournant sur elle-même (Rotarod). La vitesse de la roue est constante durant chaque passage, mais augmente entre les différents passages (3 premiers passages : 5 tours par minute, puis pour les deux passages suivants : 7 tours par minute, et enfin 10 tours par minute pour le dernier passage). Le temps passé par chaque rongeur sur la roue est mesuré. Les animaux ayant une bonne coordination motrice sont ceux qui restent le plus longtemps sur la roue.

v) Tests de mesure de l'état de dépression

Ce test est le plus stressant pour les animaux. Il est donc réalisé le dernier jour de la batterie de tests comportementaux. L'animal est placé dans un bécher (40 cm de diamètre) rempli d'eau à $25 \pm 0,5$ °C. Le niveau d'eau est fonction de la taille du rongeur (du bout du museau à mi-queue). Pendant les 10 minutes du test, l'animal présente un comportement de nage qui, avec le temps, fait de plus en plus place à des périodes d'immobilité s'apparentant à de la résignation propre à la dépression.

Le temps de résignation est noté toutes les minutes, mais seul le cumul de ce temps au cours des 5 dernières minutes de la séance est pris comme index de résignation.

5) Techniques d'analyses *in vitro*

a) Entretien

A 80% de confluence, soit tous les trois jours, les cellules IMR-32 sont passées. Leur faible adhérence permet de les décoller par simple aspersion de milieu de culture sur le tapis cellulaire. Le milieu contenant les cellules fraîchement décollées est expulsé dans 3 flasques complétées en milieu de culture (repiquage au 1 : 3). La différenciation cellulaire est activée par l'adjonction d'acide rétinoïque (10nM) au milieu de culture. Douze jours de traitement sont nécessaires pour obtenir des cellules différenciées. La composition des milieux de culture est présentée dans l'annexe (Annexe V).

b) Test de cytotoxicité

Pour les tests de cytotoxicité, les cellules sont cultivées en plaque 96 puits et différenciées pendant 14 jours. Vingt-quatre conditions ont été effectuées simultanément sur une plaque, 12 pour les cellules incubées dans un milieu supplémenté en SVF et 12 pour les cellules incubées dans un milieu non-supplémenté en SVF. Sur ces douze conditions, 3 témoins de contrôle ont été réalisés. Le premier est le « témoin négatif », il s'agit de cellules mises en culture pendant 24 h dans du milieu de culture. Le second est le « témoin bicarbonate », il s'agit de cellules mises en culture pendant 24 h dans un milieu contenant 10 mM de bicarbonate. Ce témoin représente le témoin de contamination puisque le nitrate d'uranyle est dissous dans du bicarbonate 100 mM, puis dilué au 10^{ème} dans le milieu de culture. Le troisième est le « témoin positif », il s'agit de cellules mises en culture pendant 24 h dans un milieu contenant du tampon de lyse. Ce dernier témoin est le témoin de mort cellulaire. Pour les neuf autres conditions, les cellules sont incubées pendant 24 h avec des concentrations différentes de nitrate d'uranyle (1, 5 10, 50, 100, 300, 500, 700, 1000 µM) (Tableau 7).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T-	T+	NaHCO ₃	UA	UA	UA	T-	T+	NaHCO ₃	UA	UA	UA
B	T-	T+	10mM	1µM	5µM	10µM	T-	T+	10mM	1µM	5µM	10µM
C	T-	T+	NaHCO ₃	UA	UA	UA	T-	T+	NaHCO ₃	UA	UA	UA
D	T-	T+	10mM	1µM	5µM	10µM	T-	T+	10mM	1µM	5µM	10µM
E	UA	UA	UA	UA	UA	UA	UA	UA	UA	UA	UA	UA
F	50µM	100µM	300µM	500µM	700µM	1000µM	50µM	100µM	300µM	500µM	700µM	1000µM
G	UA	UA	UA	UA	UA	UA	UA	UA	UA	UA	UA	UA
H	50µM	100µM	300µM	500µM	700µM	1000µM	50µM	100µM	300µM	500µM	700µM	1000µM
	Milieu sans SVF						Milieu + SVF					

Tableau 7 : Plan type d'une plaque 96 puits pour les tests de cytotoxicité

Avec T- représentant le « témoin négatif », T+ représentant le « témoin positif » et NaHCO₃ représentant le « témoin bicarbonate ».

i) Test de mortalité cellulaire

Le kit cytotox-Glo™ Cytotoxicity Assay (Référence G9291, Promega, Charbonnières, France), utilisé selon les recommandations du fournisseur, permet d'estimer la mortalité cellulaire dans une population donnée. Ce test est composé de deux étapes.

Etape 1 : mesure de la mortalité cellulaire due au toxique dans la population donnée.

Le réactif est un substrat peptidique luminogène (alanyl-alanyl-phénylalaninyl-aminoluciferin ; AAF-Glo™ Substrate) dégradé par une protéase libérée lors de la perte de l'intégrité membranaire. Ce peptide ne peut traverser la membrane cellulaire lorsqu'elle

est intacte, il ne peut donc réagir avec les cellules vivantes. La mortalité de la population est déterminée après lecture au luminomètre.

Etape 2 : mesure de la mortalité cellulaire de toute la population donnée.

Un tampon de lyse est ajouté au réactif, provoquant ainsi la lyse totale de la population cellulaire. Une deuxième lecture au luminomètre permet de mesurer la mortalité totale de la population.

- ⇒ Le rapport Etape1/Etape2 permet d'estimer la mortalité cellulaire due au toxique dans une population donnée.

ii) Test de viabilité cellulaire

Le test MTT (Référence 11465007001, Roche Diagnostic, Meylan, France) permet d'estimer la viabilité cellulaire. Le sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) est ajouté dans le milieu de culture. Il est métabolisé pendant 4 h par les cellules vivantes, ce qui entraîne un changement de couleur du milieu (du jaune au violet). L'ajout d'un tampon de dissolution permet l'homogénéisation de couleur au sein d'un même puits. L'intensité de coloration reflète la viabilité mais également l'activité métabolique cellulaire. La lecture de la plaque s'effectue par un spectrophotomètre à 550 nm. Dans ce test, il n'existe pas de témoin interne pour chaque puits.

iii) Préparations cellulaires pour les observations MET et SIMS

Les cellules IMR-32 différenciées sont incubées pendant 24 h à des concentrations de 10 et 100 μM d'UA (sous forme de nitrate d'uranyle). Une fixation aldéhydique est directement réalisée dans la boîte de culture par une première incubation de 10 minutes à température ambiante dans 8 mL de fixateur (soit 4 mL de glutaraldéhyde à 2,5% + 4mL de PBS 0,2 M pH 7,4), renouvelé une fois pour une seconde incubation de 50 minutes. Trois rinçages de 10 minutes sont effectués avec du PBS 0,1 M pH 7,4. Les cellules sont ensuite déshydratées par deux bains successifs de 10 minutes dans de l'éthanol à 50% puis de l'éthanol à 70%. Les cellules sont incluses en résines pour permettre d'effectuer des coupes de 800 nm pour les observations au SIMS et de 70 à 80 nm pour les observations au MET ([Annexe VIII](#)). Des coupes de 30 nm sont également réalisées afin de faire un suivi au microscope. Dans ce cas les coupes sont colorées par un bain d'une minute en bleu de toluidine.

6) Analyses statistiques

Les résultats sont représentés sous la forme « moyenne \pm écart standard à la moyenne (SEM) ». Les comparaisons entre les groupes (témoins versus contaminés), ainsi qu'entre les temps de contamination (1,5 mois versus 9 mois ou 10 semaines versus 20 semaines), entre les structures cérébrales (hippocampe versus cortex entorhinal) ou encore entre les différents milieux employés en culture cellulaire (avec ou sans SVF) ont été faites par un test de two-ways ANOVA complété par une comparaison multi-paires suivant la méthode de Holm-Sidak (SigmaStat® 3.0, SYSTAT Software Inc). Pour les comparaisons n'impliquant qu'un facteur (exemple témoin versus contaminé uniquement), un test de Student a été réalisé (SigmaStat® 3.0, SYSTAT Software Inc). La différence entre les groupes est considérée comme significative lorsque la valeur du p statistique est inférieure à 0,05.

RESULTATS

I. Le système cholinergique, une cible de l'uranium au niveau central

A. Introduction

Plusieurs études ont montré que l'administration chronique d'uranium pouvait avoir un impact sur le comportement des rats. Ainsi la mémoire à court terme se trouve altérée par une contamination de 3 mois par 10, 20 ou 40 mg d'UA/kg/jour (Albina *et al.*, 2005) ou de 1,5 ou 9 mois par 40 mg/L d'UE (Houpert *et al.*, 2005; Houpert *et al.*, 2007a). Des perturbations du cycle veille-sommeil après 1, 1,5 ou 2 mois d'exposition et de l'état anxieux des animaux après 1,5 mois d'exposition (40 mg/L d'UE) ont également été observées (Houpert *et al.*, 2005; Lestaevel *et al.*, 2005). Enfin, l'UA (75 et 150 g/L pendant 2 semaines ou 6 mois) modifie le comportement locomoteur des animaux (Briner and Murray, 2005).

De plus l'ingestion chronique d'UA induit des modifications de l'activité de l'AChE dans le cervelet après 6 mois de contamination (Bussy *et al.*, 2006).

Au vue de ces résultats, il est maintenant clair que l'uranium affecte le SNC. Toutefois, en fonction de l'uranium ingéré (UA ou UE), les effets centraux sont différentiels.

Afin de mieux comprendre ces effets, le métabolisme du système cholinergique impliqué dans la mémoire spatiale, le sommeil paradoxal et l'activité locomotrice (Whishaw *et al.*, 1985; Steriade *et al.*, 1990; Day *et al.*, 1991; McCarley, 2007; von Linstow Roloff *et al.*, 2007; Beeson, 2008; de Castro *et al.*, 2009), ont été analysés après contamination sub-chronique (1,5 mois) et chronique (9 mois) à l'UA ou à l'UE (40 mg/L). Ces analyses ont été effectuées sur l'hippocampe et le cortex, régions riches en projections cholinergiques connues pour leur implication dans de nombreux processus cognitifs et mnésiques (Miller *et al.*, 1996; Muir, 1996; Orsetti *et al.*, 1996; Ragozzino *et al.*, 1996; Stancampiano *et al.*, 1999; van der Zee and Luiten, 1999). Le choix des deux temps de contamination permet de différencier les effets précoces des effets tardifs, mais également de mettre en avant d'éventuelles adaptations du métabolisme. Par ailleurs, dans cette expérience, deux types d'uranium ont été utilisés (UA et UE). L'UA a principalement une toxicité chimique (Bleise *et al.*, 2003) alors que l'UE présente à la fois une toxicité chimique et radiologique. La comparaison des effets provoqués par l'UA avec ceux provoqués par l'UE permet de dissocier les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'uranium sur le métabolisme du système cholinergique. La dose de 40 mg/L (par eau de boisson) à laquelle

sont exposés les animaux correspond au double de la dose la plus importante retrouvée dans des eaux souterraines en Finlande (Juntunen, 1991) et 50 fois la dose retrouvée dans les eaux du Canada (Moss, 1983b).

En parallèle, nous avons cherché à comparer, sur quelques points du métabolisme du système cholinergique, les effets chimiotoxiques de l'uranium à 9 mois dans le cortex avec ceux d'un autre neurotoxique avéré. Notre choix s'est porté sur le plomb (5 mg/L). La dose utilisée dans ce travail correspond à une dose absorbée équivalente à celle de l'uranium chez le rat (coefficient d'absorption intestinale 8 fois plus élevé pour le plomb que pour l'uranium chez le rat).

Ce métal lourd est issu de la chaîne de désintégration de l'uranium. Sa toxicité chez l'homme est à l'origine de troubles d'ordre neurologique chez l'adulte comme chez l'enfant : irritabilité, troubles du sommeil, anxiété, perte de mémoire, confusion, sensation de fatigue (Haenninen et al., 1978; Awad el Karim et al., 1986; Pasternak et al., 1989) et psychomoteurs (faiblesse musculaire). Chez l'animal, lors d'intoxications aiguës au plomb, comme pour l'uranium, des altérations du tube contourné proximal ont été observées (Sabolic, 2006). Sur le plan neurologique, l'exposition pré- et post-natale à l'acétate de plomb (250 mg/L) provoque des troubles de la mémoire spatiale chez le juvénile (à 21 jours) mais pas chez les sujets plus âgés (Jett et al., 1997). Ce qui est cohérent avec le dogme annonçant une sensibilité accrue des enfants à l'intoxication au plomb. Toujours sur le plan comportemental, la contamination sub-chronique (14 jours) de rats adultes à des doses allant de 65 à 500 mg/L de plomb dans l'eau de boisson provoque une diminution de la mémoire spatiale de manière dose-dépendante (Garcia-Arenas et al., 2004). Ceci peut être mis en relation avec des perturbations du système cholinergique déjà observées. Des études montrent, après 21 jours d'exposition périnatale au plomb (0,2 % d'acétate de plomb dans l'eau de boisson) chez le rat, une baisse de l'expression génique de la ChAT et du VAcHT (Sun et al., 1997b; Sun et al., 1997a), ainsi qu'une diminution de l'activité de la ChAT (Bourjeily and Suszkiw, 1997) dans l'hippocampe. Chez le rat des études menées lors de contaminations chroniques (1 ou 3 mois) post-natales à faibles doses (0,2 ou 1 % d'acétate de plomb dans l'eau de boisson) montrent une augmentation du taux d'ACh et une diminution de l'activité de l'AChE dans l'hippocampe, le cortex et le cervelet corrélées positivement à la dose ingérée (Reddy et al., 2007). L'équipe de Costa et al a également observé une chute de l'activité de l'AChE, ainsi qu'une baisse de la densité des récepteurs muscariniques dans le cortex visuel de rats exposés en post-natal au plomb pendant 21 jours (Costa and Fox, 1983). *Ex vivo*, sur des coupes hippocampiques de rat, le plomb est à l'origine d'une augmentation de la libération spontanée d'ACh (Minnema et al., 1988; Hoshi et al., 1991; Shao and Suszkiw, 1991) accompagnée d'une augmentation

de synthèse d'ACh (Hoshi et al., 1991). Les récepteurs cholinergiques sont également atteints avec une modulation des récepteurs muscariniques sur les neurones glutamatergiques (Tsai et al., 2007). *In vitro*, l'incubation de cellules de neuroblaste de souris avec du plomb provoque un blocage des récepteurs nicotiniques. Toutefois, ce blocage semble être dose-dépendant puisque qu'il est induit par des concentrations nanomolaires et reversé par des concentrations micromolaires de plomb (Vijverberg et al., 1994).

Par contre, à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur un temps d'exposition chronique long (9 mois) à une dose de 5 mg/L.

Afin de faciliter la lecture, les résultats seront présentés par métabolites offrant un point de comparaison direct entre les différentes contaminations (UA, UE et plomb).

B. Résultats

1) Paramètres généraux de santé

Le suivi pondéral des animaux, ainsi que le relevé de leur consommation hydrique et alimentaire ont été effectués une fois par semaine pendant les 1,5 et les 9 mois de contamination à l'UA et à l'UE et pendant les 9 mois de contamination au plomb.

Aucune différence significative n'a été observée sur ces trois paramètres pendant les 1,5 et le 9 mois de contamination entre les animaux contaminés (UA ou UE) et les animaux témoins (données non présentées). Les 9 mois de contamination au plomb n'induisent pas de variation significative des ces trois paramètres par rapport aux animaux témoins (données non présentées).

Les tableaux suivants (Tableaux 8 et 9) présentent les relevées de poids et de consommation hydrique et alimentaire des animaux au début et à la fin de la contamination (1,5 ou 9 mois) à l'UA, l'UE ou au plomb :

		URANIUM					
		Témoins		UA		UE	
		Début	Fin	Début	Fin	Début	Fin
Poids (grammes)	1.5 mois	282,3 ± 7,5	495,2 ± 33,7	282,7 ± 11,4	505,1 ± 36,1	281,1 ± 5,8	501,3 ± 47,3
	9 mois	307,3 ± 14,9	610,5 ± 14,6	308,2 ± 13,3	588,3 ± 16,2	316,4 ± 13,3	632,6 ± 13,5
consommation hydrique par jour et par rat (millilitres)	1.5 mois	30,9 ± 1,0	34,5 ± 1,7	31,4 ± 1,0	32,0 ± 1,5	29,3 ± 0,7	29,9 ± 1,3
	9 mois	27,2 ± 1,1	27,2 ± 1,9	27,7 ± 1,0	27,2 ± 6,2	29,2 ± 0,9	25,9 ± 4,7
Consommation alimentaire par jour et par rat (grammes)	1.5 mois	25,9 ± 1,2	28,8 ± 1,8	26,2 ± 0,6	28,7 ± 1,2	26,0 ± 1,0	28,1 ± 1,2
	9 mois	24,6 ± 0,4	27,6 ± 1,6	24,6 ± 0,6	26,1 ± 1,4	25,7 ± 0,5	25,0 ± 0,8

Tableau 8 : Relevés du poids des animaux (témoins, UA et UE) ainsi que de leur consommation alimentaire et hydrique au début et à la fin de l'expérimentation (1,5 ou 9 mois)

	PLOMB (9 mois)			
	Témoins		Plomb	
	Début	Fin	Début	Fin
Poids (grammes)	344,1 ± 4,6	725,2 ± 21,1	342,1 ± 4,2	704,3 ± 16,5
consommation hydrique par jour et par rat (millilitres)	31,5 ± 2,2	56,2 ± 9,0	29,2 ± 6,1	28,9 ± 6,3
Consommation alimentaire par jour et par rat (grammes)	28,8 ± 1,5	58,9 ± 3,3	53,3 ± 4,8	60,3 ± 7,0

Tableau 9 : Relevés du poids des animaux (témoins et plomb) ainsi que de leur consommation alimentaire et hydrique au début et à la fin de l'expérimentation

2) Dosage d'uranium dans les structures cérébrales

Après 1,5 mois de contamination, les dosages par IC-PMS montrent une accumulation de l'uranium dans l'hippocampe après contamination à l'UE mais pas après contamination à l'UA. Dans le cortex, l'UA et l'UE ne s'accumulent pas (Figure 21).

Après 9 mois de contamination, l'UA et l'UE s'accumulent significativement dans l'hippocampe. Dans le cortex, seul l'UA s'accumule de manière significative.

Comptage d'uranium dans les structures cérébrales après 1,5 et 9 mois de contamination à l'UA et à l'UE

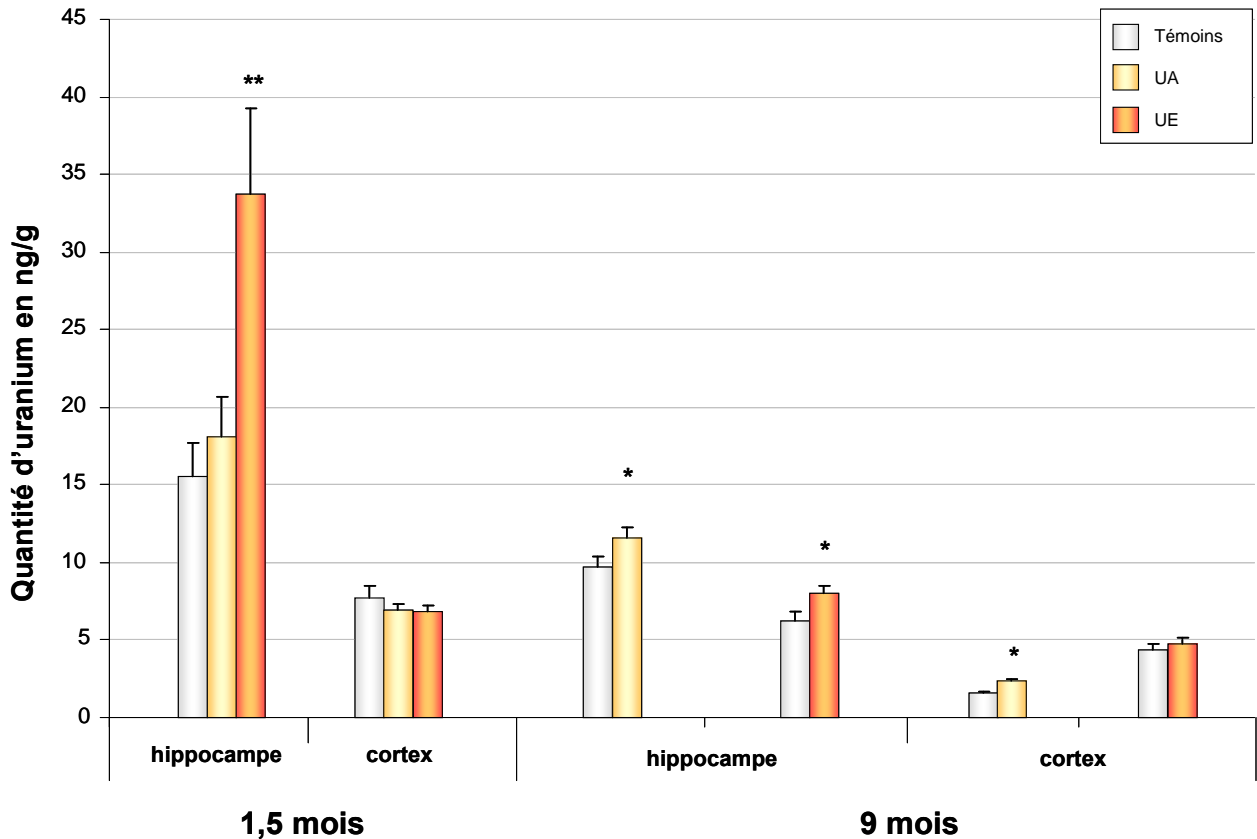


Figure 21 : Comptage d'uranium dans le cortex et l'hippocampe après 1,5 et 9 mois d'exposition à l'uranium appauvri ou enrichi

Avec $n=10$ pour chacun des dosages. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de two-way ANOVA, les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3) Synthèse de l'acétylcholine

La synthèse de l'acétylcholine est réalisée par la ChAT à partir d'acétyl CoA et de choline. La choline est le facteur limitant de cette synthèse, elle peut avoir deux origines : être captée telle que par le neurone ou synthétisée par ce dernier. La synthèse de choline passe en dernier lieu par l'action des phospholipases 1 et 2 (PLD1 et PLD2) sur la phosphatidylcholine (Figure 22).

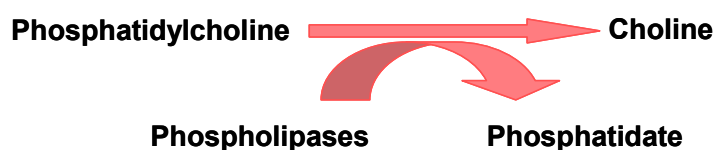


Figure 22 : Synthèse de la choline

Ces deux phospholipases se différencient par leur activité : induite par de nombreux facteurs tels que des hormones ou des facteurs de croissance pour la PLD1 et constitutive pour la PLD2. Afin d'évaluer l'atteinte que pourrait provoquer l'uranium sur la synthèse de l'acétylcholine, nous nous sommes intéressés à son enzyme de synthèse (ChAT), et aux 2 dernières enzymes en amont de la synthèse de la choline (PLD1 et PLD2).

Les résultats sont représentés dans la [Figure 23](#).

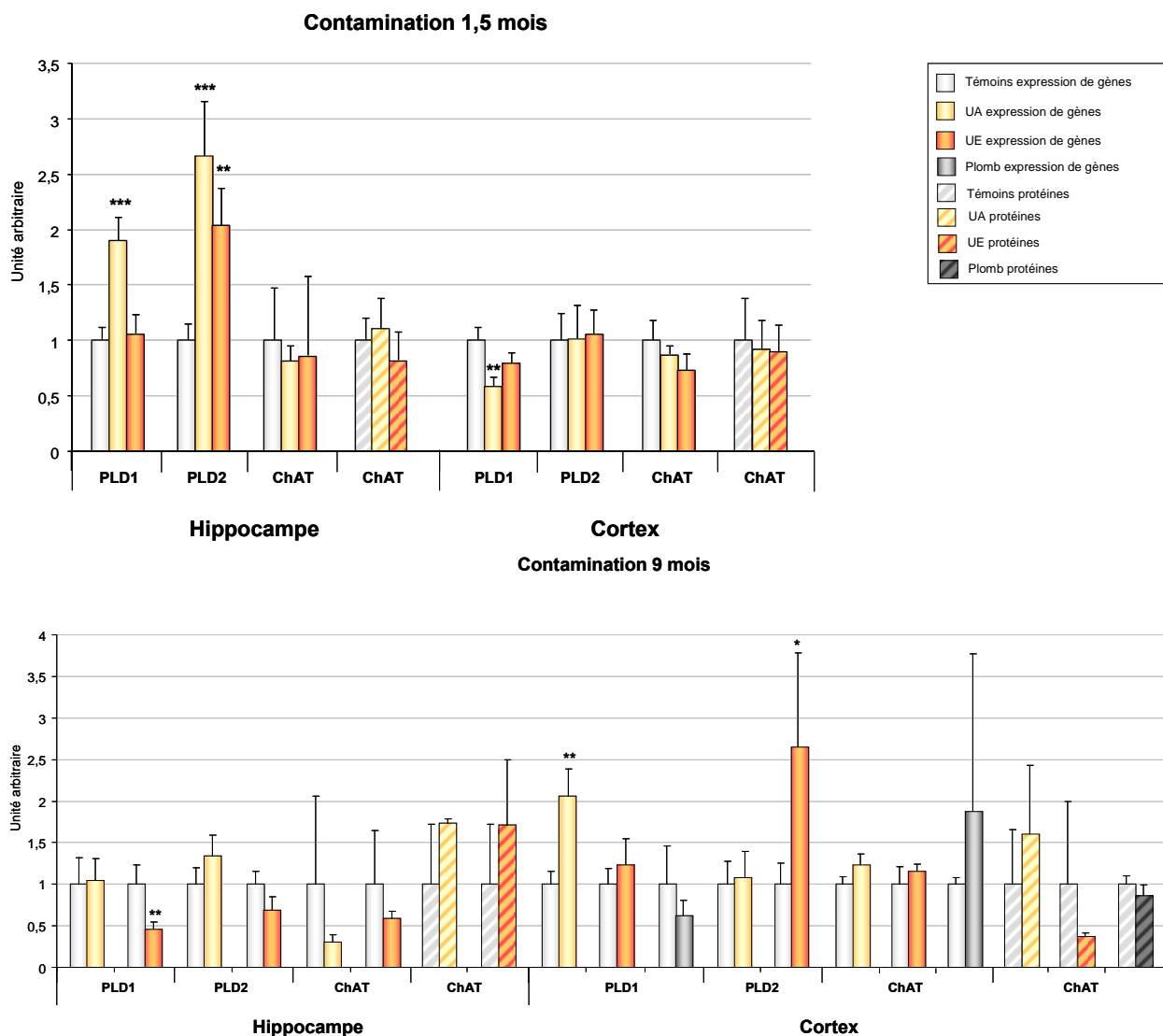


Figure 23 : Représentation graphique des résultats pour la synthèse de la choline et de l'acétylcholine chez les rats adultes

Représentation graphique des résultats d'expression génique ($n=10$) et protéique ($n=4$) des enzymes de synthèse de la choline et de l'acétylcholine après exposition sub-chronique ou chronique à l'UA, l'UE ou au plomb. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student, les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Les modifications induites par l'uranium dans l'expression génique des enzymes de synthèse de la choline et de l'acétylcholine sont répertoriées dans le tableau suivant (Tableau 10) :

	1,5 mois de contamination		9 mois de contamination	
	Hippocampe	Cortex	Hippocampe	Cortex
UA	+90% PLD1 +166% PLD2	-42% PLD1	RAS	+106% PLD1
UE	+104% PLD2	RAS	-54% PLD1	+165% PLD2
Plomb				RAS

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des modifications de la synthèse de choline et d'acétylcholine chez les rats adultes

La contamination sub-chronique à l'uranium (UA et UE) induit une augmentation de l'expression génique des enzymes de synthèse de la choline dans l'hippocampe. Dans le cortex, seul l'UA provoque une perturbation de l'expression génique de la PLD1, de plus, cette modification est inverse à celle observée dans l'hippocampe.

Au contraire, après une contamination chronique, l'hippocampe présente une diminution de l'expression génique de la PLD1 (exposition à l'UE) alors que le cortex montre une augmentation de l'expression génique de ses enzymes de synthèse de la choline après exposition à l'UA ou à l'UE. La contamination au plomb ne provoque pas de perturbation de l'expression de gènes des enzymes de synthèse de la choline ou de l'acétylcholine dans le cortex.

Par ailleurs, aucune variation de l'expression génique ou des niveaux protéiques de la ChAT n'a pu être observée.

4) Transporteurs

Il existe deux principaux transporteurs dans le métabolisme du système cholinergique. Le VACHT, est un transporteur vésiculaire de l'acétylcholine, il permet le stockage des molécules d'acétylcholine. Le CHT est le transporteur de haute affinité de la choline et permet la recapture de la choline de la fente synaptique dans le neurone présynaptique. Cette recapture est à l'origine du recyclage de la choline pour la formation de nouvelles molécules d'acétylcholine.

Les résultats obtenus pour les transporteurs, VAcHT et CHT, sont présentés dans la **Figure 24**.

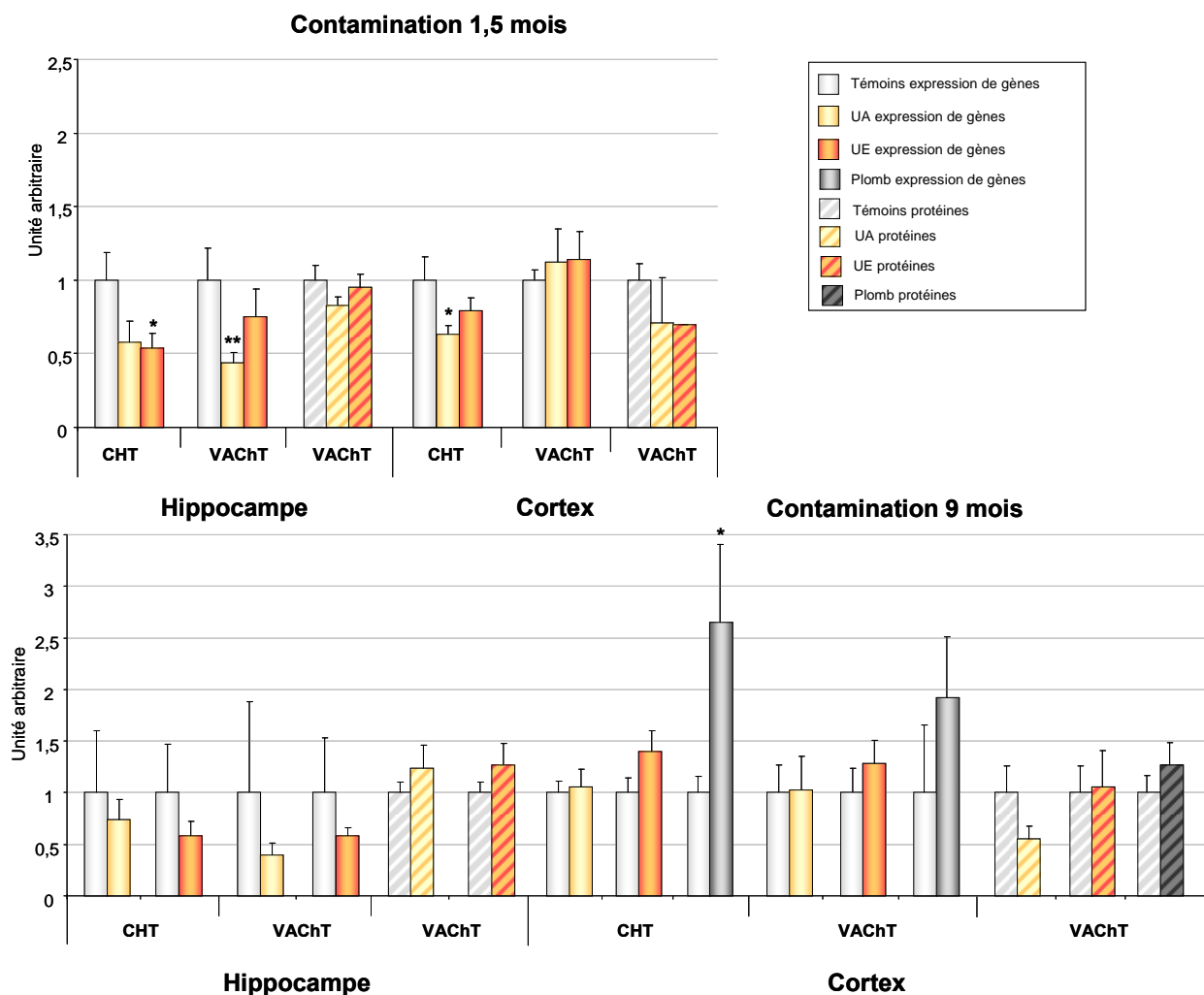


Figure 24 : Représentation graphique des résultats pour les transporteurs de l'acétylcholine et de la choline chez les rats adultes

Représentation graphique des résultats d'expression génique (n=10) et protéique (n=4) des transporteurs de l'acétylcholine et de la choline après exposition sub-chronique ou chronique à l'UA, l'UE ou au plomb. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student, les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Les quelques modifications de l'expression génique des deux transporteurs considérés au cours de l'expérimentation sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 11):

	1,5 mois de contamination		9 mois de contamination	
	Hippocampe	Cortex	Hippocampe	Cortex
UA	-56% VAcHT	-37% CHT	RAS	RAS
UE	-46% CHT	RAS	RAS	RAS
Plomb				+165% CHT

Tableau 11 : Récapitulatif des modifications des transporteurs de l'acétylcholine et de la choline chez les rats adultes

Une diminution de l'expression génique des transporteurs de l'acétylcholine et de la choline, respectivement après exposition sub-chronique à l'UA ou à l'UE est observée dans l'hippocampe. Dans le cortex, l'exposition pendant 1,5 mois à l'UA provoque une diminution d'expression du CHT.

Les 9 mois de contamination à l'UA et à l'UE n'induisent pas de perturbations géniques du VAcHT et du CHT dans l'hippocampe et le cortex. Par contre, après 9 mois de contamination au plomb, l'expression génique du CHT est augmentée.

Les différents protocoles d'expositions à l'uranium réalisés ne modifient pas les niveaux protéiques du VAcHT.

5) Récepteurs

Dans cette étude, nous avons étudié les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 2$ des récepteurs nicotiques. Deux raisons ont orienté notre choix sur ces deux sous-unités. Tout d'abord, parmi les 5 sous-unités formant le pore du récepteur nicotinique, les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 2$ sont les plus représentées dans le SNC (Hill *et al.*, 1993). D'autre part, la sous-unité $\alpha 5$ a un rôle particulier puisque, contrairement aux autres sous-unités α , elle n'interagit pas avec la molécule d'acétylcholine.

Le sous-type M1 du récepteur muscarinique est également très présent dans le SNC. De plus, il joue un rôle important dans les processus de mémorisation. En vue des études comportementales envisagées par la suite, ce type de récepteur est apparu comme un bon candidat d'étude pour nos expérimentations.

Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 25**.

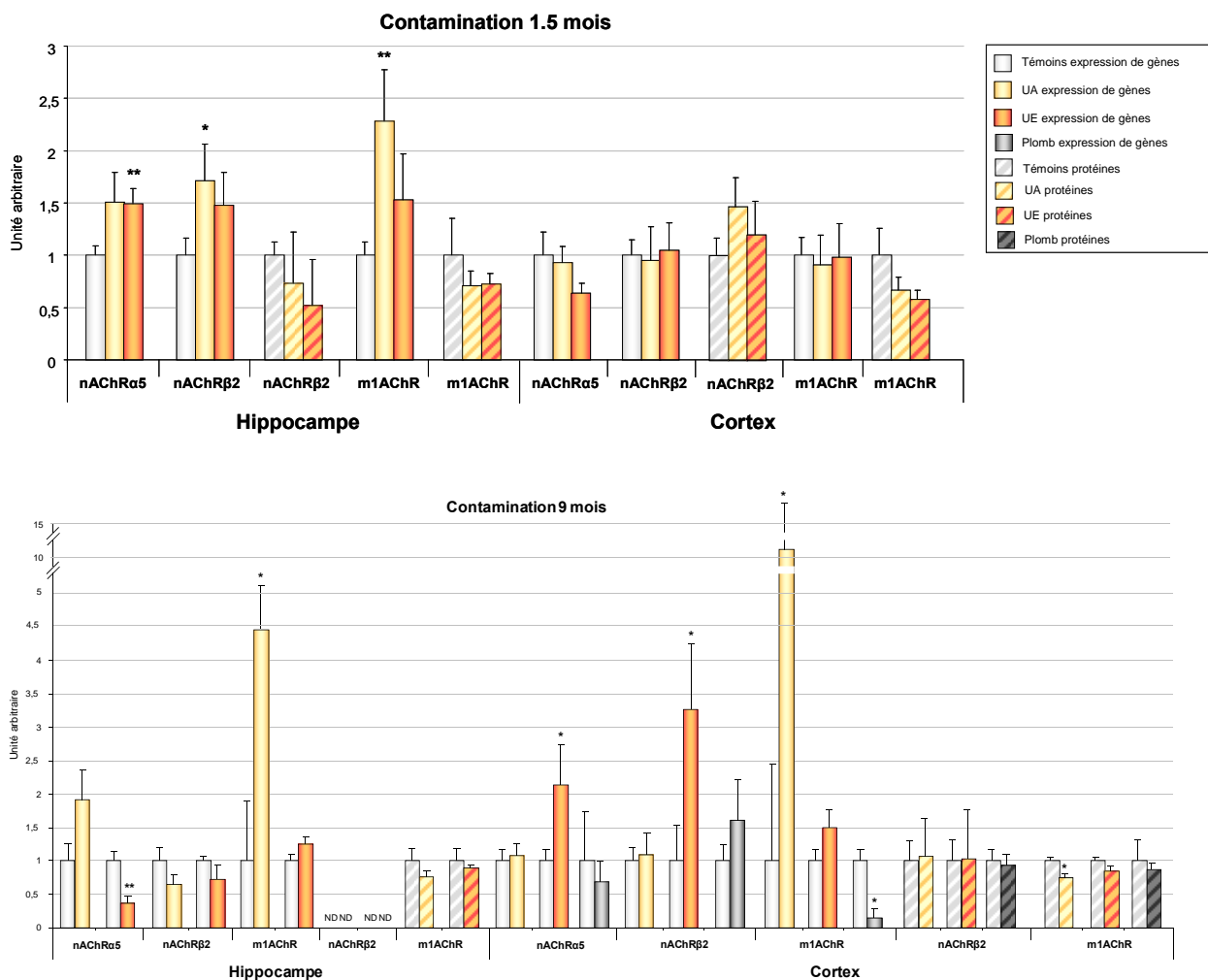


Figure 25 : Représentation graphique des résultats pour les récepteurs cholinergiques chez les rats adultes

Représentation graphique des résultats d'expression génique (n=10) et protéique (n=4) des récepteurs cholinergiques après exposition sub-chronique ou chronique à l'UA, l'UE ou au plomb. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student, les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

La modification de niveau protéique du m1AChR ainsi que les changements d'expression géniques de m1AChR, nAChR α 5 et nAChRB2 observés après contaminations sont répertoriés dans le tableau suivant (Tableau 12):

	1,5 mois de contamination		9 mois de contamination	
	Hippocampe	Cortex	Hippocampe	Cortex
UA	+71% nAChRB2 +128% m1AChR	RAS	+450% m1AChR	+990% m1AChR <u>-30% m1AChR (protéine)</u>
UE	+49% nAChR α 5	RAS	-63% nAChR α 5	+114% nAChR α 5 +226% nAChRB2
Plomb				-85% m1AChR

Tableau 12 : Récapitulatif des modifications des récepteurs cholinergiques chez les rats adultes

Dans l'hippocampe, la contamination sub-chronique à l'UA provoque une augmentation de l'expression génique de la sous-unité B2 du récepteur nicotinique et du type M1 du récepteur muscarinique. La contamination sub-chronique à l'UE est à l'origine d'une augmentation de l'expression génique de la sous-unité α 5. Dans le cortex, les contaminations à l'UA ou à l'UE pendant 1,5 mois ne provoquent pas de modification génique des sous-unités nicotiniques et du type muscarinique sur les récepteurs analysés.

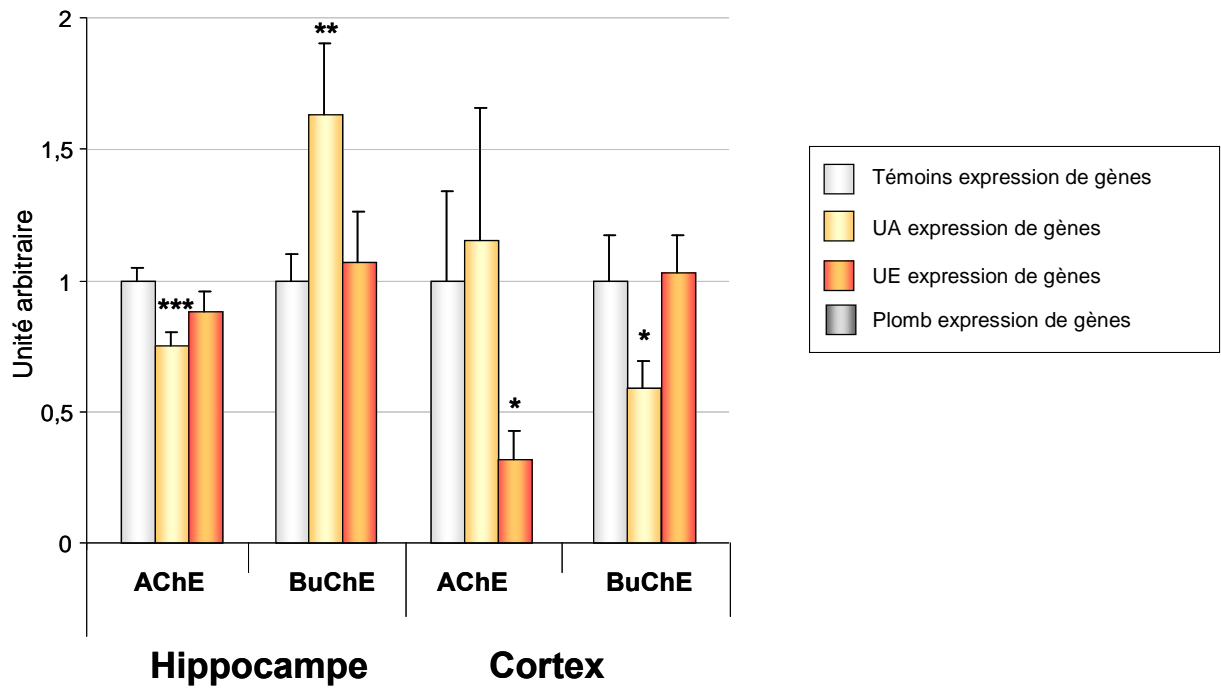
Après 9 mois de contamination, l'UA provoque, dans l'hippocampe, une forte augmentation de l'expression du m1AChR, alors que l'UE provoque une diminution du nAChR α 5. Dans le cortex, l'UA induit une forte augmentation de l'expression génique du m1AChR, et ce parallèlement à une diminution de son taux protéique. L'UE induit une augmentation de l'expression génique des nAChR α 5 et nAChRB2 dans le cortex. Le plomb provoque une diminution de l'expression de gène du m1AChR.

Il est à noter que le niveau protéique de nAChR B2 n'a pu être détecté dans l'hippocampe chez les rats de 12 mois d'âge (9 mois de contamination).

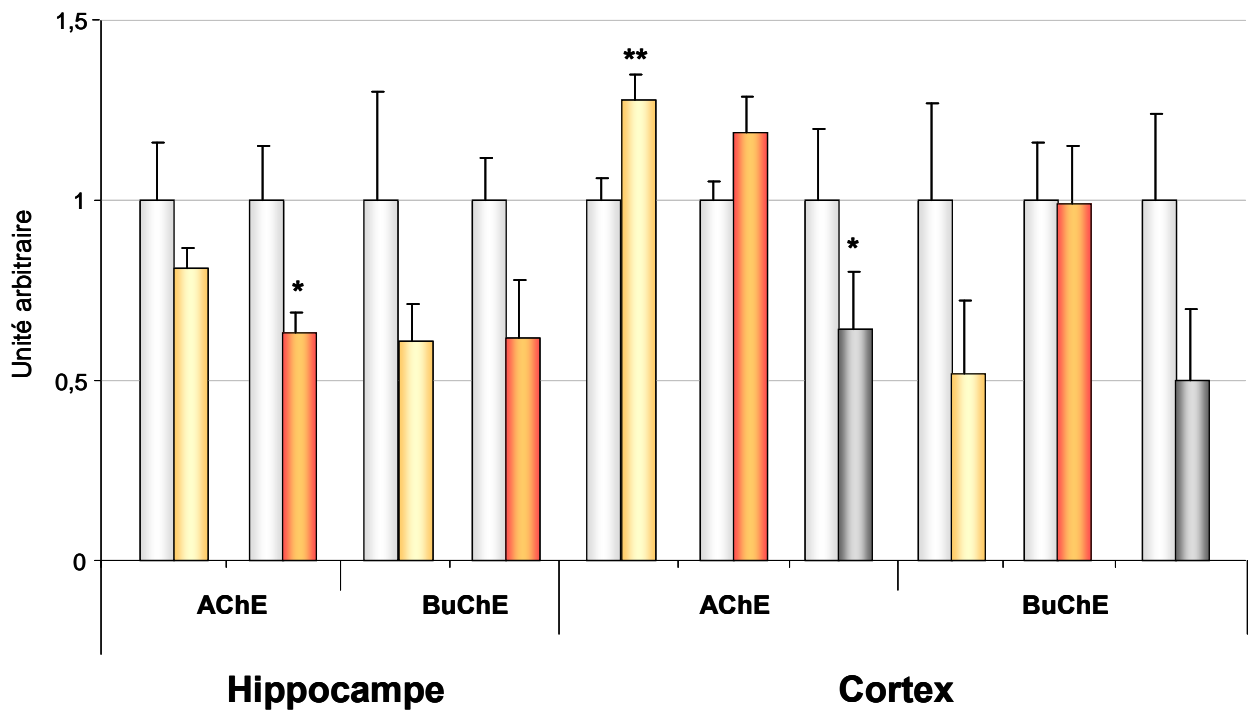
6) Acétylcholine et ses enzymes de dégradation

Libérée dans la fente synaptique, l'acétylcholine est dégradée en choline et en acétate par deux enzymes, l'ACHé et la BuChE. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 26.

Contamination 1,5 mois



Contamination 9 mois



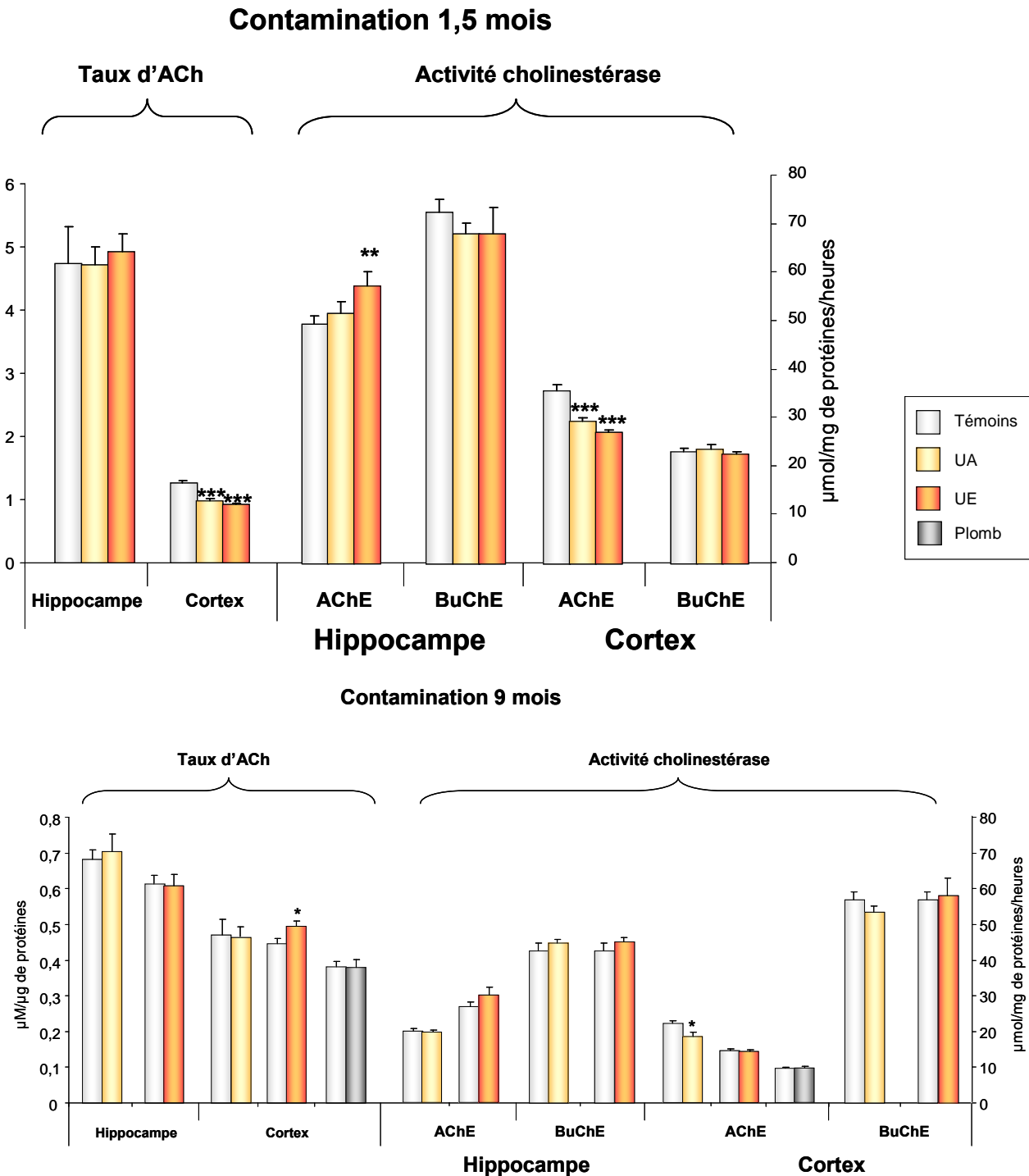


Figure 26 : Représentation graphique des résultats pour le taux d'acétylcholine et les enzymes de dégradation de l'acétylcholine chez les rats adultes

Représentation graphique des résultats d'expression génique (n=10) des enzymes de dégradation de l'acétylcholine et de dosages tissulaires (n=10) de l'acétylcholine et de ses enzymes de dégradation après exposition sub-chronique ou chronique à l'UA, l'UE ou au plomb. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student pour l'expression génique et par test de « two-way ANOVA » pour les dosages tissulaires. Les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Les effets induits par l'uranium sur le taux d'acétylcholine, ainsi que sur l'expression génique et l'activité enzymatique des enzymes de dégradation de l'acétylcholine sont regroupés dans le tableau suivant : (avec, EG = Expression génique et D = Dosages tissulaires) (Tableau 13)

	1,5 mois de contamination				9 mois de contamination			
	Hippocampe		Cortex		Hippocampe		Cortex	
	EG	D	EG	D	EG	D	EG	D
UA	-25% AChE +63% BuChE	RAS	-41% BuChE	-22% ACh -18% AChE	RAS	RAS	+28% AChE	-17% AChE
UE	RAS	+20% AChE	-68% AChE	-26% ACh -25% AChE	-37% AChE	RAS	RAS	+11% ACh
Plomb							-36% AChE	RAS

Tableau 13 : Récapitulatif des modifications du taux d'acétylcholine et des enzymes de dégradation de l'acétylcholine chez les rats adultes

Après 1,5 mois de contamination à l'UA, une diminution de l'expression génique de l'AChE ainsi qu'une augmentation de l'expression génique de la BuChE sont observées dans l'hippocampe. Par ailleurs, les dosages montrent que la fonction cholinergique n'est pas perturbée par cette contamination. Par contre, après exposition sub-chronique à l'UE dans l'hippocampe, l'expression génique de l'AChE et de la BuChE est stable, mais l'activité de l'AChE est augmentée. Dans le cortex, 1,5 mois de contamination à l'UA induisent une baisse d'expression génique de la BuChE, du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE. Après exposition sub-chronique à l'UE, une diminution d'expression génique de l'AChE, du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE a également été observée.

Après 9 mois de contamination à l'UA dans l'hippocampe, aucune modification de l'expression génique des enzymes de dégradation de l'acétylcholine, du taux d'acétylcholine, de l'activité de l'AChE n'a été montrée. Par contre après exposition à l'UE, une baisse de l'expression génique de l'AChE a été observée. Dans le cortex, 9 mois de contamination à l'UA induisent une augmentation de l'expression génique de l'AChE et une baisse de l'activité enzymatique de l'AChE. L'exposition chronique à l'UE provoque une baisse du taux d'acétylcholine cortical.

Les 9 mois de contamination au plomb sont à l'origine d'une diminution de l'expression génique de l'AChE, sans modification du taux protéique.

Le dosage de la BuChE n'a pas été réalisé chez les sujets soumis à une contamination au plomb.

7) Facteur neurotrophique et ses récepteurs

Un des rôles du facteur neurotrophique NGF chez l'adulte est d'améliorer la survie de certaines populations neuronales.

Les résultats obtenus sont présentés dans la [Figure 27](#).

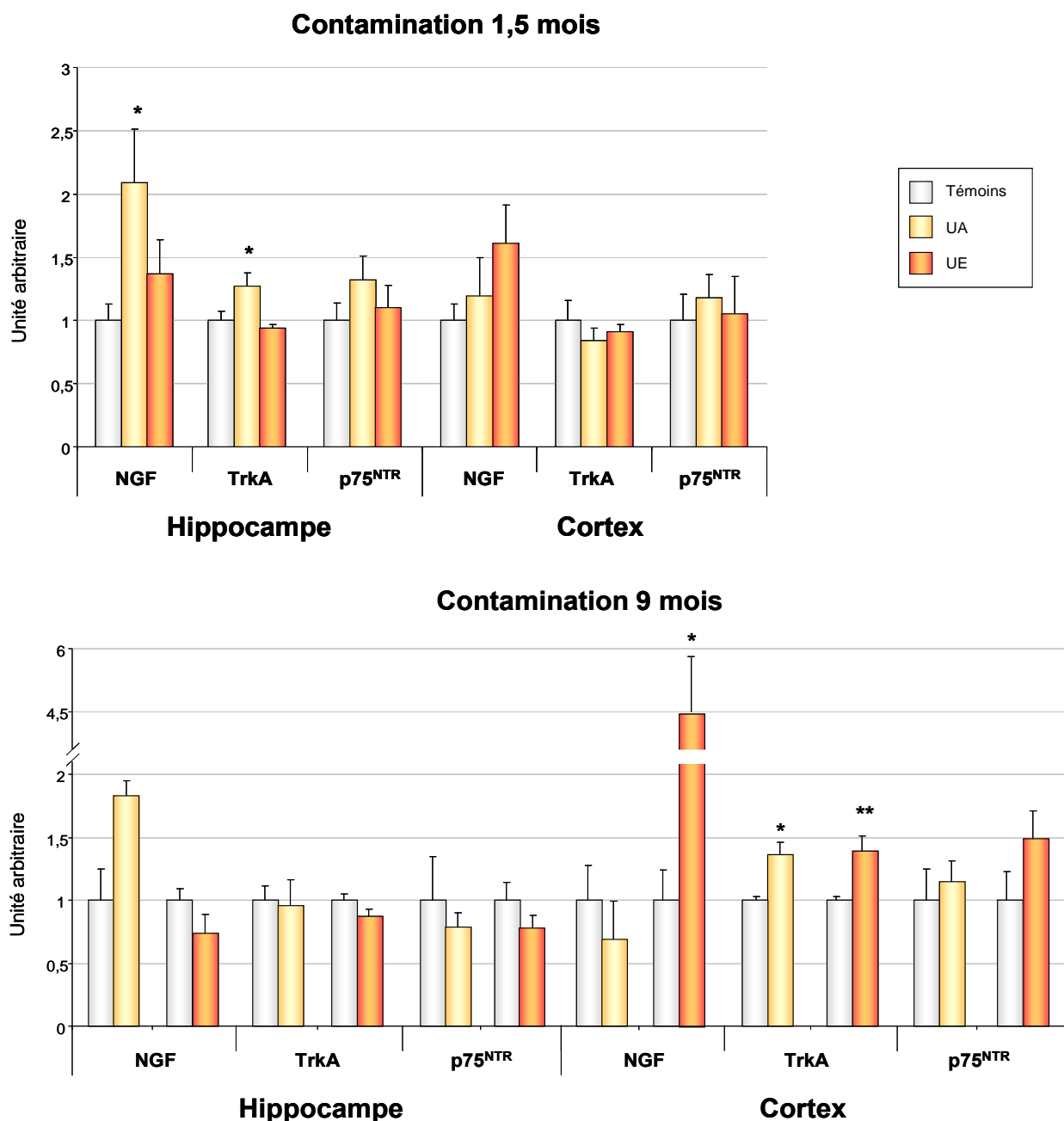


Figure 27 : Représentation graphique des résultats pour le facteur neurotrophique et ses récepteurs chez les rats adultes

Représentation graphique de l'expression génique ($n=10$) du facteur neurotrophique NGF et de ses récepteurs (TrkA et p75^{NTR}) après contamination sub-chronique et chronique à l'UA ou à l'UE. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student. Les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Les variations d'expression génique du facteur neurotrophique NGF (pour Nerve Growth Factor) et de ses récepteurs de haute affinité : TrkA (pour Tropomyosin-Related Kinase A) et de faible affinité : p75NTR (pour p75 neurotrophin receptor) sont répertoriées dans le tableau suivant (Tableau 14) :

	1,5 mois de contamination		9 mois de contamination	
	Hippocampe	Cortex	Hippocampe	Cortex
UA	+109% NGF +27% TrkA	RAS	RAS	+36% TrkA
UE	RAS	RAS	RAS	+450% NGF +39% TrkA
Plomb				

Tableau 14 : Récapitulatif des modifications du facteur neurotrophique et de ses récepteurs chez les rats adultes

L'exposition sub-chronique à l'UA induit une augmentation d'expression génique du NGF et de son récepteur de haute affinité (TrkA) dans l'hippocampe. L'exposition à l'UE dans l'hippocampe pendant 1,5 mois n'a pas d'effet sur l'expression génique du facteur neurotrophique et de ses récepteurs. L'exposition sub-chronique à l'UA ou à l'UE n'engendre pas de modification de l'expression génique du NGF et de ses récepteurs.

L'exposition chronique à l'UA ou à l'UE ne modifie pas l'expression génique du NGF et de ses récepteurs dans l'hippocampe. Dans le cortex, après 9 mois d'exposition à l'UA, l'expression du récepteur TrkA est augmentée. Après 9 mois d'exposition à l'UE, en plus de l'augmentation d'expression du récepteur TrkA, l'expression du NGF est également augmentée dans le cortex.

8) Dosage plasmatique des cholinestérases

L'activité des cholinestérases plasmatiques n'est pas modifiée pas une contamination sub-chronique à l'UA ou à l'UE, ainsi que par une contamination chronique à l'UA ($p = 0,053$).

Par contre, leur activité est diminuée par une contamination de 9 mois à l'UE (-22%) (Figure 28).

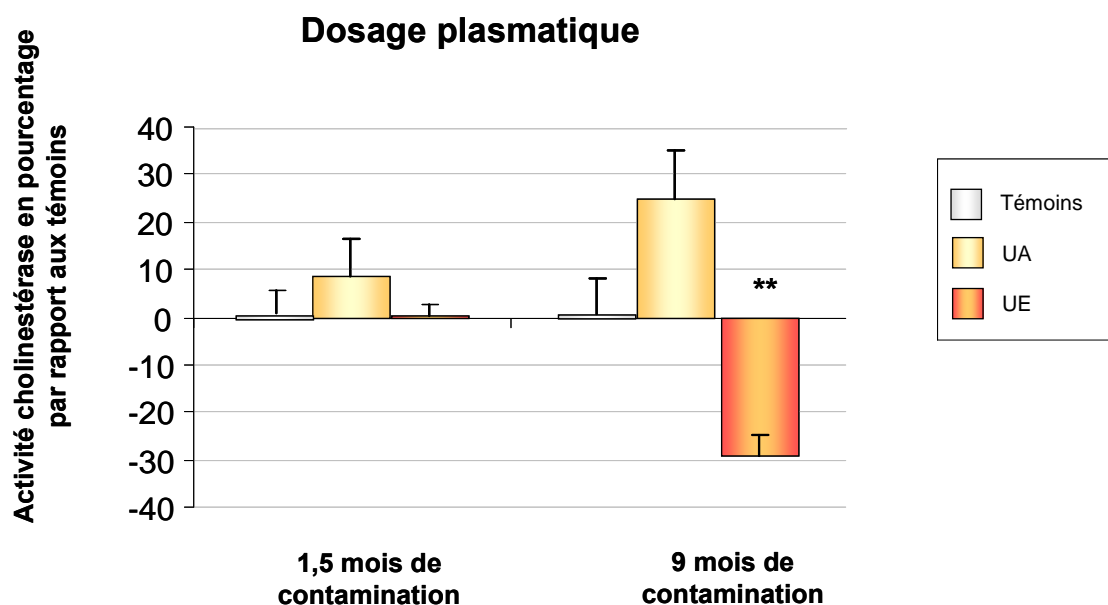


Figure 28 : Représentation graphique du dosage des cholinestérases plasmatiques

De gauche à droite 2X3 colonnes : témoins, UA puis UE, $n=10$. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student. Les valeurs significatives sont représentées par : ** $p < 0,01$.

C. Etude et analyse des résultats

Les résultats des paramètres généraux des animaux confirment que les groupes d'animaux sont homogènes et que la contamination à l'uranium (UA ou UE) n'induit pas de perturbation des constantes physiologiques chez le rat.

Par ailleurs, nos résultats montrent que les deux structures cérébrales étudiées n'ont pas le même comportement face à la mise en présence d'uranium. La discussion suivante s'articule autour de chacune des structures.

Dans l'hippocampe, les contaminations sub-chroniques et chroniques à l'uranium sont à l'origine de perturbations de l'expression génique de métabolites du système cholinergique mais la fonction moléculaire du système est conservée.

Ces variations d'expression génique sont plus nombreuses lors de la contamination sub-chronique. Ainsi, ces modifications semblent répondre à une chute du taux d'acétylcholine avec une augmentation de l'expression génique des enzymes impliquées dans la synthèse de choline (PLD1 et PLD2) et une diminution de l'expression des récepteurs (nAChRB2 et m1AChR) ; or le dosage montre un taux d'acétylcholine équivalent à celui des témoins. Par ailleurs, la hausse d'expression du facteur neurotrophique (NGF) et de son récepteur de haute affinité (TrkA) lors d'exposition à l'UA pourrait être une réponse au stress engendré par la contamination. Ceci suggère une adaptation dans le temps de cette structure face à l'exposition à l'uranium, puisque la plupart de ces perturbations disparaissent après 9 mois de contamination alors que l'accumulation d'uranium dans cette structure cérébrale persiste.

De ces constatations, l'hippocampe apparaît comme sensible à la contamination à l'uranium, mais assez robuste et plastique (nombreuses modifications d'expression de gènes) pour maintenir sa fonction à long terme.

Les acteurs hippocampiques affectés par la contamination sub-chronique à l'UA et à l'UE diffèrent peu. Cependant, la toxicité de l'UE provoque une perturbation de la fonction cholinergique *via* une hausse de l'activité AChE (+20%, $p < 0,01$) que l'UA n'engendre pas. La toxicité plus importante de l'uranium enrichi est retrouvée lors de l'exposition chronique (expression génique AChE : -37%, $p < 0,05$). Ces données montrent que les cibles des toxicités chimique et radiologique sont similaires dans l'hippocampe mais que l'augmentation de l'activité spécifique de l'uranium induit des effets plus délétères. Ces résultats peuvent également s'expliquer par l'action directe de l'UE sur l'hippocampe puisque contrairement à l'UA, il s'accumule de manière significative dans cette structure.

Il est à remarquer que le niveau protéique du nAChRB2 n'a pu être détecté dans l'hippocampe après 9 mois d'exposition (soit sur des rats de 12 mois d'âge). Il est envisageable d'émettre l'hypothèse d'un niveau protéique trop faible pour pouvoir être mesuré par Western-blot. Il est connu que ce sous-type de récepteur nicotinique n'est pas très représenté dans l'hippocampe (Hill *et al.*, 1993). De plus, il existe une diminution du nAChRB2 hippocampique liée à l'âge (Tohgi *et al.*, 1998; Ferrari *et al.*, 1999), ceci pourrait expliquer une détection possible chez les rats âgés de 4,5 mois (1,5 mois de contamination) mais plus complexe chez les rats de 12 mois (9 mois de contamination).

Dans le cortex, les perturbations de la fonction cholinergique sont plus marquées que dans l'hippocampe.

La contamination sub-chronique induit une chute du taux d'ACh et de l'activité de l'AChE. Cette perturbation de la fonction cholinergique est soulignée par une diminution de l'expression génique d'une enzyme de synthèse (PLD1) et d'un transporteur (CHT) de la choline et d'une enzyme de dégradation de l'acétylcholine (BuChE) lors d'une exposition à l'UA. L'exposition à l'UE engendre une baisse d'expression génique de l'AChE. A plus long-terme, après 9 mois de contamination, hormis les transporteurs, tout le système est perturbé au niveau génique. On note même une diminution du niveau protéique de m1AChR (-30%, $p < 0,05$) paradoxalement à une nette augmentation de son expression génique ($\times 10$, $p < 0,05$) lors de l'exposition à l'UA. Ces modulations géniques pourraient être une réponse au stress provoqué par la contamination et ainsi expliquer la tendance à la restauration de la fonction cholinergique, notamment pour le taux d'ACh après contamination à l'UA et pour l'activité AChE après contamination à l'UE. Il est à noter que la perturbation du taux d'ACh observée après 9 mois de contamination à l'UE est opposée (+11%, $p < 0,05$) à celle observée après 1,5 mois de contamination (-26%, $p < 0,001$).

Le cortex apparaît comme sensible et affecté par la contamination à l'uranium. Il semble capable de mettre en place un « processus » de défense face à la contamination à l'uranium. Toutefois, ce processus connaît une mise en place lente, puisqu'il n'est pas activé lors de contamination sub-chronique mais qu'il l'est lors de contamination chronique, et ne semble pas assez robuste pour permettre un retour à la normale de la fonction cholinergique. L'apparition de la réponse du cortex face à la contamination correspond avec l'accumulation de l'UA à 9 mois. On peut supposer que la présence de l'uranium serait motrice dans la réactivité de la structure cérébrale face au toxique.

Dans le cortex, les toxicités chimiques ou radiologiques de l'uranium engendrent des perturbations spécifiques. Lors de contamination de 1,5 mois, la fonction cholinergique est altérée de la même manière pour les deux types d'uranium, mais avec un degré d'intensité plus important pour l'UE. Par ailleurs, les cibles géniques affectées sont différentes. La contamination de 9 mois est à l'origine de modifications de la fonction cholinergique propres à l'uranium employé. L'UA provoque une baisse de l'activité de l'AChE (-17%, $p < 0,05$), alors que l'UE provoque une augmentation de l'ACh (+11%, $p < 0,05$). Cette baisse d'activité de l'AChE, marqueur de neurotoxicité, a également été montrée dans le cas d'exposition aux organophosphates (Verma et al., 2009) ou au plomb (Reddy et al., 2007). Dans notre étude le plomb induit également une diminution de l'expression génique de l'AChE (-36%, $p < 0,05$). Par ailleurs, les cibles géniques sont différentes entre la contamination à l'UA et à l'UE. Ces données montrent que les toxicités chimiques et radiologiques de l'uranium diffèrent dans le cortex. Ces effets différentiels de l'UA et de l'UE sur le cortex ont déjà été soulignés lors d'exposition à long terme (9 mois) de rats

adultes. Ce travail montrait une augmentation des marqueurs du stress oxydant par l'UA, alors que l'UE provoquait une diminution de ces mêmes facteurs (Lestavel et al., 2009). Ainsi, on peut noter une différence de toxicité entre l'UA et l'UE plus importante lors de contamination chronique, lorsque les mécanismes de compensation-défense se mettent en place.

Au niveau plasmatique, l'exposition chronique à l'UE induit une chute de l'AChE (-22%, $p < 0,01$). Ceci montre qu'il existe une atteinte systémique du système cholinergique par l'UE, mais pas par l'UA.

La toxicité corticale du plomb est bien distincte de celle de l'UE, mais aussi de celle de l'UA. Les 9 mois de contamination au plomb n'induisent que quelques modifications d'expression génique, notamment avec une diminution de l'expression de l'AChE (-36%, $p < 0,05$), contrairement à l'uranium (UA et UE confondus) qui altère la fonction cholinergique. La concentration en plomb dans l'eau de boisson est 8 fois plus faible que celle employée pour l'uranium, ceci peut expliquer une atteinte moindre du système cholinergique, mais il est clair que les cibles ne sont pas identiques. Les atteintes d'activité de l'AChE rapportées dans d'autres études sont effectivement réalisées à des concentrations entre 4 et 100 fois plus importantes que celle employée dans cette étude (Reddy et al., 2007). De plus, il a été clairement admis que les sujets adultes sont moins sensibles au plomb que les sujets en croissance (Finkelstein et al., 1998; Reddy et al., 2007). Chez l'adulte, les effets d'une contamination au plomb à faible concentration ne sont donc pas comparables avec ceux établis dans notre étude pour des contaminations à l'UA. Ainsi l'extrapolation de résultats obtenus lors de contamination au plomb pour une contamination à l'uranium serait hasardeuse.

Quant aux variations d'activité de l'AChE cérébrale, l'augmentation d'activité observée lors de contamination sub-chronique à l'UE dans l'hippocampe (+20%, $p < 0,01$) est en accord avec les résultats précédemment démontrés dans le travail de Bussy (+ 17%) (Bussy, 2005). Par contre, aucune modification de l'activité de l'AChE hippocampique n'a pu être observée lors de la contamination long-terme à l'UE, or le travail suscitait fait état d'une baisse de l'activité de l'AChE. Cette différence peut s'expliquer par une différence dans la composition de l'UE employé par Bussy. En effet, lors de ce protocole, l'UE utilisé était enrichi à 5,25% contre 4% dans notre protocole. Au niveau cortical, les résultats diffèrent également. Les diminutions d'activité de l'AChE observées après 1,5 mois (UA : -18%, $p < 0,001$, UE : -25%, $p < 0,001$) ou 9 mois d'exposition (UA : - 17%, $p < 0,05$) ne sont pas mentionnées dans le travail de Bussy. Deux points diffèrent entre ces deux expériences : la technique de dosage et la région corticale prélevée. Or après mise au point de notre

technique, il s'est avéré que les deux méthodes employées (Dosage par Amplex ou par la méthode d'Ellman) donnaient des résultats similaires. Ainsi, il est possible que cette différence provienne de la région corticale prélevée : le cortex frontal par Bussy et le cortex entorhinal lors de ce travail.

Le système cholinergique se révèle être une cible d'une exposition chronique à l'uranium. Toutefois, il apparaît que les perturbations de ce système diffèrent selon les paramètres suivants : la structure cérébrale observée, le temps de contamination des animaux et/ou l'âge des animaux, ainsi que la nature chimique ou radiologique de la toxicité uranifère. De plus les structures cérébrales n'accumulent pas de manière identique l'UA et l'UE.

Le facteur « âge » des animaux est important. Lors de cette étude, nous avons pu constater une chute importante du taux d'ACh et de l'activité de l'AChE chez des animaux âgés de 12 mois en comparaison à des animaux âgés de 4,5 mois. Cette baisse de la fonction cholinergique avec l'âge est en accord avec la littérature ([Giacobini et al., 1987](#); [Takei et al., 1989](#); [Giovannini et al., 1998](#)). De plus, nous avons pu observer que cette perte d'activité de l'AChE était en partie compensée par une augmentation de l'activité corticale de la BuChE. Ce maintien de l'activité cholinergique par la BuChE a également fait l'objet de nombreuses publications ([Perry et al., 1978a](#); [Perry et al., 1978b](#); [Greig et al., 2001](#); [Mesulam et al., 2002b](#)).

Ces résultats, obtenus après les contaminations à l'UA chez le rat adulte, ont permis de montrer que l'uranium a des effets toxiques sur le métabolisme du système cholinergique. L'impact de l'UE et du plomb ont aidé à différencier les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'uranium ([Figure 29](#)).

Pour la suite des expériences, l'UA a été choisi comme modèle afin de caractériser la toxicité chimique de l'uranium sur le système cholinergique.

Pour compléter le travail effectué, des expériences ont été menées sur deux modèles dont la sensibilité aux polluants est accrue par rapport au modèle adulte. Le premier modèle, en croissance, est le modèle juvénile ; le second, prédisposé à une dégénération neuronale, représente la population vieillissante.

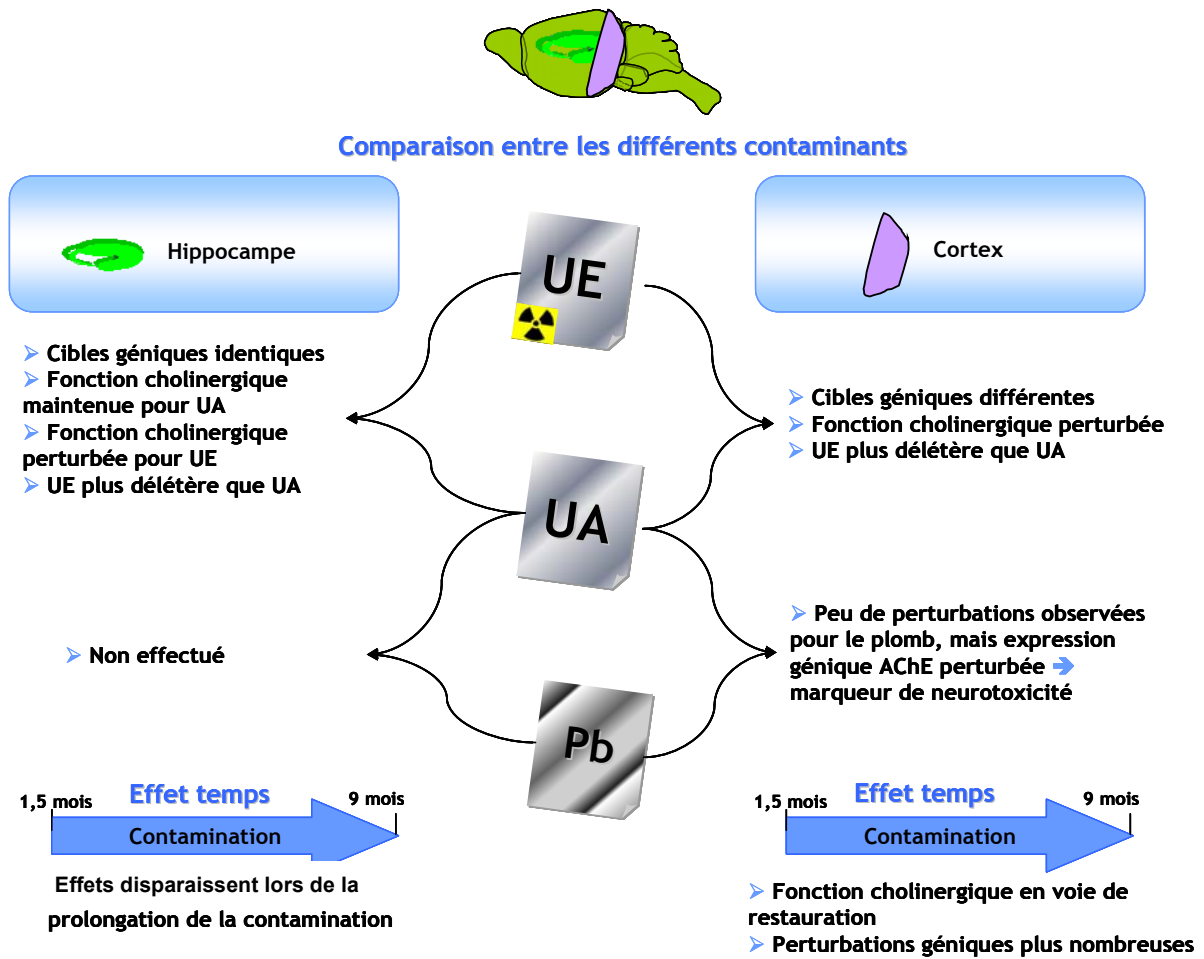


Figure 29 : Récapitulatif des résultats de la partie I : le système cholinergique, une cible de l'uranium au niveau central

D. Résumé

L'ingestion sub-chronique et chronique d'uranium affecte le SNC. Cette étude montre plus particulièrement que le système cholinergique est une cible de ce radionucléide. Toutefois, il est important de noter que l'impact de l'uranium diffère selon la structure cérébrale.

L'hippocampe est physiologiquement peu perturbé, avec un maintien de la fonction cholinergique malgré de nombreuses perturbations moléculaires (expression géniques). De plus, l'analyse des deux temps de contamination montre que les effets précoces de l'uranium sont plus importants que les effets tardifs. Ainsi, l'hippocampe fait preuve d'une grande plasticité lui permettant de s'adapter à la contamination à l'uranium afin de maintenir sa fonction cholinergique. Par ailleurs, les toxicités chimiques et radiologiques de l'uranium affectent les mêmes acteurs du système cholinergique. Toutefois l'activité spécifique supérieure de l'UE lui confère des effets plus délétères que pour l'UA.

Quant au cortex, l'impact sur le fonctionnement cholinergique est plus marqué avec des variations du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE lors de la contamination sub-chronique, alors que les perturbations moléculaires (expression géniques) ne sont pas très nombreuses. La contamination chronique engendre des perturbations moindres de la fonction cholinergique mais plus importantes de l'expression génique. Comme pour l'hippocampe le cortex semble mettre en place un mécanisme de défense/adaptation au contaminant. Toutefois ce mécanisme est plus lent à se mettre en place et ne pallie pas complètement les effets de l'uranium. Contrairement à l'hippocampe, les effets toxiques de l'UA et de l'UE dans le cortex sont différents suivant le temps de contamination. Après 1,5 mois de contamination, l'UA et l'UE altèrent la fonction cholinergique avec une intensité plus importante pour l'UE. Après 9 mois de contamination, les cibles de l'UA et de l'UE diffèrent complètement. Ceci montre que la réponse de l'organisme est différente suivant la nature du stress provoqué par le contaminant.

La comparaison des effets de l'uranium et du plomb montrent une toxicité spécifique pour chacun de ces deux métaux lourds. Ceci rendrait inapproprié une quelconque tentative d'extrapolation des résultats obtenus par le plomb pour l'uranium, du moins chez le sujet adulte.

Cette étude montre des effets de l'uranium sur le système cholinergique. Ces résultats soulèvent une question : « quels seraient les effets d'une contamination chronique à l'uranium sur des sujets plus sensibles, tels que les sujets jeunes ou âgés ? ».

Cette partie a fait l'objet d'une première publication intitulée "Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure", parue dans "Toxicology"(2009) 261 (1,2):59-67 ([Annexe IX](#)).

II. Effets de l'uranium sur des modèles sensibles : jeunes et âgés

A. Introduction

La première partie de ce travail de thèse nous a permis de démontrer un impact de la contamination par l'uranium sur le métabolisme du système cholinergique chez le rat adulte. Ces résultats nous ont amenés à poursuivre nos études afin de modéliser la population globale, incluant ainsi des sujets jeunes et des sujets âgés.

Les sujets jeunes sont représentés dans notre étude par un groupe de rats contaminés à l'UA depuis la naissance pendant 2, 4 ou 9 mois. Les rats sont contaminés *via* le lait maternel des mères dont l'eau de boisson est supplémentée en UA (10 ou 40 mg/L). Du sevrage au sacrifice, les jeunes rats sont contaminés par l'eau de boisson (10 ou 40 mg/L). Dans ce protocole, deux concentrations d'uranium ont été choisies : 40 mg/L, correspondant à la dose utilisée lors du protocole précédent (rats adultes), et 10 mg/L (soit une concentration 4 fois plus faible) afin d'observer l'éventuelle dose-dépendance des effets observés à 40 mg/L. Cette expérience sur des rats juvéniles, c'est-à-dire contaminés depuis la naissance, a pour but de déterminer les effets que peut provoquer une ingestion chronique d'uranium chez un sujet en pleine expansion neurocognitive. Le choix de ce modèle juvénile tient compte de la neurosensibilité accrue aux polluants du SNC lors de son développement. Afin de déterminer si les processus cognitifs sont perturbés par l'uranium, en plus de l'analyse de la fonction cholinergique dans l'hippocampe et le cortex, des tests comportementaux ont été réalisés. Ces tests déterminent l'impact de l'uranium sur le cycle veille-sommeil, la mémoire à court et à moyen terme, l'activité locomotrice, la coordination motrice, l'état de type « anxiété » et un index de dépression des animaux. Le choix des trois temps de contamination permet l'observation des effets de l'uranium sur le système cholinergique et le comportement pendant la phase critique de développement (2 mois de contamination) et de suivre leur évolution chez de jeunes adultes (4 mois de contamination) et des adultes d'âge plus avancé (9 mois de contamination). De plus ces temps de contamination (2 et 9 mois) sont similaires à ceux réalisés pour le modèle adulte. Ceci nous permettra de comparer les résultats obtenus dans le modèle juvénile avec ceux déjà observés pour le modèle adulte.

Les sujets âgés sont représentés par un groupe de souris invalidées pour le gène de l'ApoE. Ces souris sont prédisposées à une apparition précoce de troubles neurodégénératifs

marqués par des lésions cérébrales, ainsi que des perturbations des processus d'apprentissage et de mémorisation dès 5 mois d'âge. Ces souris sont soumises à une contamination de 3 mois à l'UA (20 mg/L, soit une concentration environnementale (Juntunen, 1991)). Dans cette expérimentation, les tests ont été réalisés à l'âge d'apparition des prémices des troubles mnésiques (4,5 mois), chez ce modèle de souris KO. Le choix de ce protocole expérimental s'appuie sur deux constatations. Premièrement, la neurodégénération est un processus naturel qui s'accroît avec l'âge. Deuxièmement, les mécanismes de défense face aux polluants extérieurs sont moins efficaces avec l'âge. Ainsi, cette expérience permet de déterminer si l'uranium a un effet potentialisateur sur l'apparition des dommages neurodégénératifs. Comme pour l'expérience menée sur les rats juvéniles, l'observation des effets de l'uranium passe par l'analyse du métabolisme cholinergique dans le cortex, ainsi que par la réalisation de quelques tests comportementaux (mémoire à court et moyen terme, activité locomotrice et mesure de l'état de type « anxiété » et d'un index de dépression).

B. Résultats : Juvéniles

Pour des raisons de logistique, tous les tests n'ont pas pu être réalisés sur tous nos groupes d'animaux. Le tableau suivant est un récapitulatif des études menées sur les rats juvéniles (Tableau 15).

	2 mois	4 mois	9 mois
UA 10 mg/L	Comportement	Système cholinergique Comportement	
UA 40 mg/L	Système cholinergique Comportement	Système cholinergique Comportement	Système cholinergique

Tableau 15 : Etudes réalisées sur les rats juvéniles

1) Paramètres généraux de santé

Un relevé hebdomadaire du poids et des consommations alimentaire et hydrique a été réalisé chez les rats depuis la naissance jusqu'à la fin de l'étude (2, 4 ou 9 mois).

Un récapitulatif des résultats obtenus aux étapes clés de l'étude est présenté dans le tableau suivant (Tableau 16):

		Témoins			URANIUM					
					UA 10 mg/L			UA 40 mg/L		
		Début	Sevrage	Fin	Début	Sevrage	Fin	Début	Sevrage	Fin
Poids (grammes)	2 mois	7,5 ± 0,4	143,7 ± 5,0	476,1 ± 15,9	6,9 ± 0,4	131,5 ± 3,8	435,8 ± 9,2 *	6,7 ± 0,8	121,1 ± 6,7 *	409,4 ± 11,1 **
	4 mois	7,5 ± 0,4	143,7 ± 5,0	566,2 ± 20,3	6,9 ± 0,4	131,5 ± 3,8	516,3 ± 11,2 *	6,7 ± 0,8	121,1 ± 6,7 *	472,0 ± 10,7 ***
	9 mois	6,9 ± 0,2	98,4 ± 2,5	643,0 ± 19,6				7,1 ± 0,1	106,6 ± 1,9	659,3 ± 22,7
consommation hydrique par jour et par rat (millilitres)	2 mois		18,9 ± 0,7	29,1 ± 0,7		17,2 ± 0,8	26,2 ± 0,1		15,1 ± 1,1 *	24,5 ± 0,4 **
	4 mois		18,9 ± 0,7	30,6 ± 1,2		17,2 ± 0,8	25,4 ± 1,6		15,1 ± 1,1 *	23,3 ± 1,3 *
	9 mois		28,4 ± 0,7	34,5 ± 2,3					28,1 ± 0,5	28,7 ± 2,6
Consommation alimentaire par jour et par rat (grammes)	2 mois		19,6 ± 0,6	28,9 ± 1,7		17,9 ± 0,7	26,9 ± 0,4		14,4 ± 1,6 **	24,8 ± 0,2
	4 mois		19,6 ± 0,6	29,9 ± 1,6		17,9 ± 0,7	24,8 ± 0,6		14,4 ± 1,6 **	23,2 ± 0,2 *
	9 mois		21,3 ± 0,4	29,4 ± 1,0					22,4 ± 0,3	29,1 ± 0,8

Tableau 16 : Relevé des paramètres généraux des rats juvéniles

*Relevé des paramètres généraux des rats à la naissance, au sevrage et à la fin de la contamination (n=15). Un pool de deux expérimentations a été effectué pour les 2 mois de contamination. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student, les valeurs significatives sont représentées par : * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001*

2 mois de contamination : Les animaux ont un poids homogène entre les différents groupes (témoins, UA 10 mg/L, UA 40 mg/L) à la naissance. Au sevrage, on note une prise de poids significativement moins importante pour les rats contaminés à l'UA 40 mg/L (-16%, p<0,05) par rapport aux rats témoins. Les rats exposés à l'UA 10 mg/L ont également une prise de poids moins importante mais cette différence n'est pas significative par rapport aux témoins (-9%, p= 0.076). En parallèle, les consommations alimentaire et hydrique sont moins importantes pour les rats contaminés à l'UA 40 mg/L (-27% (p<0,01) et -21% (p<0,05) respectivement). Les rats contaminés à l'UA 10 mg/L ne présentent pas de modification de leur consommation alimentaire et hydrique par rapport aux rats témoins. La prise moins importante de poids des animaux contaminés se maintient avec, à la fin des 10 semaines de contamination, une diminution de 14% (p<0,05) de la prise de poids des rats exposés à l'UA 40 mg/L et une diminution de 8% (p<0,01) pour les rats exposés à l'UA à 10 mg/L. Cette diminution de la prise de poids est corrélée avec une diminution de la consommation hydrique (UA 40 mg/L : -16% (p<0,01) et UA 10 mg/L : -10%, p<0,05). Toutefois, la consommation alimentaire des rats contaminés (UA 10 et 40 mg/L confondus) est équivalente à celle des témoins.

4 mois de contamination: Pendant les 2 mois séparant l'étude précédente de celle-ci, les animaux ont conservé une prise de poids moins importante pour les animaux contaminés par rapport aux témoins (UA 40 mg/L : -17% (p<0,001) et UA 10 mg/L : -9%, p<0,05). La

consommation hydrique et alimentaire des rats exposés à l'UA 10 mg/L est équivalente à celle des rats non-exposés. Par contre, la consommation hydrique et alimentaire est également diminuée chez les animaux exposés à l'UA 40 mg/L (-24%, $p < 0,05$ et -19%, $p < 0,05$, respectivement) par rapport aux animaux témoins.

9 mois de contamination : Pour ce lot d'animaux, les résultats sont différents de ceux observés après 2 ou 4 mois de contamination. Le poids des animaux exposés à l'UA 40 mg/L est équivalent à celui des animaux non-exposés de la naissance jusqu'à la fin de l'expérimentation. De même, la consommation hydrique et alimentaire est identique entre les animaux contaminés et les animaux témoins pendant les 9 mois de contamination.

Malgré ces différences de poids observé chez les rats contaminés pendant 2 et 4 mois à l'uranium par rapport aux rats témoins, aucun signe de souffrance n'a pu être observé chez les animaux (prostration, nervosité, perte de poils, piloérection).

2) Dosage d'uranium dans les structures cérébrales

Le taux d'uranium dans l'hippocampe et le cortex des rats juvéniles contaminés pendant 2 mois à l'UA 40 mg/L sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 17).

		Juvéniles 2 mois	
		Evian	Uranium 40 mg/L
Concentration d'uranium (ng/g)	Hippocampe	2,1 ± 0,7	1,9 ± 0,3
	Cortex	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,1

Tableau 17 : Dosage d'uranium dans l'hippocampe et le cortex des rats juvéniles contaminés pendant 2 mois

Concentration d'uranium en ng/g d'hippocampe ou de cortex chez les rats juvéniles non-contaminés et contaminés à l'UA 40 mg/L pendant 2 mois (n=5). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student entre les rats non-contaminés et les rats contaminés à l'UA 40 mg/L.

Aucune accumulation significative d'uranium dans l'hippocampe ou le cortex n'a pu être observée chez les rats contaminés à l'UA 40 mg/L pendant 2 mois depuis la naissance.

Le taux d'uranium dans le cortex des rats juvéniles contaminés pendant 4 mois à l'UA 10 ou 40 mg/L sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 18)

		Juvéniles 4 mois		
		Evian	Uranium 10 mg/L	Uranium 40 mg/L
Concentration d'uranium (ng/g)	Cortex	2,0 ± 0,6	2,0 ± 0,6	1,5 ± 0,4

Tableau 18: Dosage d'uranium dans le cortex des rats juvéniles contaminés pendant 4 mois

Concentration d'uranium en ng/g de cortex chez les rats juvéniles non-contaminés et contaminés à l'UA 10 ou 40 mg/L pendant 4 mois (n=5). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student entre les rats non-contaminés et les rats contaminés à l'UA 10 ou 40 mg/L.

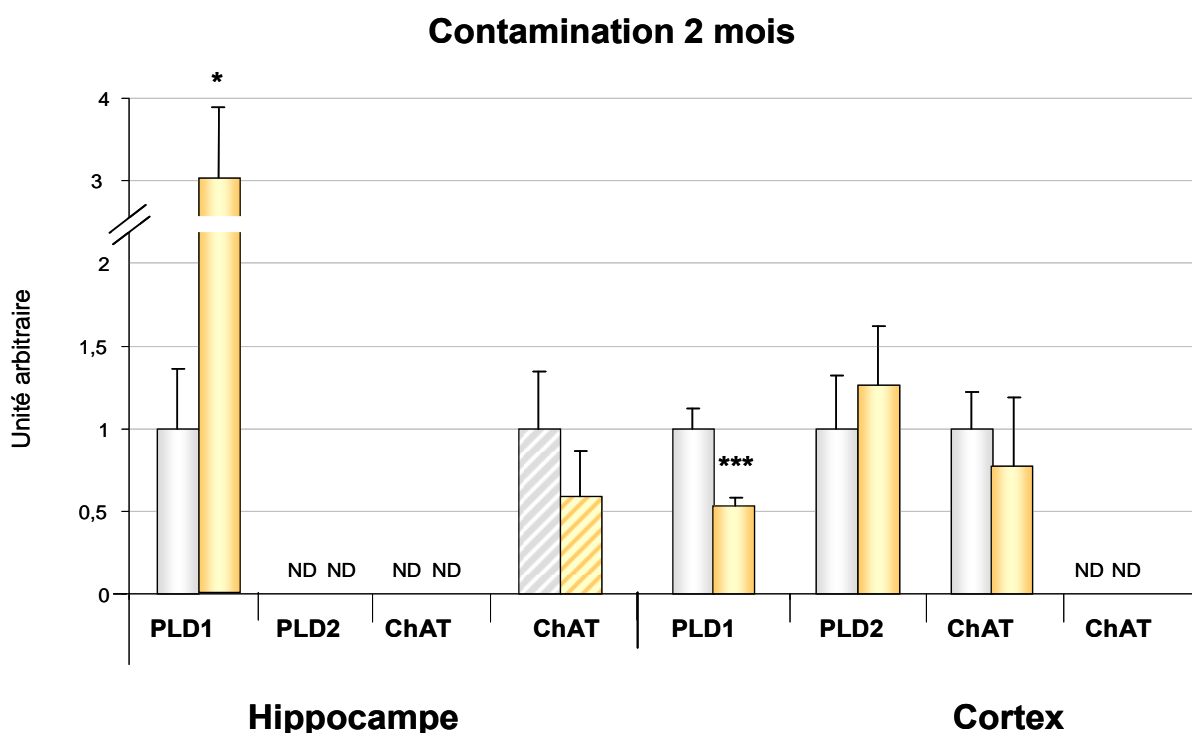
Aucune accumulation significative d'uranium dans le cortex n'a pu être observée chez les rats contaminés à l'UA 10 ou 40 mg/L pendant 4 mois depuis la naissance.

Les dosages d'uranium dans l'hippocampe et le cortex n'ont pu être réalisés pour les rats juvéniles contaminés pendant 9 mois à l'UA 40 mg/L. Pour les rats juvéniles contaminés pendant 2 mois à l'UA 10 mg/L, aucun dosage d'uranium n'avait été prévu.

3) Métabolisme cholinergique

a) Synthèse de l'acétylcholine

L'ensemble des résultats obtenus pour les acteurs de la synthèse de l'acétylcholine est représenté dans la Figure 30.



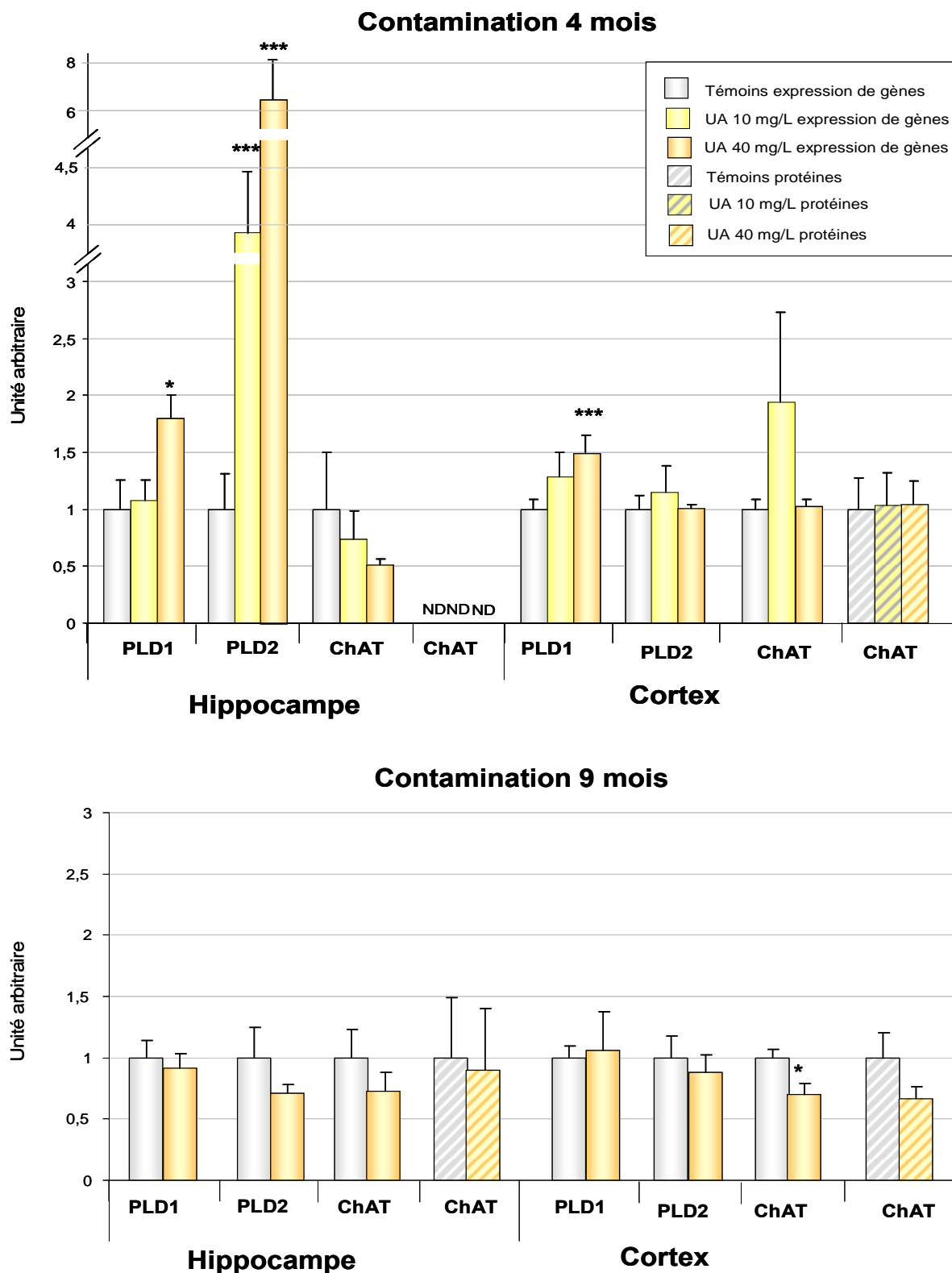


Figure 30 : Représentation graphique des résultats pour les enzymes de synthèse de la choline et de l'acétylcholine chez les rats juvéniles

Représentation graphique des résultats d'expression génique (n=10) et protéique (n=4) des enzymes de synthèse de la choline et de l'acétylcholine après exposition sub-chronique ou chronique à l'UA 10 mg/L ou l'UA 40 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student, les valeurs significatives sont représentées par : * p < 0,05, *** p < 0,001.

Les modifications géniques des enzymes de synthèse de la choline (PLD1 et PLD2) et de l'acétylcholine (ChAT) observées lors des différentes contaminations sur les rats juvéniles sont rapportées dans le tableau suivant (Tableau 19):

	2 mois de contamination	4 mois de contamination		9 mois de contamination
Hippocampe	+194% PLD1	UA10	+375% PLD2	RAS
		UA40	+80% PLD1 +635% PLD2	
Cortex	-47% PLD1	UA10	RAS	-30% ChAT
		UA40	+49% PLD1	

Tableau 19 : Récapitulatif des modifications des enzymes de synthèse de la choline et de l'acétylcholine chez les rats juvéniles

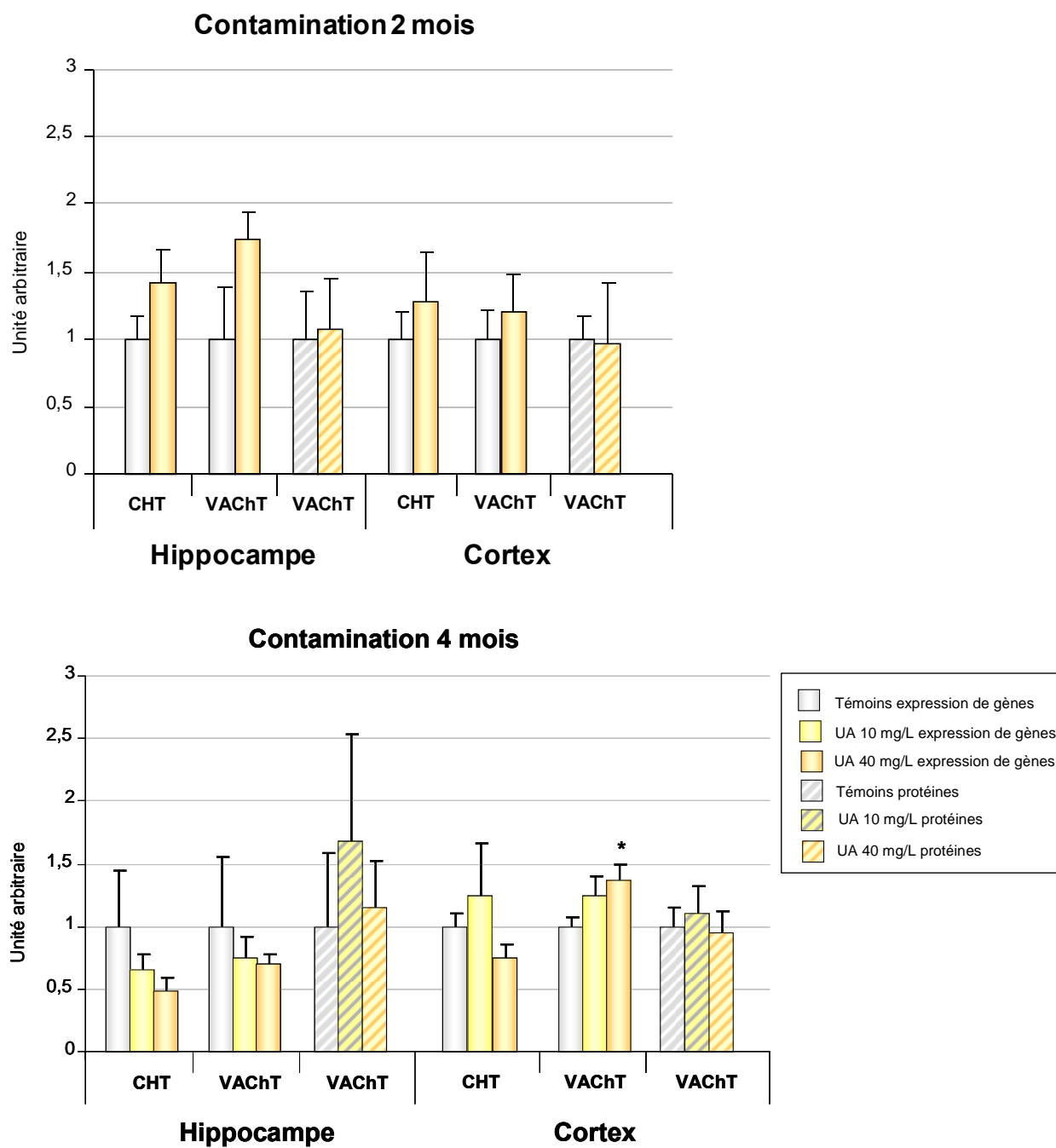
Dans l'hippocampe, après 2 mois de contamination, l'expression génique de la PLD1 est augmentée. Après 4 mois de contamination à l'UA 40 mg/L, l'expression du gène de la PLD1 et de la PLD2 est augmentée, alors que pour l'exposition à l'UA 10 mg/L, seule l'expression de la PLD2 est augmentée. Par contre, l'exposition plus prolongée à l'UA (9 mois) ne provoque pas de variation de l'expression génique des enzymes de synthèse de la choline et de l'acétylcholine.

Dans le cortex, l'expression génique de la PLD1 est diminuée après 2 mois de contamination. L'exposition pendant 4 mois à l'UA 40 mg/L provoque à l'inverse une augmentation de l'expression du gène de la PLD1. L'exposition à l'UA 10 mg/L n'induit pas de modification de l'expression génique des enzymes de synthèse de la choline et de l'acétylcholine. Pour le troisième temps de contamination (9 mois), l'uranium provoque une baisse de l'expression du gène de la ChAT.

Le niveau protéique de la ChAT n'est pas altéré par les différentes contaminations chez les rats juvéniles.

b) Transporteurs

Les résultats observés pour les transporteurs sont représentés dans la [Figure 31](#).



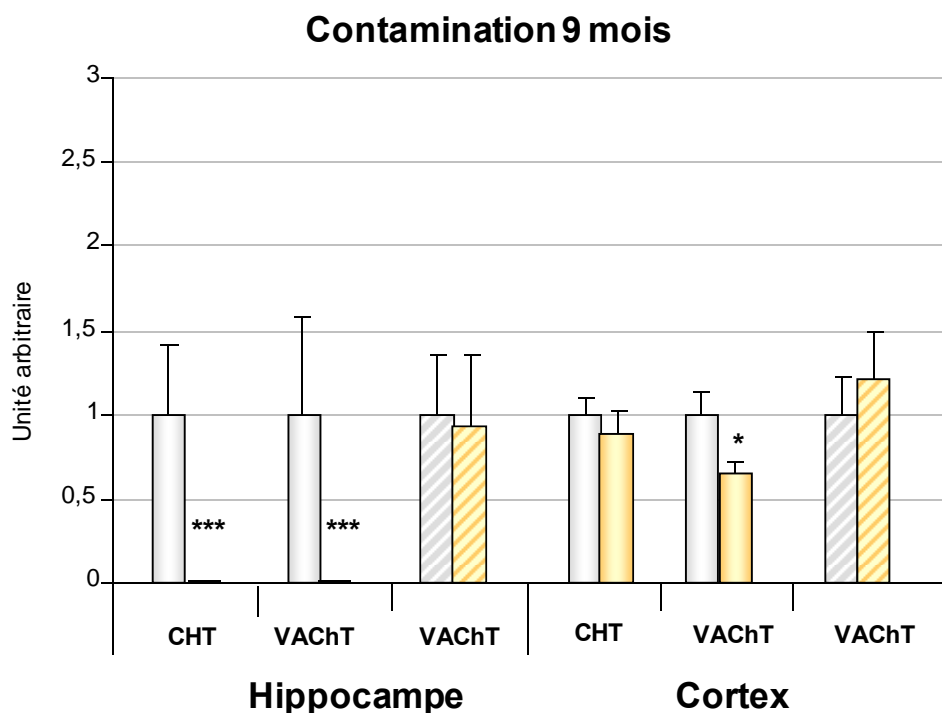


Figure 31 : Représentation graphique des résultats pour les transporteurs de l'acétylcholine et de la choline chez les rats juvéniles

Représentation graphique des résultats d'expression génique (n=10) et protéique (n=4) des transporteurs de l'acétylcholine et de la choline après exposition sub-chronique ou chronique à l'UA 10 mg/L ou à l'UA 40 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student, les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Les perturbations de l'expression géniques des transporteurs de l'acétylcholine (VAcHT) et de la choline (CHT), relevées après les différentes contaminations de rats juvéniles, sont répertoriées dans le tableau suivant (Tableau 20):

	2 mois de contamination	4 mois de contamination		9 mois de contamination
Hippocampe	RAS	UA10	RAS	-99% CHT -99% VAcHT
		UA40	RAS	
Cortex	RAS	UA10	RAS	-35% VAcHT
		UA40	+37% VAcHT	

Tableau 20 : Récapitulatif des modifications des transporteurs de l'acétylcholine et de la choline chez les rats juvéniles

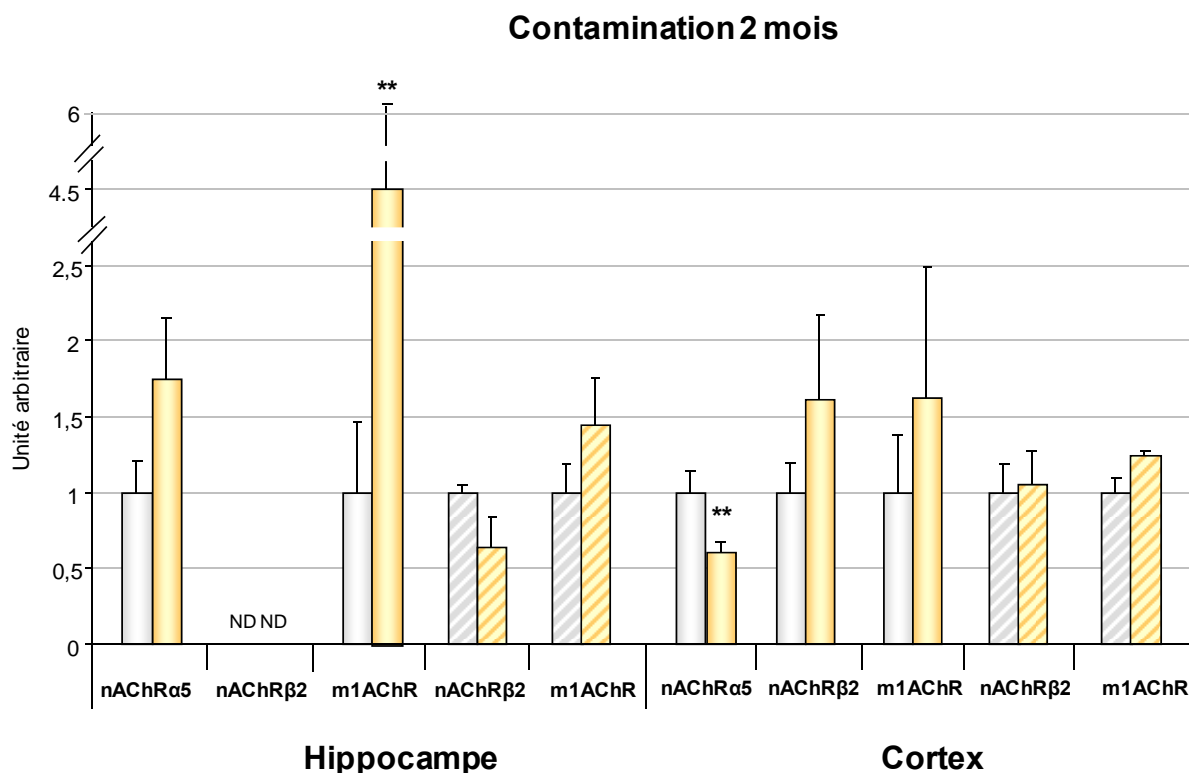
Dans l'hippocampe, les expositions de 2 ou 4 mois à l'UA (10 et 40 mg/L inclus) n'induisent pas de modification de l'expression génique des transporteurs VAcHT et CHT. Par contre, la prolongation de l'exposition (9 mois), provoque une chute importante des deux transporteurs du système cholinergique.

Dans le cortex, deux mois de contamination à l'uranium ne provoquent pas de modification de l'expression génique des transporteurs VACHT et CHT. Par contre, une augmentation de l'expression génique du VACHT a pu être observée après 4 mois d'exposition à l'UA 40 mg/L, alors que l'exposition à l'UA 10 mg/L ne modifie pas l'expression génique des transporteurs. A l'inverse, une baisse de l'expression du gène du VACHT a été montrée après 9 mois de contamination à l'UA.

Aucune modification du niveau protéique du VACHT n'a pu être observée au cours de cette expérience.

c) Récepteurs

L'expression génique et protéique des différents récepteurs cholinergiques est représentée dans la [Figure 32](#).



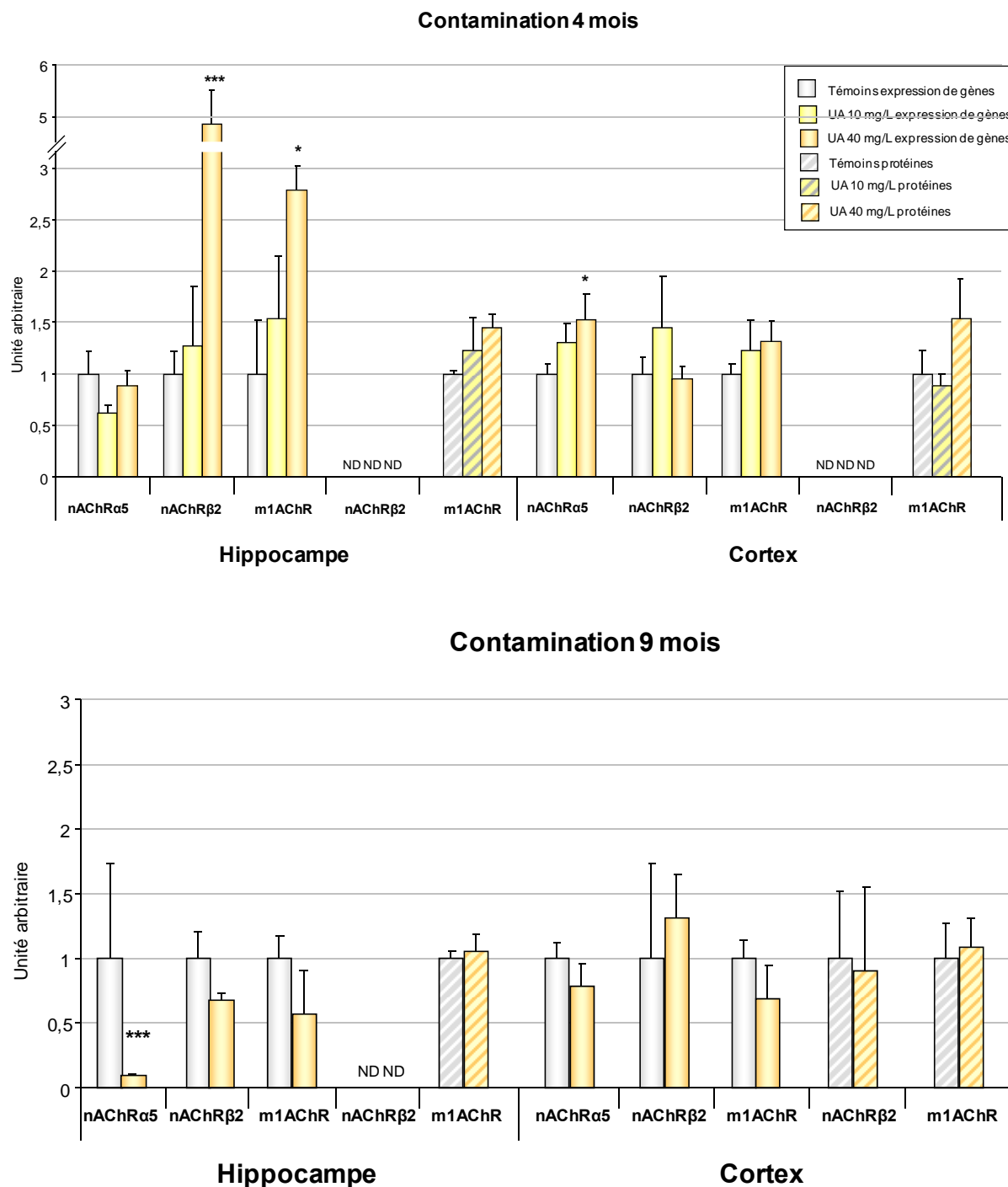


Figure 32 : Représentation graphique des résultats pour les récepteurs cholinergiques chez les rats juvéniles

Représentation graphique des résultats d'expression génique (n=10) et protéique (n=4) des récepteurs cholinergiques après exposition sub-chronique ou chronique à l'UA 10 mg/L ou à l'UA 40 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student, les valeurs significatives sont représentées par : * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Les variations d'expression géniques des récepteurs nicotiques (nAChR α 5 et nAChR β 2) et muscariniques (m1AChR), provoquées par les différentes expositions à l'uranium sur les rats juvéniles, sont rapportées dans le tableau ci-dessous (Tableau 21) :

	2 mois de contamination	4 mois de contamination		9 mois de contamination
Hippocampe	+450% m1AChR	UA10	RAS	-99% nAChR α 5
		UA40	+480% nAChR β 2 +178% m1AChR	
Cortex	-39% nAChR α 5	UA10	RAS	RAS
		UA40	+53% nAChR α 5	

Tableau 21 : Récapitulatif des modifications des récepteurs cholinergiques chez les rats juvéniles

Dans l'hippocampe, après 2 mois de contamination l'expression génique du m1AChR est nettement augmentée. Par ailleurs, l'expression du gène du nAChR β 2 n'a pu être déterminée. Après 4 mois de contamination à l'UA 40 mg/L, une augmentation de l'expression génique du nAChR β 2 et du m1AChR a pu être montrée. Toutefois, l'exposition à l'UA 10 mg/L ne provoque pas de modification de l'expression génique des récepteurs observés par rapport aux témoins. La contamination prolongée à l'UA (9 mois) induit une chute importante du nAChR α 5.

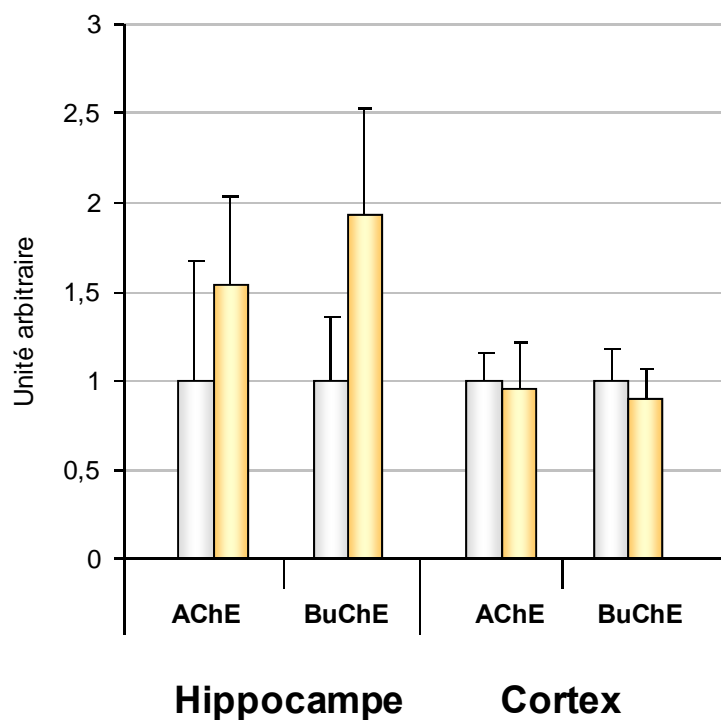
Dans le cortex, des trois sous-unités ou type de récepteurs observés, seule la sous-unité α 5 est perturbée par la contamination à l'uranium. En effet, après 2 mois d'exposition à l'UA, son expression génique est diminuée. Par contre, elle est légèrement augmentée après 4 mois d'exposition à l'UA 40 mg/L. L'exposition à l'UA 10 mg/L pendant 4 mois, ainsi qu'à l'UA 40 mg/L pendant 9 mois ne modifie pas son expression génique.

Le niveau protéique des récepteurs nAChR β 2 et m1AChR reste inchangé lors des différentes contaminations. Toutefois, pour le nAChR β 2, le niveau protéique n'a pu être déterminé dans l'hippocampe après 4 et 9 mois de contamination et dans le cortex après 4 mois de contamination.

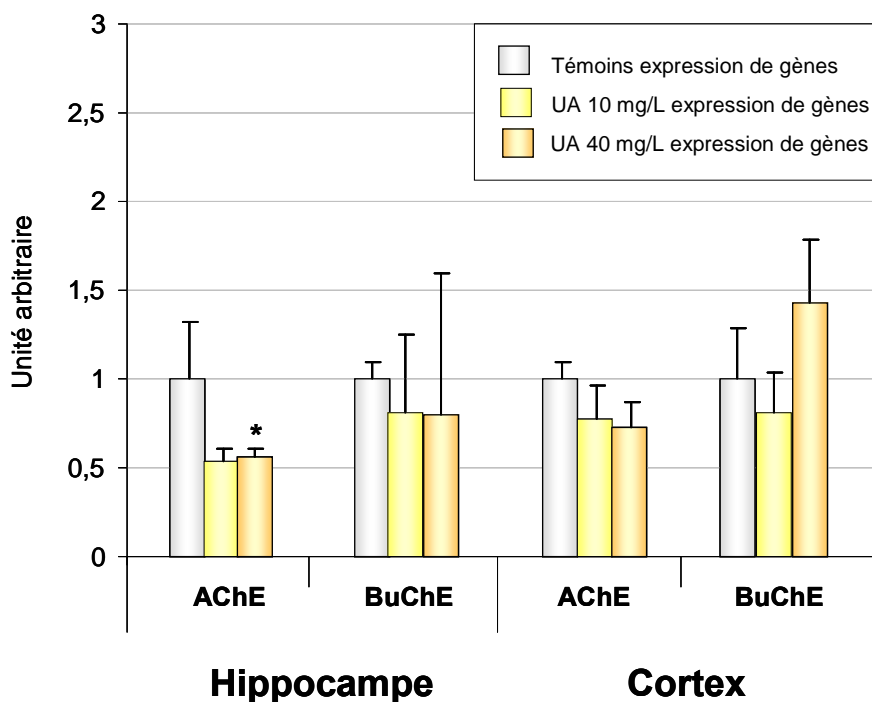
d) Acétylcholine et ses enzymes de dégradation

L'expression génique des enzymes de dégradation de l'acétylcholine et les résultats des dosages de l'acétylcholine et d'activité de l'AChE sont respectivement représentés dans la Figure 33.

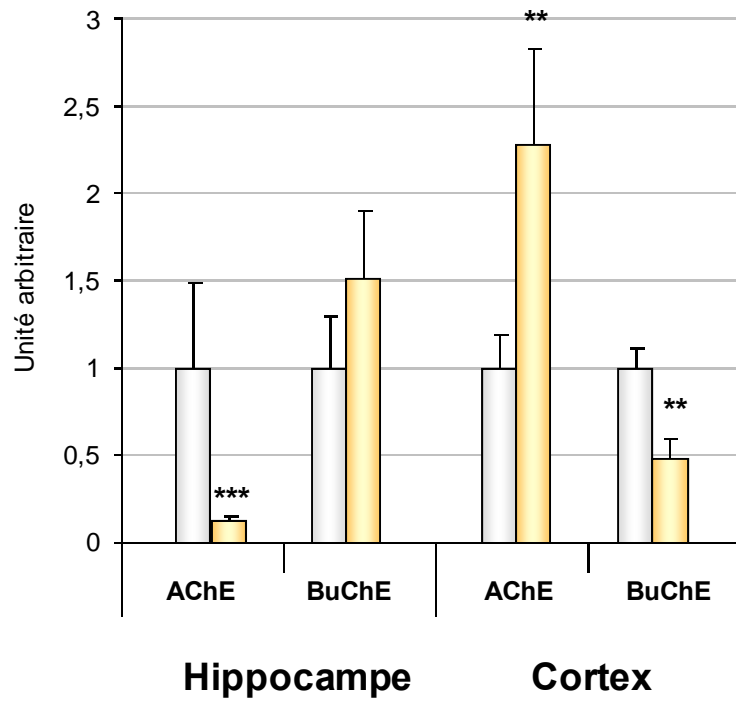
Contamination 2 mois



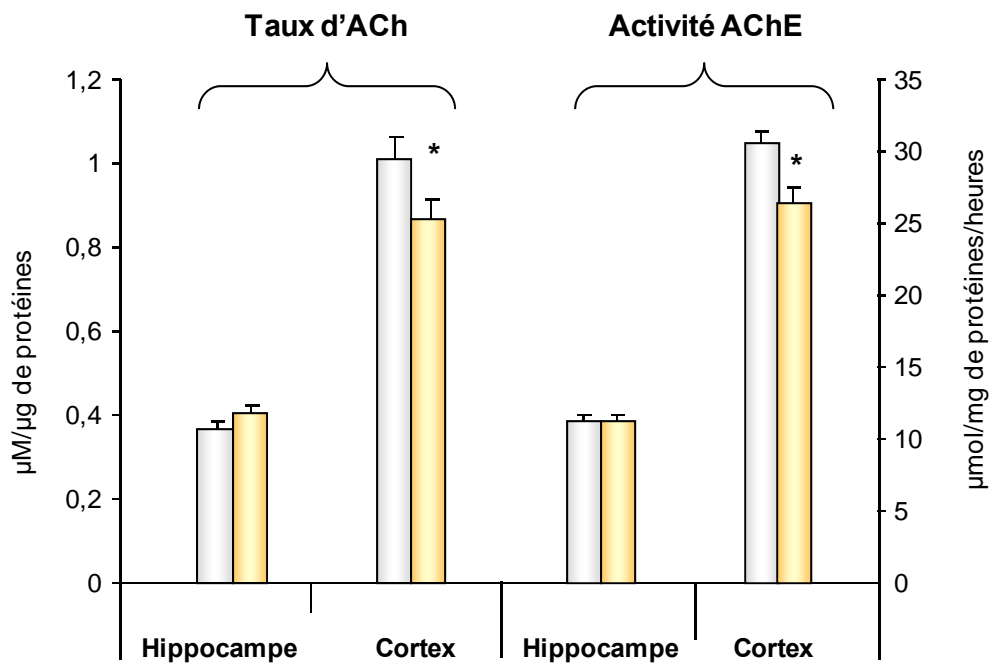
Contamination 4 mois



Contamination 9 mois



Contamination 2 mois



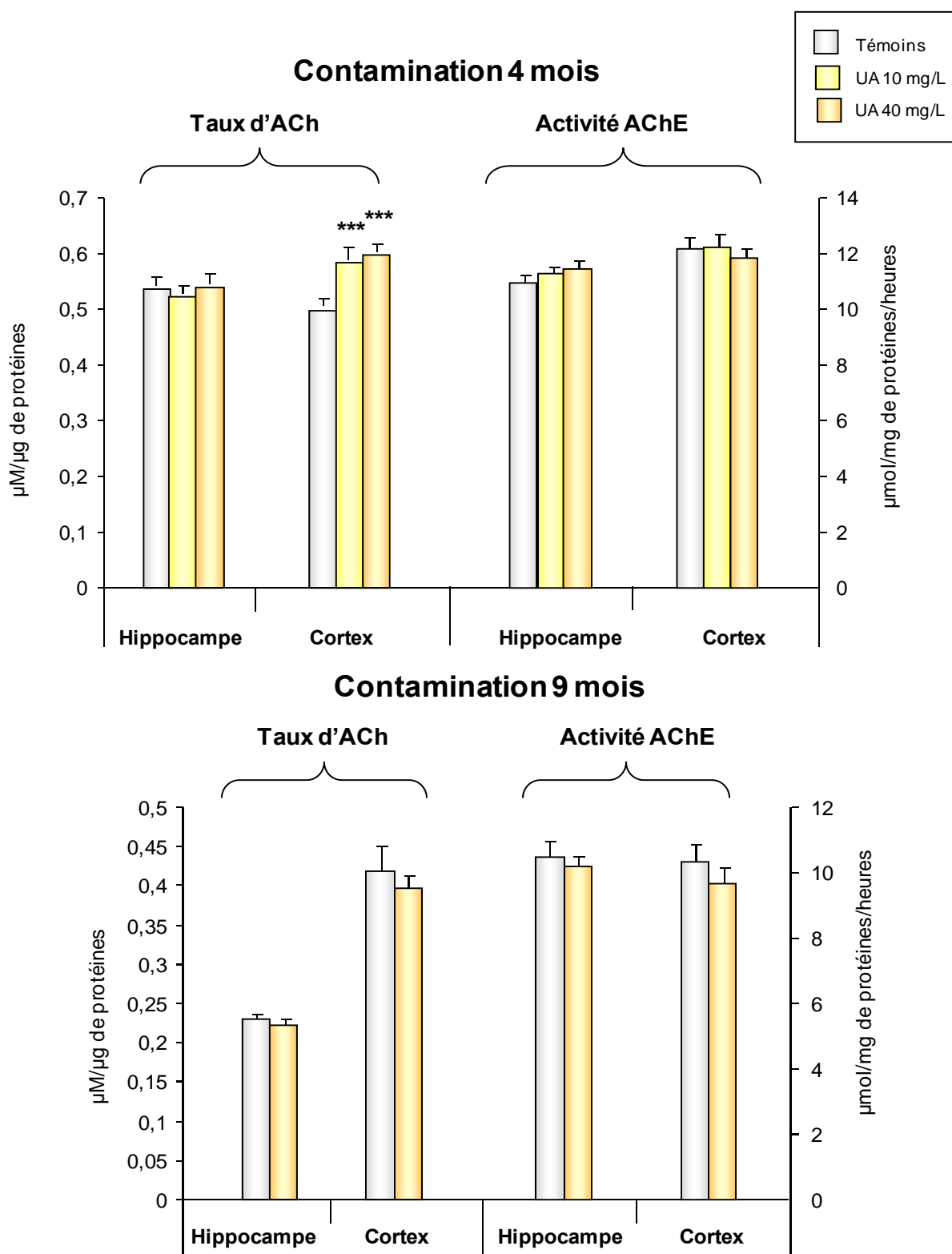


Figure 33: Représentation graphique des résultats du taux d'acétylcholine et des enzymes de dégradation de l'acétylcholine chez les rats juvéniles

Représentation graphique des résultats d'expression génique (n=10) des enzymes de dégradation de l'acétylcholine et de dosages tissulaires (n=10) de l'acétylcholine et de l'AChE après exposition sub-chronique ou chronique à l'UA1à mg/L ou à l'UA 40 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student pour l'expression génique et par test de « two-way ANOVA » pour les dosages tissulaires. Les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Les modifications d'expression génique de l'AChE et de la BuChE ainsi que du taux d'ACh et de l'activité de l'AChE sont rapportées dans le tableau suivant (Tableau 22):

	2 mois de contamination		4 mois de contamination			9 mois de contamination	
	Expression génique	Dosages		Expression génique	Dosages	Expression génique	Dosages
Hippocampe	RAS	RAS	UA10	RAS	RAS	-88% AChE	RAS
			UA40	-44% AChE	RAS		
Cortex	RAS	-14% ACh -14% AChE	UA10	RAS	+18% ACh	+129% AChE -52% BuChE	RAS
			UA40	RAS	+20% ACh		

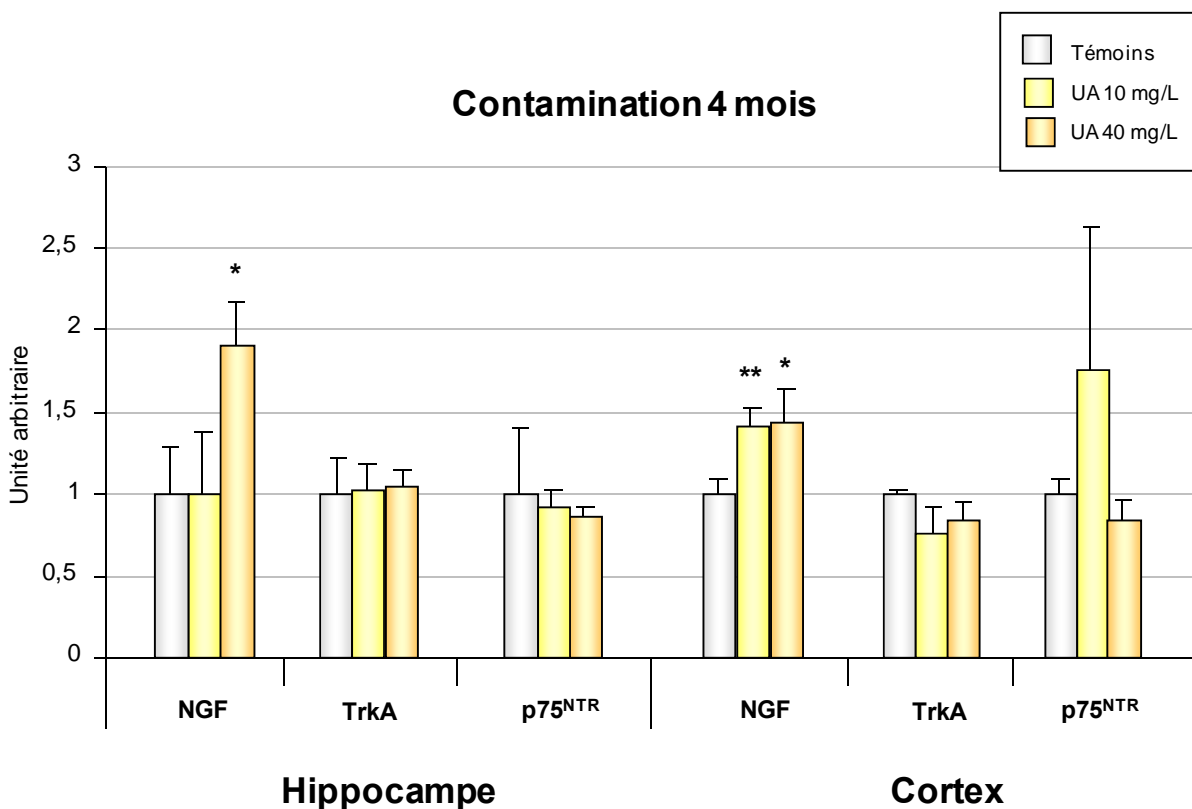
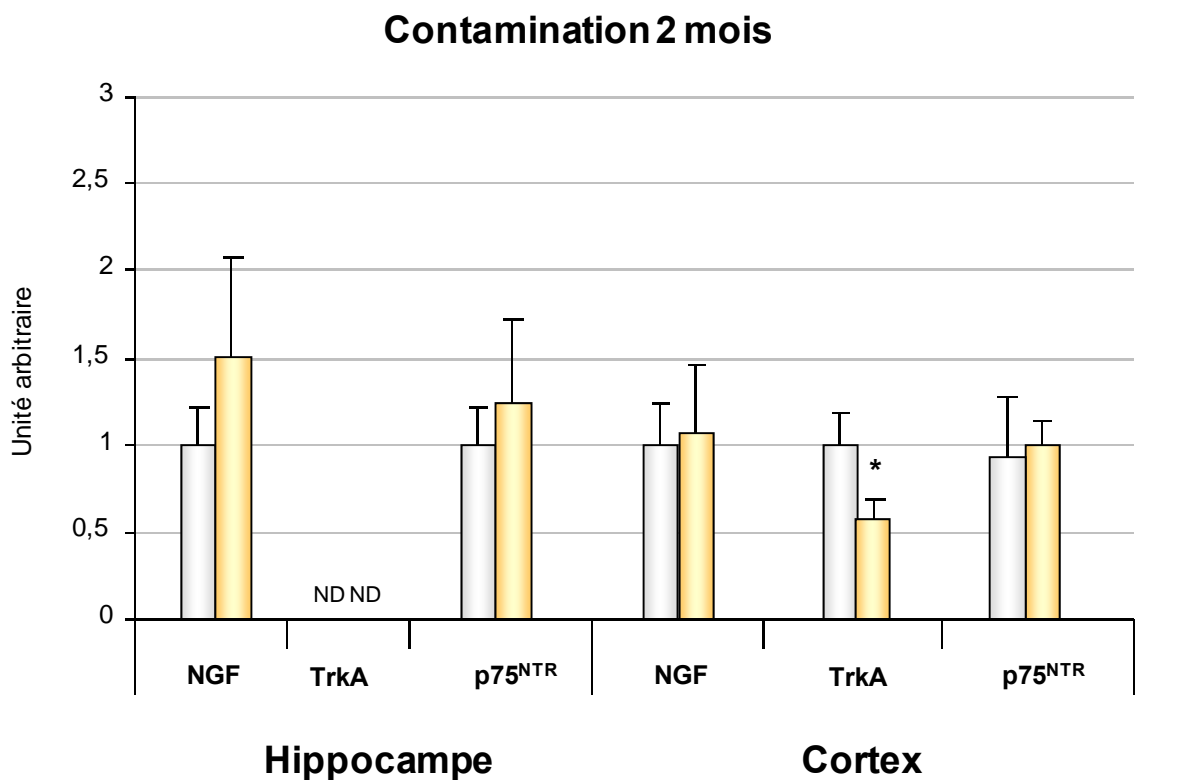
Tableau 22 : Récapitulatif des modifications du taux d'acétylcholine et des enzymes de dégradation de l'acétylcholine chez les rats juvéniles

Dans l'hippocampe, aucune modification de l'expression génique de l'AChE ou de la BuChE n'a été observée après 2 mois de contamination à l'UA 40 mg/L ou 4 mois de contamination à l'UA 10 mg/L. Par contre, une diminution de l'expression du gène de l'AChE a été observée après 4 mois de contamination à l'UA 40 mg/L. Cette diminution est amplifiée lors de l'exposition pendant 9 mois à l'UA. Les dosages tissulaires du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE ne sont pas perturbés par les différentes contaminations à l'UA (2 et 9 mois à l'UA 40 mg/L, ainsi que 4 mois à l'UA 10 et 40 mg/L).

Dans le cortex, l'expression génique de l'AChE et de la BuChE n'est pas modifiée par les contaminations de 2 ou 4 mois à l'UA (UA 10 et 40 mg/L confondus pour le temps 4 mois). Par contre, après 9 mois de contamination, l'expression génique de l'AChE est augmentée alors que celle de la BuChE est diminuée de moitié. Le taux d'acétylcholine et l'activité de l'AChE sont diminués dans les mêmes proportions après 2 mois de contamination à l'UA. Le taux d'acétylcholine est augmenté de manière similaire après 4 mois de contamination à l'UA 10 ou 40 mg/L. Par contre l'activité de l'AChE chez les contaminés reste inchangée par rapport à celle des témoins. Après 9 mois d'exposition à l'UA, les dosages tissulaires montrent que le taux d'acétylcholine et l'activité de l'AChE ne sont pas modifiés par rapport aux valeurs témoins.

e) Facteur neurotrophique et ses récepteurs

L'expression génique du facteur neurotrophique (NGF) et de ses récepteurs (TrkA et p75^{NTR}) est représentée dans la [Figure 34](#).



Contamination 9 mois

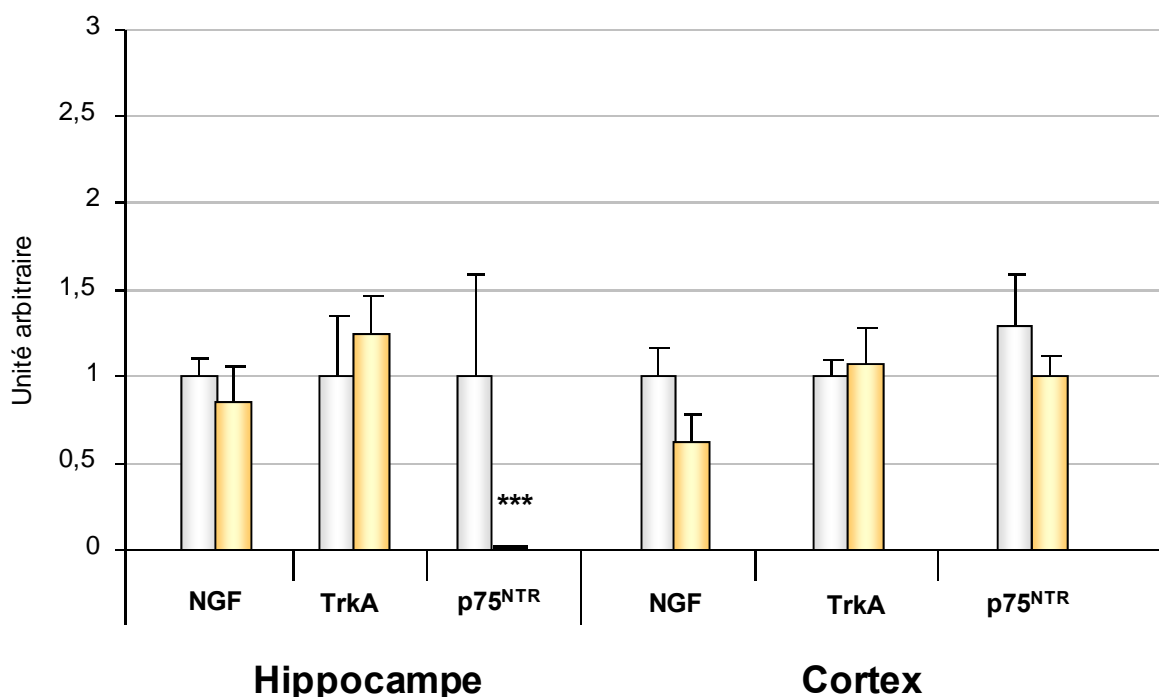


Figure 34 : Représentation graphique des résultats du facteur neurotrophique et de ses récepteurs chez les rats juvéniles

Représentation graphique de l'expression génique (n=10) du facteur neurotrophique NGF et de ses récepteurs (TrkA et p75^{NTR}) après contamination sub-chronique et chronique à l'UA 10mg/L ou l'UA 40 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student. Les valeurs significatives sont représentées par : * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Les variations d'expression génique du facteur neurotrophique et de ses récepteurs lors des différentes expositions à l'uranium sont rapportées dans le tableau ci-dessous (Tableau 23) :

	2 mois de contamination	4 mois de contamination		9 mois de contamination
Hippocampe	RAS	UA10	RAS	-99% p75^{NTR}
		UA40	RAS	
Cortex	-42% TrkA	UA10	+42% NGF	RAS
		UA40	+43% NGF	

Tableau 23 : Récapitulatif des modifications du facteur neurotrophique et de ses récepteurs chez les rats juvéniles

Dans l'hippocampe, l'expression génique du récepteur de haute affinité du facteur de croissance (TrkA) n'a pu être déterminée chez les rats ayant été soumis à 2 mois de contamination à l'uranium. Toutefois, aucune modification de l'expression génique du

facteur neurotrophique ou de ses récepteurs n'a pu être mise en évidence après les contaminations de 2 mois ou de 4 mois (UA 10 et 40 mg/L confondus). Par contre, une forte chute de l'expression du gène du récepteur p75^{NTR} a été montrée lors d'une exposition de 9 mois à l'UA.

Dans le cortex, 2 mois de contamination à l'UA induisent une diminution de l'expression du gène du TrKA. Lors des contaminations de 4 mois, l'UA 10 et 40 mg/L provoquent une augmentation similaire de l'expression génique du NGF. Par contre, aucune variation de l'expression des gènes du NGF, TrKA ou p75^{NTR} n'a pu être observée après 9 mois de contamination.

f) Dosage plasmatique des cholinestérases

Lors des différentes expositions à l'uranium, le dosage des cholinestérases plasmatiques (ChE) (Figure 35) ne montre aucune perturbation de l'activité des ChE.

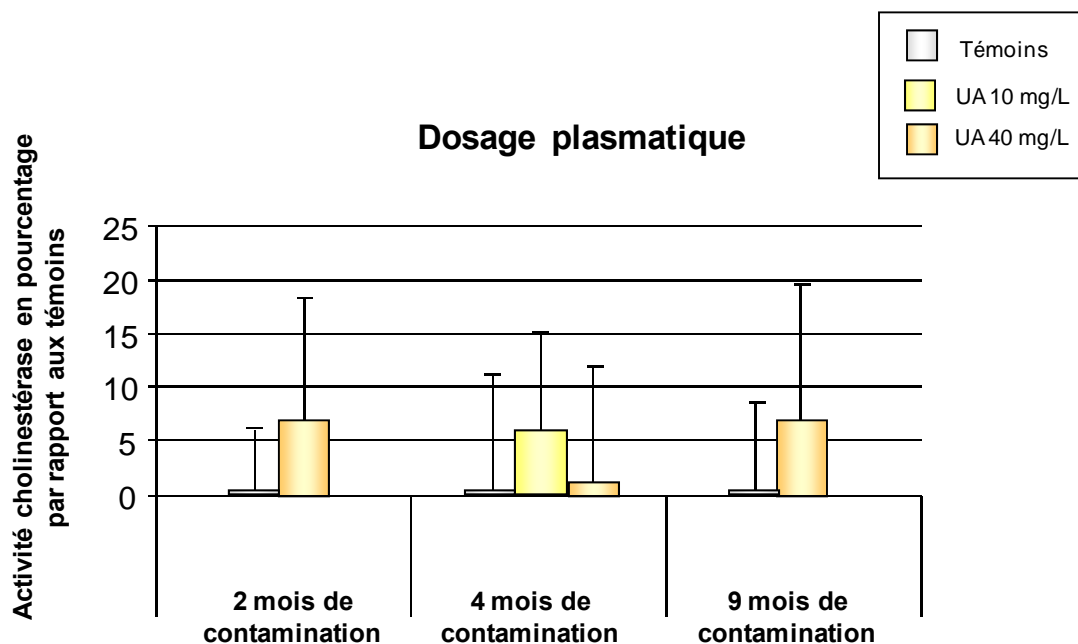


Figure 35: Représentation graphique du dosage des cholinestérases plasmatiques

Avec n=10, de gauche à droite 2 x 3 colonnes : témoins, (UA 10 mg/L pour 4 mois de contamination) puis UA 40 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student.

4) Tests comportementaux

a) Cycle veille-sommeil

Le pourcentage de temps passé sur 24 h dans chacune des trois phases du cycle veille-sommeil, i.e. éveil, sommeil à ondes lentes et sommeil paradoxal, est représenté dans la [Figure 36](#). Aucune différence significative n'a pu être observée pour chacune de ces phases entre les rats témoins et les rats contaminés pendant 2 mois à l'UA à 40 mg/L. Toutefois, on note une tendance ($p=0,077$) à une diminution du temps passé en éveil chez les rats contaminés par rapport aux rats témoins.

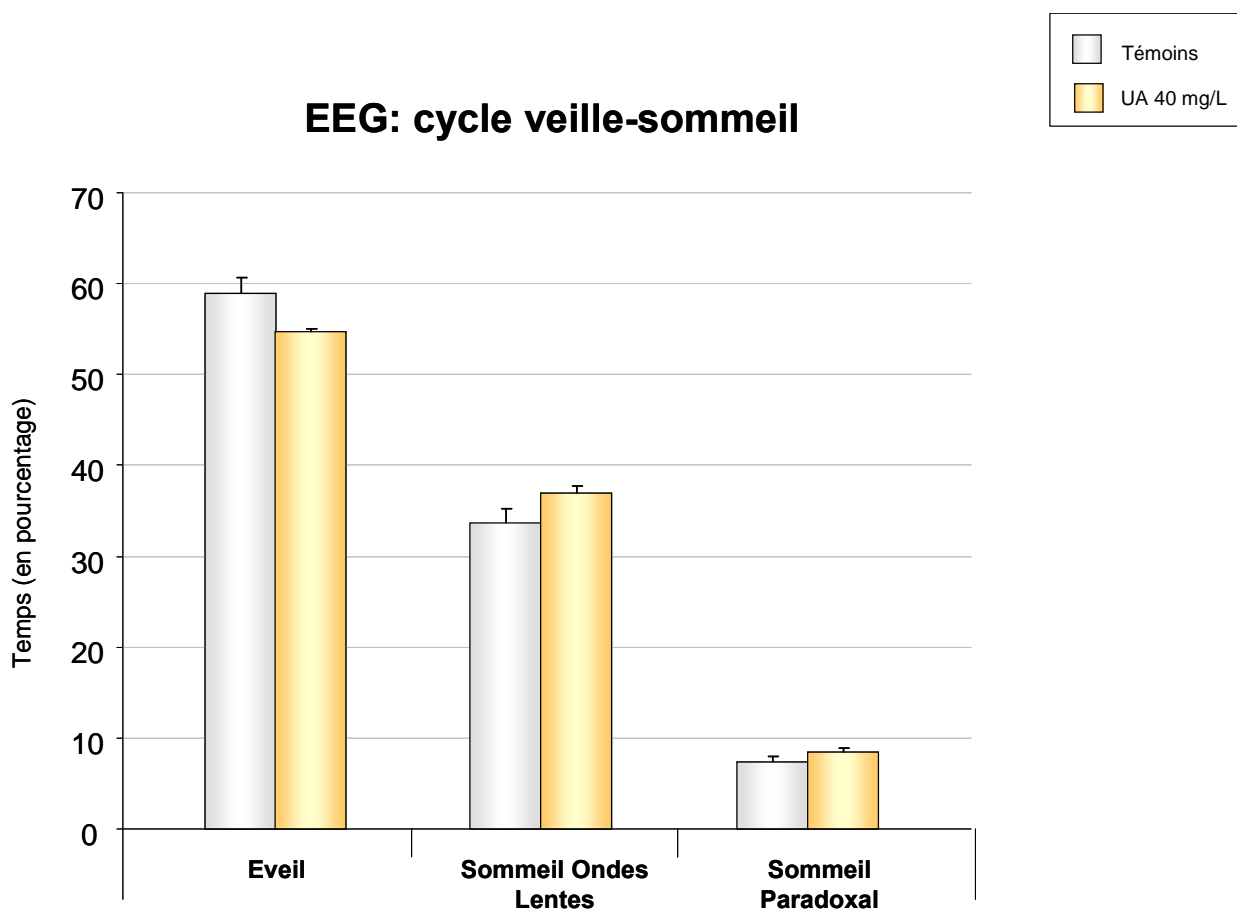


Figure 36 : Représentation graphique des résultats de l'EEG des rats juvéniles (2 mois d'exposition)

Représentation graphique du pourcentage de temps passé en éveil, sommeil à ondes lentes ou sommeil paradoxal chez les rats après 2 mois de contamination à l'UA 40 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student.

b) Mémoire à court terme

La mémoire à court terme a été mesurée à l'aide d'un labyrinthe en Y. Les résultats (Figure 37) montrent que le nombre de visites est équivalent entre les différentes contaminations (concentration d'UA et temps d'exposition), ceci suggère que l'activité locomotrice des rats n'est pas affectée par ces contaminations.

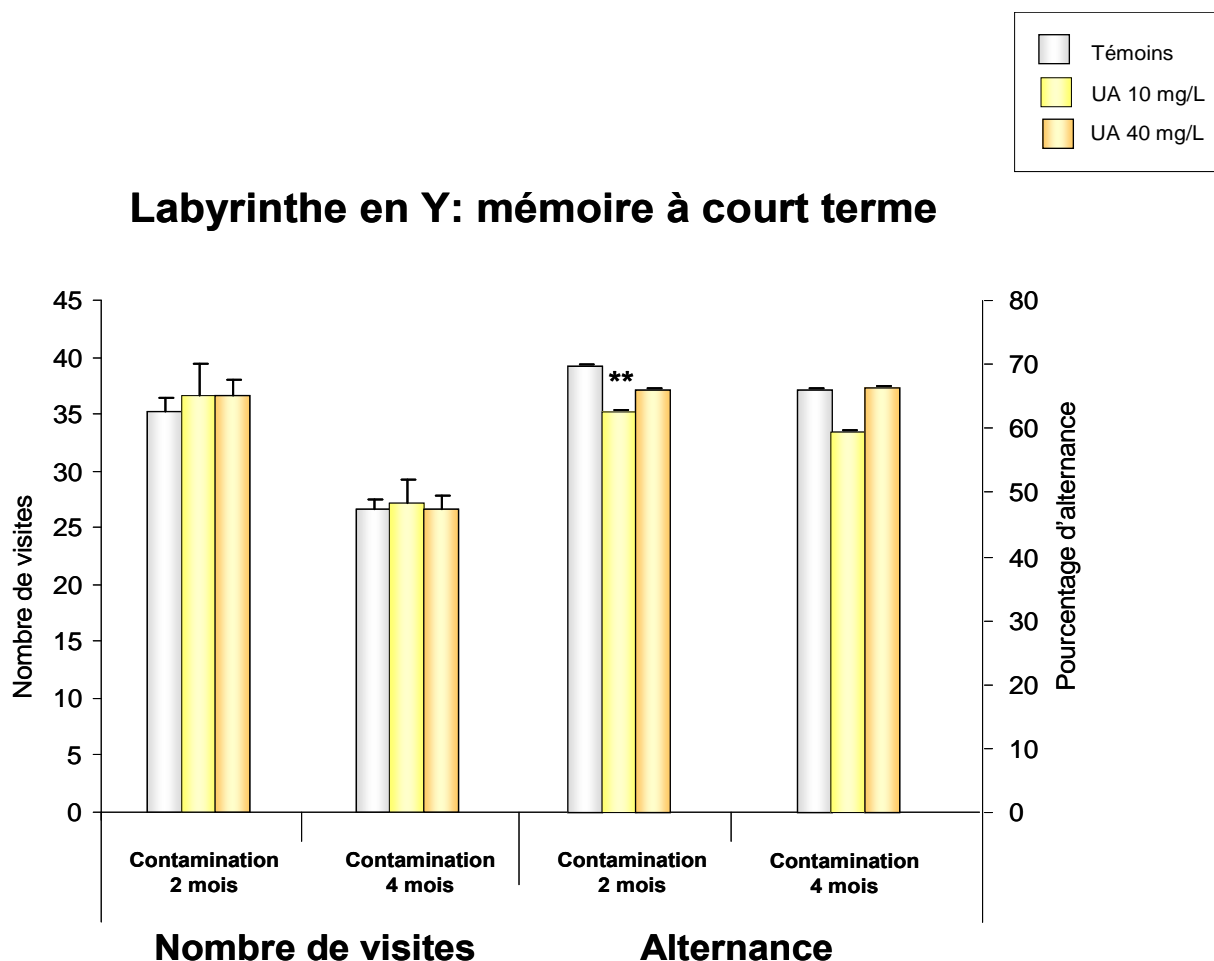


Figure 37 : Représentation graphique des résultats du test de mémoire à court terme chez les rats juvéniles

Représentation graphique du nombre de visites et de l'alternance dans les trois branches du labyrinthe en Y chez les rats après 2 mois de contamination à l'UA 10 et 40 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student. Les valeurs significatives sont représentées par : ** $p < 0,01$.

Par contre, après 2 mois de contamination à l'UA 10 mg/L, le pourcentage d'alternance est diminué (-10%, $p < 0,01$) par rapport aux témoins. Ceci signifie que la mémoire de travail est affectée chez ces animaux.

Pour les animaux exposés pendant 2 mois à 40 mg/L d'UA ou pendant 4 mois à 10 ou 40 mg/L d'UA, le pourcentage d'alternance des rats contaminés est équivalent à celui des rats témoins.

c) Mémoire à moyen terme

La mémoire à moyen terme a été mesurée par le test de reconnaissance d'objets. Les résultats obtenus en 1^{ère} session d'exploration montrent que les animaux passent autant de temps sur chacun des deux objets, et ce, quelque soit la concentration en UA ou le temps d'exposition à l'UA (Figure 38).

Reconnaissance d'objet: mémoire à moyen terme

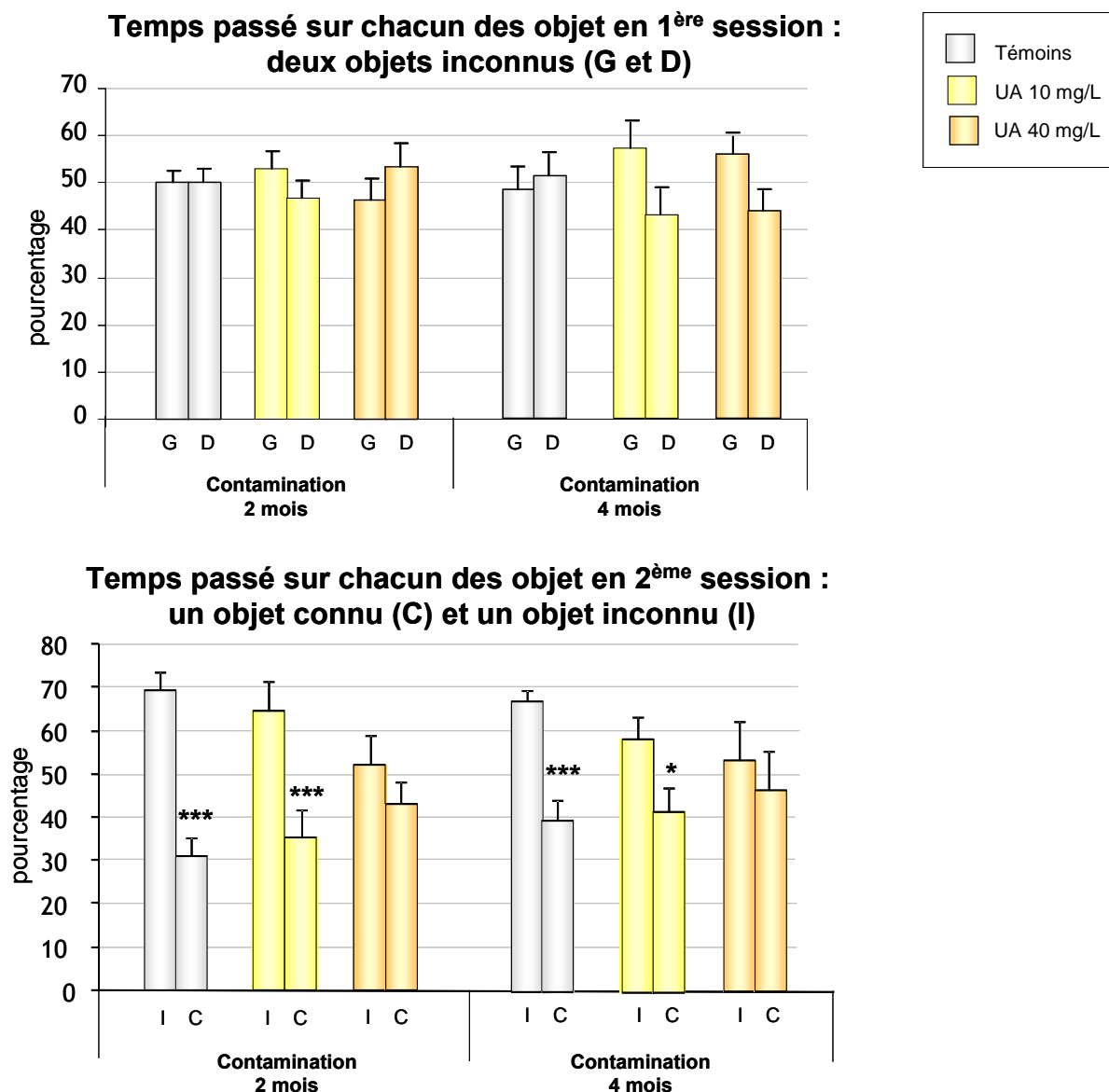


Figure 38 : Représentation graphique des résultats du test de mémoire à moyen terme chez les rats juvéniles

Représentation graphique du pourcentage de temps passé à explorer chacun des objets présentés aux rats après 2 mois de contamination à l'UA 10 et 40 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student. Les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

En 2^{ème} session, c'est-à-dire lorsque le nouvel objet est présenté aux animaux, les animaux témoins et contaminés à l'UA 10 mg/L passent significativement plus de temps sur l'objet inconnu, que ce soit pour 2 ou 4 mois d'exposition. Ces animaux ne présentent donc pas d'altération de la mémoire à court terme. Par contre, les rats exposés pendant 2 ou 4 mois à l'UA 40 mg/L passent en moyenne autant de temps sur l'objet connu que sur l'objet inconnu. Ainsi un déficit de la mémoire à moyen terme a pu être mis en évidence chez les rats juvéniles contaminés pendant 2 ou 4 mois à l'UA 40 mg/L.

d) Activité locomotrice et exploratrice

Le test de mesure de l'activité locomotrice et exploratrice est réalisé dans un actimètre par mesure des déplacements horizontaux et verticaux des animaux. Les rats ne présentent aucun déficit de l'activité locomotrice et exploratrice lors d'expositions de 2 ou 4 mois à l'UA 10 ou 40 mg/L (Figure 39).

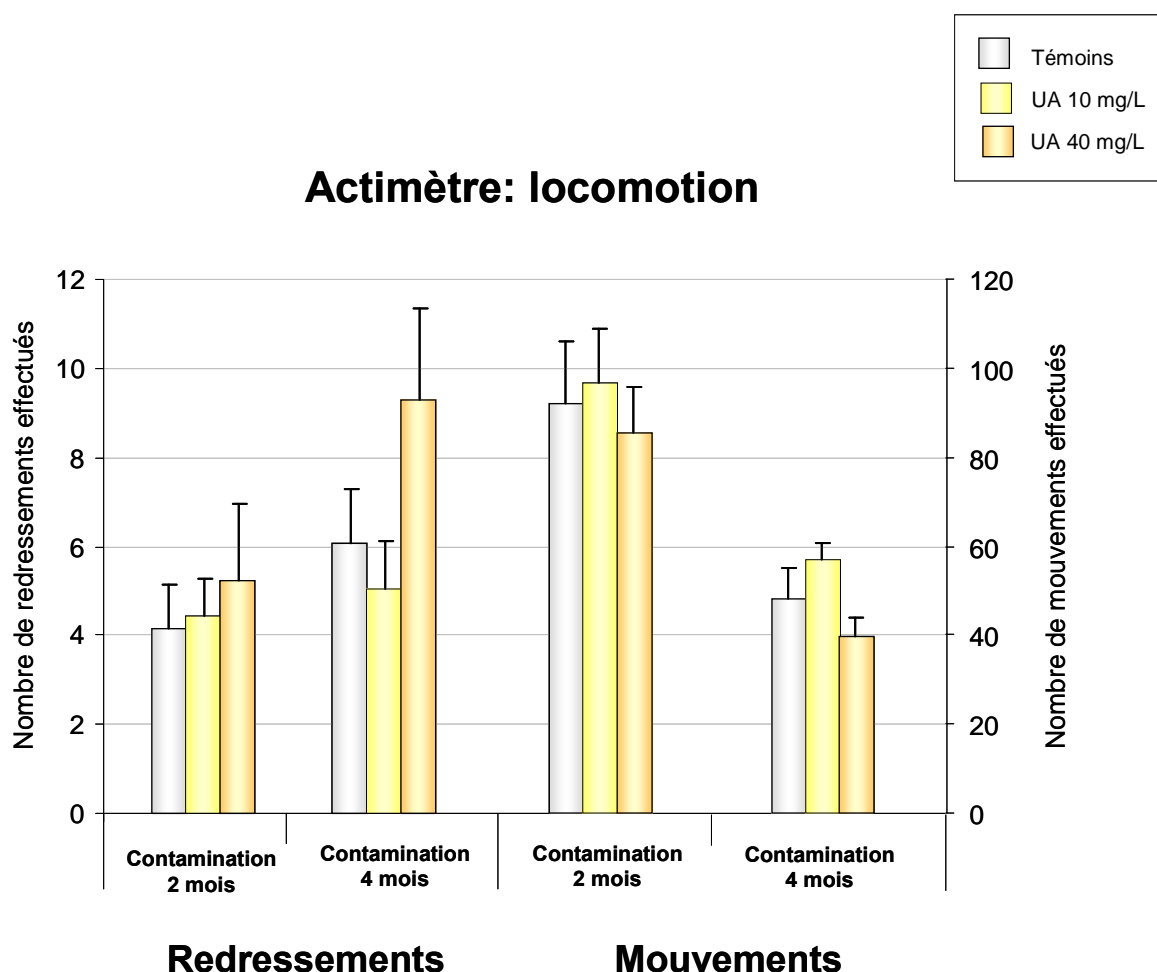


Figure 39 : Représentation graphique des résultats du test de l'activité locomotrice et exploratoire chez les rats juvéniles

Représentation graphique du nombre de redressements et de mouvements effectués par les rats après 2 mois de contamination à l'UA 10 et 40 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student.

e) Coordination motrice

La coordination motrice des rats a été mesurée à l'aide d'un Rotarod.

La première partie du test, l'habituation, consiste à accoutumer l'animal à l'appareil par 3 tests effectués à une vitesse constante de la roue de 5 tours par minute. Chez des rats contaminés pendant 2 mois, le profil d'apprentissage de ces rats exposés à l'UA 10 mg/L est proche de celui observé après une exposition à l'UA 40 mg/L. Par contre le profil observé pour les rats témoins est différent de celui observé après exposition à l'UA (10 et 40 mg/L confondus). Cette première observation montre que les rats contaminés à l'UA 10 ou 40 mg/L ont une moins bonne capacité d'apprentissage que les rats témoins (Figure 41).

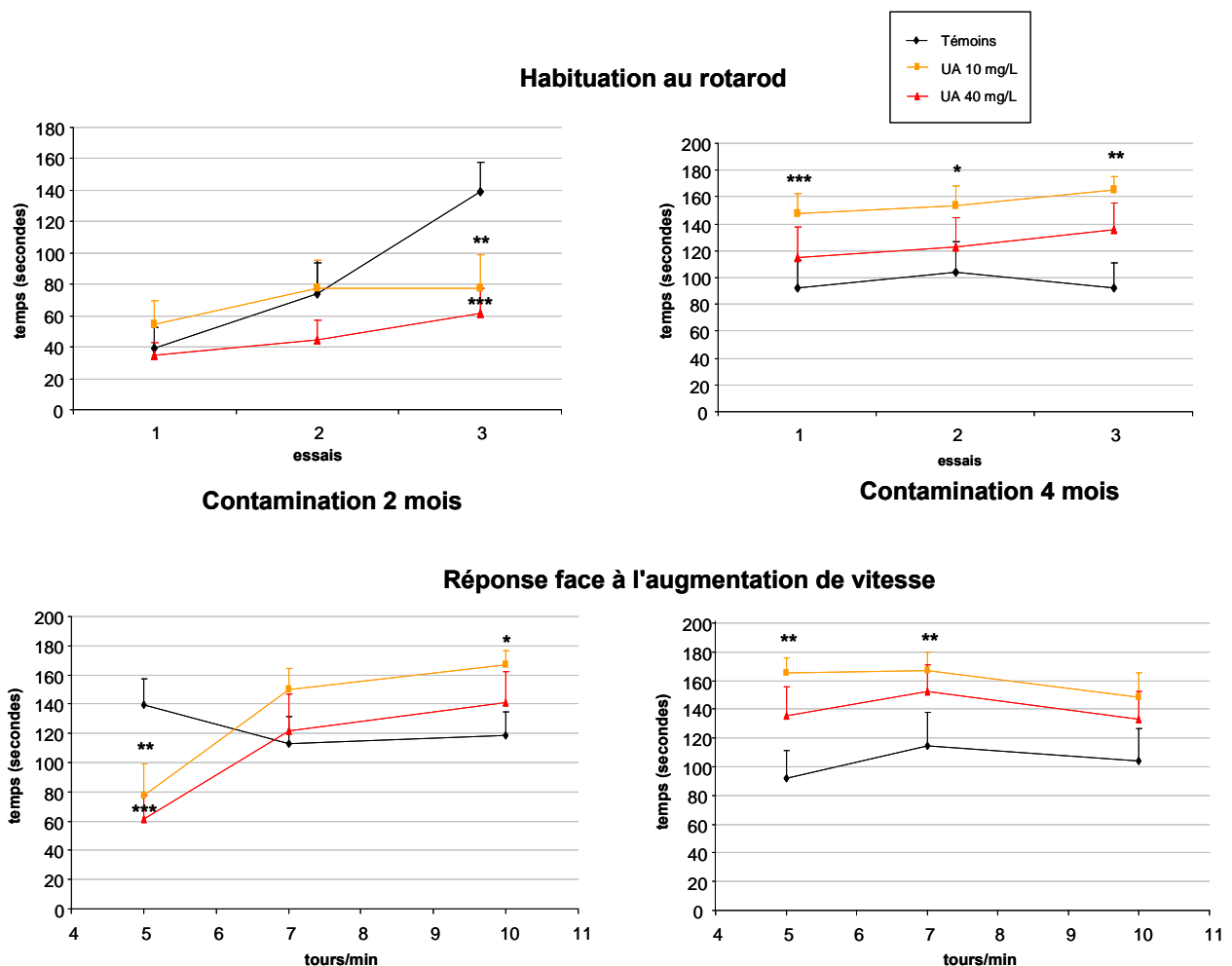


Figure 40 : Représentation graphique des résultats du test de coordination motrice chez les rats juvéniles

Représentation graphique de l'habituation à la roue (temps passé sur la roue maintenue à vitesse constante (5 tours/minute) sur trois essais) et de la réponse face à l'augmentation de vitesse (temps passé sur la roue lors de 3 essais, à chaque essai la vitesse de rotation est augmentée : 5, 7 et 10 tours/minute) pour les rats après 2 mois de contamination à l'UA 10 et 40 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de two-way ANOVA complété par la méthode de Holm-Sidak. Les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Chez les rats exposés pendant 4 mois, le profil d'habituement au Rotarod est le même pour les rats exposés à l'UA 10 mg/L, que pour les rats exposés à 40 mg/L. Par contre le profil observé chez les témoins est différent de celui des rats contaminés (10 et 40 mg/L confondus). Cependant, cette observation souligne une capacité d'adaptation significativement meilleure uniquement pour les animaux exposés à l'UA 10 mg/L. Ces animaux ont pu rester plus longtemps sur le Rotarod que les rats témoins et ce pour les trois tests.

La deuxième partie du test permet de mesurer les capacités de coordination motrice des animaux. Trois tests sont effectués avec, pour chaque test, une vitesse de rotation de la roue différente (5, 7 puis 10 tours/min). Après 2 mois de contamination, le profil de réussite des animaux est identique pour les rats exposés à l'uranium (10 et 40 mg/L) et différent de celui des rats témoins. Les rats contaminés à l'uranium (10 et 40 mg/L) rattrapent le niveau des rats témoins à 7 tours/min et les rats UA 10 mg/L surpassent les rats témoins à 10 tours/min. Cependant, seule la coordination motrice des rats exposés à 10 mg/L d'UA apparaît comme significativement meilleure que celles des animaux contaminés à 40 mg/L ou que celle des animaux témoins.

Après 4 mois de contamination, les profils de réussite sont identiques entre les deux types de contamination et entre les contaminés et les témoins. Toutefois, les rats exposés à l'UA 10 mg/L ont une meilleure coordination motrice que les rats UA 40 mg/L ou les rats témoins à 5 et 7 tours/min. Les trois groupes présentent des résultats équivalents lorsque la vitesse est augmentée et passe à 10 tours/min.

f) Etat de type « anxiété »

Ce test comptabilise le temps passé dans les branches ouvertes ou fermées du labyrinthe en croix.

Après 2 mois de contamination à l'UA 40 mg/L, les rats passent plus de temps dans les branches fermées que les rats témoins ou les rats contaminés à l'UA à 10 mg/L. Les rats contaminés à l'UA 40 mg/L montrent des signes d'anxiété plus importants que les rats témoins ou les rats contaminés à l'UA 10mg/L (Figure 41).

Après 4 mois d'exposition à l'uranium, les rats contaminés à l'UA 10 mg/L passent moins de temps dans les branches fermées que les rats témoins. De plus les rats contaminés à l'UA à 40 mg/L passent plus de temps dans les branches ouvertes que les témoins. Ainsi, les rats contaminés à l'uranium apparaissent comme moins anxieux que les rats témoins.

Par ailleurs, le nombre de visites dans les branches ouvertes ou fermées sont équivalents pour les rats exposés pendant 2 mois à l'UA 10 et 40 mg/L. Par contre, après 4 mois de contamination à l'UA 10 et 40 mg/L, les rats ont effectué un nombre plus important de visites dans les branches ouvertes que les rats témoins (+65%, $p < 0,05$ et +69%, $p < 0,01$ respectivement).

Labyrinthe en croix: anxiété

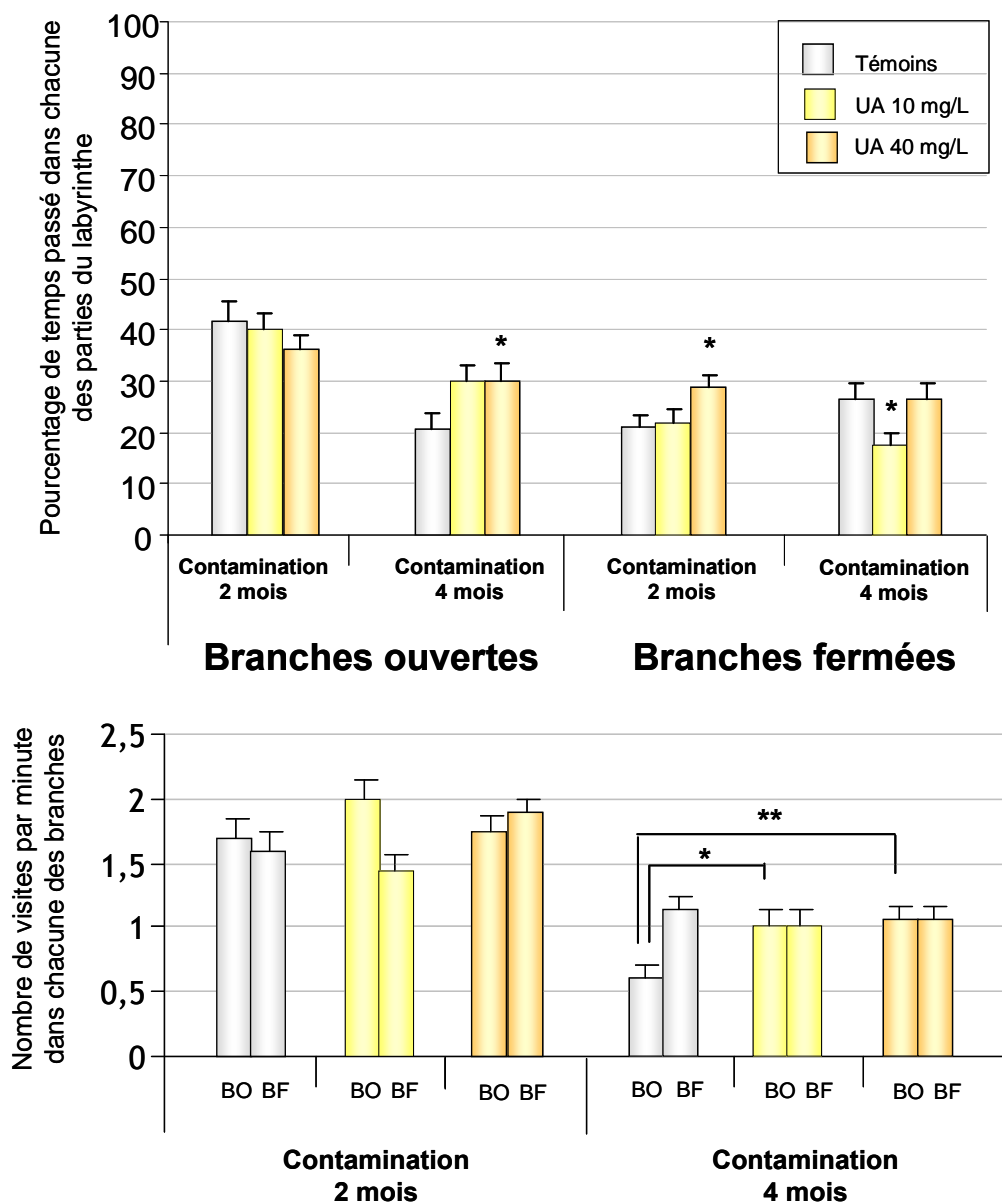


Figure 41 : Représentation graphique des résultats du test de mesure de l'état « anxieux » des rats juvéniles

En haut : représentation graphique du pourcentage de temps passé dans les branches ouvertes ou fermées du labyrinthe en croix surélevé par les rats après 2 et 4 mois de contamination à l'UA 10 et 40 mg/L.

En bas : représentation graphique du nombre de visites effectuées dans chacun des bras du labyrinthe en croix surélevé par les rats après 2 et 4 mois de contamination à l'UA 10 et 40 mg/L.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de Student. Les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

g) Indice de dépression

Ce test comptabilise le temps de résignation de l'animal traduit par un arrêt de la nage dans une piscine où il ne peut se maintenir à la surface qu'en nageant.

Après 2 mois d'exposition à l'uranium, les rats contaminés à l'UA à 40 mg/L font preuve de 49% ($p < 0,01$) de résignation en moins que les rats témoins. Les rats exposés à 10 mg/L montrent des résultats similaires aux témoins (Figure 42).

Nage forcée: résignation-dépression

Temps cumulé de résignation

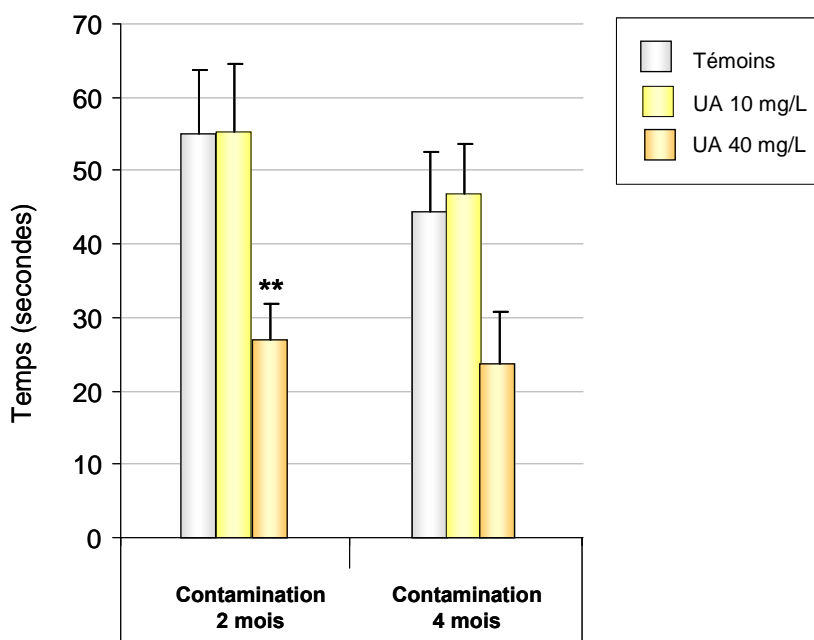


Figure 42 : Représentation graphique des résultats du test de mesure de l'état dit de « dépression » chez les rats juvéniles

Représentation graphique du temps d'immobilisation dans la piscine des rats après 2 mois de contamination à l'UA 10 et 40 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de Student. Les valeurs significatives sont représentées par : ** $p < 0,01$.

Après 4 mois d'exposition à l'uranium, les rats témoins et les rats contaminés présentent les mêmes résultats. Toutefois, une tendance à la diminution de la résignation a pu être observée chez les rats exposés à l'UA 40 mg/L, mais cette tendance n'est pas significative ($p = 0.067$).

C. Résultats : ApoE^{-/-}

1) Paramètres généraux de santé

Un relevé hebdomadaire du poids et des consommations alimentaire et hydrique a été réalisé chez les souris (souris de génotype sauvage non-contaminées et les souris transgéniques ApoE^{-/-} non-contaminées et contaminées à l'UA 20 mg/L) durant les 3 mois de l'étude.

Le poids des animaux est significativement plus important pour les souris ApoE^{-/-} (non-contaminées et contaminées confondues) que pour les souris de génotype sauvage pendant les trois mois de l'expérimentation. Une différence de poids a également été observée au début de la contamination (1^{ère} semaine) entre les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées à l'UA 20 mg/L. Cette différence (-5%, p<0,05) n'a été observée que pour la première semaine de contamination ; par la suite, les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et contaminées à l'UA 20 mg/L ont présenté un poids similaire pendant les 3 mois.

La consommation hydrique a également été modifiée par la mutation. Les souris KO ApoE ont significativement plus bu que les souris de phénotype sauvage, et ce durant les 3 mois de l'expérimentation.

Par contre, la consommation alimentaire a été équivalente pendant les 3 mois pour les 3 groupes de souris (Sauvages, ApoE^{-/-} non-contaminées et ApoE^{-/-} contaminées à l'UA 20 mg/L).

Un récapitulatif des relevés de poids, de consommation hydrique et alimentaire au début et à la fin de l'expérience est présenté dans le tableau suivant : (Tableau 24)

	Evian				Uranium 20 mg/L	
	Souris sauvages		Souris ApoE ^{-/-}		Souris ApoE ^{-/-}	
	Début	Fin	Début	Fin	Début	Fin
Poids (grammes)	23,2 ± 0,3	25,5 ± 0,3	25,9 ± 0,5 ***	28,8 ± 1,1 ***	24,5 ± 0,4 *** ^{/§}	28,9 ± 0,6 ***
Consommation hydrique par souris et par jour (mL)	3,4 ± 0,1	3,2 ± 0,1	5,0 ± 0,2 ***	5,3 ± 0,2 ***	4,4 ± 0,2 ***	4,9 ± 0,3 ***
Consommation alimentaire par souris et par jour (grammes)	3,7 ± 0,1	3,9 ± 0,1	3,7 ± 0,1	3,6 ± 0,3	3,5 ± 0,1	3,9 ± 0,4

Tableau 24 : Relevé des paramètres généraux de santé des souris de génotype sauvage et des souris ApoE^{-/-}

Relevé des paramètres généraux des souris au début et à la fin de l'expérimentation (n=15). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student, les valeurs significativement différentes des valeurs des souris sauvages sont représentées par : *** p < 0,001. Les valeurs significativement différentes entre les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées sont représentées par : [§] p < 0,05.

2) Dosage d'uranium dans le cortex

Un dosage d'uranium du cortex cérébral a été effectué chez les souris de génotype sauvage non-contaminées, les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées à l'UA 20 mg/L (Tableau 25).

	Evian		Uranium 20 mg/L
	Souris sauvages	Souris ApoE ^{-/-}	Souris ApoE ^{-/-}
Concentration d'uranium (ng/g)	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,3	1,3 ± 0,1

Tableau 25 : Dosage d'uranium dans le cortex des souris de génotype sauvage et des souris ApoE^{-/-}

Concentration d'uranium en ng/g de cortex chez les souris de génotype sauvage non-contaminées et chez les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et contaminées à l'UA 20 mg/L (n=6). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student entre les souris non-contaminées et les souris contaminées à l'UA 20 mg/L.

Aucune accumulation d'uranium n'a pu être mesurée chez les souris ApoE^{-/-} contaminées pendant 3 mois à l'UA 20 mg/L par rapport aux souris sauvages non-contaminées ou aux souris ApoE^{-/-} non-contaminées.

3) Métabolisme cholinergique

L'observation des différents acteurs du système colinergique a été réalisée dans le cortex entorhinal des souris ApoE^{-/-}.

a) Modifications dues à la mutation

Il s'agit d'une comparaison entre les souris sauvages non-contaminées et les souris mutées non-contaminées.

Pour les différents acteurs du métabolisme du système cholinergique, seule l'expression génique de la sous-unité $\alpha 5$ du récepteur nicotinique est diminuée (-34%, $p < 0,001$) par la mutation ApoE^{-/-}. L'expression génique des autres acteurs (ChAT, VAcHT, nAChR $\beta 2$, m1AChR, BuChE) n'est pas modifiée par cette mutation (Figure 43).

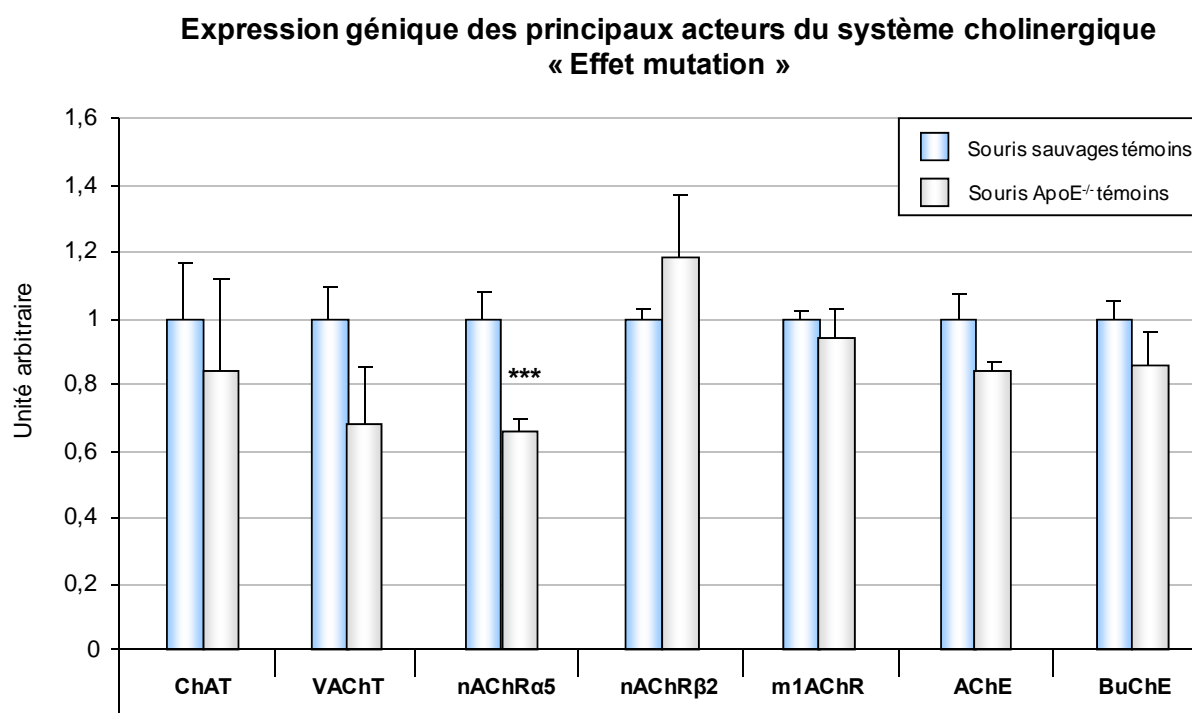


Figure 43 : Représentation graphique des résultats géniques pour les principaux acteurs du système cholinergique chez les souris de génotype sauvage et les souris ApoE^{-/-} non-contaminées

Représentation graphique des résultats d'expression génique ($n=10$) des principaux acteurs du système cholinergique chez les souris sauvages non contaminées et les souris mutées après 3 mois d'hébergement dans notre animalerie. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student. Les valeurs significatives sont représentées par : *** $p < 0,001$.

Les dosages du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE ne diffèrent pas significativement entre les souris sauvages et les souris mutées (Figure 44).

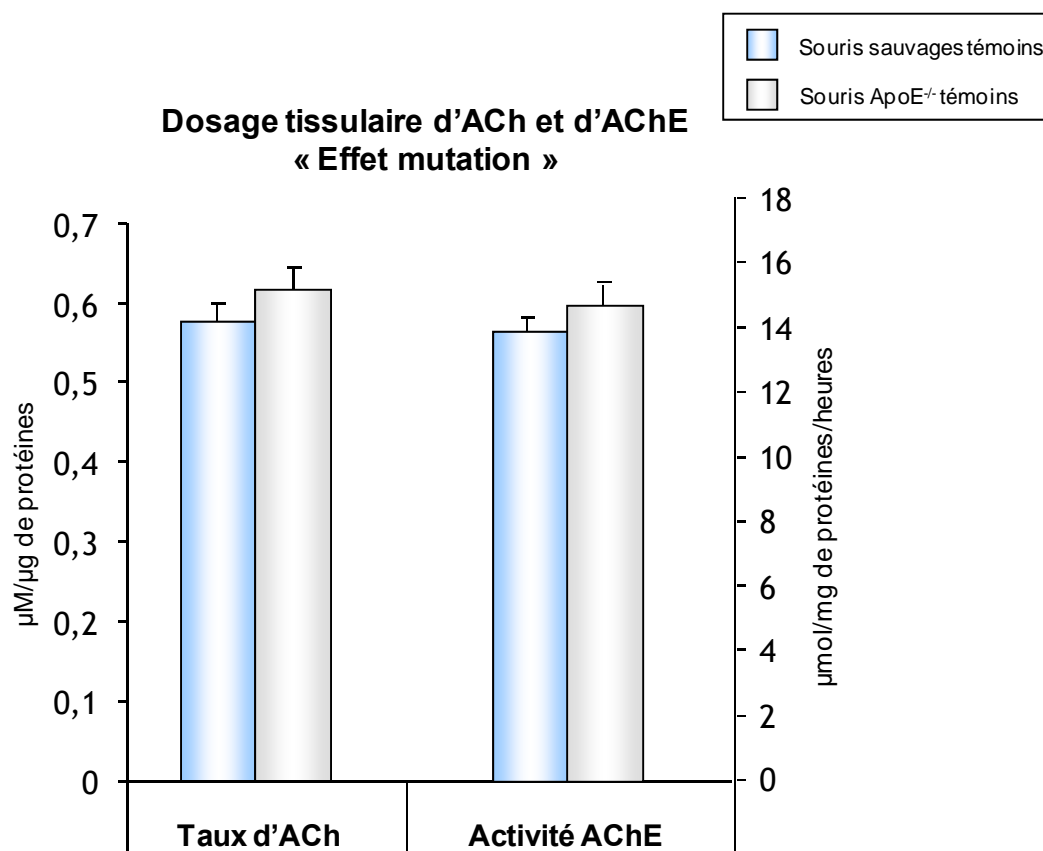


Figure 44 : Représentation graphique du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE chez les souris de génotype sauvage et les souris ApoE^{-/-} non-contaminées

Représentation graphique du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE (n=10) chez les souris sauvages non-contaminées et les souris mutées non-contaminées après 3 mois d'hébergement dans l'animalerie. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student.

Le dosage plasmatique des cholinestérases montre que l'activité des cholinestérases est augmentée de 18% ($p < 0,001$) chez les souris mutées par rapport aux souris sauvages (Figure 45).

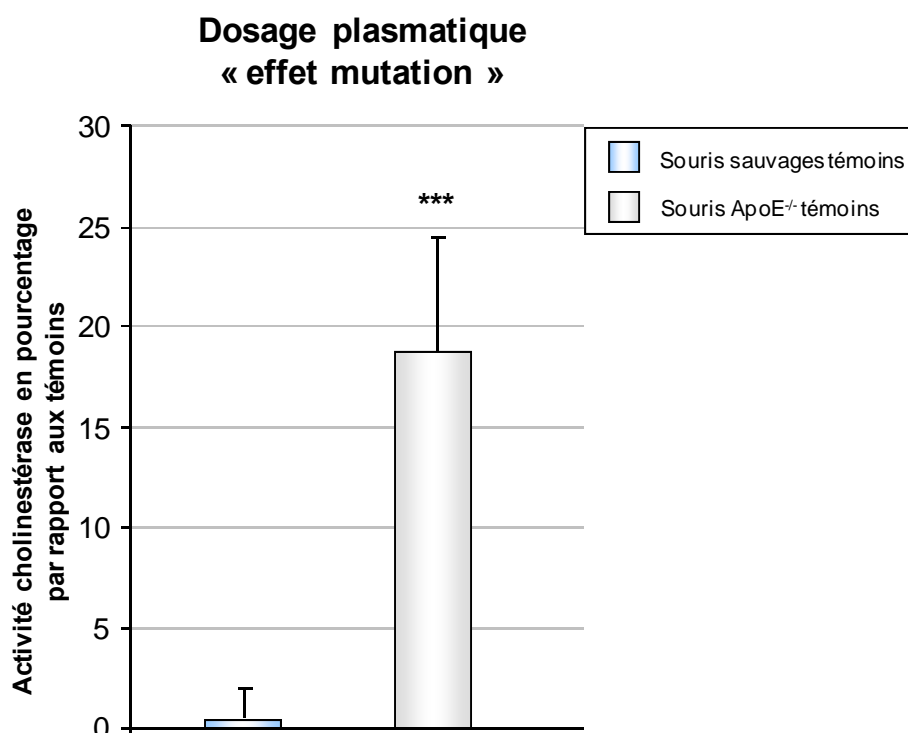


Figure 45 : Représentation graphique de l'activité des cholinestérases plasmatiques chez les souris de génotype sauvage et les souris ApoE^{-/-} non-contaminées

*Représentation graphique de l'activité des cholinestérases plasmatiques (n=10) chez les souris sauvages non-contaminées et les souris mutées non-contaminées après 3 mois d'hébergement dans l'animalerie. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student. Les valeurs significatives sont représentées par : *** $p < 0,001$.*

b) Modifications dues à la contamination

Il s'agit de la comparaison entre les souris mutées non-contaminées et les souris mutées contaminées.

Parmi les différents acteurs du métabolisme du système cholinergique, seule l'expression génique des deux enzymes de dégradation de l'acétylcholine est augmentée, +13% ($p < 0,05$) pour l'AChE et +46% ($p < 0,01$) pour la BuChE, chez les souris mutées contaminées à l'uranium par rapport aux souris mutées non-contaminées. Les autres protagonistes du système cholinergiques (ChAT, VAcHT, nAChR α 5, nAChR β 2, m1AChR) ne sont pas modifiés par la contamination à l'uranium (Figure 46).

**Expression génique des principaux acteurs du système cholinergique
« Effet contamination »**

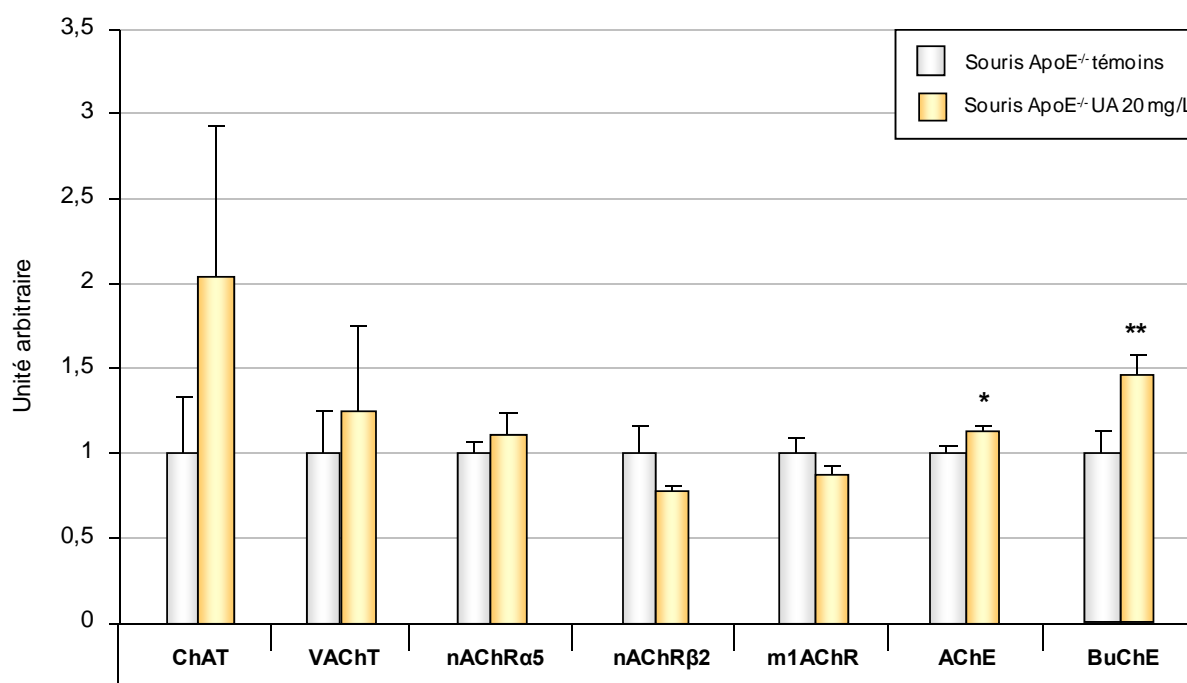


Figure 46 : Représentation graphique des résultats géniques pour les principaux acteurs du système cholinergique chez les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées

Représentation graphique des résultats d'expression génique (n=10) des principaux acteurs du système cholinergique chez les souris mutées après 3 mois de contamination à l'UA 20 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student. Les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Les dosages du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE sont équivalents chez les souris mutées non-contaminées et les souris mutées contaminées à l'uranium (Figure 47).

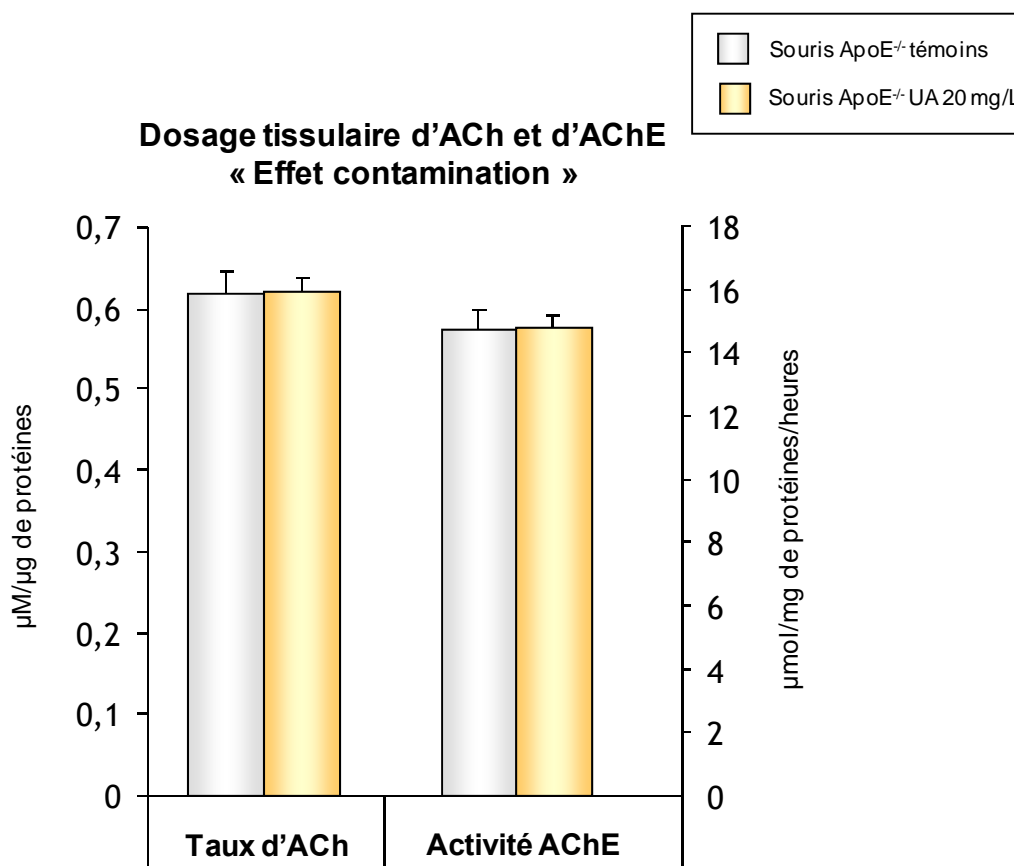


Figure 47 : Représentation graphique du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE chez les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées

Représentation graphique du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE (n=10) chez les souris mutées non-contaminées et les souris mutées contaminées après 3 mois de contamination à l'UA 20 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student.

L'activité des cholinestérases plasmatiques des souris ApoE contaminées à l'uranium n'est pas significativement différente des celle des souris non-contaminées (Figure 48).

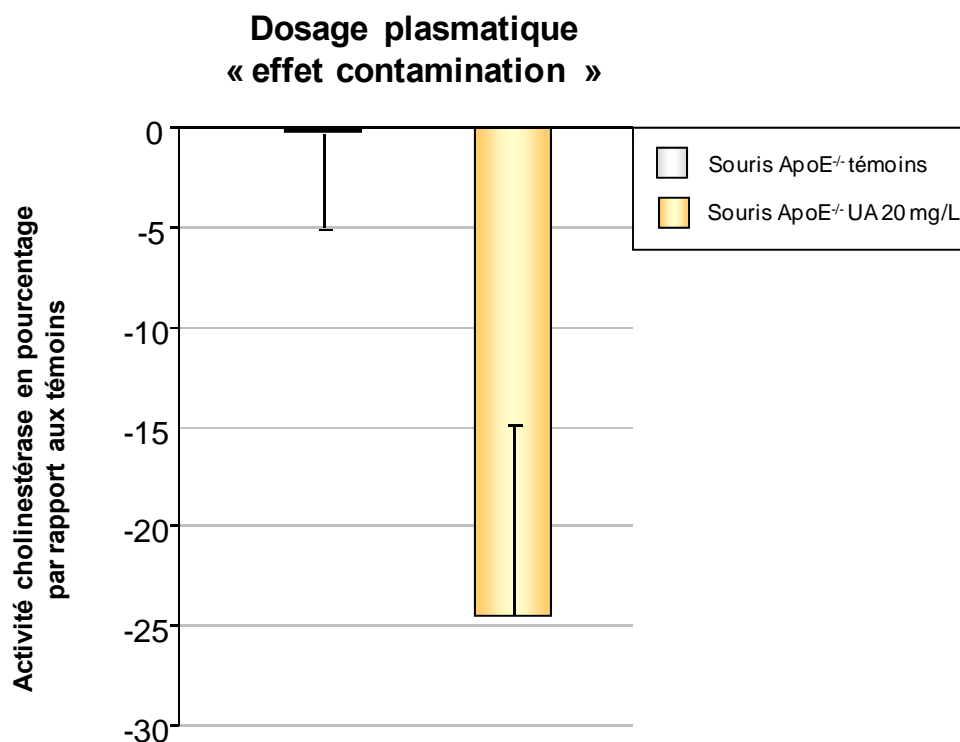


Figure 48 : Représentation graphique de l'activité des cholinestérases plasmatiques chez les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées

Représentation graphique de l'activité des cholinestérases plasmatiques (n=10) chez les souris mutées non-contaminées et les souris mutées contaminées après 3 mois de contamination à l'UA 20 mg/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student.

4) Tests comportementaux

a) Mémoire à court terme

Les résultats sont présentés dans la Figure 49.

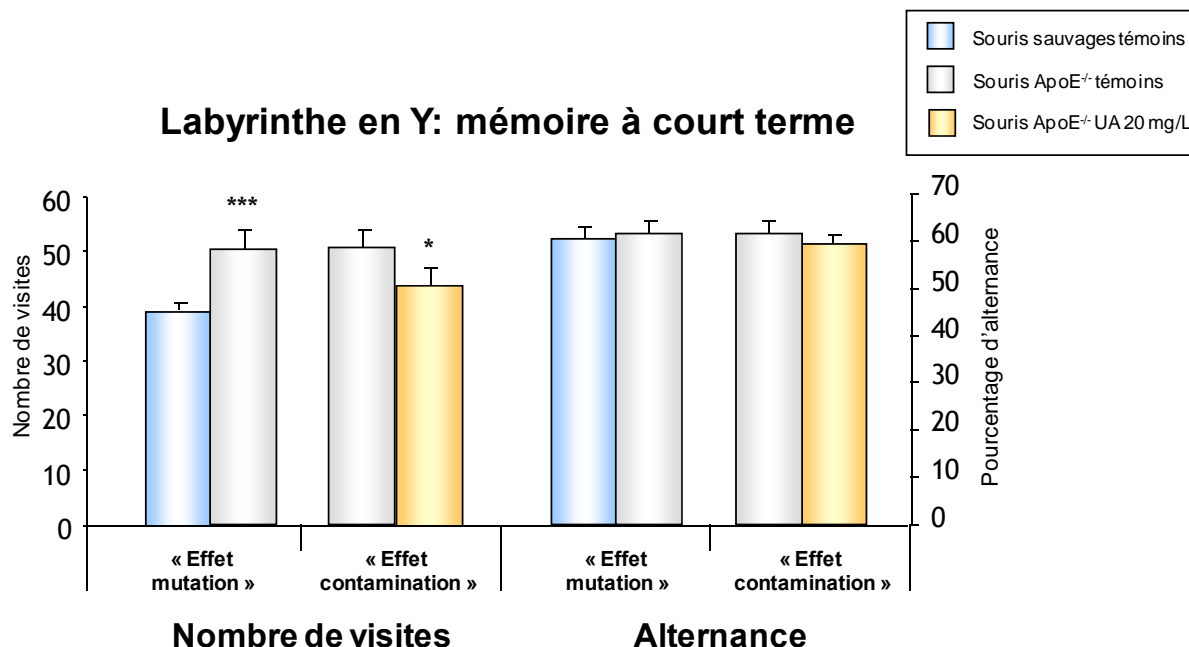


Figure 49 : Représentation graphique des résultats du test de mémoire à court terme chez les souris de génotype sauvage non-contaminées, les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées

Représentation graphique du nombre de visites et de l'alternance dans les trois branches du labyrinthe en Y chez les souris sauvages non-contaminées et les souris mutées non-contaminées après 3 mois d'hébergement dans l'animalerie et chez les souris mutées non-contaminées et les souris mutées contaminées pendant 3 mois à l'UA 20 mg/L (n=15). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student. Les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

i) Modifications dues à la mutation

Le nombre de visites, dans les différentes branches du labyrinthe, effectuées par les animaux mutés non-contaminés à l'UA est significativement supérieur (+29%, $p < 0,001$) au nombre de visites effectuées par les animaux sauvages. Ceci suggère une activité locomotrice plus importante des souris mutées par rapport aux souris sauvages.

Le pourcentage d'alternance entre les différentes branches du labyrinthe est équivalent entre les souris sauvages et les souris ApoE^{-/-} non-contaminées. Ceci suggère, qu'à cet âge, la mémoire à court terme n'est pas altérée par la mutation.

ii) Modifications dues à la contamination

Les souris contaminées ont effectué un nombre de visites, dans les différentes branches, significativement moins important (-14%, $p < 0,05$) que les souris mutées non-contaminées. Ceci suggère que la contamination des souris mutées est à l'origine d'une diminution d'activité de ces dernières par rapport aux souris mutées non-contaminées à l'UA.

Par ailleurs, le pourcentage d'alternance dans les différentes branches n'est pas modifié par la contamination. Ceci suggère que la contamination à l'UA n'induit pas, dans ce modèle de souris ApoE^{-/-}, de déficit de la mémoire de travail.

b) Mémoire à moyen terme

Les résultats sont présentés dans la [Figure 50](#)

i) Modifications dues à la mutation

En première session, les souris sauvages et les souris mutées non-contaminées passent autant de temps sur les deux objets.

En seconde session, les souris sauvages et mutées non-contaminées passent autant de temps sur les deux objets.

ii) Modifications dues à la contamination

En première session, les souris mutées non-contaminées et les souris mutées contaminées à l'UA passent autant de temps sur les deux objets.

En seconde session, les souris mutées non-contaminées et mutées contaminées à l'UA passent autant de temps sur les deux objets.

Ces résultats suggèrent que les 3 groupes de souris (sauvages non-contaminées, ApoE^{-/-} non-contaminées et ApoE^{-/-} contaminées) n'ont pas reconnu l'objet présenté en première session.

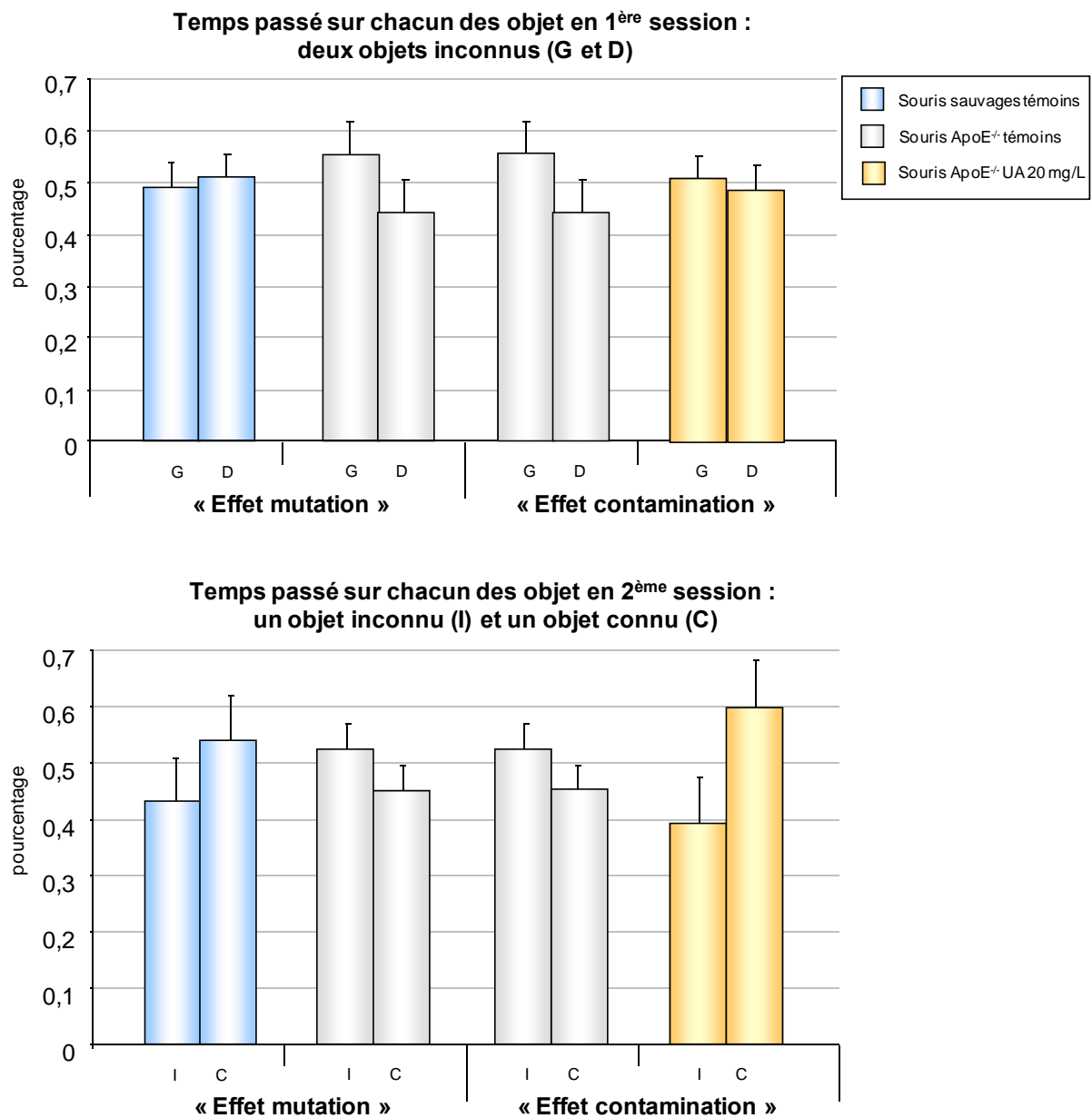


Figure 50 : Représentation graphique des résultats du test de mémoire à moyen terme chez les souris de génotype sauvage non-contaminées, les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées

Représentation graphique du pourcentage de temps passé à explorer chacun des objets présentés aux souris sauvages non-contaminées et aux souris mutées non-contaminées après 3 mois d'hébergement dans l'animalerie et aux souris mutées non-contaminées et aux souris mutées contaminées pendant 3 mois à l'UA 20 mg/L (n=15). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student.

c) Activité locomotrice et exploratrice

Les résultats sont présentés dans la [Figure 51](#)

i) Modifications dues à la mutation

Aucune modification du nombre de redressements ou du nombre de mouvements n'a été enregistrée chez les souris ApoE^{-/-} par rapport aux souris sauvages. Ceci suggère que la mutation n'affecte ni le système locomoteur, ni l'activité exploratrice des animaux.

ii) Modifications dues à la contamination

La contamination à l'uranium des souris mutées n'induit pas de modification du nombre de redressements ou du nombre de mouvements par rapport aux souris mutées non-contaminées. Ainsi, l'uranium ne semble pas affecter les capacités locomotrices et exploratrices des souris ApoE^{-/-}

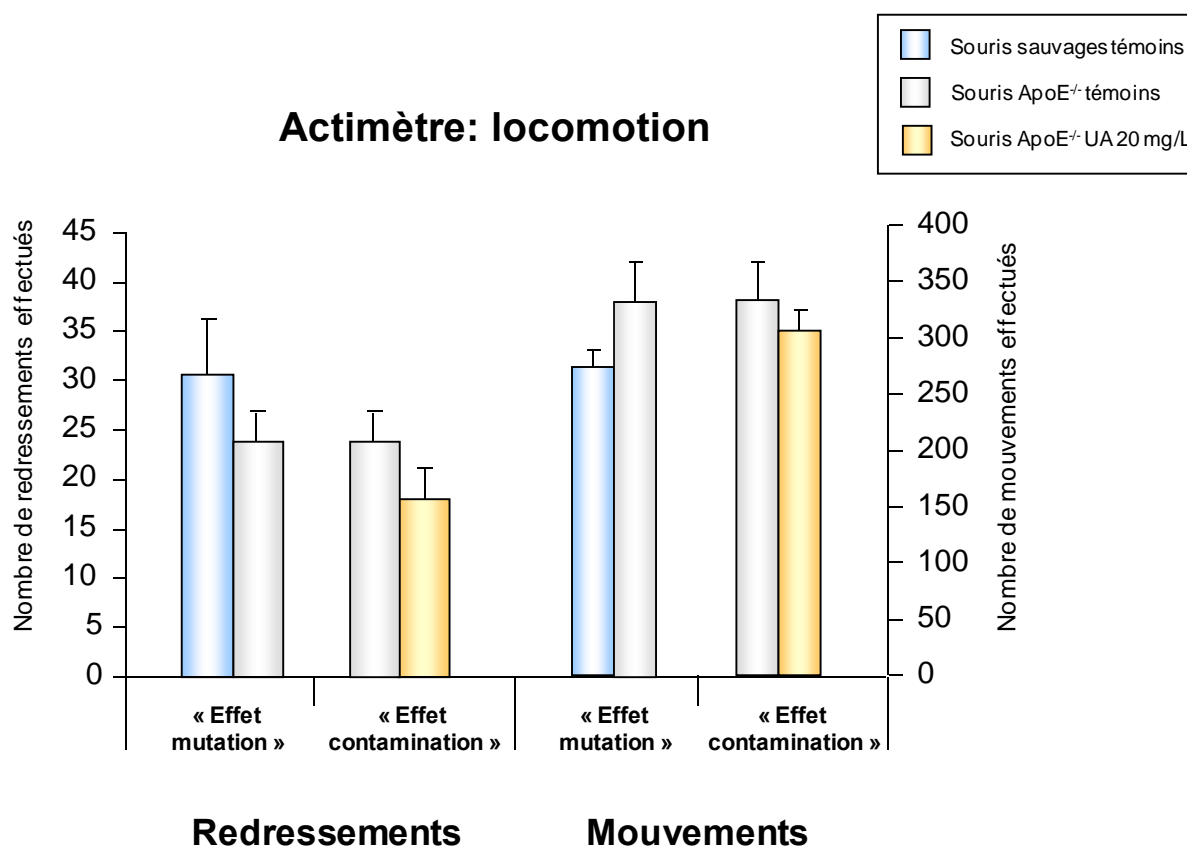


Figure 51 : Représentation graphique des résultats du test de mesure de l'activité locomotrice et exploratoire chez les souris de génotype sauvage non-contaminées, les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées

Représentation graphique du nombre de redressements et de mouvements effectués par les souris sauvages non-contaminées et les souris mutées non-contaminées après 3 mois d'hébergement dans l'animalerie et par les souris mutées non-contaminées et les souris mutées contaminées pendant 3 mois à l'UA 20 mg/L (n=15). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student.

d) Etat de type « anxiété »

Les résultats sont présentés dans la [Figure 52](#)

i) Modifications dues à la mutation

Les souris ApoE^{-/-} non-contaminées passent un temps équivalent à celui des souris de phénotype sauvage dans chacune des parties du labyrinthe en croix. **La mutation n'affecte pas l'état de type « anxiété » des souris.** Cependant, le nombre de visites dans les branches fermées est augmenté pour les souris ApoE^{-/-} non-contaminées par rapport aux souris de génotype sauvage (non-contaminées). Ce résultat suggère une augmentation de l'activité locomotrice des animaux.

ii) Modifications dues à la contamination

Le temps passé dans chacune des parties du labyrinthe en croix est équivalent entre les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées. **La contamination à l'uranium ne semble pas perturber l'état de type « anxiété » des animaux.** Par ailleurs, le nombre de visites dans les différentes branches du labyrinthe est équivalent pour les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et pour les souris ApoE^{-/-} contaminées.

Labyrinthe en croix: anxiété

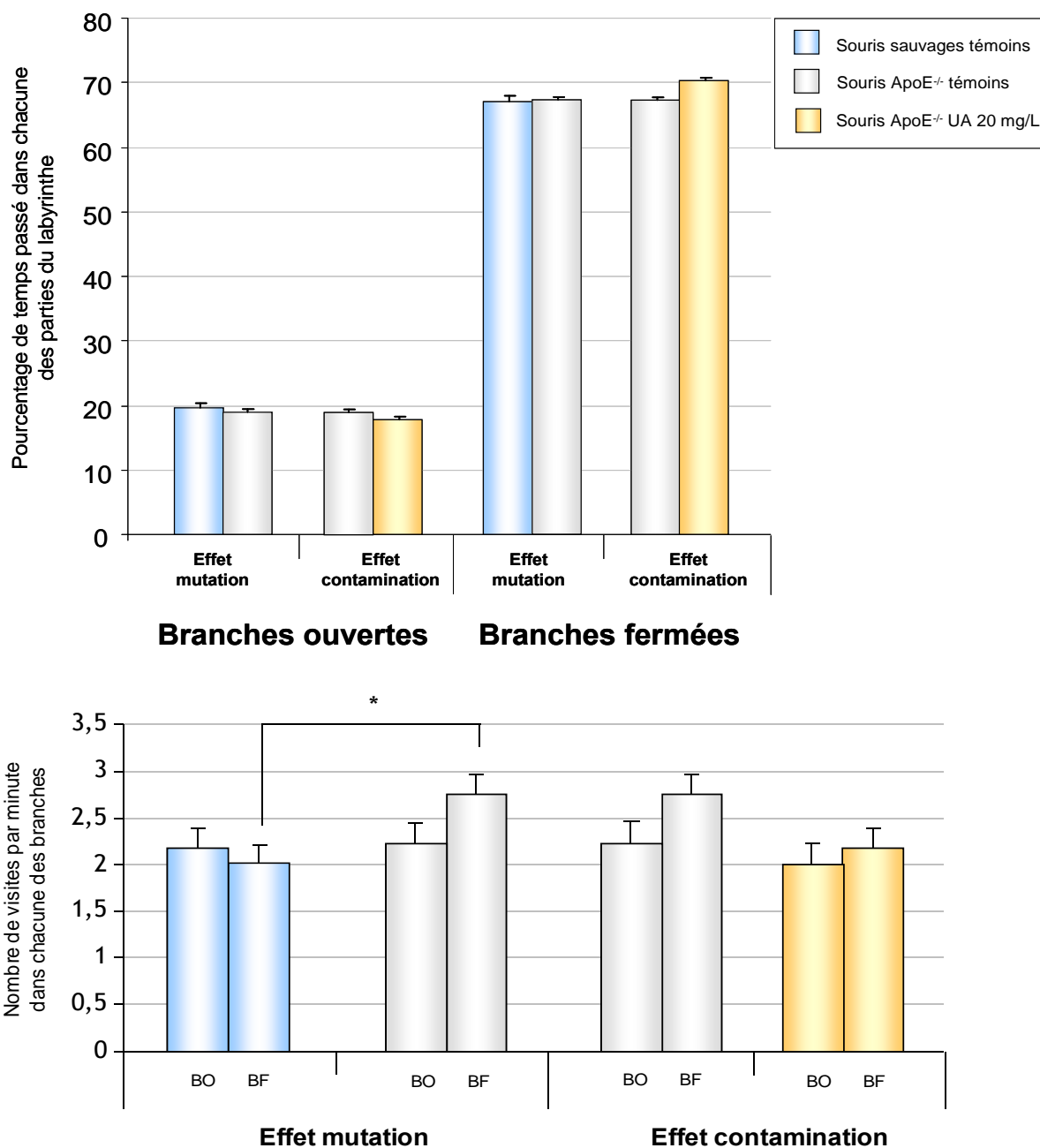


Figure 52 : Représentation graphique des résultats du test de mesure de l'état « anxieux » chez les souris de génotype sauvage non-contaminées, les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées

En haut : représentation graphique du pourcentage de temps passé dans les branches ouvertes ou fermées du labyrinthe en croix surélevé par les souris de génotype sauvage, les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées à l'UA 20 mg/L pendant 3 mois (n=15).

En bas : représentation graphique du nombre de visites effectuées dans chacun des bras du labyrinthe en croix surélevé par les souris de génotype sauvage, les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées à l'UA 20 mg/L pendant 3 mois (n=15).

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de Student. Les valeurs significatives sont représentées par : * p < 0,05.

e) Indice de dépression

Les résultats sont présentés dans la [Figure 53](#)

i) Modifications dues à la mutation

Il n'y a pas de différence significative observée entre les souris mutées et les souris de souche sauvage sur le temps d'immobilité passé dans la piscine. **La mutation n'affecte pas la résignation des animaux.**

ii) Modifications dues à la contamination

Les souris mutées contaminées passent autant de temps immobiles dans la piscine que les souris mutées non-contaminées. **La contamination à l'UA ne modifie pas le comportement dit de « dépression » des animaux.**

Nage forcée: résignation-dépression

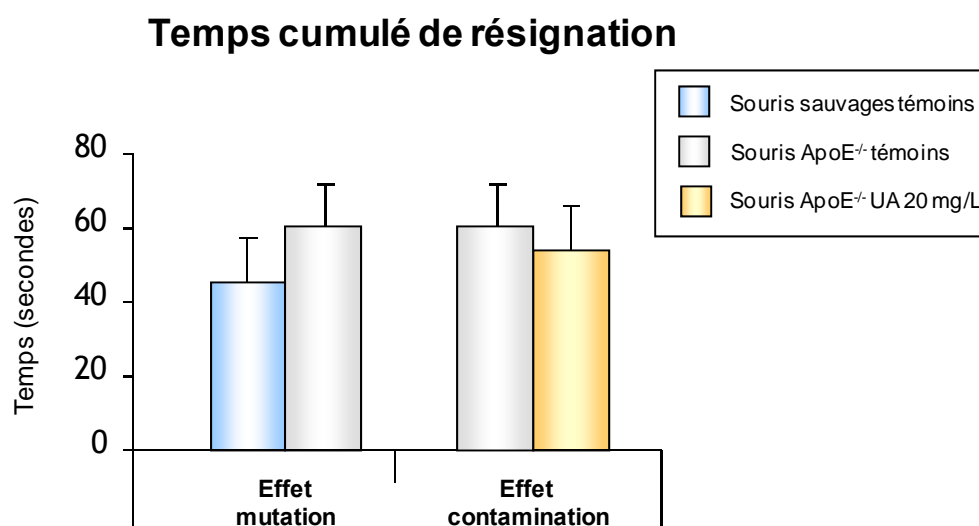


Figure 53 : Représentation graphique des résultats du test de mesure de l'état dit de « dépression » chez les souris de génotype sauvage non-contaminées, les souris ApoE^{-/-} non-contaminées et les souris ApoE^{-/-} contaminées

Représentation graphique du temps d'immobilisation dans la piscine par les souris sauvages non-contaminées et les souris mutées non-contaminées après 3 mois d'hébergement dans l'animalerie et par les souris mutées non-contaminées et les souris mutées contaminées pendant 3 mois à l'UA 20 mg/L (n=15). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de Student.

D. Etude et analyse des résultats

La contamination des rats depuis la naissance avec l'UA provoque des perturbations de la croissance avec une diminution de la prise de poids des animaux. Cet effet est dose dépendant puisque moins important lors d'une exposition à l'UA 10 mg/L par rapport à une exposition à l'UA 40 mg/L. L'effet toxique de l'uranium est donc très important chez le rat juvénile. Toutefois, ce résultat n'a pu être confirmé lors de l'exposition à l'UA 40 mg/L pendant 9 mois. Cette différence de réponse de l'organisme entre les expérimentations suggère un rôle important de la sensibilité inter-individuelle.

Lors des études menées sur le métabolisme du système cholinergique chez les rats juvéniles, l'effet structure-dépendant de la contamination à l'uranium apparaît. Ainsi la discussion sera, comme lors de l'expérience précédente sur les rats adultes, scindée en deux : discussion des effets sur l'hippocampe puis sur le cortex.

L'hippocampe est peu perturbé par la contamination à l'uranium. Deux mois d'exposition à l'UA (40 mg/L) ne sont à l'origine que de quelques perturbations d'expression génique notamment avec une augmentation d'expression de l'enzyme de synthèse de la choline (PLD1) et d'un récepteur muscarinique (m1AChR). Une exposition plus prolongée (4 mois à 40mg/L) perturbe également l'expression génique de la synthèse de choline et des récepteurs cholinergiques, cependant l'impact de la contamination est plus important qu'à 2 mois d'exposition puisque les 2 enzymes de synthèse de la choline sont activées (PLD1 et PLD2) ainsi que 2 types de récepteurs (nAChR β 2 et m1AChR). Une diminution de l'expression du gène de l'AChE est également à noter. Ceci montre une activation du système face à la contamination. Cette activation est dose-dépendante puisque que la contamination de 4 mois à 10 mg/L n'affecte plus que l'enzyme de synthèse de la choline (PLD2). Enfin, les 9 mois de contamination à l'UA (40 mg/L) provoquent une forte inhibition du système avec une régulation négative de l'expression génique des transporteurs (VAcHT, CHT), d'un sous-type de récepteur (nAChR α 5), de l'enzyme de dégradation (AChE) et d'un récepteur au NGF (p75^{NTR}). Ces résultats, opposés à ceux obtenus à 2 ou 4 mois d'exposition à l'UA, montrent que l'hippocampe est plus atteint par la contamination lorsqu'elle est prolongée. Néanmoins, la fonction cholinergique est maintenue dans l'hippocampe après 2, 4 et 9 mois de contamination à l'UA 40 mg/L et après 4 mois de contamination à l'UA 10 mg/L.

Le cortex, après 2 mois de contamination à l'UA (40 mg/L), voit l'expression de quelques uns de ses gènes chuter (PLD1, nAChR α 5, TrkA), ainsi que son taux d'acétylcholine et l'activité de son AChE. L'uranium perturbe le système dans sa globalité puisque la fonction

cholinergique n'a pu être maintenue. A 4 mois d'exposition (40 mg/L), le système semble « réagir » puisqu'on note une forte augmentation d'expression de nombreux gènes (notamment ceux dont l'expression était en chute après 2 mois d'exposition à l'UA 40 mg/L) avec un retour à la normale de l'activité de l'AChE et un rebond du taux d'acétylcholine. Cette réponse est, comme pour l'hippocampe, dose-dépendante puisque le même type de résultats, mais avec une amplitude moindre, est obtenu après 4 mois d'exposition à 10 mg/L d'UA. Après 9 mois d'exposition à l'UA (40 mg/L), les variations d'expression génique sont moins nombreuses et s'orientent vers une diminution de la synthèse d'ACh (chute de la ChAT et du VAcHT). **Le cortex semble avoir trouvé un « équilibre compensatoire » lui permettant de maintenir sa fonction cholinergique.**

En conclusion, ces résultats montrent que la réactivité et l'atteinte de l'hippocampe et du cortex cérébral diffèrent énormément. Etant donné qu'il n'y a pas d'accumulation de l'uranium dans l'hippocampe et le cortex (après 2 mois de contamination), ces différences proviennent d'une sensibilité à l'uranium propre à chacune de ces deux structures cérébrales.

La contamination à l'uranium affecte également le comportement.

Pour l'aspect mnésique, **la mémoire à court terme est légèrement, mais significativement, altérée** chez les rats après 2 mois de contamination à l'UA (10mg/L). Paradoxalement, l'exposition à une quantité plus importante d'uranium (40 mg/L) n'induit pas d'altération de ce type de mémoire. Le système cholinergique de l'hippocampe ne montre que de minimes altérations, uniquement au niveau génique. Cette différence d'effet face aux 2 concentrations d'UA (10 et 40 mg/L) pourrait s'expliquer par une action plus discrète de l'uranium lorsqu'il est en faible quantité. Ces effets délétères mettraient plus de temps à être détectés et palliés. En effet, lors d'expositions plus longues, i.e. à 4 mois, la mémoire de travail est identique chez les sujets contaminés (10 et 40 mg/L) et non-contaminés. La mémoire à moyen terme est perturbée par la contamination à l'UA (40 mg/L) après 2 mois de contamination et n'est pas restaurée après 4 mois d'exposition. Cette altération pourrait-être en partie liée aux perturbations observées dans le cortex où la fonction cholinergique n'est pas maintenue lors de ces deux contaminations (2 et 4 mois de contamination à l'UA 40 mg/L). Cette perturbation, non compensée dans le temps, de la mémoire à moyen terme n'est pas présente lors de la contamination à plus faible concentration d'UA (10 mg/L). **La mémoire à moyen terme est altérée par l'uranium de manière dose-dépendante.**

Sur le plan moteur, lors du test de coordination, les animaux à deux mois d'exposition à 10 ou 40 mg/L montraient une capacité d'adaptation au test moins importante que les rats

témoins. Par contre, après 4 mois d'exposition, les animaux contaminés à 10 mg/L avaient de meilleures capacités d'adaptation au test que les témoins, tandis que les animaux exposés à 40 mg/L avaient des résultats équivalents à ceux des témoins. Une fois de plus ces résultats peuvent être reliés aux perturbations de la fonction cholinergique observées dans le cortex avec un déficit cholinergique à 2 mois pallié après 4 mois d'exposition. Ceci montre une réponse du système face au toxique, cette réponse se met en place entre 2 et 4 mois et permet de compenser certains effets « délétères » de l'uranium.

Concernant la coordination motrice en elle-même, les animaux contaminés pendant 2 mois à l'UA à 10 ou 40 mg/L et pendant 4 mois à l'UA à 10 mg/L sont plus performants que les rats témoins. L'effet de l'uranium disparaît avec le temps pour la plus forte concentration d'UA utilisée puisque les rats exposés 4 mois à 40 mg/L ont des résultats équivalents à ceux des témoins. Par contre, lors de contamination à l'UA 10 mg/L, les effets persistent à 4 mois. Comme précédemment observé pour le test de mémoire à court terme, l'action de l'uranium à 10 mg/L semble plus difficile à déceler ou à contrer pour l'organisme.

Pour les tests reflétant l'état psychique de l'animal, les résultats montrent que les rats sont plus anxieux après deux mois de contamination (10 ou 40 mg/L) que les rats témoins. Au contraire, après 4 mois d'exposition, les animaux sont moins « anxieux » que les animaux non-exposés. De plus, le nombre d'entrées dans les branches ouvertes est supérieur pour les rats contaminés pendant 4 mois à l'UA 10 et 40 mg/L par rapport aux animaux témoins. Cette augmentation du nombre de visites dans les branches ouvertes conduit les rats contaminés (4 mois, UA 10 et 40 mg/L) à entrer indifféremment dans les branches ouvertes ou fermées du labyrinthe. Ceci confirme une apparente diminution de l'état « anxieux » des animaux contaminés. Par ailleurs, les effets dans le temps de l'uranium apparaissent encore comme réversibles et accompagnés d'une « surcompensation » de l'organisme.

L'état de type « dépression » est identique entre les animaux témoins et contaminés, sauf pour les animaux exposés pendant 2 mois à l'UA à 40 mg/L. Par ailleurs, l'activité locomotrice de ces rats est équivalente à celle des rats témoins. L'immobilité moins importante des rats exposés 2 mois à l'UA 40 mg/L n'est donc pas liée à une hyperactivité de l'animal mais plutôt à une forme de combativité plus importante. De nouveau, l'effet de l'uranium est absent lors d'une contamination plus longue (4 mois).

Quant au cycle veille-sommeil, il n'est pas perturbé par les différentes contaminations à l'uranium.

Un parallèle entre les résultats obtenus sur le métabolisme du système cholinergique et les observations comportementales a ainsi pu être effectué. Cependant, un lien direct est difficilement possible de part l'importante implication du système cholinergique dans de nombreux système neuronaux et de part la complexité des mécanismes neuronaux impliqués dans les actions comportementales.

Ces expériences menées sur les rats juvéniles, soulignent la capacité de l'organisme à s'adapter ou à compenser des effets délétères de l'uranium puisque l'impact de la contamination à l'uranium est proportionnel à la dose et inversement proportionnel au temps d'exposition (Figure 54).

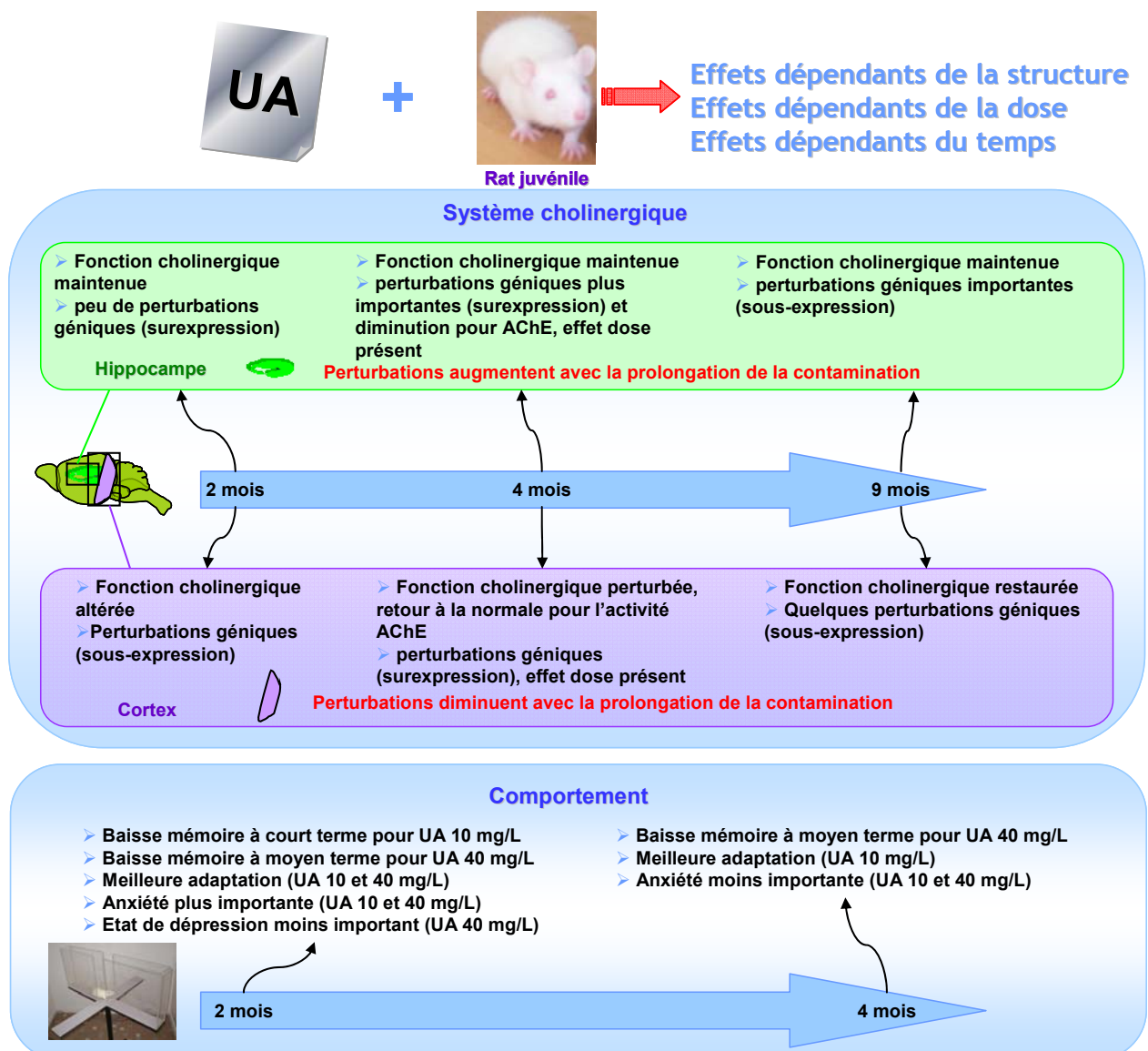


Figure 54 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus chez les rats juvéniles.

Chez les souris ApoE^{-/-}, il est important de déterminer si la mutation ApoE^{-/-} a une incidence sur les acteurs observés du système cholinergique, ainsi que sur les tests comportementaux effectués. En effet, il existe une controverse quant aux effets possibles de la mutation sur la fonction cholinergique et le comportement des souris (Gordon *et al.*, 1995; Anderson and Higgins, 1997; Chapman and Michaelson, 1998; Kleifeld *et al.*, 1998; Krzywkowski *et al.*, 1999; Bronfman *et al.*, 2000; Buttini *et al.*, 2002). Il est donc essentiel de déterminer s'il existe une perturbation de nos souris invalidées pour le gène de l'ApoE à l'âge de 4,5 mois.

Le relevé des paramètres généraux souligne clairement une des pathologies pour lesquelles les souris sont prédisposées (hypercholestérolémie); puisque la prise de poids et la consommation hydrique des animaux mutés sont supérieures à celles des souris de phénotype sauvage.

La caractérisation du modèle montre que les souris mutées ne présentent que peu de modifications du métabolisme cholinergique parmi les gènes et protéines explorés. En effet, la mutation ne serait à l'origine que d'une diminution de l'expression génique de la sous-unité $\alpha 5$ du récepteur nicotinique. Sur le plan comportemental, les souris ApoE^{-/-} ne présentent pas de trouble de la mémoire de travail mais sont plus actives que les souris sauvages avec une augmentation du nombre de branches visitées dans le labyrinthe en Y et dans le labyrinthe en croix surélevé. Cette observation n'est pas en accord avec une étude précédente où les animaux sauvages et ApoE^{-/-} présentaient des résultats identiques pour le test du labyrinthe en Y (Anderson and Higgins, 1997). De plus, cette potentielle augmentation d'activité n'a pas été observée lors du test de mesure de l'activité locomotrice, comme précédemment montré dans la publication d'Anderson *et al.* (Anderson and Higgins, 1997). Cette hyperactivité des souris mutées dans le labyrinthe en Y et en croix ne serait donc pas due à une augmentation de l'activité locomotrice. Il aurait pu s'agir d'une augmentation de l'activité exploratoire des animaux, mais les nombres de redressements des animaux dans l'actimètre, caractérisant l'activité exploratoire, est identique entre les souris sauvages et mutées. Cependant, un état d'anxiété plus important des animaux pourrait expliquer l'hyperactivité des souris mutées par rapport aux souris sauvages, mais cette hypothèse est invalidée par les résultats obtenus lors de test du labyrinthe en croix. L'augmentation d'activité des souris semblerait être une réponse à la stimulation des animaux car l'environnement dans les labyrinthes (dessins différents dans le labyrinthe en Y et ouverture sur la pièce de comportement pour le labyrinthe en croix) est plus riche que dans l'actimètre.

Par ailleurs, les résultats obtenus lors du test de mémoire à moyen terme (reconnaissance d'objet), ne sont pas exploitables. En effet, même si les animaux (sauvages ou mutés) ont montré un intérêt équivalent pour chacun des objets en 1^{ère} session d'exploration ; en 2^{ème} session, ils n'ont apparemment pas reconnu l'objet qui leur avait déjà été présenté puisqu'ils ont passé autant de temps à explorer chacun des deux objets. Cette constatation pourrait signifier un manque de mémoire à moyen terme chez ces animaux, mais les souris sauvages ne devraient pas avoir de déficit mnésique de cet ordre, cette souche étant utilisée en routine pour de nombreux tests comportementaux, y compris mnésiques, comme le montre le grand nombre de publications réalisées sur ce modèle ([Granon et al., 2003](#); [Cressant et al., 2007](#); [Avale et al., 2008](#); [Harvey and Dickenson, 2009](#); [Xu et al., 2009](#)). Il est reconnu que l'enrichissement du milieu des souris est très important pour leur développement cognitif ([Gardner et al., 1975](#)), or le milieu d'élevage de ces souris n'était pas enrichi. Ce biais d'expérimentation pourrait avoir eu une incidence sur les capacités mnésiques de ces animaux. Au niveau psychique, la mutation n'a pas d'effet sur la résignation des souris, et donc n'est pas à l'origine d'un comportement dit de dépression chez ces animaux.

Cette première partie de l'expérience montre que la mutation ApoE^{-/-} a peu d'incidences sur les acteurs du métabolisme cholinergique observés et sur le comportement des souris ([Anderson and Higgins, 1997](#)). La deuxième partie de l'expérience a pour but d'effectuer les mêmes observations sur les souris mutées après 3 mois de contamination à l'UA 20 mg/L afin d'identifier les paramètres perturbés par l'uranium.

L'étude des paramètres généraux de santé (prise de poids, consommation hydrique et alimentaire) ne souligne pas de différence significative entre les souris mutées non-contaminées et les souris mutées contaminées.

La contamination des souris ApoE^{-/-} serait à l'origine d'une augmentation de l'expression génique de l'ACHé et de la BuChE dans le cortex mais la fonction cholinergique de ces souris n'est pas altérée. Toutefois, les perturbations géniques des enzymes de dégradation de l'acétylcholine souligne un effet neurotoxique de l'uranium chez les souris ApoE^{-/-}. Cet effet serait indirect puisqu'il n'y a pas d'accumulation d'uranium dans le cortex. Néanmoins, la contamination de 3 mois à l'UA (20 mg/L) ne provoque pas de dégénérescence du système cholinergique chez les souris ApoE^{-/-} âgées de 4 mois.

Sur le plan comportemental, les animaux contaminés n'ont pas de déficit de la mémoire à court terme. Cependant, ce test a permis de souligner une diminution de leur activité dans le labyrinthe en Y par rapport aux souris mutées non-contaminées. La baisse d'activité n'a pas été confirmée dans le labyrinthe en croix. Par ailleurs, l'activité locomotrice n'est pas

en cause puisque le test de l'actimètre ne révèle aucune différence entre les souris non-contaminées et les souris contaminées. La diminution d'activité des souris dans le labyrinthe en Y pourrait montrer une diminution de la curiosité exploratoire des animaux. Or, d'après les mesures effectuées dans l'actimètre, l'activité exploratoire des animaux n'est pas altérée. La diminution du nombre de visites n'est pas non plus causée par une diminution de l'état d'anxiété des animaux. La baisse d'activité observée chez les souris apparaît sporadique et spécifique du labyrinthe en Y.

Concernant le test de mémoire à moyen terme, les résultats ne peuvent pas être interprétés pour deux raisons. Premièrement, le test n'a pas fonctionné lors de la caractérisation du modèle, et donc nous ne pouvons savoir si les souris mutées non-contaminées ont ou non un déficit mnésique. Or, ces souris mutées non-contaminées servent de témoins pour la contamination. Deuxièmement, les souris mutées non-contaminées et les souris mutées contaminées ont eu des résultats similaires à ceux observés lors de la caractérisation du modèle : pas d'apparente reconnaissance de l'objet présenté lors de la première session. Concernant l'état « psychique » des souris, la contamination ne semble pas influencer le comportement dit de dépression.

De ces résultats, nous pouvons dire qu'une contamination de 3 mois à l'UA (20 mg/L) sur des souris ApoE^{-/-} adultes ne provoque que peu de perturbations métaboliques du système cholinergique et n'accélère pas la cinétique d'apparition des premiers troubles de la mémoire spatiale à court terme. Les activités locomotrice et exploratrice, ainsi que l'état dit de dépression ne sont pas non plus perturbés par la contamination. Par contre, nous ne pouvons conclure concernant la mémoire à moyen terme. En conclusion, **l'uranium ne semble pas avoir d'effet potentialisateur sur les troubles neurodégénératifs auxquels sont prédisposés les souris ApoE^{-/-} après 3 mois de contamination à l'UA 20 mg/l pour des souris de 4,5 mois d'âge en fin d'expérimentation (Figure 55).**

Une comparaison entre le modèle « rats juvéniles » et le modèle « souris ApoE^{-/-} » est délicate pour plusieurs raisons. Premièrement, l'âge de début de contamination est différent alors qu'il est bien connu que le cerveau en plein développement est bien plus sensible aux polluants. La toxicité de l'uranium ne peut avoir le même impact sur un cerveau de nouveau-né et un cerveau adulte. Deuxièmement, la quantité d'uranium ingérée diffère suivant le modèle. Les rats juvéniles sont exposés *per os* à 2 ou 8 mg d'UA/rat/jour, soit 0,5 ou 2 mg d'UA/kg/jour alors que les souris sont exposées à 0,1 mg d'UA/souris/jour, soit à 4mg d'UA/kg/jour. La charge systémique en UA est 2 ou 8 fois plus élevée chez la souris que chez le rat. Les effets de l'uranium sur le modèle juvénile ne peuvent être comparés avec ceux observés sur le modèle de souris ApoE^{-/-}. Néanmoins, une

comparaison pourrait être possible entre les effets observés chez les rats adultes et les souris ApoE^{-/-}.

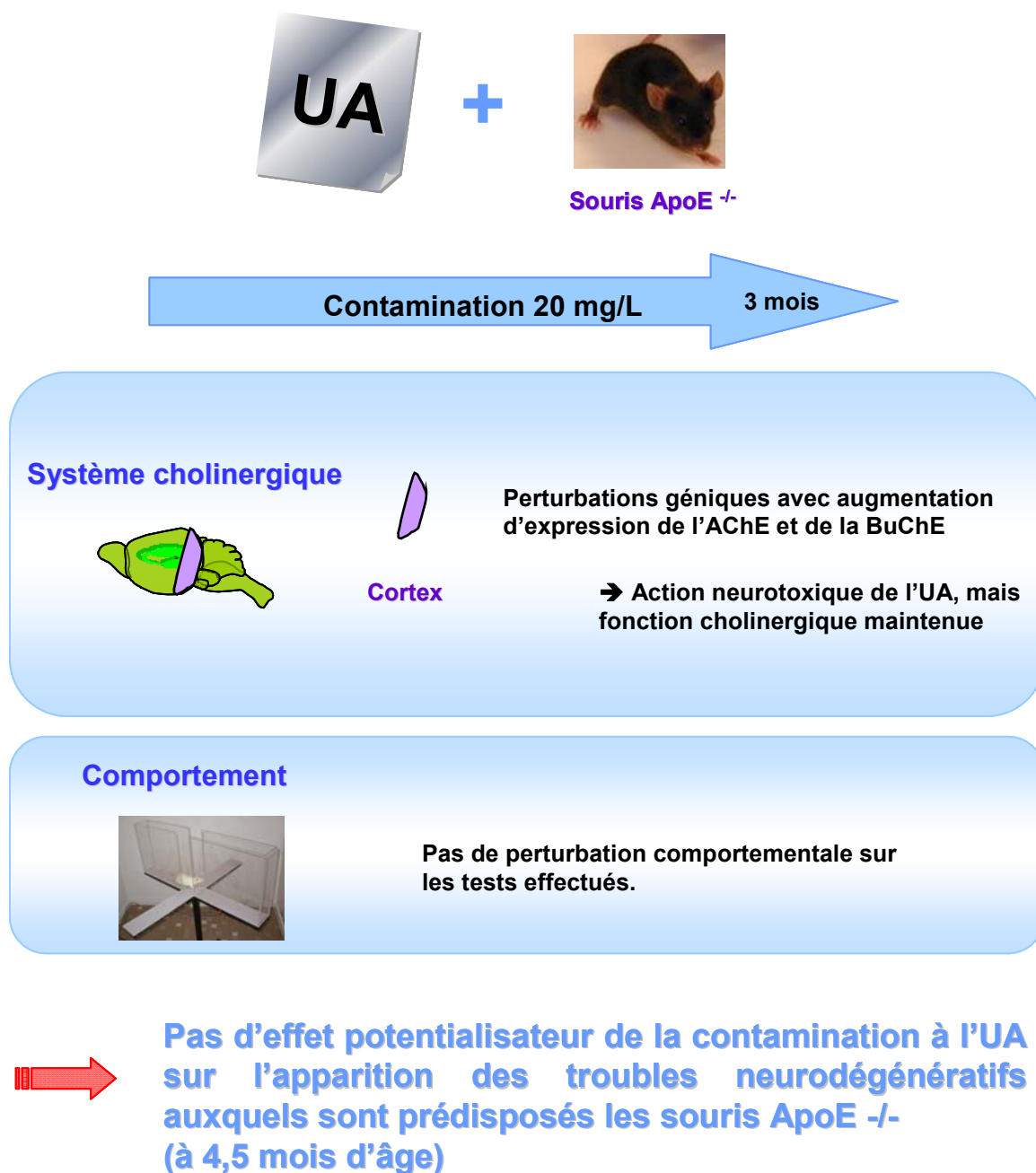


Figure 55 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus chez les souris ApoE^{-/-}.

E. Résumé

L'étude précédente a permis de montrer que le système cholinergique était une cible de l'uranium chez le rat adulte. Dans le but de caractériser ces effets, deux modèles, qualifiés de plus sensibles aux polluants environnementaux, ont été exposés à l'UA.

Le premier est un modèle de rats juvéniles. La contamination à l'UA commence depuis la naissance et se poursuit pendant plusieurs mois. Deux concentrations d'UA ont été choisies afin de pouvoir comparer avec les rats adultes mais aussi de pouvoir observer un éventuel effet dose. Les rats ont été exposés pendant 2 ou 4 mois à l'UA 10 et 40 mg/L ; ou pendant 9 mois à l'UA 40 mg/L.

Le second est un modèle de souris, mutées pour le gène de l'ApoE, prédisposées à une dégénération neuronale. Elles ont été contaminées pendant 3 mois à 20 mg/L d'UA. Le temps de contamination correspond aux prémices d'apparition de la pathologie neuronale chez cette souris et la concentration d'uranium correspond à une dose environnementale ([Juntunen, 1991](#)).

Pour ces deux modèles, une analyse de certains acteurs du système cholinergique, dans l'hippocampe et le cortex pour les juvéniles et uniquement dans le cortex pour les souris ApoE^{-/-}, ainsi que des tests comportementaux ont été réalisés.

Chez les rats juvéniles, l'atteinte de l'hippocampe et du cortex diffère lors d'ingestions d'UA.

L'hippocampe est peu perturbé par une exposition sub-chronique à l'UA et parvient à maintenir sa fonction cholinergique. Toutefois, l'impact de l'UA sur le métabolisme du système cholinergique de l'hippocampe augmente avec le temps d'exposition. A l'inverse, le système cholinergique du cortex se trouve hautement perturbé après 2 mois de contamination à l'uranium avec une fonction cholinergique altérée. Ces effets sur le système cholinergique tendent à disparaître lorsque le temps d'exposition augmente. Le cortex semble ainsi mettre en place un mécanisme de compensation pour maintenir la fonction cholinergique. Ce mécanisme ne se met pas immédiatement en place et ne devient efficace qu'entre 4 et 9 mois de contamination chronique à l'UA.

Par ailleurs, ces deux structures cérébrales sont sensibles à la dose ; les effets observés à 10 mg/L d'UA sont systématiquement moins importants que ceux observés à 40 mg/L d'UA.

Sur le plan comportemental, après 2 mois d'exposition à l'UA 10 mg/L, les rats présentent des déficits de la mémoire à court terme et de la capacité d'adaptation locomotrice

(réponse face à l'augmentation de la vitesse de la roue). Après 4 mois de contamination à l'UA 10 mg/L, la mémoire à court terme est rétablie. L'adaptation locomotrice est également restaurée et apparaît même meilleure que celle des animaux témoins. De plus, les animaux présentent un comportement moins anxieux que les rats témoins.

Les animaux exposés à l'UA 40 mg/L pendant 2 mois présentent des déficits de la mémoire à moyen terme et de l'adaptation locomotrice. Une augmentation de l'état dit d'anxiété et une diminution de l'état dit de dépression ont également été observées chez ces animaux. Après 4 mois de contamination à l'UA 40 mg/L, la mémoire à moyen terme reste altérée et l'adaptation locomotrice est totalement restaurée par rapport aux animaux témoins. L'état de type « anxieux » est diminué et ces rats apparaissent même moins « anxieux » que les animaux témoins. Enfin, l'état dit de dépression est rétabli et est équivalent à celui des rats témoins. Ainsi, ces résultats montrent que le SNC réagit face à la contamination à l'UA. Entre 2 et 4 mois d'exposition, il met en place des mécanismes compensatoires, voire surcompensatoires, afin de préserver l'intégrité des fonctions cognitives des rats.

Pour les souris ApoE^{-/-}, la caractérisation de la mutation a montré qu'elle n'avait pas d'incidence sur le métabolisme du système cholinergique et n'induisait, au niveau comportemental, qu'une augmentation de l'activité des animaux dans les labyrinthes en Y et en croix. Ainsi, ce modèle a été validé pour les études de contamination. Lors de la contamination à l'UA 20 mg/L, les études du métabolisme du système cholinergique ont montré que le système n'était qu'à peine perturbé avec un maintien quasi-total de tous les paramètres étudiés. Sur le plan comportemental, la contamination n'a pas perturbé l'état « psychique » des animaux et n'a pas accéléré la cinétique d'apparition des troubles de la mémoire spatiale à court terme. En conclusion, à 4 mois d'âge et après 3 mois de contamination à l'UA 20 mg/L, les souris ApoE^{-/-} ne présentent pas de signe de neurodégénération du système cholinergique, ni de trouble de la mémoire à court terme. L'uranium ne semble pas avoir d'effet potentialisateur sur ces troubles.

III. Effets de l'uranium sur une lignée cellulaire neuronale humaine, les cellules IMR-32

Comme il a été préalablement démontré, l'UA induit des perturbations du système cholinergique *in vivo*. Les cibles de l'UA varient en fonction de l'âge de l'animal, de la structure cérébrale et du temps de contamination. Cependant, les mécanismes d'action de l'UA sur le métabolisme du système cholinergique restent inconnus.

Même si les résultats précédents montrent que l'UA peut perturber le système cholinergique dans sa quasi globalité, le récepteur muscarinique de type 1 semble particulièrement affecté *in vivo*. Ainsi, le travail suivant sera axé sur les effets de l'UA sur le récepteur muscarinique de type 1.

Afin de comprendre certains de ces mécanismes, une lignée cellulaire neuronale humaine a été mise en contact avec de l'UA.

Ce type cellulaire a été choisi car il présente naturellement les récepteurs cholinergiques sur sa membrane (Clementi *et al.*, 1986). Par contre, il ne possède que peu de vésicules synaptiques. Ce modèle a pour but d'observer les interactions entre l'UA et les récepteurs cholinergiques, mais également de visualiser un éventuel passage de l'UA dans la cellule et son devenir.

A. Caractérisation du modèle pour le récepteur muscarinique de type 1

L'expression des récepteurs cholinergiques est dépendante de la différenciation cellulaire (Rossino *et al.*, 1991; Poongodi *et al.*, 2002). Les premières études menées sur les IMR-32 ont pour but de déterminer la cinétique d'expression du récepteur muscarinique de type 1 en présence de son facteur de différenciation, l'acide rétinoïque à 10 nM (Figure 56).

L'analyse des western-blots montre une tendance à l'augmentation du taux protéique des m1AChR à partir du 7^{ème} jour de différenciation. Toutefois, l'augmentation n'est significative qu'après 12 jours de culture en présence d'acide rétinoïque. La prolongation de la différenciation cellulaire n'a plus d'incidence sur le taux de m1AChR observé entre le 12 et le 15^{ème} jour. Le taux protéique de m1AChR a atteint un plateau. Ceci montre que 12 jours de différenciation par de l'acide rétinoïque à 10 nM suffisent pour obtenir une

expression protéique maximum du récepteur muscarinique de type 1 dans les cellules IMR-32.

Cinétique d'apparition du récepteur muscarinique de type 1 sur les cellules IMR32 en fonction du nombre de jours de différenciation

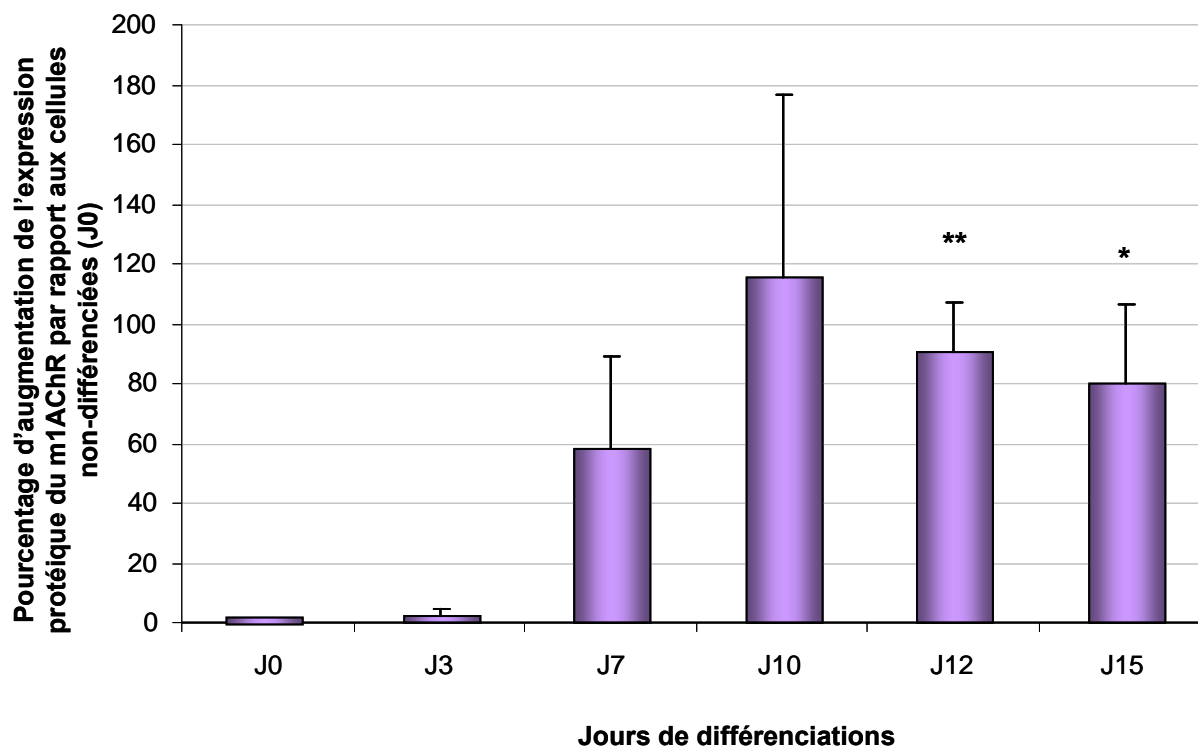


Figure 56 : Représentation graphique de la cinétique d'apparition du m1AChR dans les cellules IMR-32 en fonction du temps de différenciation

*Représentation du taux protéique du récepteur muscarinique de type 1 en fonction du nombre de jours de différenciation cellulaire. La valeur est exprimée en pourcentage d'augmentation par rapport aux cellules non-différenciée (J0). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n= 3). Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student, les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.*

En parallèle, une observation du nombre et de la croissance des neurites a été réalisée (Figure 57).

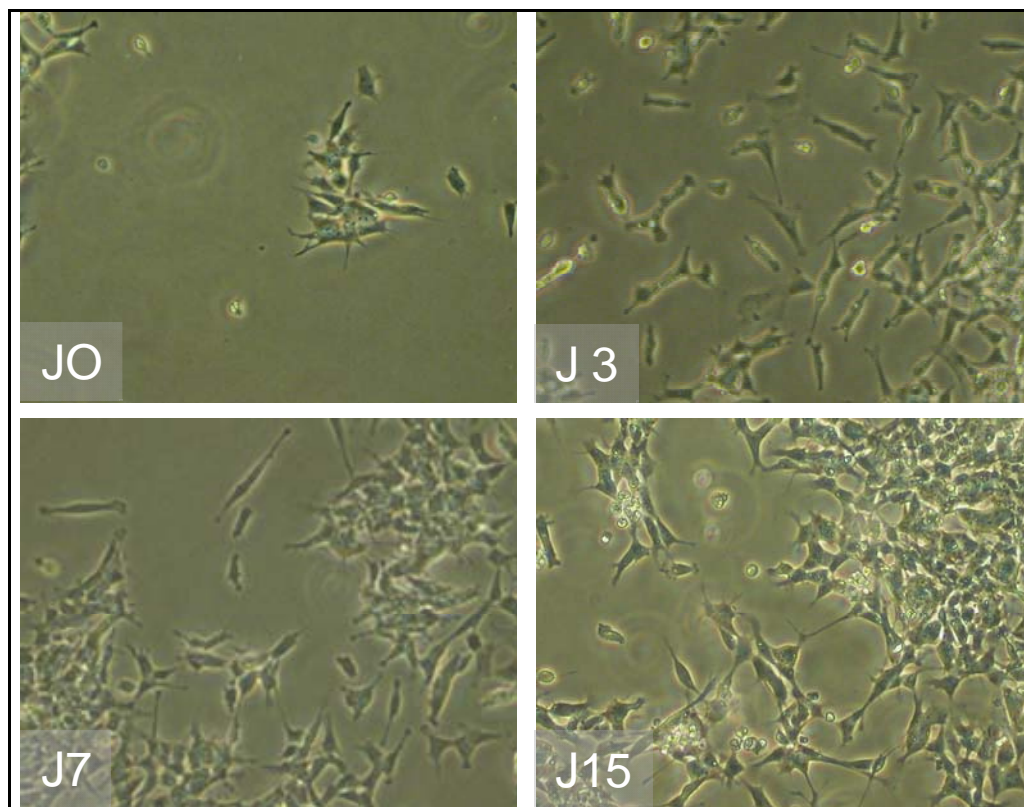


Figure 57 : Photographies des cellules IMR-32 à différents stades de différenciation

Observations par microscopie optique (x100). A J0, les cellules sont peu étalées avec de petits neurites (cellules à passage 8). A J3, les cellules s'allongent mais les neurites restent de taille modérés (cellules à passage 8). A J7, les neurites s'allongent (cellules à passage 8). A J15, les cellules sont interconnectées entre-elles par des neurites étendus (cellules à passage 9).

Les cellules, peu allongées avec des neurites très courts (J0), s'allongent progressivement (J3) lors d'exposition à l'acide rétinoïque. Puis leurs neurites s'étendent (J7) jusqu'à permettre de nombreuses interconnections neuronales (J15).

B. Tests de cytotoxicité

Au vue des premiers résultats de caractérisation des cellules IMR-32, les tests de cytotoxicité ont été effectués après 14 jours de différenciation cellulaire à passage 8 ou 9. Le but de ces tests de cytotoxicité est de déterminer la concentration cytotoxique de l'UA à un temps donné. Ces tests ont été réalisés en présence et en absence de sérum de veau fœtal (SVF). Le SVF apporte des nutriments et des facteurs de croissance nécessaires pour la culture des cellules, mais sa composition exacte est inconnue. Ainsi, lors d'expérimentations, il est généralement ôté des milieux de culture à cause des interactions qu'il pourrait provoquer. Deux types de tests ont été utilisés : le test CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay et le test MTT (sels de tétrazolium). Ces deux tests sont couramment employés afin de mesurer la mortalité ou la viabilité cellulaire (Slater *et al.*, 1963; Berridge and Tan, 1993; Su *et al.*, 2006; Niles *et al.*, 2007). Lors de ces tests, 9 concentrations d'UA différentes (entre 1 et 1000 μM) ont été utilisées, 1 témoin mis dans des conditions de culture normale (T-), 1 témoin mis en présence de bicarbonate à 10 mM (Bicar 10 mM) et 1 témoin de lyse pour estimer une valeur représentant une mortalité à 100 % (T+). Le témoin « Bicar 10 mM » est le témoin du véhicule de l'UA puisque l'UA est dissous, lors de sa préparation, dans du bicarbonate à 10 mM.

Le test CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay mesure l'activité des protéases cellulaires relâchées par la cellule lors de leur perte d'intégrité membranaire, on quantifie ainsi la mortalité cellulaire.

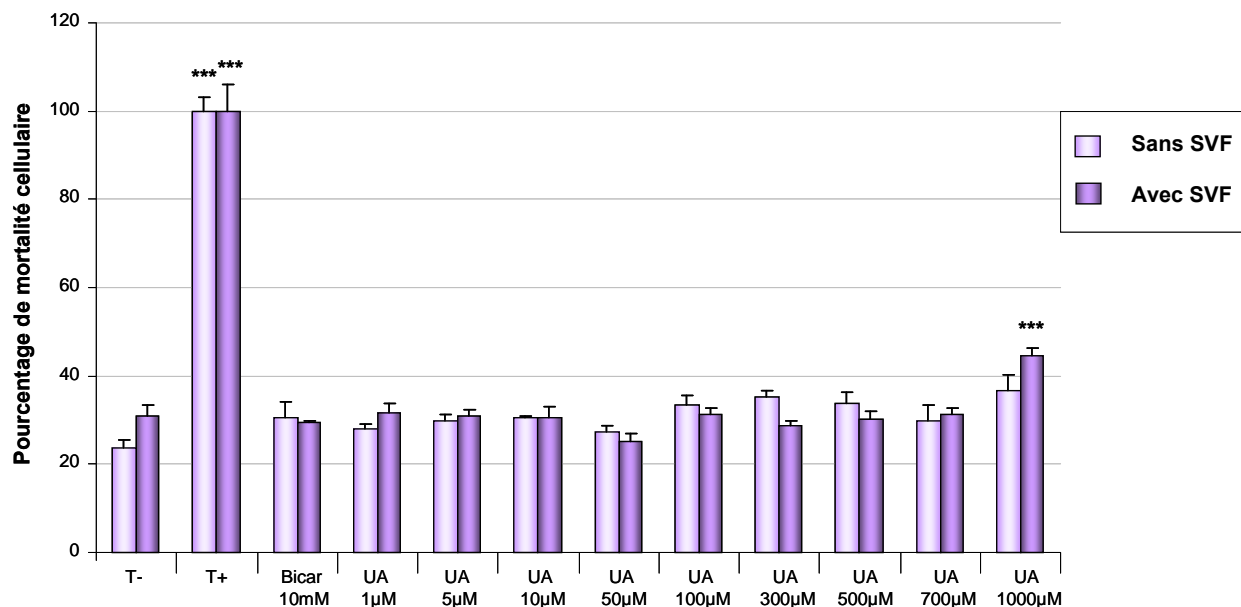
A 4 h, la mortalité cellulaire est très faible dans toutes nos conditions, avec des valeurs de mortalité équivalentes entre les cellules contaminées à l'UA et les cellules témoins sauf pour l'exposition à 1000 μM des cellules en présence de SVF. Dans cette condition, une cytotoxicité de l'UA sur les cellules IMR-32 apparaît. Toutefois, aucune différence significative n'est observée entre les cellules déprivées en SVF et les cellules cultivées en présence de SVF.

A 24 h, la mortalité cellulaire augmente à des concentrations d'UA supérieures ou égale à 500 μM , et semble plus importante en présence de SVF qu'en absence de SVF. Ainsi, le seuil de cytotoxicité de l'UA apparaît à des valeurs supérieures ou égales à 500 μM sur les cellules en présence ou non de SVF. Par ailleurs, une différence significative est observée entre les cellules déprivées en SVF et les cellules cultivées en présence e SVF.

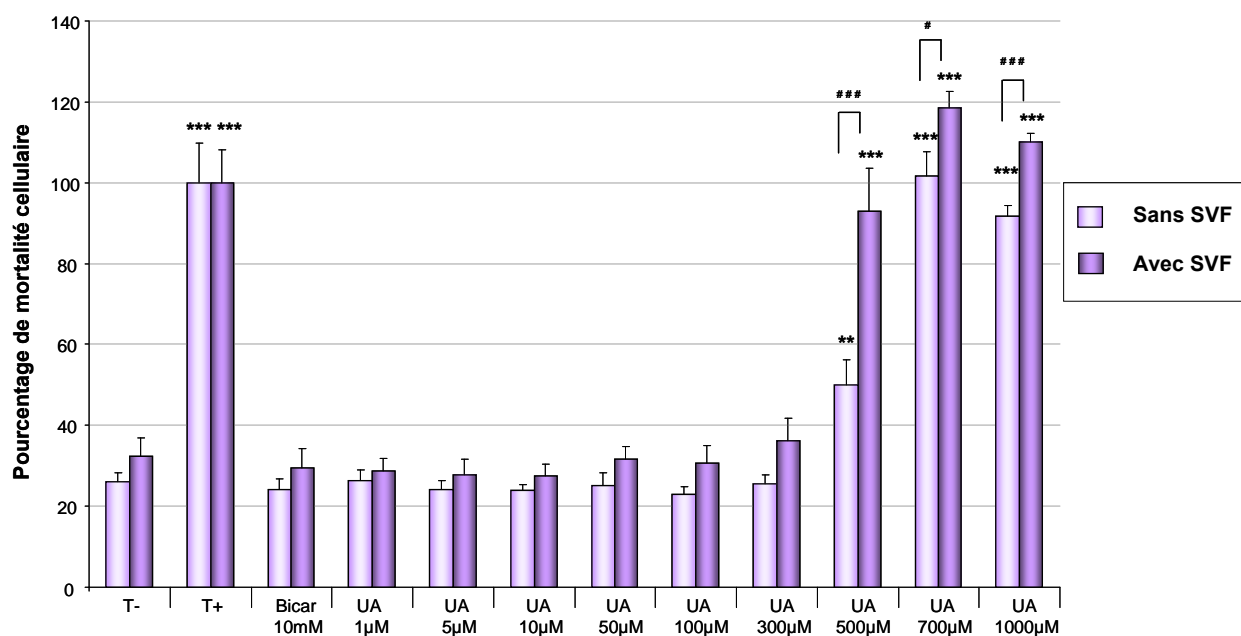
A 48 h, la mortalité cellulaire basale est très importante. Toutefois, une action cytotoxique de l'UA à partir d'une concentration de 300 μM sur les cellules en présence de

SVF est observée. Les cellules déprivées en SVF présentent une cytotoxicité dès la concentration de 500 μM d'UA. Une différence significative est observée entre les cellules déprivées en SVF et les cellules cultivées en présence de SVF pour des concentrations en UA de 700 μM et 1000 μM (Figure 58).

Mortalité cellulaire à 4 h



Mortalité cellulaire à 24 h



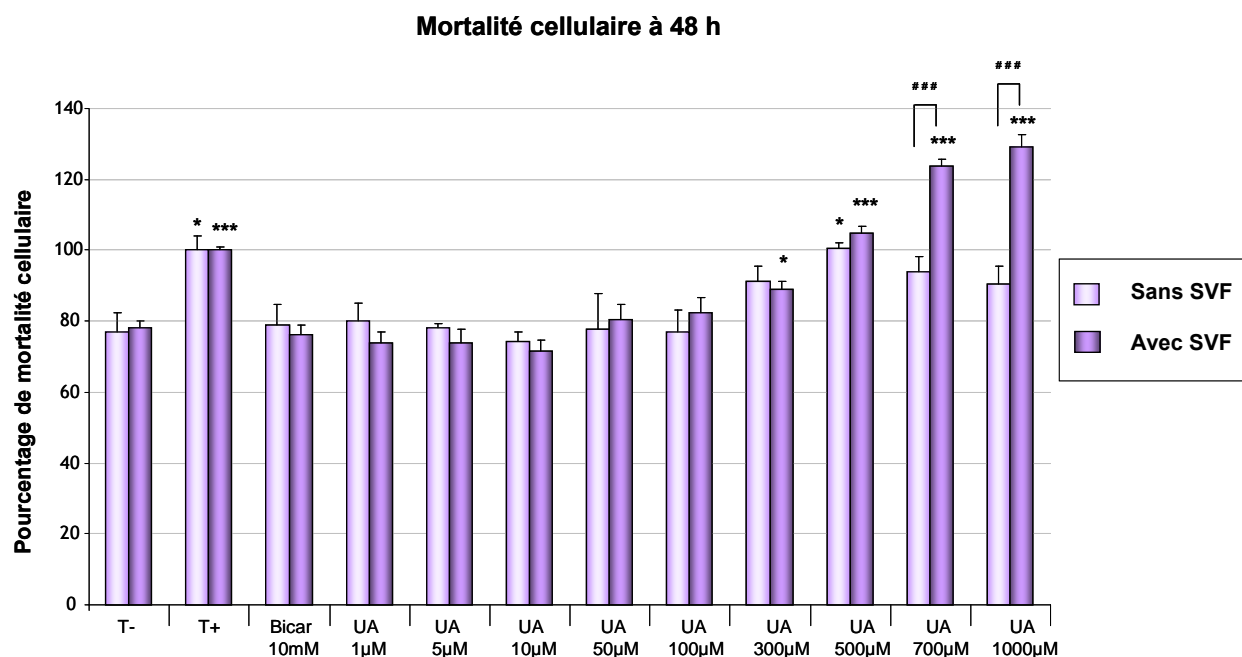


Figure 58 : Représentation graphique de la mortalité cellulaire après incubation de 4, 24 ou 48 h en présence différentes concentrations de nitrate d'uranylé

Représentation de la mortalité cellulaire après 4 h, 24 h ou 48 h d'incubation en présence de concentrations croissantes d'UA ($n=4$, Passage 9). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM avec T-, cellules en présence de leur milieu ; T+, cellules en présence de tampon de lyse ; Bicar 10 mM, cellules en présence de bicarbonate à 10 mM ; UA 1 μ M, cellules en présence d'UA appauvri à 1 μ M ; etc. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student par rapport aux cellules en présence de bicarbonate pour les comparaisons des différentes conditions, les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Les comparaisons entre les cellules incubées avec ou sans SVF ont été effectuées avec un test two-way ANOVA complété par la méthode de Holm-Sidak, les valeurs significatives sont représentées par : # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$

En conclusion de ce test de cytotoxicité, le temps choisi pour les expériences ultérieures sera de 24 h. En effet, à 4 h les cellules ne sont pas encore soumises à l'action cytotoxique de l'UA et à 48 h les cellules sont fragilisées par un milieu appauvri en nutriments induisant une mortalité basale trop importante.

Les résultats de viabilité obtenus pour le test MTT à des concentrations de nitrate d'uranyle dans le milieu allant de 1 à 1000 μM pendant 24 h sont représentés dans le graphique suivant (Figure 59) :

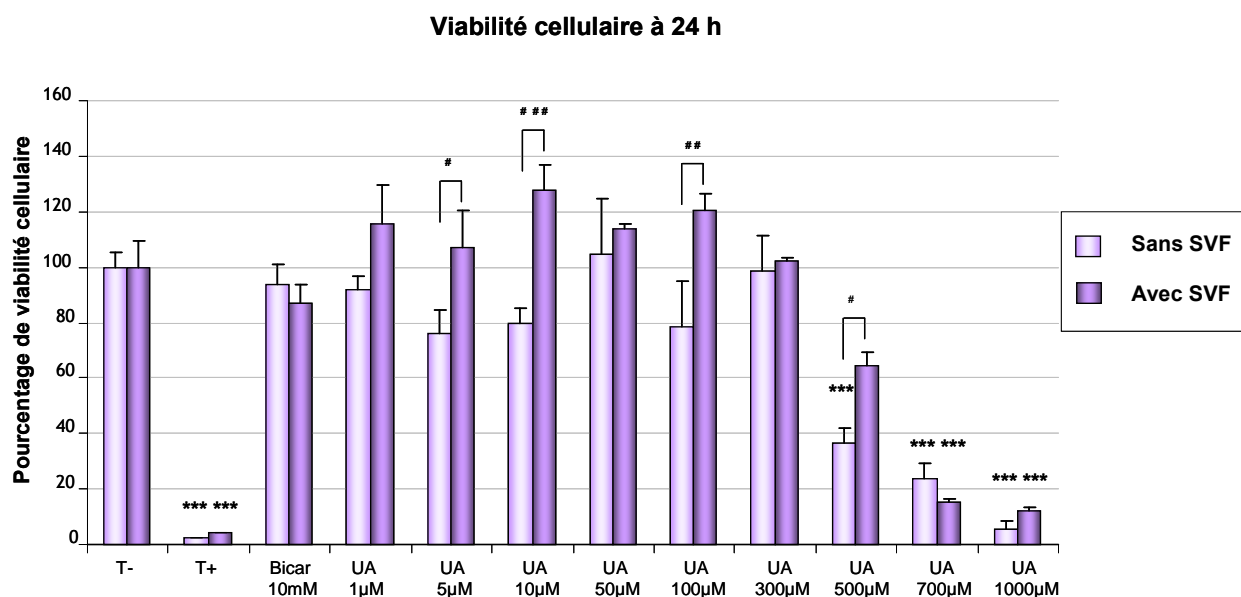


Figure 59 : Représentation graphique de la viabilité cellulaire après 24 h d'incubation avec différentes concentrations de nitrate d'uranyle

Représentation de la viabilité cellulaire après 24 h d'incubation en présence de concentrations croissantes d'UA. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ($n=4$, Passage 9) avec T-, cellules en présence de leur milieu ; T+, cellules en présence de tampon de lyse ; Bicar 10 mM, cellules en présence de bicarbonate à 10 mM ; UA 1 μM , cellules en présence d'UA appauvri à 1 μM ; etc. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test de student par rapport aux cellules en présence de bicarbonate pour les comparaisons des différentes conditions les valeurs significatives sont représentées par : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Les comparaisons entre les cellules incubées avec ou sans SVF ont été effectuées avec un test two-wayANOVA complété par la méthode de Holm-Sidak, les valeurs significatives sont représentées par : # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$.

Ce test mesure l'activité métabolique des cellules, la viabilité cellulaire est ainsi quantifiée. A 24 h, comme attendu, la viabilité des cellules est plus importante en présence de SVF, nutriment essentiel à la survie cellulaire. De plus jusqu'à une concentration de 300 μM d'UA (incluse), la viabilité des cellules est équivalente à celle des cellules témoins. Une baisse significative de viabilité est observée à partir de 500 μM d'UA pour les cellules déprivées en SVF et à partir de 700 μM d'UA pour les cellules incubées en présence de SVF. A 500 μM d'UA pour les cellules cultivées en présence de SVF, une tendance ($p = 0,067$) à la baisse de viabilité est observée, toutefois, cette chute de viabilité n'est pas significative. De plus, une différence significative entre les cellules déprivées en SVF et les cellules cultivées en présence de SVF pour des concentrations d'UA de 5 μM , 10 μM , 100 μM et 500 μM est constatée.

En parallèle de ce test de viabilité, une étude morphologique des cellules en présence d'UA a été réalisée par microscopie optique (Figure 60).

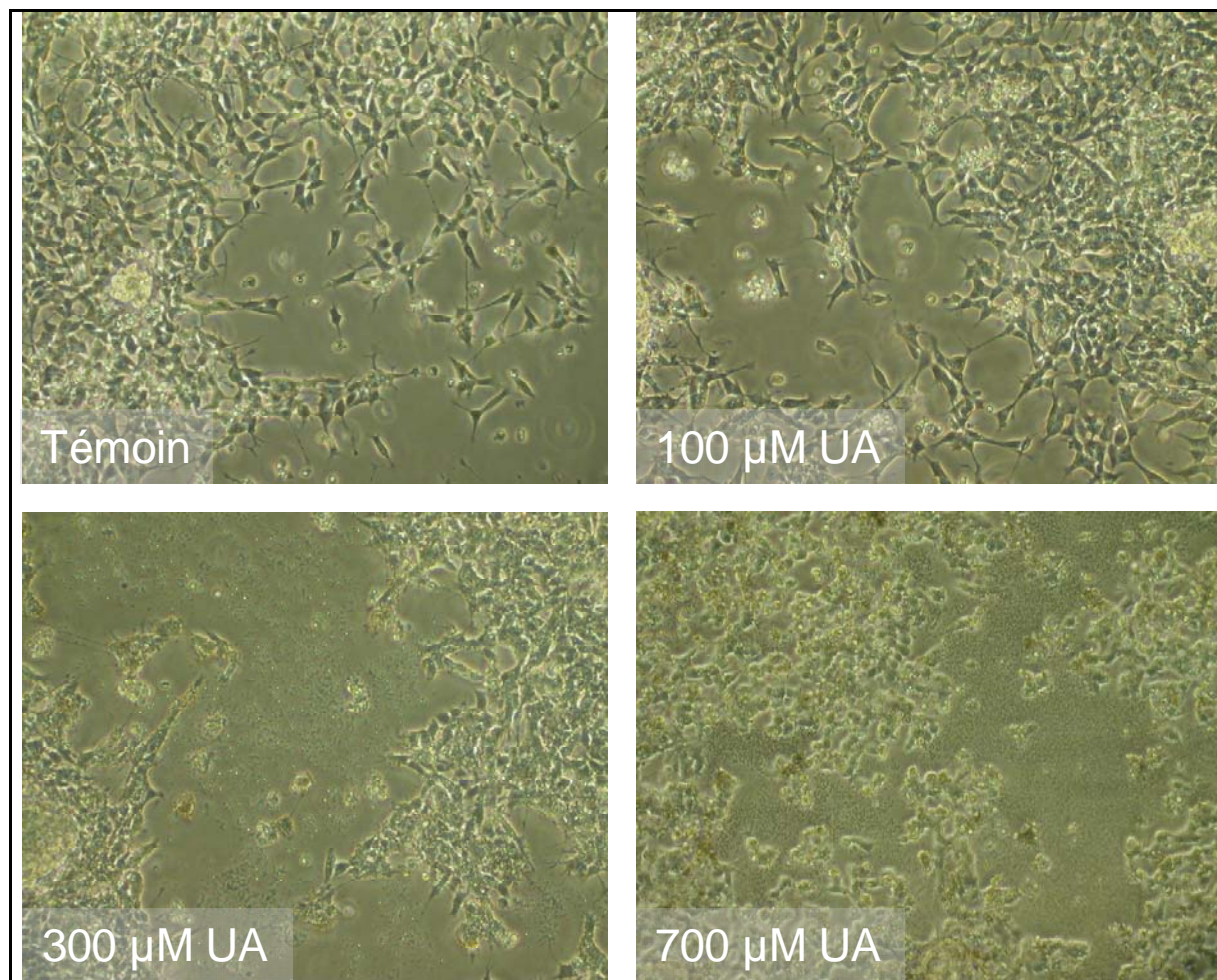


Figure 60 : Photographies des cellules IMR-32 incubées en présence de SVF pendant le test de cytotoxicité à 24 h

Observations par microscopie optique (x100). Passage 8. Les cellules témoins ont été incubées dans du bicarbonate à 10 mM. Les cellules 100 µM UA ne présentent pas de signe extérieur de souffrance. A 300 µM, les cellules et leurs neurites sont moins allongés, de plus des précipités d'UA dans le milieu cellulaire peuvent être observés. A 700 µM, les cellules sont recroquevillées sur elles-mêmes, avec toujours la présence de précipités d'UA dans le milieu cellulaire.

Les cellules ont été incubées pendant 24 h dans du milieu non-supplémenté en SVF. Les cellules témoins ont été incubées dans du milieu contenant du bicarbonate à 10 mM. Les cellules incubées avec de l'UA à 100 µM ont une morphologie similaire aux cellules témoins. D'aspect extérieur, nous ne notons pas d'effet l'UA sur les cellules IMR-32 à 100 µM pendant 24 h. Lors de l'incubation à 300 µM d'UA, les cellules ont changé morphologiquement, avec une diminution de la taille de la cellule et de ses neurites. Par ailleurs, des précipités d'UA peuvent être observés dans le milieu cellulaire. Lors de l'incubation à 700 µM d'UA, l'aspect morphologique des cellules est complètement

perturbé, les cellules meurent. Des précipités d'UA sont également présents dans le milieu cellulaire.

C. Observation microscopique par SIMS et par MET du comportement de l'UA sur les cellules IMR-32

Les observations au SIMS (spectrométrie de masse à ionisation secondaire) ou MET (microscope électronique à transmission) ont été effectuées sur les cellules IMR-32 différenciées pendant 14 jours à l'acide rétinoïque 10 nM et incubées pendant 24 h à une concentration non-cytotoxique de nitrate d'uranyle (100 μ M d'UA).

1) Observations SIMS

En parallèle des observations au SIMS, les cellules ont été observées au microscope après coloration simple (bleu de toluidine) (Figure 61).

L'image microscopique renseigne sur la structure de la cellule. L'image sodium du SIMS permet de visualiser le cytoplasme des cellules IMR-32. Ainsi, un parallèle entre l'observation microscopique et SIMS est possible. Le spectre obtenu par le SIMS ne présente pas de pic pour la masse atomique 238 (masse correspondant à 99% de la masse atomique de l'UA). Ceci signifie que le SIMS ne détecte pas d'UA sur les échantillons de cellules témoins.

Après incubation pendant 24 heures dans 100 μ M d'UA les cellules présentent une apparence similaire aux cellules témoins lors de l'observation microscopique. Toutefois, des précipités d'UA peuvent être observés sur la coupe au niveau extracellulaire (Figure 62).

L'analyse au SIMS des coupes de cellules incubées avec 100 μ M d'UA pendant 24 h montre la présence de précipités intracellulaires d'UA, confirmée par le spectre de l'isotope ^{238}U . Ces précipités d'UA sont colocalisés avec des « amas » d'ions Ca^{2+} et Na^{+} . Une présence diffuse et nettement moins importante d'UA est également détectée à l'intérieur de la cellule. La visualisation calcique de la coupe met en évidence une répartition des ions Ca^{2+} au niveau cytoplasmique des cellules. Le noyau ne comporte qu'une faible teneur en calcium avec par endroit des petits « amas calciques ». La répartition des ions sodium est plus diffuse que sur la coupe de cellules témoins avec toutefois une concentration plus importante au niveau cytoplasmique.

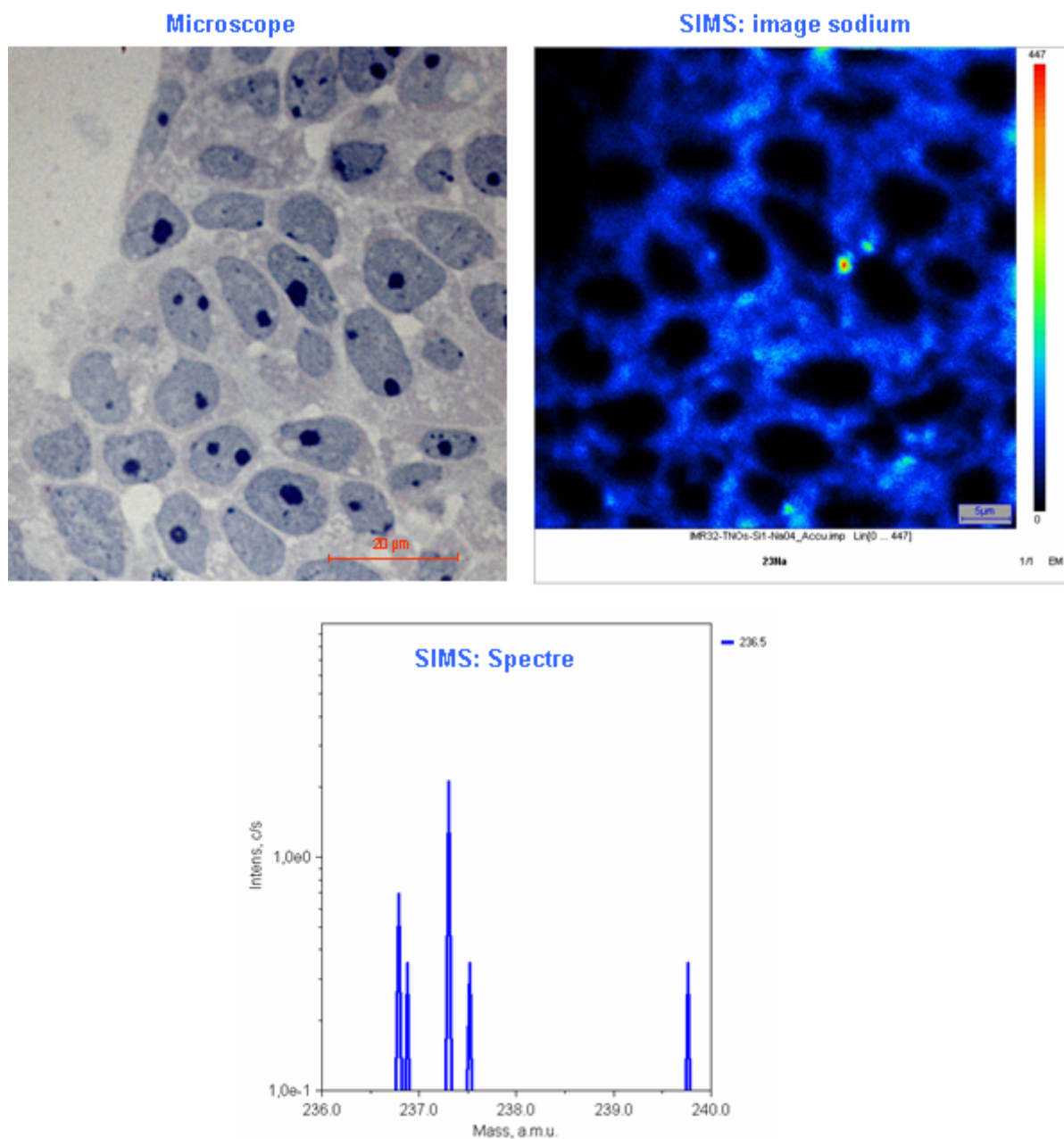


Figure 61 : Observations au microscope et au SIMS de quelques cellules IMR-32 (cellules témoins)
La photographie au microscope a été réalisée après coloration au bleu de toluidine. L'image SIMS montre la répartition des ions sodium sur cette coupe et permet de visualiser la « structure cellulaire ». Le spectre SIMS confirme l'absence d'UA (pas de pic à 238 unités de masse atomique).

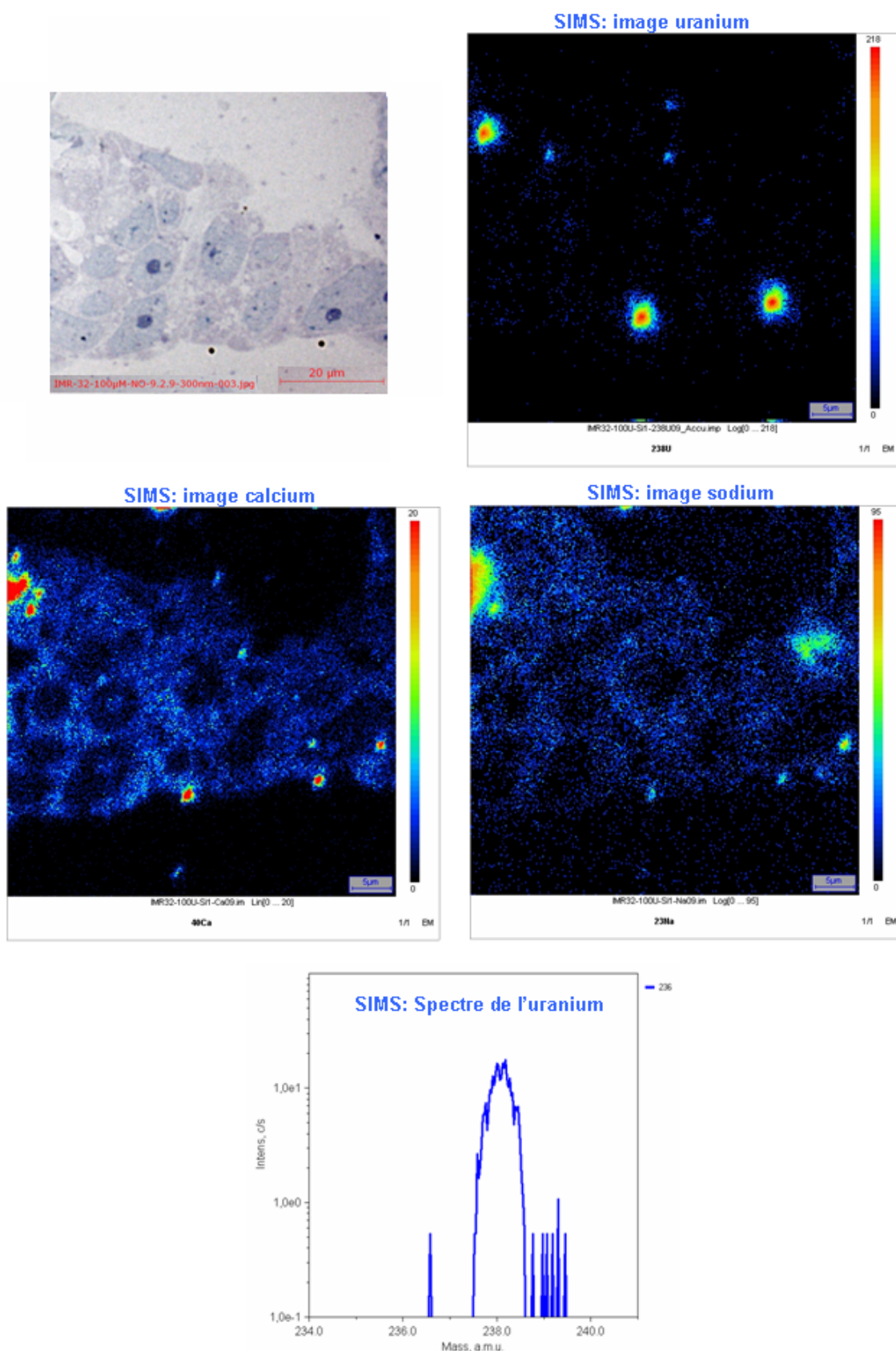


Figure 62 : Observations au microscope et au SIMS de quelques cellules IMR-32 après exposition pendant 24 h au nitrate d'uranyle (100 µM d'UA)

La photographie au microscope a été réalisée après coloration au bleu de toluidine. Les images SIMS montrent la répartition de l'UA sur cette coupe, mais également la répartition des ions calcium et sodium. Le spectre confirme la présence d'UA (pic à 238 unités de masse atomique).

2) Observations MET

Les cellules témoins ont été observées en parallèle au microscope et au MET. Une reconstitution à partir de deux photographies effectuées au MET permet la visualisation du neurone observé au microscope (Figure 63).

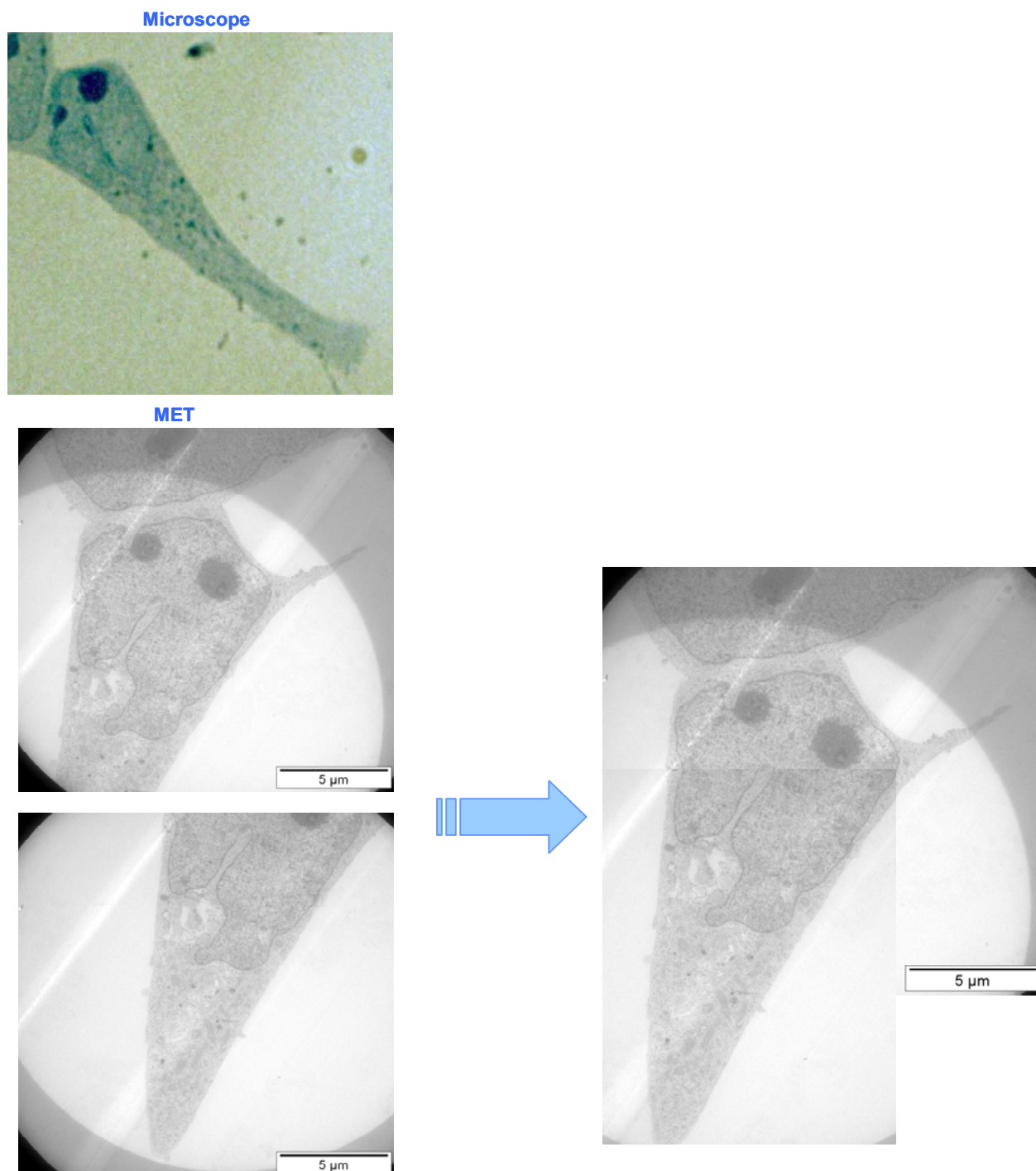


Figure 63 : Photographies d'un neurone en microscopie et en MET

En haut : observation microscopique d'un neurone. En bas, observation MET du même neurone. Deux photographies MET ont été accolées afin de visualiser le neurone dans sa globalité.

Les cellules exposées à l'UA (100 μM , pendant 24 h) contiennent des précipités d'UA en intracellulaire. Ces précipités ont également été retrouvés à la membrane cytoplasmique (invagination de la membrane autour du précipité) et en extracellulaire. Le spectre confirmant la nature des précipités n'a pu être réalisé que pour l'amas extracellulaire d'UA, ainsi les spectres des précipités intracellulaires ou présents à la membrane cellulaire seraient à effectuer afin de confirmer leur nature uranifère (Figure 64).

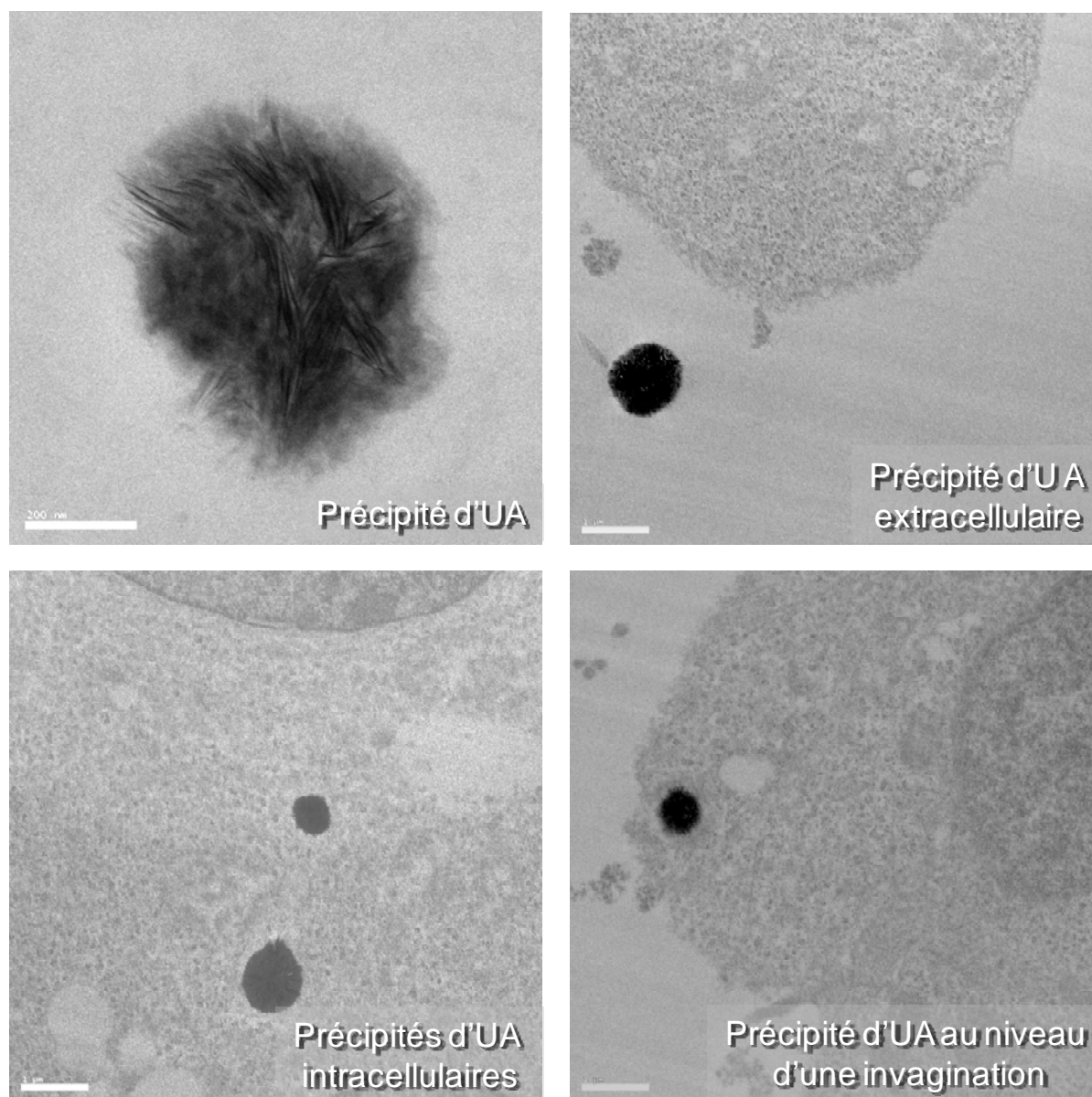


Figure 64 : Photographies réalisées au MET de précipités d'UA intra- et extracellulaires sur les cellules IMR-32

D. Etude et analyse des résultats

La culture des cellules IMR-32 en présence d'acide rétinoïque induit la différenciation cellulaire (Rossino et al., 1991; Poongodi et al., 2002). Cette différenciation s'effectue en plusieurs jours d'exposition continue au facteur de différenciation. Dans le protocole expérimental effectué, la différenciation des cellules IMR-32 a été contrôlée par l'expression protéique du récepteur muscarinique de type 1. En parallèle, la différenciation morphologique a été vérifiée. En effet, des études montrent que la cinétique d'expression des récepteurs cholinergiques diffère en fonction du facteur de différenciation employé (Gotti et al., 1987). Par ailleurs, le but de cette étude serait d'observer les éventuelles interactions de l'UA avec le m1AChR. Ainsi, **12 jours de différenciation cellulaire à l'acide rétinoïque 10 nM sont nécessaires à la différenciation complète des cellules IMR-32 pour le récepteur muscarinique de type 1.**

Lors des tests de cytotoxicité, les résultats obtenus ont confirmé que **le véhicule de l'UA (Bicarbonate à 10 mM) n'induit pas de toxicité cellulaire. Les effets observés lors d'incubation à l'UA sont uniquement dus à la toxicité du nitrate d'uranyle.**

Une réponse différente des cellules IMR-32 face à la prolongation de l'exposition à l'UA a également été observée. A 4 h, les cellules ne sont que peu sensibles à la toxicité de l'UA. A 24 h, la toxicité de l'UA apparaît à une concentration de 500 μM d'UA. A 48 h, la toxicité de l'UA se déclare dès 300 μM . Il semble donc, que lors de contact prolongé, le seuil de cytotoxicité des cellules diminue. Toutefois, il est à noter que la mortalité cellulaire basale est très élevée à 48 h, ceci traduit sans doute une souffrance cellulaire induite par le changement de pH et le manque de nutriments du milieu. **Ce travail préliminaire a permis de choisir le temps 24 h ; temps le plus adéquat pour étudier les effets de l'UA sur les cellules IMR-32. L'étude de 3 temps d'incubation montre que la cytotoxicité de l'UA sur les cellules IMR-32 est dépendante du temps d'incubation.**

Par ailleurs, à 24 h et 48 h, la cytotoxicité induite par l'UA aux plus fortes concentrations est supérieure à la toxicité du tampon de lyse, prise comme référence. Ceci signifie que le tampon de lyse n'a pas une efficacité totale.

Comme précédemment expliqué, l'effet toxique de l'UA est différent suivant le temps d'incubation. A 24 h, le seuil de cytotoxicité est de 500 μM d'UA. Pour des concentrations inférieures à 500 μM d'UA, le taux de mortalité des cellules est équivalent à celui des cellules témoins (cellules incubées dans du bicarbonate à 10 mM). A 700 μM d'UA, la cytotoxicité atteint son maximum. L'étude des différentes concentrations d'UA montre

que la cytotoxicité sur les cellules IMR-32 est dépendante de la concentration d'UA employée.

Lors des tests de cytotoxicité et à des concentrations toxiques d'UA, les cellules cultivées en présence de SVF ont une mortalité supérieure aux cellules déprivées en SVF. Deux hypothèses découlent de cette constatation : soit le SVF potentialise l'action toxique de l'UA sur les cellules, soit la déprivation en SVF protège les cellules de l'action de l'UA. La première hypothèse repose sur le fait que le SVF, en apportant de nombreux nutriments à la cellule mais également en activant de nombreuses voies de signalisation, aiderait l'UA soit à entrer dans la cellule, soit à interférer avec des voies de signalisation. La deuxième hypothèse, serait que la déprivation en SVF induirait un état de « dormance » de la cellule et ainsi la protégerait de l'action cytotoxique de l'UA. Il est connu que la déprivation en SVF provoque l'apoptose cellulaire, les cellules ne peuvent donc pas être incubées plus de 48h dans de telles conditions sans fausser les résultats de cytotoxicité. Ainsi, la cytotoxicité de l'UA sur les cellules IMR-32 est dépendante de la présence ou non de SVF.

A 500 μM , paradoxalement aux résultats obtenus avec le test de mortalité cellulaire, la viabilité des cellules cultivées en présence de SVF n'est pas altérée par l'UA alors que celle des cellules déprivées en SVF chute. Néanmoins, une tendance à la chute de viabilité est observée pour les cellules cultivées en présence de SVF à 500 μM d'UA ($p = 0,067$). Il faut noter que le test de viabilité cellulaire est moins puissant que le test de mortalité cellulaire. Le test de mortalité cellulaire tient compte du nombre de cellules contenues dans chaque puits alors que le test de viabilité n'en tient pas compte. Ainsi, pour le test de mortalité, chacune des valeurs est normalisée par le nombre de cellules totales, ce qui n'a pas pu être effectué pour le test de viabilité.

De ces résultats, nous pouvons déduire que le seuil de cytotoxicité des cellules IMR-32 pour le nitrate d'UA est de 500 μM à 24 h.

En outre, lors des observations par microscopie optique, les cellules incubées 24 h à l'UA 100 μM ne présentent pas de différence morphologique par rapport aux cellules témoins. Ceci confirme les résultats obtenus lors des tests de cytotoxicité. L'incubation à 300 μM induit des modifications de la taille des cellules et de leurs neurites. Cependant, à 24 h, la cytotoxicité de l'UA sur les cellules IMR-32 n'est pas détectée à une concentration d'UA de 300 μM , mais elle apparaît au bout de 48 h d'incubation. Ainsi, les désordres morphologiques induits par l'UA sont observables avant qu'ils ne provoquent la mort des

cellules. Les observations effectuées à 700 μM d'UA sont cohérentes avec les valeurs obtenues lors des tests de mortalité et de viabilité cellulaire.

Les observations au SIMS et au MET ont permis d'affirmer la présence d'UA dans les cellules IMR-32. Ces observations montrent que l'UA est majoritairement présent sous forme de précipités agrégeant les ions calcium et sodium.

Une photographie réalisée au MET semble montrer une invagination de la membrane autour d'un précipité d'UA. Ceci suggère deux hypothèses. Premièrement, les précipités d'UA pourraient être endocytosés par les cellules. Deuxièmement, l'UA, absorbé par la cellule sous forme ionique, précipiterait dans la cellule. Ces précipités seraient ensuite exocytosés par la cellule dans le milieu extracellulaire.

En conclusion, **l'UA parvient à entrer dans le cytoplasme des cellules IMR-32 après 24 h d'incubation à 100 μM .** La présence d'UA en intracellulaire pourrait être à l'origine de désordres ioniques dans la cellule. L'entrée d'UA, sous forme ionique (UO_2^{2+}) ou de précipité (agrégeant des ions calcium et sodium), provoquerait un flux cationique entrant. Deux réponses peuvent en résulter. D'une part, ce flux entrant serait compensé par un flux sortant d'ions « essentiels », afin de maintenir le potentiel cellulaire. Cette compensation se ferait donc au détriment de composés ioniques « utiles » à la cellule. D'autre part, le flux entrant cationique ne serait pas compensé et provoquerait également un désordre ionique. Dans ces deux cas, la mort cellulaire serait en partie induite par ce désordre ionique intracellulaire qui perturberait le fonctionnement normal de la cellule (Figure 65).

Par ailleurs, l'action directe de l'uranium sur les neurones n'a pu être étudiée comme préalablement envisagé. Les travaux réalisés posent les bases pour des expériences futures qui permettraient de comprendre le mode d'action cytotoxique de l'UA sur des cellules neuronales ; et notamment d'observer d'éventuelles interactions avec les récepteurs cholinergiques.

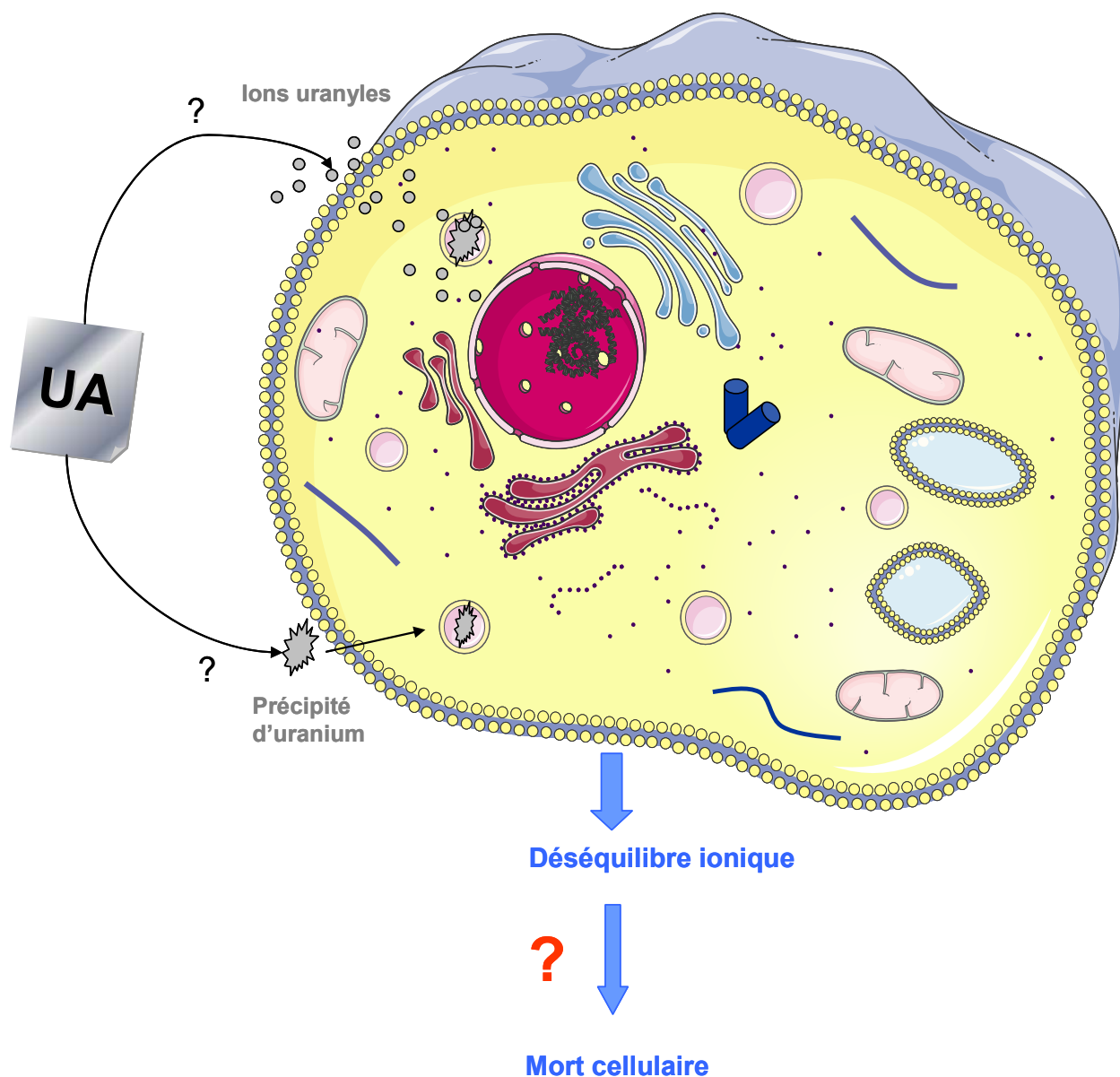


Figure 65 : Comportement de l'UA sur les cellules IMR-32

L'UA entrerait dans les cellules IMR-32 sous forme de précipités ou sous forme ionique précipitant dans la cellule. Cette entrée massive de cations serait à l'origine de fortes perturbations ioniques intracellulaires. Ces modifications ioniques pourraient être une des voies de cytotoxicité de l'UA. Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art.

E. Résumé

Afin de comprendre d'observer le comportement de l'UA sur les neurones, les cellules IMR-32 issues d'un neuroblastome humain ont été choisies. Ce modèle présente naturellement les récepteurs cholinergiques à sa membrane. Le but de ce modèle cellulaire était d'étudier les mécanismes d'action de l'UA sur le système cholinergique et plus particulièrement sur le récepteur muscarinique de type 1 (lui-même particulièrement perturbé *in vivo* lors des études précédentes). Les premières expériences ont permis de déterminer le temps de différenciation nécessaire (12 jours) aux cellules pour obtenir un taux d'expression maximal du récepteur m1AChR. Ainsi, les expériences suivantes ont été réalisées après différenciation cellulaire à l'acide rétinoïque 10 nM pendant 14 jours. Les tests de cytotoxicité ont montré que les effets de l'UA sur les cellules IMR-32 étaient dépendants du temps d'exposition des cellules et de la concentration en uranium du milieu cellulaire. De plus, la présence ou non de SVF dans le milieu de culture influe également sur la cytotoxicité de l'UA. Le seuil de cytotoxicité à 24 h des cellules neuronales IMR-32 a été déterminé à 500 μM d'UA.

Par ailleurs les observations SIMS et MET permettent d'affirmer la présence intracytoplasmique d'UA, majoritairement sous forme de précipités, dans les cellules IMR-32. Ces précipités seraient des « amas » ioniques regroupant également des ions calcium et sodium.

L'action directe de l'uranium sur les neurones n'a pu être étudiée comme préalablement envisagé. Les travaux réalisés posent les bases pour des expériences futures qui permettraient de comprendre le mode d'action cytotoxique de l'UA sur des cellules neuronales ; et notamment d'observer d'éventuelles interactions avec les récepteurs cholinergiques.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I. Etat général des animaux

Les rats adultes n'ont présenté aucun signe de souffrance lors des contaminations à l'uranium (prostrations, nervosité, perte de poils). De plus, la mesure hebdomadaire des constantes de poids, de prises alimentaires et hydriques montrent que l'état général des animaux n'est pas affecté lors de nos différents protocoles de contamination à l'uranium (UA et UE confondus). Ceci est en accord avec les précédentes études effectuées au sein du laboratoire ([Houpert et al., 2005](#); [Lestaevel et al., 2005](#); [Souidi et al., 2005](#); [Gueguen et al., 2006](#); [Paquet et al., 2006](#); [Gueguen et al., 2007](#); [Grignard et al., 2008](#); [Lestaevel et al., 2009](#)). Ainsi, les protocoles réalisés dans ce travail s'appuient sur une abondante littérature. Pourtant, lors du travail de Bussy, les auteurs ont remarqué une diminution de la prise de poids des animaux contaminés à l'UA (40 mg/L) pendant 6 ou 9 mois sans que cela n'affecte la consommation alimentaire ou hydrique. De plus, le comportement des animaux était normal (pas de prostration ou de nervosité apparente). Les auteurs suggèrent que la différence de poids observé à la fin de l'expérimentation serait due à l'amplification d'une différence existante dès le début de l'expérimentation ([Bussy et al., 2006](#)). Par ailleurs, l'équipe de Briner a montré que l'ingestion chronique d'UA à une concentration de 75 mg/L pendant 2 semaines et 6 mois n'affecte pas la prise de poids des animaux. Par contre, cette étude montre qu'à des concentrations plus élevées (150 mg/L), la prise de poids des animaux contaminés pendant 2 semaines et 6 mois était significativement inférieure à celle des animaux témoins ([Briner and Murray, 2005](#)). Ceci confirme qu'à 40 mg/L la concentration en uranium dans l'eau de boisson n'est pas assez importante pour induire des perturbations de l'état général des animaux.

Par ailleurs, les comptages réalisés sur le rein, cible privilégiée de l'uranium, des animaux contaminés détectent au maximum des concentrations d'uranium de 0,3 µg/g de rein. Nous avons donc travaillé en dessous du seuil de néphrotoxicité estimé à 0,7 µg d'U/g de rein ([Diamond et al., 1989](#)).

L'ingestion chronique d'uranium à une dose de 1 mg/rat/jour n'affecte pas l'état général des rats adultes.

Les rats exposés à l'uranium depuis la naissance sont, quant à eux, plus affectés par la contamination à l'uranium. Des diminutions de poids mais aussi de consommation alimentaire et hydrique (entre -15 et -20%) ont pu être observées lors de contamination de 2 et 4 mois. Ces résultats diffèrent de ceux observés chez les rats adultes ou chez les rats juvéniles exposés pendant 9 mois à l'UA 40 mg/L. Ainsi, à concentrations égales (40 mg/L)

ou inférieures (10 mg/L) de celles données aux rats adultes, l'uranium peut avoir un effet sur les paramètres généraux des rats juvéniles, sans que les rats ne présentent de signes extérieurs de souffrance.

Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. La première fait référence à des études antérieures qui ont montré que l'absorption de l'uranium était plus importante chez le nouveau-né que chez l'adulte (Sullivan, 1980a; Leggett, 1994). Ceci impliquerait que les rats juvéniles aient absorbé des quantités d'uranium plus importantes que les adultes. Cette hypothèse expliquerait les effets observés par l'augmentation d'intoxication chez les jeunes rats. Un dosage de la quantité d'uranium dans le rein permettrait d'infirmier ou non cette hypothèse. La seconde hypothèse fait référence à la sensibilité accrue du métabolisme en croissance des jeunes sujets. L'uranium pourrait perturber le développement général de l'animal provoquant un retard de croissance, comme cela a préalablement été décrit pour le plomb ou le mercure (ATSDR, 1999; Selevan *et al.*, 2003). Ces deux hypothèses ne s'excluent pas l'une de l'autre. Une synergie entre l'augmentation d'absorption de l'uranium et la sensibilité des jeunes rats peut être à l'origine de la diminution de poids corporel, de la prise alimentaire ou de la consommation hydrique observées lors de cette étude.

Toutefois, ces résultats ne sont pas confirmés lors des 9 mois de contamination des rats juvéniles. Cette différence pourrait provenir d'une variabilité inter-individuelle. En effet, il a été montré que le passage de l'uranium dans le lait maternel était très différent d'un individu à l'autre (Wappelhorst *et al.*, 2002). Il est possible que le lot de rats soumis aux 9 mois de contamination présente un transfert dans le lait maternel moins important que les rats soumis à 2 ou 4 mois de contamination. Les rats juvéniles (9 mois d'exposition) auraient absorbé moins d'uranium pendant la phase de lactation que les rats juvéniles (2 ou 4 mois de contamination). Or les différences entre les animaux contaminés et non-contaminés apparaissent entre la naissance et le sevrage et ne font que se maintenir à l'âge adulte. Le poids des animaux (9 mois de contamination) est ainsi resté identique à celui des animaux non-contaminés pendant toute la durée de l'expérimentation.

L'ingestion chronique d'uranium à des doses de 0,25 (10 mg/L) ou 1 mg/rat/jour (40 mg/L) peut affecter la croissance des rats contaminés depuis la naissance.

Cette étude souligne la sensibilité accrue des jeunes sujets face à l'intoxication par les métaux lourds, et notamment par l'uranium.

Comme pour le modèle « rat adulte », les souris adultes ApoE^{-/-} ne présentent aucun signe de souffrance extérieure et les paramètres généraux de santé sont équivalents entre les

souris non-contaminées et les souris contaminées à 20 mg/L d'UA pendant les 3 mois d'exposition. En tenant compte du poids et de la consommation hydrique des animaux, l'ingestion d'uranium est 2 fois plus importante dans notre modèle « souris » que dans le modèle « rats adultes » (40 mg/L) avec respectivement 4 mg/kg/jour et 2 mg/kg/jour. Cependant, les souris sont légèrement moins sensibles à l'uranium que les rats lors d'ingestion puisque la DL_{50} *per os* est respectivement de 242 mg/kg contre 204 mg/kg (Albina *et al.*, 2005). Ces résultats montrent qu'à 0,1 mg/souris/jour, soit 4 mg/kg/jour pendant 3 mois, l'UA n'affecte pas l'état général des souris invalidées pour le gène de l'ApoE.

II. Accumulation d'uranium dans le cerveau des rongeurs

La quantité d'uranium accumulé dans le cerveau n'a pu être réalisée pour tous nos modèles. Cependant, les dosages ont pu être effectués pour le modèle « rat adulte » après 1,5 et 9 mois d'exposition à l'UA et à l'UE (40 mg/L) et pour le modèle « rat juvénile » après 2 mois de contamination à l'UA (40 mg/L) dans l'hippocampe et le cortex.

La contamination à l'UA (40 mg/L) pendant 2 mois ne provoque pas d'accumulation d'uranium dans l'hippocampe et le cortex des rats juvéniles. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus pour les rats adultes, où l'UA ne s'accumule ni dans l'hippocampe ni dans le cortex après 1,5 mois de contamination. Une étude antérieure montre également que lors d'une contamination sub-chronique à l'UA (40 mg/L), la quantité d'uranium mesurée dans l'hippocampe et le cortex des rats exposés n'est pas significativement différente de celle retrouvée chez les rats témoins (Bussy, 2005). Par contre, lorsque la contamination est prolongée chez les rats adultes (9 mois, 40 mg/L), l'uranium s'accumule significativement dans l'hippocampe et le cortex. Ces résultats sont en accord avec l'étude menée par Bussy (Bussy, 2005). Par ailleurs, Monleau *et al.* notent que le bulbe olfactif, le cortex frontal, l'hippocampe et le cervelet contiennent une quantité significativement différente d'uranium par rapport aux animaux témoins, 1 jour après inhalations répétées d'UA. Deux jours post-inhalation, seuls le cortex frontal et l'hippocampe présentent toujours une quantité importante et significative d'uranium par rapport aux rats témoins (Monleau *et al.*, 2005). Fitsanakis décrit également une accumulation hétérogène de l'UA. Trois mois post-implantation de pastilles d'UA en intramusculaire, le cortex, le striatum, le cervelet, le mésencéphale et le tronc cérébral présentent une accumulation significative d'uranium ; 6 mois post-implantation, seuls le cortex, le cervelet et le mésencéphale conservent cette accumulation préférentielle

(Fitsanakis et al., 2006). Comme le montrent ces travaux, ainsi que les résultats de notre étude, **l'accumulation de l'uranium apparaît être dépendante du temps d'exposition**. Il se peut que cette variation d'accumulation puisse également être en lien avec l'âge des animaux. En effet, il a été démontré que les mécanismes de défense face aux polluants sont moins performants avec l'âge (Devlin et al., 2003).

Pour l'exposition à l'UE (40 mg/L), une accumulation significative d'uranium a été observée dans l'hippocampe après 1,5 et 9 mois de contamination chez les rats adultes. Le cortex, quant à lui ne semble pas accumuler d'UE pour cette concentration et à ces temps d'exposition. Ces résultats confirment également ceux obtenus par l'équipe de Bussy (Bussy, 2005).

Ainsi, l'accumulation de l'uranium est différente entre l'hippocampe et le cortex. Des résultats similaires ont été rapportés par Houpert et al., avec une accumulation préférentielle de l'UA dans les régions centrales du cerveau (hippocampe et striatum) après ingestion chronique d'UA (Houpert et al., 2007c). D'après Barber et al., ce sont ces mêmes structures qui accumulent l'UA lors d'injection intra-péritonéale (1 mg/kg) (Barber et al., 2005). **L'accumulation d'uranium semble être dépendante de la structure cérébrale.**

De plus, entre ces lieux d'accumulation distincts, une clairance différentielle de l'uranium peut être observée (Barber et al., 2007). L'hippocampe, le striatum et le cervelet semblent « éliminer » plus difficilement l'uranium que le cortex. En effet, le taux d'uranium cortical diminue dès le 5^{ème} jour post-injection d'UA (1 mg/kg), alors que pour les trois structures citées précédemment, le taux d'uranium se maintient au-delà du 30^{ème} jour post-injection. Ceci suggère qu'en plus des mécanismes d'accumulation, les mécanismes de clairance sont également dépendants de la structure cérébrale.

Les différents travaux suscités montrent que l'accumulation d'uranium diffère suivant un autre critère : la voie d'exposition. Une publication de l'équipe de Houpert souligne spécifiquement cet aspect en comparant l'accumulation d'uranium dans les différentes structures cérébrales après injection, inhalation ou ingestion. Selon l'auteur, l'injection induit une distribution cérébrale de l'uranium plus homogène que l'inhalation et l'ingestion. Une distribution antéro-postérieure est décrite lors d'inhalation et l'ingestion provoque une accumulation dans les régions centrales du cerveau (hippocampe et striatum) (Houpert et al., 2007c). Un travail récent sur l'inhalation d'uranium a d'ailleurs montré qu'il existe un passage cérébral direct par voie nasale. Les auteurs suggèrent une implication des récepteurs olfactifs pour ce passage de l'uranium vers les bulbes olfactifs

(Tournier *et al.*, 2009). Ainsi, **les mécanismes de distribution de l'uranium semblent différents en fonction de la voie d'exposition.**

Lors de notre étude, l'UA et l'UE ont montré un comportement différent avec une accumulation plus précoce de l'UE sur celle de l'UA dans l'hippocampe. Ces résultats confirment ceux observés par Houpert *et al.* lors d'une exposition sub-chronique à l'UA et à l'UE (Houpert *et al.*, 2005). De plus l'UE ne s'est pas accumulé dans le cortex pour nos deux temps de contamination (1,5 et 9 mois) alors que l'UA s'y accumule après 9 mois d'exposition. Ces résultats suggèrent que **l'accumulation de l'uranium est dépendante de son isotopie.** Le mécanisme sous-jacent pour expliquer cette différence entre l'UA et l'UE reste inconnu. Toutefois, l'action radioactive de l'UE pourrait permettre un passage hémato-méningé plus important.

Toutes ces analyses montrent que la distribution, l'accumulation et la clairance cérébrale de l'uranium sont dépendantes de nombreux facteurs tels que la structure cérébrale, le temps d'exposition, l'âge du sujet, la voie d'absorption et l'isotopie de l'actinide. Toutefois, les mécanismes sous-jacents restent inconnus.

III. Comparaison entre les modèles

A. Rats : uranium enrichi versus uranium appauvri

L'hippocampe et le cortex réagissent de manière différente face aux contaminations à l'UE et à l'UA. Pour l'hippocampe, l'exposition sub-chronique et chronique à l'UE perturbe les mêmes cibles du système cholinergique que lors de contamination à l'UA, mais avec une intensité plus importante. Ainsi, **les cibles chimiques et radiologiques sont similaires dans l'hippocampe**, mais l'activité spécifique plus importante de l'UE lui confère des effets plus délétères que l'UA.

Concernant le cortex, la fonction cholinergique est plus affectée après contamination sub-chronique à l'UE par rapport à l'UA. Par ailleurs, les cibles géniques perturbées sont différentes après contamination à l'UE et à l'UA. Lorsque la contamination a été prolongée à 9 mois, des effets opposés ont été observés, entre l'UE et l'UA, sur la fonction cholinergique (-11% du taux d'ACh pour l'UE et + 17% activité AChE pour l'UA). Ainsi, **les effets entre l'UE et l'UA sont différents dans le cortex.** De plus, cette différence est accentuée avec le temps d'exposition au toxique, lorsque l'organisme met en place ses

mécanismes de défense/compensation face à l'uranium. Ceci souligne que ces mécanismes sont différents entre l'UE et l'UA.

La publication de Lestaevel et al avait également montré un effet différentiel, voire opposé, de l'UE et de l'UA sur certains marqueurs du stress oxydant (Lestaevel et al., 2009), soulignant ainsi une sensibilité chimique et radiologique distincte dans le cortex pour l'uranium.

Une étude antérieure au sein du laboratoire avait montré, qu'au contraire, les effets de l'UE étaient de nature moins délétère que les effets de l'UA. Toutefois, cette étude portait sur d'autres neurotransmetteurs, les monoamines (Bussy, 2005). Ainsi, la sensibilité à l'action radiotoxique et chimiotoxique de l'uranium est propre à chacun des neurotransmetteurs.

B. Rats : juvéniles versus adultes

Chez les rats juvéniles, comme chez les rats adultes, l'hippocampe et le cortex répondent différemment face à la contamination à l'UA (40 mg/L). La comparaison entre l'exposition juvénile et adulte s'articulera donc de manière indépendante autour de chacune de ces structures.

Lors de l'exposition sub-chronique pour les rats juvéniles (2 mois) et adultes (1,5 mois), la fonction cholinergique est maintenue dans l'hippocampe. Seules quelques perturbations géniques des enzymes de synthèse et des récepteurs cholinergiques ont pu être observées. Dans le cortex la fonction cholinergique est perturbée. La baisse du taux d'acétylcholine, et la baisse d'activité de l'AChE est légèrement plus marquée chez les rats contaminés à l'âge adulte. Par ailleurs, les modifications d'expression génique diffèrent quelque peu entre les rats juvéniles et adultes (gènes cibles différents). Néanmoins, il apparaît qu'après une contamination sub-chronique à l'UA (40 mg/L), les perturbations cholinergiques hippocampiques et corticales sont très similaires entre les animaux exposés depuis la naissance ou à l'âge adulte.

Lors de l'exposition chronique (9 mois) pour les rats juvéniles et les rats adultes, la fonction cholinergique reste maintenue dans l'hippocampe. Toutefois, un nombre plus important de modifications d'expression de gène a été observé chez les rats juvéniles par rapport aux rats adultes. Dans le cortex, une restauration totale de la fonction cholinergique a été constatée chez les rats juvéniles. Chez les rats adultes, cette restauration n'a été que partielle avec une activité AChE encore significativement inférieure à celle des animaux témoins. Ainsi, **en cas d'exposition chronique,**

l'hippocampe des rats contaminés depuis la naissance semble moins capable d'adaptation que celui des adultes. Inversement, on note que le cortex des rats juvéniles s'adapte mieux à la contamination chronique que celui des rats adultes.

Une comparaison en fonction de l'âge des animaux peut être effectuée entre les rats juvéniles contaminés pendant 4 mois et les rats adultes contaminés pendant 1,5 mois. Les deux groupes ont un âge équivalent (4 et 3,5 mois respectivement), mais ont subi un temps de contamination différent. La fonction cholinergique hippocampique est maintenue au prix d'un nombre important de modifications géniques pour ces deux groupes d'animaux. Par contre, dans le cortex, les rats juvéniles et adultes réagissent différemment. Chez les juvéniles, la fonction cholinergique est « suractivée », avec une augmentation du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE. Chez les rats adultes, la fonction cholinergique est « inhibée » avec une chute du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE. Ainsi, **l'âge du début de contamination influe sur la réponse de l'hippocampe et du cortex face à la toxicité de l'uranium.**

En outre, un travail antérieur a démontré que les effets provoqués par une contamination chez les sujets en développement pouvaient ne se révéler qu'à l'âge adulte. Les rats ont été exposés à l'UE (40 mg/L) depuis leur conception jusqu'à leur sevrage, puis n'ont plus jamais été en contact avec l'uranium. A l'âge de 2, 5 et 9 mois, les rats ont été soumis à quelques tests comportementaux. Une baisse de la mémoire de travail (mémoire à court terme) a été observée à 2 mois, puis a disparu lors des tests réalisés à 5 et 9 mois (Houpert et al., 2007b). Cette diminution transitoire de la mémoire à court terme (entre le 15 et le 22^{ème} jour post exposition) avait déjà été décrite par l'équipe de Barber lors d'une injection intramusculaire d'acétate d'uranyle (1 mg/kg) (Barber et al., 2007). La disparition de ces troubles pourrait provenir de perturbations de certains systèmes neuronaux ou neurotransmetteurs palliés par une adaptation de l'organisme. Par contre, le travail de Houpert met en évidence un résultat plus inattendu : une hyperactivité des rats a été révélée à l'âge de 5 et 9 mois. Les auteurs écartent l'hypothèse d'un effet direct de l'uranium sur le cerveau puisqu'aucune accumulation d'uranium n'a pu être montrée chez les animaux contaminés par rapport aux animaux témoins (Houpert et al., 2007b). **Le retard observé pour l'activité motrice serait issu de perturbations neuronales engendrées par l'uranium pendant la phase critique du développement cérébral des jeunes rats.**

Ainsi, ces résultats nous obligent à ne pas écarter une éventuelle sensibilité supérieure des animaux juvéniles par rapport aux animaux adultes, les tests effectués ne permettant peut-être pas de les détecter. D'autre part, ceci nous amène à souligner l'importance des

répercussions que peut provoquer l'action d'un neurotoxique pendant le développement du SNC.

C. Rats adultes versus souris adultes

La comparaison entre le modèle de rats adultes et de souris adultes invalidées pour le gène de l'ApoE est complexe puisque les concentrations d'uranium administrées sont différentes. Les rats ont ingéré environ 2 mg/kg/jour d'UA pour environ 4 mg/kg/jour pour les souris. Toutefois, les perturbations corticales cholinergiques sont bien moins nombreuses et marquées chez les souris par rapport aux rats. De cette comparaison, on notera que **le seuil de sensibilité du système cholinergique face à l'ingestion d'UA est différent entre le rat et la souris**, avec une sensibilité moindre pour la souris comme cela avait préalablement été suggérée par Domingo avec une DL₅₀ plus élevée pour la souris que pour le rat (Albina *et al.*, 2005).

D. Modèles dits « sensibles » : rats juvéniles versus souris adultes transgéniques

Concernant nos deux représentants du modèle dit « sensibles », les effets observés chez les rats juvéniles et chez les souris adultes ne montrent pas de similarité dans l'atteinte cholinergique et comportementale. De plus, la concentration d'uranium employé, l'âge et l'espèce des animaux sont différents. Des équivalences dans ces paramètres auraient été nécessaires pour permettre une meilleure comparaison.

IV. Effets tissu- et dose-dépendants de l'uranium

L'analyse des résultats précédents souligne **une toxicité structure-dépendante de l'uranium**. Ces variations tissu-cérébral-dépendantes avaient déjà été observées pour l'activité de l'AChE et la génération de monoxyde d'azote lors d'injections répétées d'acétate d'uranyle (0,1 mg/kg) (Abou-Donia *et al.*, 2001). L'équipe de Linares a également montré que les marqueurs du stress oxydant impliqués dans la réponse à l'ingestion chronique d'acétate d'uranyle étaient différents dans l'hippocampe et le cortex (CAT/SOD et TBARS respectivement) (Albina *et al.*, 2005). Dans notre étude, l'uranium induit de nombreuses variations géniques dans l'hippocampe mais la fonction cholinergique parvient à être préservée. Ainsi, l'hippocampe, chez les juvéniles comme chez les adultes, fait preuve d'une grande plasticité. Il n'y a que dans le cas de la contamination sub-

chronique à l'UE chez l'adulte que l'activité de l'AChE augmente. Ceci est une preuve de l'action neurotoxique de l'uranium. Il est délicat de n'attribuer cette action délétère qu'à la radioactivité plus importante de l'UE. En effet, l'accumulation significative de l'UE, mais pas de l'UA, dans l'hippocampe à 1,5 mois d'exposition peut expliquer ce résultat. Deux hypothèses découlent de ces constatations. Premièrement, une accumulation préférentielle de l'UE par rapport à l'UA dans l'hippocampe serait à l'origine des dommages observés. Deuxièmement, l'activité spécifique de l'UE lui permettrait, en altérant la BHE, d'entrer dans le cerveau où il s'accumulerait dans l'hippocampe (zone d'accumulation préférentielle de l'uranium par ingestion (Houpert et al., 2007c)). Parvenu dans l'hippocampe, ses propriétés chimiques et/ou radiologiques perturberaient l'activité de l'AChE. Toutefois, l'accumulation d'uranium ne semble pas être la seule cause de ces effets différentiels entre l'UA et l'UE. En effet, après 9 mois de contamination, l'UA et l'UE s'accumulent dans l'hippocampe, pourtant la fonction cholinergique est maintenue même si elle est accompagnée de nombreuses perturbations géniques.

Le système cholinergique cortical est altéré dans sa globalité par la contamination à l'uranium. La fonction cholinergique ne parvient à être restaurée partiellement qu'après 9 mois de contamination pour les rats juvéniles et adultes. Ainsi, les différentes contaminations à l'uranium réalisées pendant ce travail ont provoqué des perturbations du système cholinergique dont les répercussions peuvent avoir une incidence critique sur la fonctionnalité de ce système et ceux qui lui sont directement liés.

Dans l'hippocampe comme dans le cortex, les contaminations à l'UA 10 et 40 mg/L ont mis en évidence un **effet dose-dépendant** des perturbations du système cholinergique et des troubles comportementaux. Au niveau du système cholinergique, les effets induits par l'UA 40 mg/L sont systématiquement plus importants (amplification de la perturbation observée avec l'UA 10 mg/L), voire plus nombreux (perturbation d'autres acteurs du système). Par ailleurs, une étude antérieure a montré que les marqueurs du stress oxydant répondaient de manière dose-dépendante à la quantité d'acétate d'uranium ingérée (Albina et al., 2005).

Au niveau comportemental, les rats contaminés à l'UA 10 mg/L et à l'UA 40 mg/L présentent des résultats souvent différents. D'ailleurs, des effets paradoxaux ont été observés puisque certains résultats comportementaux sont améliorés par la contamination à l'UA 10 mg/L par rapport aux animaux témoins et aux animaux contaminés à l'UA 40 mg/L. Ainsi, pour le test du rotarod, les effets de l'UA 10 mg/L sur la coordination motrice (après 2 et 4 mois de contamination) et l'adaptation à l'augmentation de vitesse (après 2 mois d'exposition) sont bénéfiques par rapport aux animaux témoins et aux animaux

contaminés à l'UA 40 mg/L. Ces animaux partent d'un état préférentiel puisque, dès le premier test, leurs résultats sont meilleurs que ceux des animaux témoins. Les animaux exposés à 10 mg/L d'UA auraient une capacité plus importante à lutter contre des comportements spontanés. Ces résultats surprenants pourraient être expliqués par les hypothèses suivantes. Premièrement, les légères défaillances du système cholinergique après contamination à l'UA 10 mg/L seraient compensées, voire surcompensées par un autre système. Toutefois, dans ce cas, la contamination à l'UA 40 mg/L devraient également induire un phénomène compensatoire, ce qui n'apparaît pas lors de ces expériences. Deuxièmement, les résultats montrent que le métabolisme du système cholinergique n'est que peu altéré par la contamination à l'UA 10 mg/L. Or, le système cholinergique régit la stimulation/inhibition d'autres neurotransmetteurs ; ainsi la contamination à l'UA 10 mg/L pourrait avoir un impact sur la libération d'autres neurotransmetteurs. Cet impact modéré pourrait être à l'origine d'une facilitation de certaines tâches comportementales comme observées lors du test de rotarod.

Par ailleurs, pour le test de mémoire à court terme, les rats exposés pendant 2 mois à l'UA 10 mg/L sont moins performants que les rats témoins et les rats exposés à l'UA 40 mg/L. Ceci est le seul cas, parmi les tests réalisés, où les effets de l'uranium sont plus délétères après exposition à l'UA 10 mg/L qu'après une exposition à l'UA 40 mg/L. Ce résultat soutiendrait la seconde hypothèse suscitée, dans ce cas l'impact de l'uranium sur la libération d'autres neurotransmetteurs aurait un effet néfaste sur la mémoire de travail.

Toutefois, dans de nombreuses études, l'aspect dose-dépendance des déficits comportementaux a pu être mis en évidence. L'activité locomotrice et exploratrice des rats est doublée ou triplée après 6 mois d'ingestion de 75 et 150 mg/L d'acétate d'uranyle respectivement ([Briner and Murray, 2005](#)). Selon Barber et al, l'activité locomotrice et la capacité d'agrippement des rats sont amoindries par des doses croissantes d'acétate d'uranyle injectées en intramusculaire (0,3 et 1 mg/kg) ([Barber et al., 2007](#)). Lors de ces études, la dose d'uranium administrée aux rats était 2 et 100 fois plus importante que notre concentration la plus élevée (40 mg/L). Ceci explique l'amplitude des effets comportementaux observés par ces études.

V. Effet du temps de contamination à l'uranium sur le système cholinergique et le comportement

Lors de ce travail, nous avons pu observer les effets de l'uranium après expositions sub-chroniques et chroniques. Il est apparu que **les effets cholinergiques et comportementaux de l'uranium tendent à disparaître lorsque l'exposition à l'uranium est prolongée.**

Des résultats similaires ont été obtenus par l'équipe de Briner. Ils ont observé une augmentation de l'activité locomotrice corrélée avec une augmentation de l'oxydation lipidique après 2 semaines d'exposition à l'acétate d'uranyle (150 mg/L). Après 6 mois d'exposition, l'activité locomotrice restait perturbée mais n'était plus corrélée à l'augmentation d'oxydation lipidique (Briner and Murray, 2005). Par ailleurs, après une exposition à l'UE 40 mg/L, les effets toxiques de l'uranium sur la neurotransmission sont de moins en moins délétères entre les différents temps d'observation (1,5, 6, 9 et 18 mois d'exposition) (Bussy, 2005). Au niveau comportemental, une augmentation du temps passé en sommeil paradoxal a été démontrée pour les rats après 1 et 2 mois d'exposition à l'UE (40 mg/L). Par contre après 3 mois d'exposition, le temps passé en sommeil paradoxal des rats contaminés était équivalent à celui des rats témoins (Lestaevel et al., 2005). Ainsi, l'organisme semble capable de s'adapter ou de compenser des effets délétères de l'uranium puisque l'impact de la contamination à l'uranium est inversement proportionnel au temps d'exposition.

Par contre, les travaux de Bussy et al ont également montré des résultats opposés aux nôtres lorsque la contamination était réalisée avec de l'UA 40 mg/L. Dans cette étude, les effets de l'UA sont progressifs avec une perturbation du turn-over de la dopamine et de la sérotonine lorsque la contamination est prolongée (Bussy, 2005). Cependant, ce résultat montre que les différents systèmes neuronaux, même s'ils communiquent entre-eux, restent indépendants les uns des autres face à l'action de l'uranium.

En outre, les perturbations cholinergiques hippocampiques sont plus nombreuses chez les rats juvéniles lorsque l'exposition à l'uranium est prolongée ; même si la fonction cholinergique est maintenue. Ceci pourrait provenir d'une sensibilité accrue de l'hippocampe pendant son développement. L'impact hippocampique de l'UA chez les sujets juvéniles pourrait apparaître avec l'âge, soit par épuisement du système de

compensation, soit à cause des actions néfastes de l'UA provoquées lors du développement du système cholinergique.

VI. Implication du système cholinergique dans les troubles du comportement observés après contamination à l'uranium

Selon Alexander Karczmar : « Aucun comportement n'est l'affaire d'un seul neurotransmetteur, pourtant le système cholinergique y tient souvent une place importante. ». Ainsi, nous allons tenter d'établir un parallèle entre les perturbations cholinergiques et les modifications comportementales observées.

Chez les rats juvéniles, parmi les 7 tests réalisés, 4 comportements sont altérés par la contamination à l'UA (10 et/ou 40 mg/L).

Après 2 mois d'exposition à l'UA 40 mg/L, le taux d'acétylcholine et l'activité de l'AChE chutent. Au niveau comportemental, un déficit de mémoire à moyen terme, des performances moins bonnes pour l'habituation au rotarod, une anxiété plus élevée et un temps d'immobilité plus faible ont été observés par rapport aux animaux témoins.

De nombreuses études font état d'une implication directe de la fonction cholinergique dans les processus de mémorisation (Spangler *et al.*, 1990; Pepeu and Giovannini, 2004), d'apprentissage (Ridley *et al.*, 1991) et d'acquisition (Vnek *et al.*, 1996). La chute du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE dans l'hippocampe et le cortex pourrait être à l'origine de la baisse de performance des jeunes rats lors du test de mémoire à moyen terme et lors de l'habituation au rotarod.

L'action de la nicotine (généralement inhalée depuis les cigarettes) a clairement un effet anxiolytique (Brioni *et al.*, 1993; Cao *et al.*, 1993). Des études montrent que des fortes doses de nicotine provoquent à l'inverse un effet anxiogène (Irvine *et al.*, 1999; Ouagazzal *et al.*, 1999; Cheeta *et al.*, 2001). Ainsi, la chute du taux d'acétylcholine dans l'hippocampe et le cortex, observée chez les rats juvéniles, pourrait provoquer cette augmentation d'anxiété des rats. Concernant la diminution de résignation des juvéniles, elle est étrangement corrélée avec l'augmentation d'anxiété des animaux. Il se pourrait qu'elle ne soit pas la preuve d'une diminution de l'état dit de « dépression » des rats mais plutôt d'une augmentation d'anxiété de la part de ces animaux.

Après 4 mois de contamination, un déficit de la mémoire à moyen terme est persistant. Pourtant, le taux d'acétylcholine cortical est supérieur à celui des animaux témoins. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. Premièrement, l'hyperactivité du système cholinergique pourrait induire une hyperactivité des rats à l'origine de troubles attentionnels. Cependant, les tests montrent que l'activité des animaux n'est pas modifiée. Deuxièmement, la contamination pourrait provoquer des lésions au niveau du noyau basal de Meynert, ce qui expliquerait les troubles mnésiques observés. Toutefois, l'augmentation du taux d'acétylcholine met en doute cette hypothèse. Troisièmement, la contamination depuis la naissance pourrait induire des perturbations de la migration et des interconnexions neuronales. Ceci pourrait provoquer un déficit mnésique que la surcompensation cholinergique ne pourrait pallier. Une analyse histologique permettrait de valider ou non cette hypothèse.

La coordination locomotrice des jeunes rats est améliorée par rapport aux témoins pour les vitesses de 5 et 7 tours par minute. Or, une implication du système cholinergique a également été démontrée dans la capacité locomotrice des rats ([Day et al., 1991](#); [Mizuno et al., 1991](#)). Ainsi l'augmentation de la libération d'acétylcholine dans l'hippocampe et le cortex faciliterait la coordination motrice.

Par ailleurs, l'anxiété des rats est diminuée. Cette diminution peut être corrélée avec l'augmentation du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE observée dans le cortex. En effet, des études montrent d'une part que le taux de choline chez l'homme est corrélé négativement avec l'anxiété ([Bjelland et al., 2009](#)) et d'autre part que l'injection hippocampique de composés cholinergique pouvait avoir un rôle anxiolytique chez le rat ([Engin and Treit, 2007](#)).

Un parallèle entre les résultats obtenus sur le métabolisme du système cholinergique et les observations comportementales existe. Cependant, un lien direct est difficilement possible de part l'importante implication du système cholinergique dans de nombreux systèmes neuronaux et de part la complexité des mécanismes neuronaux impliqués dans les actions comportementales. Par exemple dans notre étude, les performances au test de mémoire à court terme ne sont pas perturbées alors qu'un lien étroit entre le système cholinergique hippocampique et cortical et ce type de mémoire a été démontré ([Hironaka et al., 2001](#)). Par ailleurs, la fonction cholinergique régit la libération de neurotransmetteurs, ainsi elle module la libération de dopamine *via* les neurones glutamatergiques et/ou GABAergiques ([Janhunen and Ahtee, 2007](#)). **Les multiples afférences du système cholinergique rendent compliqué une éventuelle explication de cause à effet. Et ceci d'autant que le modèle**

utilisé (rats juvéniles) peut présenter des afférences anormales dues à des perturbations lors de la différenciation et de la migration neuronale induites par l'uranium.

En outre, chez les souris ApoE^{-/-}, la contamination à L'UA (20 mg/L) n'a modifié que l'expression de quelques gènes (augmentation de l'ACHé et de la BuChE) et les tests réalisés ne mettent en évidence qu'une diminution d'activité dans le labyrinthe en Y. Toutefois, cette observation n'a pas été vérifiée lors du test d'activité locomotrice. L'augmentation d'activité observée dans les labyrinthes en Y reste à confirmer.

VII. Effets de l'UE sur le SNC et irradiation externe : comparaison

Lors des expositions chroniques à l'UE (40 mg/L) réalisées au cours de ce travail, l'hippocampe et le cortex ont présenté des réponses différentes. L'atteinte des deux structures est très marquée après 1,5 mois de contamination avec une perturbation de la fonction cholinergique. Dans l'hippocampe, de nombreuses variations d'expression génique des différents acteurs cholinergiques ont également été observées. Cette atteinte plus importante de l'hippocampe pourrait provenir d'une accumulation spécifique de l'UE dans cette structure. Toutefois, l'hippocampe a fait preuve d'une grande adaptabilité dans le temps avec une restauration de la fonction cholinergique après 9 mois de contamination malgré une accumulation persistante de l'UE. A l'inverse, le cortex ne parvient pas à rétablir sa fonction cholinergique après 9 mois d'exposition et les modifications d'expression génique se font plus nombreuses, alors qu'aucune accumulation d'UE n'a pu être mesurée. Ainsi les perturbations observées dans le cortex sont la résultante d'une action indirecte de l'UE mais en lien avec son activité radiologique.

Des études *ex vivo* et *in vivo* ont précédemment montré que le système cholinergique pouvait être perturbé lors d'irradiations. Dans l'hippocampe de lapin, l'irradiation induit une diminution de l'efficacité du transporteur de haute affinité de la choline (CHT), à l'origine d'une recapture neuronale de la choline moins importante (6 Gy) (Savas *et al.*, 2001). Une augmentation d'activité de l'ACHé et de la ChAT et une augmentation d'expression génique du NGF ont également été observées après irradiation (0,5, 1 et 2 Gy) de cultures de neurones de prosencéphale de souris (Dimberg and Larkfors, 1994). Dans ces deux protocoles, les effets observés étaient dépendants de la dose d'irradiation reçue.

Sur le plan comportemental, un travail a démontré que l'irradiation externe crâniale unique de 20 Gy induit des perturbations de la mémoire spatiale et de la mémoire de travail chez le rat plus de 40 semaines après l'irradiation. Ces troubles seraient dépendants de la dose et de la tâche mnésique (Hodges *et al.*, 1998). L'équipe d'Atwood a également montré un déficit de la mémoire à moyen terme (test de reconnaissance d'objet) chez le rat 54 jours après irradiations cérébrales fractionnées (45 Gy délivrés par 5 Gy, 2 fois par semaine pendant 4,5 semaines) (Atwood *et al.*, 2007). Suivant un protocole similaire, des perturbations de la mémoire spatiale, corrélées avec une augmentation du nombre de récepteurs au glutamate (de type NMDA mais pas AMPA) dans la régions CA1 de l'hippocampe ont été observées 12 mois post-irradiation (Shi *et al.*, 2006). Enfin, deux études comparatives sur l'impact d'irradiations cérébrales chez les rats jeunes et âgés montrent une diminution des capacités mnésiques plus précoces, mais avec une récupération partielle dans le temps, chez les rats jeunes par rapport aux rats adultes. De plus, une atteinte des performances d'apprentissage a également été observée plus précocement chez les rats jeunes que chez les rats adultes, cette fois sans qu'il y ait récupération (irradiation de 30 Gy fractionnée en 10 séances de 3 Gy sur 12 jours) (Diserbo *et al.*, 2002). Ces résultats soulignent une atteinte comportementale, et plus particulièrement mnésique, résultante de l'irradiation du cerveau. Cette atteinte apparaît comme dépendante de l'âge.

Par ailleurs, lors d'irradiations corps-entier à plus faible dose, les perturbations mnésiques transitoires ont été démontrées chez le rat jeune (irradiation 4,5 Gy) (Diserbo *et al.*, 2002) et la souris jeune (4,5 Gy) (Martin *et al.*, 2001). Chez la souris, des modifications temporaires du métabolisme de la dopamine et de la sérotonine ont également été observées (Martin *et al.*, 2001).

En outre, de nombreuses études montrent que l'irradiation externe *in utero* ou juvénile provoque des atteintes hippocampiques et corticales. Les réponses de ces deux structures sont différentes et sont induites par des modifications architecturales des neurones, sans que leur nombre ne soit modifié (Jensh *et al.*, 1995; Fushiki *et al.*, 1997; Inouye *et al.*, 2000; Abou-Donia *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2002; Silasi *et al.*, 2004; Takai *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2006; Miki *et al.*, 2007). De plus, ces modifications hippocampiques et corticales sont à l'origine de perturbations de l'apprentissage (Sienkiewicz *et al.*, 1992; Takai *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2006). Chez l'adulte, les effets centraux de l'irradiation corps-entier provoque une neuro-inflammation (Gourmelon *et al.*, 2005) et une perméabilité transitoire de la BHE (Trnovec *et al.*, 1990; Nakata *et al.*, 1995; Diserbo *et al.*, 2002). Cette

perméabilité transitoire pourrait être à l'origine d'effets neurologiques indirects provoqués par le passage hémato-méningé de molécules neurotoxiques.

La littérature montre que le système cholinergique, et plus globalement le système nerveux central, est perturbé lors d'irradiation du SNC. Toutefois la dose d'irradiation reçue lors de la contamination chronique à l'uranium est bien plus faible que celle reçue lors d'irradiations crânielles ou corps entier rapportées dans les articles cités ci-dessus.

VIII. Effets de l'uranium et d'autres neurotoxiques sur le système cholinergique : comparaison

Dans ce travail, le plomb n'a induit que quelques troubles d'ordre générique avec une diminution de l'expression de l'AChE et du récepteur muscarinique de type 1 et une augmentation d'expression du transporteur de haute affinité de la choline. Ces résultats sont de faible ampleur en comparaison avec l'abondante littérature désignant le système cholinergique comme une cible de ce métal lourd. Ces travaux, pour la plupart réalisés sur un modèle néo- ou périnatal, montrent une altération de la fonction cholinergique, avec une diminution de l'activité de la ChAT (Bielarczyk et al., 1996; Bourjeily and Suszkiw, 1997; Sun et al., 1997a) et de l'AChE (Finkelstein et al., 1998; Reddy et al., 2007) ainsi qu'une augmentation du taux de l'acétylcholine (Reddy et al., 2007). De plus, la libération synaptique de l'acétylcholine serait augmentée (Toth et al., 1987; Minnema et al., 1988; Hoshi et al., 1991; Shao and Suszkiw, 1991) avec en parallèle une diminution de la densité des récepteurs muscariniques de type 1 (Finkelstein et al., 1998). Par ailleurs, une perturbation de la consolidation de la mémoire spatiale a été observée après exposition sub-chronique à 500 ppm d'acétate de plomb (Garcia-Arenas et al., 2004). Ainsi, deux facteurs peuvent expliquer la différence de ces résultats avec les nôtres. D'une part, la concentration de plomb que nous avons donné à boire aux rats est bien plus faible que les doses administrées aux rats dans les études *in vivo* suscitées. D'autre part, nos rats ont débuté la contamination à l'âge adulte alors que les études précédentes ont été réalisées en périnatal, période de mise en place de l'architecture cérébrale.

Dans notre étude, l'absorption intestinale du plomb (8 fois plus élevée que celle de l'UA) a été prise en compte lors des calculs de concentration. Ainsi, une comparaison directe entre les effets de l'UA et du plomb peut être réalisée puisque la charge systémique pour ces deux métaux est équivalente pour nos rats adultes. Ces résultats montrent une

sensibilité du système cholinergique moins importante pour le plomb que pour l'UA. En outre, les études menées par d'autres équipes montrent que les cibles et les altérations du système cholinergique sont très proches entre le plomb et l'UA. Ceci nous amène à conclure que la toxicité de l'UA sur le système cholinergique se déclare très probablement à des concentrations plus faibles que pour le plomb.

Après contamination à l'uranium, la fonction cholinergique est altérée avec des modifications du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE. L'uranium pourrait provoquer une libération d'acétylcholine, comme le font le plomb (Toth *et al.*, 1987), le mercure (Cooper *et al.*, 1982) ou l'aluminium (Jankowska *et al.*, 2000). Cette libération massive d'acétylcholine dans la fente synaptique induirait une déplétion en neurotransmetteur puisque seulement 50% de l'acétylcholine est recaptée par les neurones. La baisse d'activité de l'AChE serait une adaptation du métabolisme à la chute d'acétylcholine. Une autre hypothèse peut être envisagée. En effet, la diminution concomitante du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE serait la résultante d'une perte neuronale, comme cela a déjà été montré pour des expositions chroniques au mercure (Castoldi *et al.*, 2001) ou à l'éthanol (Arendt *et al.*, 1988; Costa and Guizzetti, 1999).

Concernant les récepteurs cholinergiques, des variations d'expression génique ont pu être observées (hormis après 9 mois d'exposition des rats adultes à l'UA 40 mg/L). Or les études antérieures visant à estimer l'impact des métaux lourds sur le système cholinergique mettent en évidence des modifications de la densité des récepteurs cholinergiques mais pas de leur nombre ni de leur affinité (Castoldi *et al.*, 1996; Bonfante-Cabarcas *et al.*, 2002; Mirzoian and Luetje, 2002). Ainsi, les perturbations induites par l'uranium sur les récepteurs cholinergiques sont très certainement à compléter par des études de binding et d'immunohistochimie.

D'un point de vue comportemental, l'uranium induit des perturbations mnésiques et psychiques. Au niveau mnésique, l'uranium n'est pas le seul toxique à induire des altérations de la mémoire puisque quelques études l'ont déjà démontré après exposition au mercure (Castoldi *et al.*, 2001), au zinc (Bonfante-Cabarcas *et al.*, 2002) ou à l'éthanol (Beracochea *et al.*, 1986).

Sur le plan psychique, la diminution transitoire de résignation des rats contaminés pendant 2 mois à l'UA (40 mg/L) a jusqu'à présent été attribuée à une augmentation d'anxiété. Toutefois, d'autres études font également état d'une amélioration des performances (moins d'immobilité) chez les rongeurs exposés de manière aiguë au magnésium (Poleszak

et al., 2005) ou au lithium (Redrobe and Bourin, 1999), en aiguë ou en chronique au zinc (Nowak et al., 2003) ou en chronique au césium (Messiha, 1978). Les effets « anti-dépresseurs » du magnésium sont soumis à une habitude de l'organisme au traitement, puisque l'effet disparaît lors d'exposition chronique (Poleszak et al., 2005). Il se pourrait que, comme pour le magnésium, les effets « bénéfiques » de l'uranium soient soumis à une forme d'accoutumance de l'organisme et disparaissent lorsque l'exposition à l'actinide se prolonge.

Au niveau plasmatique, l'exposition chronique à l'UE chez l'adulte est à l'origine d'une chute de l'activité des cholinestérases plasmatiques. Cette atteinte systémique du système cholinergique peut être rapprochée des perturbations observées lors d'expositions aux organophosphates (insecticides) (Al-Badrany and Mohammad, 2007; Loko F., 2007) ou au cadmium (Machreki-Ajmi et al., 2008).

IX. Modes d'action de l'uranium sur les neurones

Un travail de thèse a préalablement montré que l'entrée de l'uranium dans les cellules rénales pouvait avoir deux origines (Muller, 2002). Quantitativement, la fraction la plus conséquente d'uranium passe par une endocytose clathrine-dépendante. L'uranium endocyté est regroupé dans les lysosomes où il précipite. Qualitativement, la fraction cytotoxique de l'uranium passe par le co-transporteur NaPi II. Cette fraction est la plus toxique puisque l'uranium est sous forme libre et soluble.

Si l'on considère que le passage de l'uranium au sein des cellules neuronales suit les mêmes voies, deux pools d'uranium seraient présents dans les cellules IMR-32.

Dans notre travail, le pool provenant de l'endocytose clathrine-dépendante serait celui visualisé par les techniques de TEM et de SIMS sous forme de précipités d'UA. Dans les cellules neuronales, la clathrine permet l'endocytose des vésicules de neurotransmetteurs exocytosées (Granseth et al., 2006), or la particularité des cellules IMR-32 est de ne posséder qu'un très faible nombre de vésicules cholinergiques. Ainsi, le rendement endocytotique de l'uranium pourrait être sous-estimé dans ce type cellulaire par rapport à celui observé dans d'autres lignées.

La fraction, bien plus faible, d'uranium entrée par le co-transporteur NaPi II serait à l'origine de la cytotoxicité cellulaire. Cependant la cytotoxicité de l'UA pour les neurones n'apparaît qu'à 500 μM à 24h, or dans d'autres types cellulaires (ostéoblastes, cellules rénales et hépatiques) elle apparaît dès 300 μM (Thiebault et al., 2007; Milgram et al.,

2008a) (données internes au laboratoire). Cette différence pourrait provenir de l'activation plus importante de ce transporteur dans les autres lignées cellulaires. Ainsi, la fraction d'uranium cytotoxique s'accumulerait moins facilement dans les cellules IMR-32 ce qui apparaîtrait comme une sensibilité moins importante face à l'uranium. Cependant, ces résultats sont de même ordre de grandeur, ce qui démontre qu'il existe une forme d'homogénéité dans la réponse des différents types cellulaires face à la contamination à l'UA.

Le mode d'action cytotoxique de l'uranium reste inexpliqué. Des études antérieures montrent que l'uranium (UO_2^{2+}) pourrait mimer l'action du calcium (Ca^{2+}) et provoquer la libération de l'acétylcholine dans la fente synaptique (Lin-Shiau et al., 1979; Lin-Shiau and Fu, 1986). Des actions similaires ont pu être observées pour d'autres métaux lourds présents sous forme cationique dans l'organisme tels que le plomb (Cooper et al., 1982; Suszkiw et al., 1984; Toth et al., 1987), le cadmium (Cooper et al., 1982; Suszkiw et al., 1984; Toth et al., 1987), le mercure (Cooper et al., 1982) ou encore l'aluminium (Jankowska et al., 2000). Si l'uranium parvient effectivement à mimer le calcium, cela pourrait avoir deux grandes conséquences.

La première serait une libération intempestive d'acétylcholine dans la fente synaptique, et ce en l'absence de potentiel d'action. Ceci pourrait conduire à des messages dits « parasites » et provoquer des interférences neuronales. Cette sur-stimulation neuronale pourrait avoir un rôle dans les perturbations mnésiques engendrées par l'uranium. L'équipe de Pellmar a d'ailleurs mis en évidence des changements électrophysiologiques sur des coupes hippocampiques de rats portant des implants de pastilles d'UA (Pellmar et al., 1999b). Les auteurs suggèrent que ces changements pourraient avoir un impact sur les déficits neurologiques observés après exposition à l'uranium.

La seconde serait une mauvaise interprétation cellulaire de la présence d'ions uranyles. La cellule pourrait y voir la libération importante de calcium intracellulaire. De plus, un déséquilibre osmotique provoqué par l'entrée d'ions uranyles (UO_2^{2+}) ou de précipités d'UA (composés d'UA, de Ca^{2+} et de Na^+) pourrait être à l'origine de la mort cellulaire. Une étude a d'ailleurs démontré l'induction de l'apoptose caspase-dépendante de cellules rénales (NRK-52^E) en présence de faibles concentrations d'UA. Selon les auteurs, l'apoptose serait déclenchée par une chute du potentiel membranaire mitochondrial, à l'origine de l'activation des caspases 9 et 3 (Thiebault et al., 2007). Par ailleurs, une publication a démontré qu'une injection intra-péritonéale de nitrate d'uranyle chez le rat provoquait une importante accumulation de calcium dans les mitochondries des cellules

rénales. D'après les auteurs, la mitochondrie accumulerait le calcium afin de limiter le déséquilibre osmotique induit par la forte concentration de calcium cytosolique. Ceci pourrait conduire à la mort des mitochondries, entraînant par la suite la mort des cellules (Carafoli *et al.*, 1971).

Une autre hypothèse pourrait être envisagée si l'on tient compte de l'aspect radiotoxique de l'uranium. La radiotoxicité du nitrate d'uranyle utilisé en culture cellulaire est négligeable, sauf si l'uranium entre dans la cellule et s'y accumule. Ainsi, l'activité radiologique de l'uranium, même très faible, pourrait induire des lésions dans l'ADN cellulaire à l'origine de la nécrose cellulaire (Thiebault *et al.*, 2007).

Ainsi, la cytotoxicité de l'uranium pourrait à la fois être la résultante de l'apoptose et de la nécrose des cellules.

X. Perspectives

Ce travail, de part le grand nombre de modèles envisagés ainsi que les résultats obtenus, ouvre d'abondantes perspectives.

Dans un futur proche, un complément d'étude sur les expérimentations animales déjà réalisées serait à considérer.

Afin de compléter les données obtenues par les dosages du taux d'acétylcholine et de l'activité de l'AChE, le dosage de l'activité de la choline acétyltransférase (ChAT) devrait être envisagé. Ce dosage donnerait des informations sur l'intégrité et la viabilité des neurones cholinergiques. Le dosage de la ChAT, en plus des deux dosages déjà réalisés, permettrait de confirmer l'atteinte de la fonction cholinergique par la contamination à l'uranium.

L'étude du système cholinergique pourrait s'étendre à d'autres structures que l'hippocampe et le cortex, avec notamment une analyse du noyau basal de Meynert et de ses projections. Cette étude nous renseignerait sur l'impact de l'uranium sur un des grands noyaux cholinergiques du système nerveux central. Ce travail pourrait être effectué par radiomarquage de la ChAT et révélation en chambre β -imager.

Enfin, la contamination d'un groupe de souris de génotype sauvage à l'UA 20 mg/L pendant 3 mois permettrait de compléter les résultats obtenus pour les souris ApoE^{-/-}. L'ajout de ce groupe apporterait des informations sur l'effet de l'uranium sur les souris de génotype sauvage. Ceci nous permettrait de conclure quant aux effets spécifiques de l'uranium sur le groupe de souris mutées pour le gène de l'ApoE, en comparant avec les effets observés chez les souris de génotype sauvage.

A plus long terme, la mise en place de certaines expériences pourrait répondre à des interrogations précises soulevées lors de ce travail de thèse.

Lors de la contamination des animaux juvéniles à l'UA 40 mg/L, certains des effets comportementaux ont disparu entre les temps 2 et 4 mois. Des tests comportementaux pourraient être réalisés entre ces deux mois afin de connaître le temps nécessaire à

l'organisme pour « s'adapter » à la contamination. En parallèle une étude du système cholinergique (comme réalisée jusqu'ici) permettrait de discuter d'une éventuelle corrélation entre la disparition des troubles comportementaux et une amélioration de la fonction cholinergique.

Par ailleurs, chez les souris ApoE^{-/-}, la contamination de 3 mois à l'UA 20 mg/L n'a pas déclenché d'apparition plus précoce des symptômes pour lesquels les souris sont prédisposées. L'exposition des souris à l'uranium pendant un temps plus long, permettrait de déterminer une éventuelle potentialisation par l'uranium des symptômes que présenteront ces souris.

L'action de l'uranium sur le système cholinergique est indéniable, mais son mode d'action reste encore à éclaircir.

Les études *in vivo* réalisées chez les rats adultes au cours de cette thèse ont montré que le récepteur muscarinique de type 1 était particulièrement perturbé, notamment avec une diminution de 30% de son niveau protéique dans le cortex après 9 mois de contamination à l'UA. Des expériences de binding sur ce récepteur (m1AChR) permettraient de compléter ces résultats en observant une éventuelle perturbation du nombre ou de l'affinité du récepteur sur les membranes synaptiques.

In vitro, des contaminations d'uranium à des concentrations non-cytotoxiques seraient à prévoir afin d'observer une éventuelle action de l'uranium sur ces récepteurs muscariniques de type 1. Ces récepteurs appartiennent à la famille des RCPG (pour Récepteur Couplé aux Protéines G). C'est pourquoi, l'étude de l'activation de la voie de signalisation des protéines G serait à analyser. Ce travail de signalétique pourrait nous amener à comprendre les mécanismes de mort cellulaire induits par l'uranium. Par ailleurs, la localisation cellulaire de l'uranium, entamée lors des analyses par SIMS, pourrait être approfondie en MET dans le but d'essayer d'observer les voies d'entrées et les cibles cellulaires de l'uranium.

En ouvrant les perspectives à un champ plus large, deux autres expériences seraient à concevoir.

Premièrement, une imagerie par tomographie par émission de positron (T.E.P.) pourrait nous renseigner sur la distribution de l'uranium au niveau cérébral, ou corps entier. Pour

cela, il faudrait pouvoir marquer l'uranium avec un traceur et observer à l'aide d'un scanner la cinétique de distribution de l'uranium dans le cerveau. Cette méthode apporterait peut-être des indices quant au moyen ou au lieu d'entrée de l'uranium dans le cerveau (zone(s) de fenestration de la BHE, régions spécifiques)

Deuxièmement, puisqu'il existe des interactions acétylcholine-dopamine, il se pourrait que les perturbations du système cholinergique observées après contamination à l'uranium aient des répercussions sur le système dopaminergique. Une étude de la libération d'acétylcholine et de dopamine par microdialyse dans certaines structures comme l'hippocampe, le cortex ou le striatum pourrait être envisagée lors de tests mnésiques ou moteurs (labyrinthe à 8 bras, piscine de Morris, Rotarod, etc.). Cette étude nous renseignerait sur la fonctionnalité des systèmes cholinergiques et dopaminergiques après la contamination à l'uranium. Une éventuelle modification de la libération des neurotransmetteurs apporterait des informations plus précises que les mesures de taux d'acétylcholine ou de dopamine puisque cette mesure serait en continue et en réponse directe à une stimulation.

XI. Conclusion générale

Ce travail montre que le système cholinergique du rongeur est une cible de la contamination chronique *per os* de l'uranium à des doses environnementales (Figure 66).

L'accumulation cérébrale de l'uranium est dépendante de nombreux facteurs tels que le temps d'exposition, la voie d'administration, la structure cérébrale, l'âge de l'animal ainsi que de l'isotope de l'uranium employé.

Les différents modèles explorés (adultes, juvéniles, prédisposés à une pathologie neurodégénérative) présentent une sensibilité différente à la contamination. Ainsi, l'impact de l'uranium semble plus délétère chez les rats juvéniles que chez les rats adultes et plus délétère chez les rats adultes que chez les souris adultes. Cependant, quelque soit le modèle, le cortex semble plus sensible à la toxicité de l'UA que l'hippocampe. De plus l'accumulation de l'uranium et les cibles du système cholinergique sont spécifiques à chacune de ces deux structures. Par ailleurs, ces travaux montrent que la toxicité de l'uranium est dose-dépendante. En outre, la prolongation de la contamination est à l'origine d'une forme d'adaptabilité de l'organisme, puisque que les effets de l'uranium sont inversement proportionnels à la durée d'exposition, sauf au niveau hippocampique pour le modèle juvénile.

Un parallèle entre les résultats obtenus sur le métabolisme du système cholinergique et les observations comportementales a pu être effectué. Cependant, un lien direct est difficilement possible de part l'importante implication du système cholinergique dans de nombreux systèmes neuronaux et de part la complexité des mécanismes neuronaux impliqués dans les actions comportementales.

Par ailleurs, la contamination au plomb n'a eu que peu d'effets sur le système cholinergique puisque la concentration en plomb de l'eau de boisson des animaux était faible (5 mg/L). Ceci ne nous permet pas de comparer nos résultats avec les observations effectuées lors de la contamination à l'uranium. Néanmoins, des travaux antérieurs réalisés à des concentrations plus importantes de plomb montrent que les cibles cholinergiques et comportementales sont très proches de celles touchées par la contamination à l'uranium. De plus, la toxicité de l'UA semble se déclarer à des concentrations plus faibles que pour le plomb. En outre, les effets de l'uranium sur le

système cholinergique sont assez similaires avec ceux observés après exposition à d'autres métaux lourds présents sous forme cationique dans l'organisme. Ceci souligne la chimiotoxicité de l'UA dans les effets centraux observés.

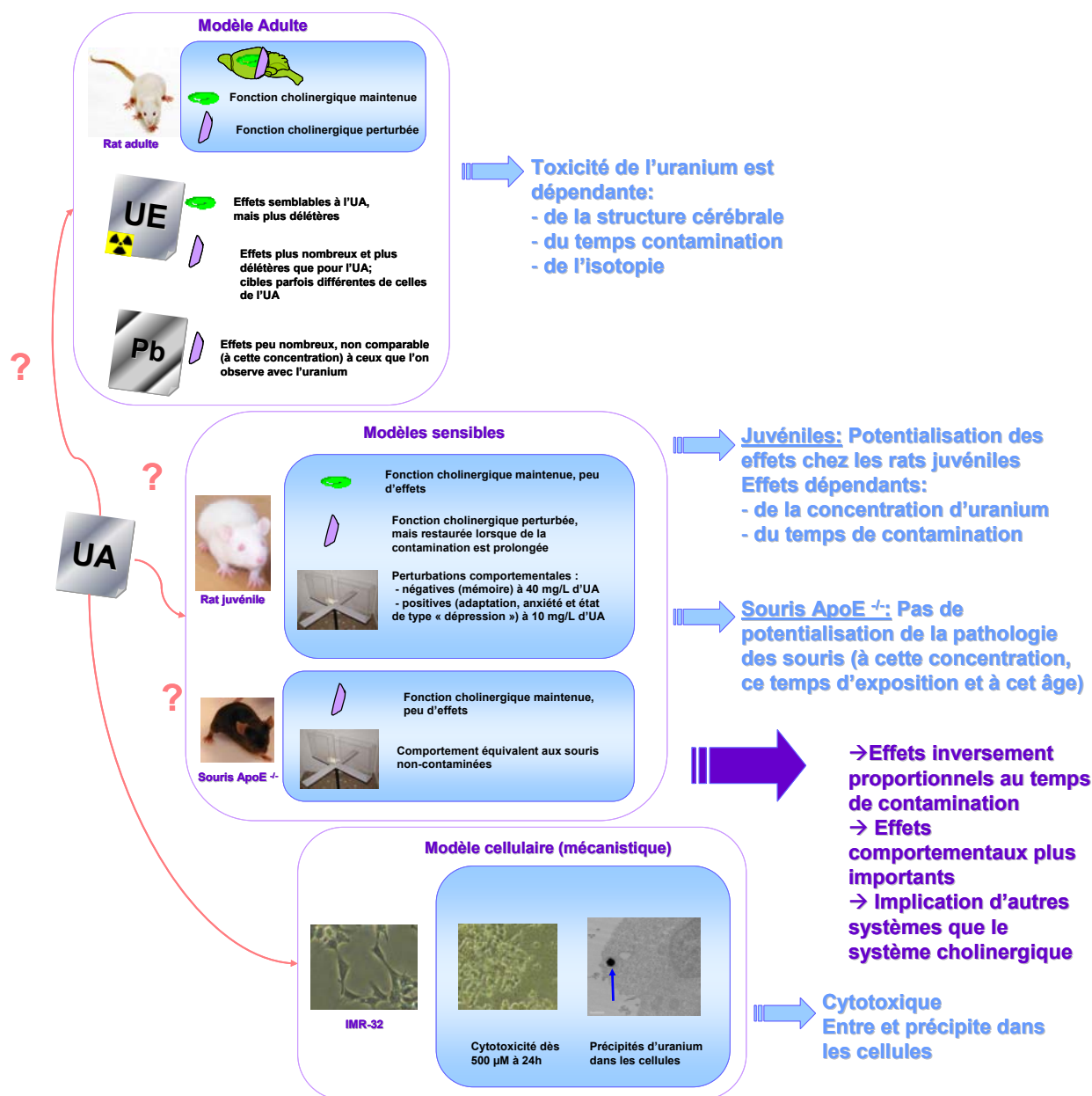


Figure 66 : Représentation de la conclusion générale du travail de thèse

Concernant la contamination à l'UE, des réponses distinctes ont été observées pour l'hippocampe et le cortex. Dans l'hippocampe, les cibles du système cholinergique sont semblables à celles affectées par la contamination à l'UA, mais avec une action plus délétère de l'UE. Dans le cortex, les cibles de l'UE sont différentes et plus nombreuses que celles observées après exposition à l'UA. Ces résultats soulignent les effets structure-dépendants de la contamination à l'uranium puisque les atteintes hippocampiques et corticales sont différentes en fonction du degré de radiotoxicité de l'actinide.

Au niveau cellulaire, ce travail montre que l'uranium rentre dans les cellules neuronales IMR-32 où il induit une action cytotoxique dès 500 μM après 24h d'incubation.

Ces résultats ouvrent une piste sur la compréhension des mécanismes de neurotoxicité de l'uranium.

ANNEXES

I. Compte-rendu - données personnelles transmises par Marie Donnadiou-Claraz

Réunion de travail du 20 Décembre 05 - Compte-rendu et relevé de décisions

Présents : Pr JJ Hauw, B.Dhieux, M.Donnadiou-Claraz, P.Lestaevel

A. Etat d'avancement

CONTAMINANT	Durée	Nbre rats	Activité expérimentale	Avancement Planning
TE	9mois	4	Préparation des échantillons	FAIT
		2	Microtomie	FAIT
		2	Coloration Crésyl	FAIT
		2	Comptage neuronal Hippocampe	FAIT
UA 40mg/l	9mois	4	Préparation des échantillons	FAIT
		2	Microtomie	FAIT
		2	Coloration Crésyl	FAIT
		2	Comptage neuronal Hippocampe	FAIT
UE 4% 40mg/l	9mois	4	Préparation des échantillons	FAIT
		2	Microtomie	FAIT
		2	Coloration Crésyl	FAIT
		2	Comptage neuronal Hippocampe	FAIT
TE	1.5mois	4	Préparation des échantillons	FAIT
		2	Microtomie	FAIT
		2	Coloration Crésyl	FAIT
		2	Comptage neuronal Hippocampe	FAIT
UA 40mg/l	1.5mois	4	Préparation des échantillons	FAIT
		2	Microtomie	FAIT
		2	Coloration Crésyl	FAIT
		2	Comptage neuronal Hippocampe	FAIT
UE 4% 40mg/l	1.5mois	4	Préparation des échantillons	FAIT
		2	Microtomie	FAIT
		2	Coloration Crésyl	FAIT
		2	Comptage neuronal Hippocampe	FAIT

2/

Décompte des neurones des différentes zones de l'hippocampe

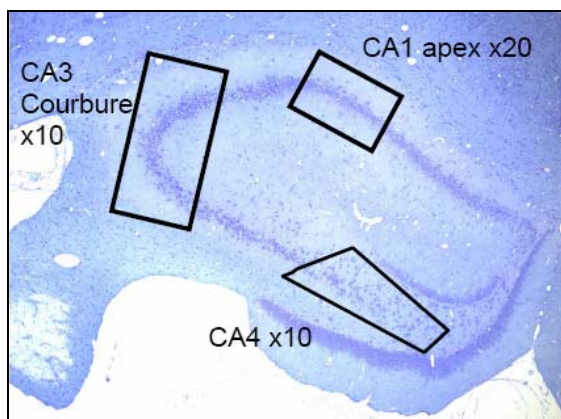
B. Méthodologie de comptage

La méthodologie de comptage des neurones des différentes zones de l'hippocampe a été présentée et approuvée par le Pr Hauw. Trois zones de l'hippocampe (CA1, CA3 et CA4) et quatre localisations dans la partie antérieure de l'hippocampe (planches P29, P30, P32, P33 selon l'atlas PAXINOS) ont été considérées. Seuls les neurones dont le nucléole est bien visible dans le noyau, ont été comptabilisés. Le nombre de neurones a été ramené par unité de surface. Chaque zone est comptée en aveugle par une personne différente de façon à limiter au maximum les artéfacts de lecture :

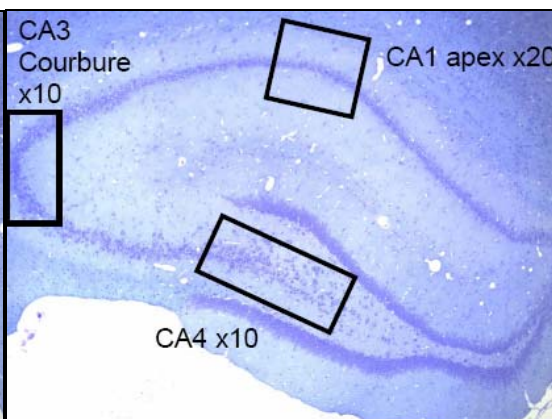
CA1 : B ;DHIEUX ; CA3 : P.HOUPERT ; CA4 : M.DONNADIEU-CLARAZ

Méthodologie de comptage des neurones de l'hippocampe

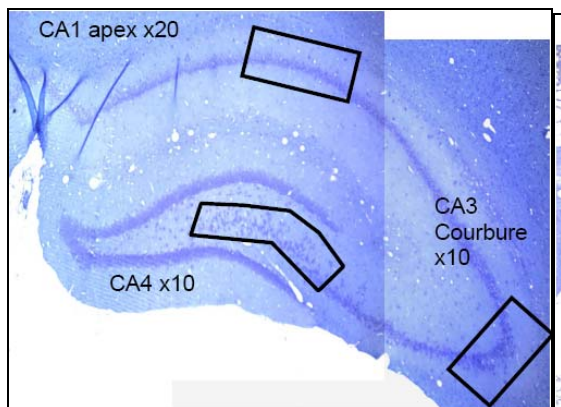
P29 :



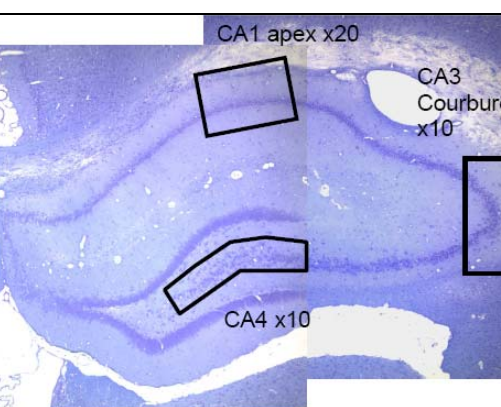
P30 :



P32 :



P33 :

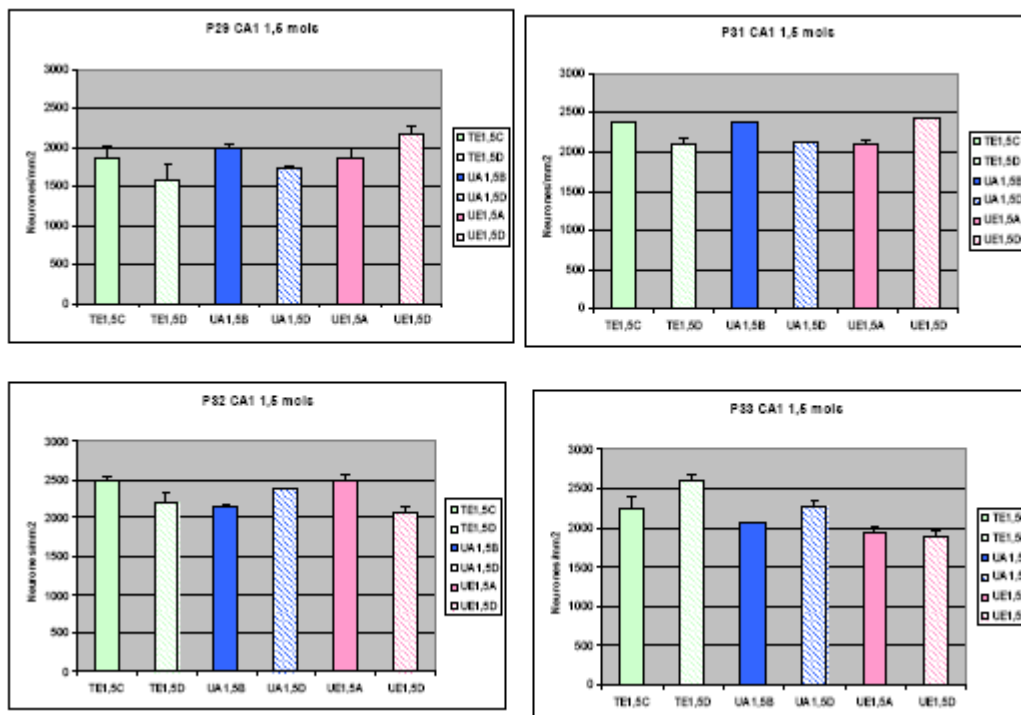


1) Résultats.

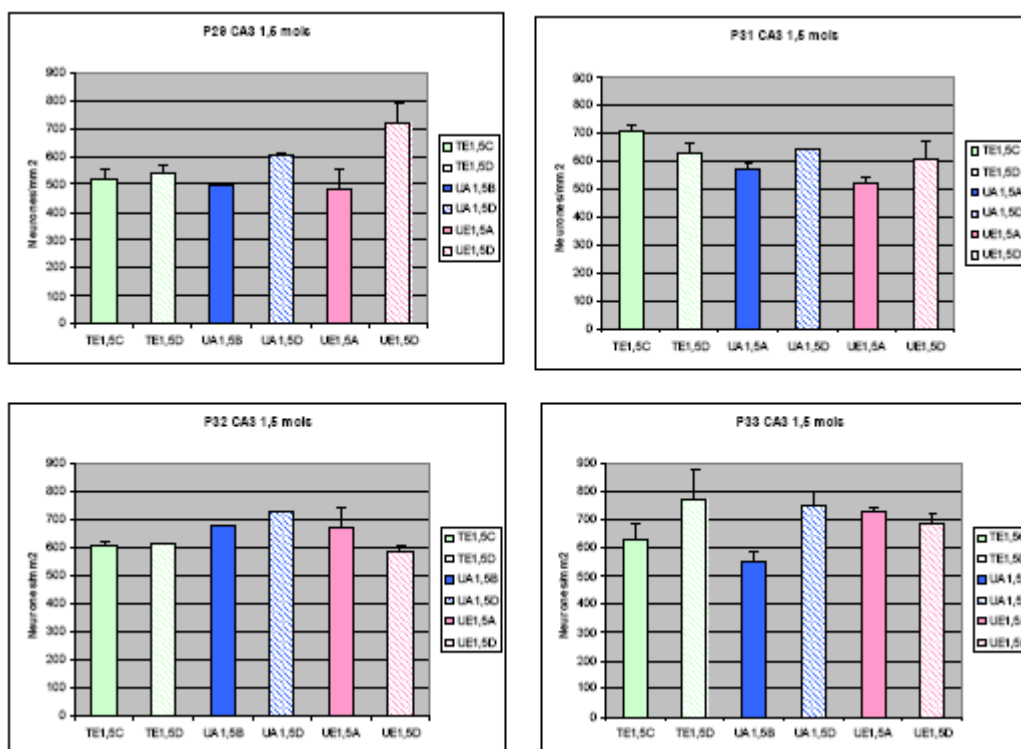
Les résultats préliminaires, concernant 2 animaux sur les 4 composant chaque lot expérimental, ne montrent pas de perte neuronale sensible entre le lot témoin et les lots contaminés UA ou UE, au niveau de l'hippocampe.

Résultats préliminaires de décompte des neurones de l'hippocampe

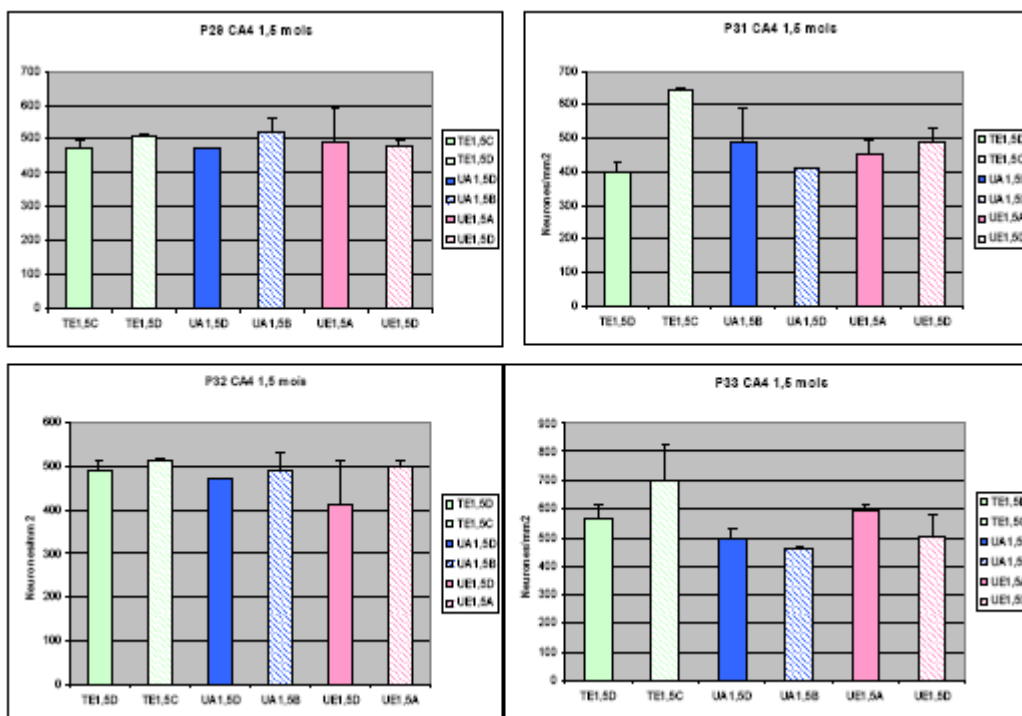
SNC-HISTO-U-1.5mois- Zone CA1



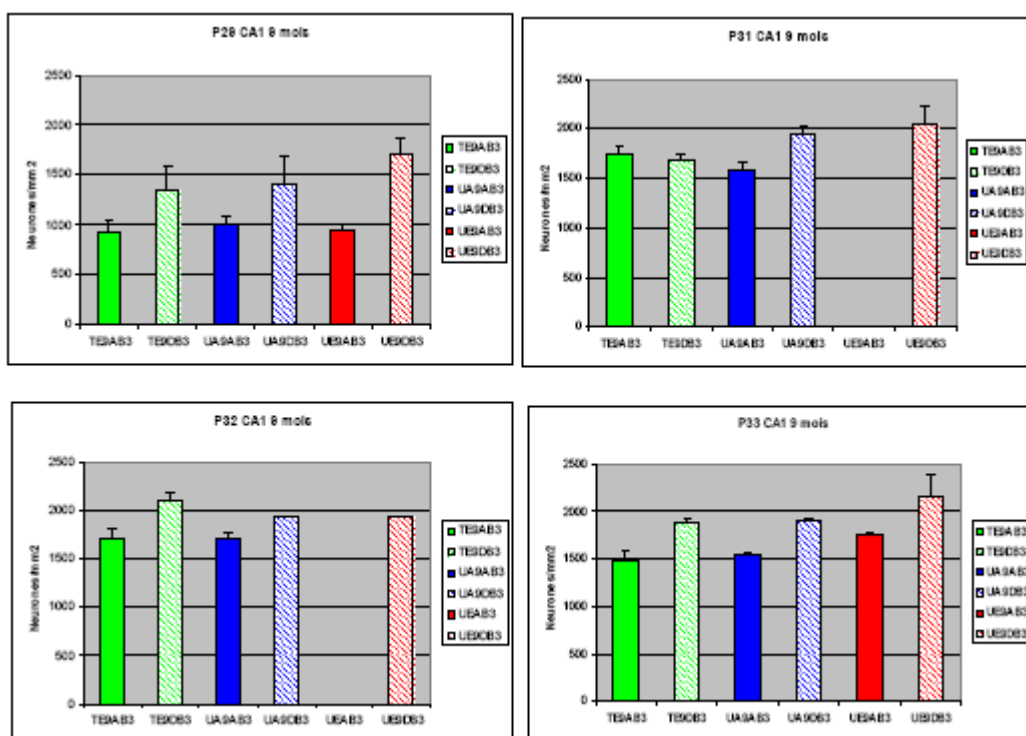
SNC-HISTO-U-1.5mois- Zone CA3



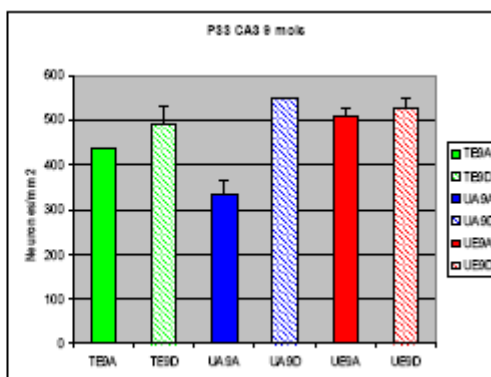
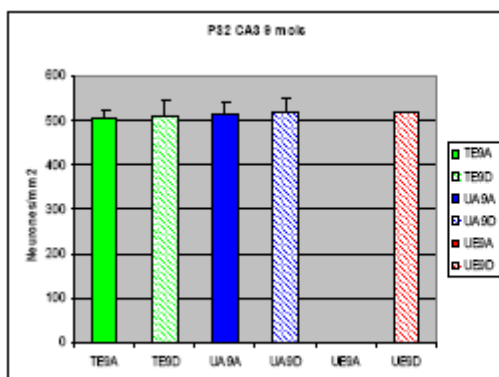
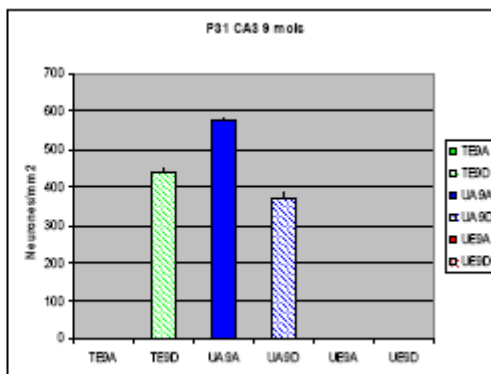
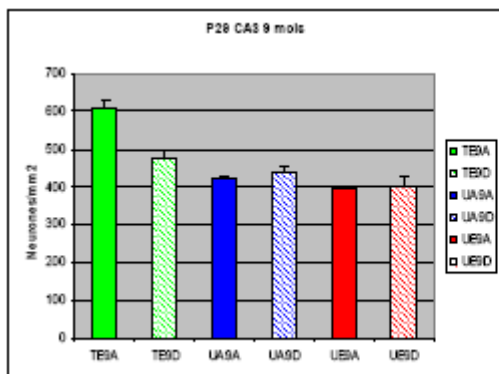
SNC-HISTO-U-1.5mois- Zone CA4



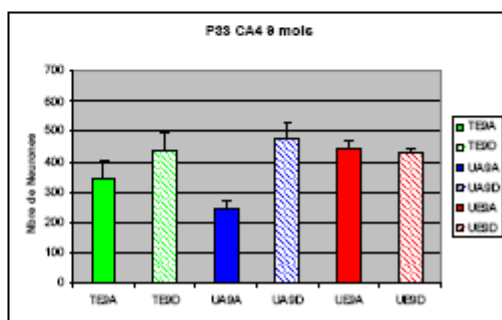
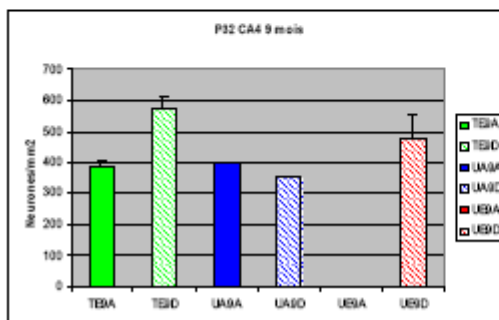
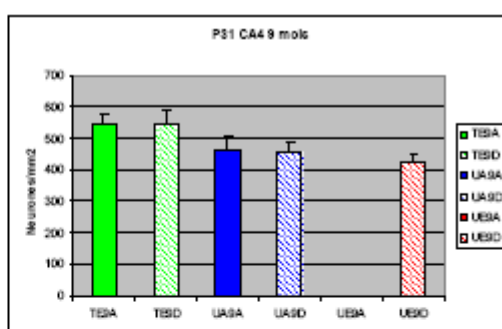
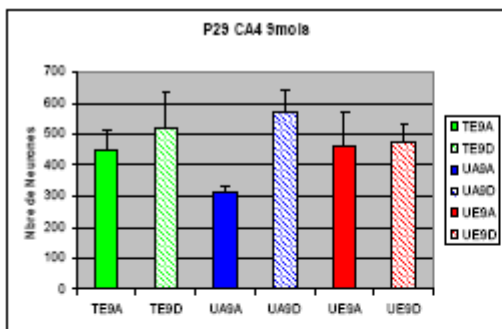
SNC-HISTO-U-9mois- Zone CA1



SNC-HISTO-U-9mois- Zone CA3



SNC-HISTO-U-9mois- Zone CA4



2) Perspectives

Le programme Uranium est mis en attente durant le premier semestre 2006 en raison de la priorité du programme Césium.

D'autres paramètres seront évalués au niveau de l'hippocampe notamment :

- Surface totale de l'hippocampe, nombre de neurones ramenés à cette surface totale.
- Epaisseur des nucléoles (sur 20-30 neurones présentant un nucléole bien marqué).

II. Préparation de la solution d'UA

Préparation des Eaux de Boisson

Eau minérale naturelle (Evian), complétée en Uranium Appauvri (source Gisel n° 00-PIE-00118) (solution 40 mg.L⁻¹ pour Envirhom)

- se munir au préalable de la clé des Matières Nucléaires -

Sous une hotte (P36) :

Mesurer en éprouvette graduée de 2L, le volume d'eau minérale nécessaire (rq : 20 rats consomment en moyenne 6L de boisson par semaine)

Verser ce volume à l'aide de l'entonnoir dans les touries identifiées de l'animalerie (rq : les touries sont identifiées par le radioélément, l'enrichissement et la teneur en mg.L⁻¹ (pour exemple : UA - 40 mg.L⁻¹))

La source se présente sous la forme d'une poudre jaune (coffre des matières), ajouter la quantité désirée de nitrate d'uranyle hexahydraté [PM=502.13 g.mol⁻¹] (soit une teneur en uranium [PM=238 g.mol⁻¹] de 47.4mg d'uranium pour 100mg de poudre) pour parvenir à la concentration de 40 mg.L⁻¹ d'uranium soit :

0.0844 g d'UA pour 1L de boisson

0.4220 g d'UA pour 5L de boisson

0.8440 g d'UA pour 10L de boisson

1,688g d'UA pour 20L de boisson

Homogénéiser par basculements du contenant

Veiller au suivi / traitement des déchets contaminés

Nettoyer la surface de travail après intervention

Prévoir un aliquote (fiolle à scintillation plastique) afin de réaliser une mesure KPA de contrôle et une mesure pH

NB: Effectuer la mesure de pH le jour où la solution est distribuée aux rats, le mieux étant de mesurer le pH dans les biberons (= mesure directe de ce qui est donné aux rats, dans un souci d'évaluation de la spéciation de l'uranium distribué).

Adapter la quantité d'eau de boisson préparée chaque semaine à la consommation réelle afin d'avoir des solutions « fraîches ». Jeter le reliquat lors du remplissage des biberons.

Mesurer la concentration en U dans la solution au plus tôt de façon à corriger une éventuelle erreur ou modification de la solution.

NB : reporter la quantité utilisée sur le classeur bleu des matières (bureau de V. Chazel) ou le cahier (bureau de D. Lurmin) en absence de V. Chazel.

Pour la fabrication de solution d'UA à 20 mg/L, diviser par deux le poids de la poudre de nitrate d'uranyle à prélever, pour la solution à 10 mg/L, diviser par 4.

III. Préparation de la solution d'UE

Préparation des Eaux de Boisson

Eau minérale naturelle (Evian), complémentée en Uranium Enrichi 4.26 % (source Gisel n° 04-PIE-00005) (solution 40 mg.L⁻¹)

- se munir au préalable de la clé des Matières Nucléaires -

Sous une hotte (P36) :

Mesurer en éprouvette graduée de 2L, le volume d'eau minérale nécessaire (rq : 20 rats consomment en moyenne 6L de boisson par semaine)

Verser ce volume à l'aide de l'entonnoir dans les touries identifiées de l'animalerie (rq : les touries sont identifiées par le radioélément, l'enrichissement et la teneur en mg.L⁻¹ (pour exemple : UE4% - 40 mg.L⁻¹))

La source se présente sous la forme d'une solution jaune (coffre des matières), ajouter le volume désiré de nitrate d'uranyle hexahydraté [PM=502.13 g.mol⁻¹] enrichi à 4% (avec une concentration en uranium [PM=238 g.mol⁻¹] de 100g d'uranium pour 1000mL de solution) pour parvenir à la concentration de 40 mg.L⁻¹ d'uranium soit :

400 µL d'UE pour 1L de boisson

2.4 mL d'UE pour 6L de boisson

4 mL d'UE pour 10L de boisson

Homogénéiser par basculements du contenant

Veiller au suivi / traitement des déchets contaminés

Nettoyer la surface de travail après intervention

Prévoir un aliquote (fiolle à scintillation plastique) afin de réaliser une mesure KPA de contrôle et une mesure pH

NB: Effectuer la mesure de pH le jour où la solution est distribuée aux rats, le mieux étant de mesurer le pH dans les biberons (= mesure directe de ce qui est donné aux rats, dans un souci d'évaluation de la spéciation de l'uranium distribué).

Adapter la quantité d'eau de boisson préparée chaque semaine à la consommation réelle afin d'avoir des solutions « fraîches ». Jeter le reliquat lors du remplissage des biberons.

Mesurer la concentration en U dans la solution au plus tôt de façon à corriger une éventuelle erreur ou modification de la solution.

NB : reporter la quantité utilisée sur le classeur bleu des matières (bureau de V. Chazel) ou le cahier (bureau de D. Lurmin) en absence de V. Chazel.

IV. Préparation de la solution de plomb

Pour 1 L de solution de nitrate de plomb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{PM}= 331 \text{ g/mol}$) à 5 mg/L.

Ajouter 8 mg de poudre de nitrate de plomb dans 1 litre d'eau. Dissoudre la poudre dans 10 mL avant de la diluer progressivement dans les 990 mL de solution finale, ceci limite la formation de précipités de plomb.

V. Préparation du milieu cellulaire :

Nom	Milieu avec SVF	Milieu sans SVF	Fournisseur	Référence
Minimum Essential Medium	475 mL	485 mL	Sigma	M2279-500ml
Sérum de veau fœtal	10 mL		Sigma	F7524
Acides aminés non-essentiels	5 mL	5 mL	Sigma	M7145-100ml
Pénicilline/ Streptomycine	5 mL	5 mL	Sigma	P0781-100ml
L-Glutamine	5 mL	5 mL	Sigma	G7513-100ml
Amphotéricine B	200 µL	200 µL	Sigma	A2942
Total	500 mL	500 mL		

Tableau 26 : Composition des milieux de cultures avec et sans SVF

Lors de la différenciation cellulaire, le milieu avec SVF est supplémenté avec 50 µL d'acide rétinoïque à 100 µM. Le milieu cellulaire obtenu est à une concentration finale de 10 nM d'acide rétinoïque. La différenciation cellulaire ne s'effectue qu'avec le milieu contenant du SVF.

VI. Préparation des solutions de nitrate d'uranyle pour la culture cellulaire.

A. Préparation de la solution de dissolution de l'uranium

Pour 100 mL de solution de bicarbonate (NaHCO_3) à 100 mM, pH 8,10

Ajouter 100 mL d'eau milliQ à 0,84 g de NaHCO_3

B. Préparation de la solution mère de nitrate d'uranyle

Pour 3 mL de solution de nitrate d'uranyle à 10 mM, pH 6,86

Ajouter 15 mg de poudre d'UA ($PM= 205 \text{ g/mol}$) à 3 mL de solution de bicarbonate à 100 mM.

NB : filtrer sous hotte la solution de nitrate d'uranyle avant utilisation

VII. Préparation des milieux contenant l'uranium

Pour la préparation des milieux contenant le nitrate d'uranyle.

Un exemple de préparation de milieux à 100 et 10 μM est présenté dans e tableau suivant :

Concentration finale d'uranium	100 μM	10 μM
Volume de nitrate d'uranyle 10 mM en μL	100	10
Volume de bicarbonate 100 mM en μL	900	990
Volume de milieu de culture en mL	9	9
Volume total en mL	10	10

Tableau 27 : Exemple de préparation des milieux contenant le nitrate d'uranyle

VIII. Préparation des cellules pour le SIMS et le MET

Attention, les cellules sont cultivées en boîtes P100 (type boîte de pétri) afin de permettre l'inclusion en gélules de résine.

A. PREPARATION DES SOLUTIONS

PREPARATION DES SOLUTIONS STOCK

a) SOLUTION STOCK DE GLUTARALDEHYDE

Glutaraldéhyde: $\text{COH}(\text{CH}_2)_3\text{COH}$ PM = 100g

Solution commerciale à 50%

Solution Stock à 6% A CONSERVER A 4° C

- Glutaraldéhyde à 50%.....12ml

- H₂O distillée.....qsp 100ml

b) RESINE

Composition de la résine en fonction des tissus à inclure (Issu du protocole Electron Microscopy Sciences (EMBed-812 Embedding Kit cat. #14120) :

EPON 812 60 ml

Durcisseur MNA 15 ml

Durcisseur DDSA 66 ml

Accélérateur BDMA 3% 4 ml

Soit un volume total de 145 ml de résine (soit environ 100 gélules).

Il existe une perte lors de la préparation due à une viscosité de la résine.

Préférer des seringues de capacité 50 mL avec bouchon

(i) Préparation de résine

Durée 15-30mn ; SOUS LA HOTTE ; GANTS.

Les volumes sont mesurés avec des seringues plastiques jetables que l'on remplit par le haut en prenant soin de boucher l'orifice-aiguille avec le pouce ganté ou des bouchons adaptables à l'embout de seringue.

1-Ajouter la résine et les durcisseurs dans un bécher jetable et mélanger doucement avec une baguette de verre puis par agitation rotative douce. Le liquide apparaît clair et sans structure. IL EST TRES IMPORTANT QUE LE MELANGE SOIT PARFAITEMENT HOMOGENE.

2-Ajouter l'accélérateur DBMA, homogénéiser à la baguette de verre et continuer l'agitation rotative douce pendant 1 à 2 mn ;

Le milieu est alors prêt à l'utilisation.

(ii) Conservation :

Pour une utilisation ultérieure, il est possible de conserver à 4°C (quelques semaines) ou de congeler la résine (plusieurs mois). Pour faciliter l'utilisation ultérieure et éviter toute altération de la résine par condensation, suivre la procédure suivante :

1- Utiliser des seringues de volume adapté à l'utilisation ultérieure (50, 20 ml) équipées d'un bouchon. Identifier les seringues en fonction du type de résine, de la date de préparation et du préparateur.

2- Remplir la seringue en enlevant le piston par le dessus.

3- Chasser l'air par retournement de la seringue (piston) et action sur le piston.

4- Boucher la seringue.

5- Envelopper de papier aluminium et conserver au réfrigérateur ou au congélateur.

Rq : la résine peut être décongelée puis recongelée sans altération de ses qualités.

B. PREPARATION DES SOLUTIONS DE TRAVAIL

1) SOLUTION DE FIXATION PAR IMMERSION

a) Glutaraldéhyde 2,5% dans Tp PBS 0.1M (pH=7.4)
CaCl₂ 0.003M

Glutaraldéhyde à 5%.....2 volumes
PBS à 0,2 M (pH=7,4)..... 10 volumes
H₂O distillée.....8 volumes

b) SOLUTION DE LAVAGE

PBS 0,1 M, pH 7,4

2) SOLUTIONS DE DESHYDRATATION

Solutions commerciales : Ethanol à 95% et absolu ; oxyde de propylène

Solutions de travail à préparer :

Ethanol 70% : Ethanol à 95%.....100ml

H₂O distillée.....39ml

C. PROTOCOLE

1) Préparation des cellules pour le SIMS

i) FIXATION

- Placer le fixateur dans les boîtes de culture.
- Conserver 10 minutes à température ambiante.
- Renouveler le fixateur et conserver 50 minutes à température ambiante.

ii) LAVAGE

3 bains de 10 minutes au PBS

iii) DESHYDRATATION

Effectuer une déshydratation éthylique progressive à température ambiante :

- 10 minutes dans de l'éthanol à 50%
- 10 minutes dans de l'éthanol à 70%

iv) IMPREGNATION

Préparer un mélange volume à volume oxyde de propylène/résine. Bien homogénéiser le mélange

Remplacer le bain d'éthanol 70% par le mélange oxyde de propylène/résine

Conserver la résine et les cellules à 4°C jusqu'au lendemain (bien boucher la seringue de la résine)

Le lendemain, sortir les boîtes et la résine du réfrigérateur et les laisser revenir à température ambiante.

v) INCLUSION

Identifier les gélules au rotring 0.3

Remplir les gélules de résine jusqu'à 1-2 mm du bord

Déposer la gélule à la surface de la boîte de pétri

vi) POLYMERISATION

1 - Laisser les gélules à l'étuve sèche à 37°C pendant 2h pour le dégazage des microbulles d'air dans la résine.

2 - Mettre les gélules à l'étuve sèche à 60°C pendant 48 h

3 - La polymérisation terminée, sortir les blocs et les ranger dans les boîtes à puits

ATTENDRE 3-4 H AVANT DE COUPER

vii) A-4 - GESTION DES DECHETS

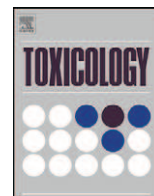
	DECHETS	TYPE DE POUBELLE	ELIMINATION
POUBELLE SOLVANTS	Ethanol	Tourie	Evaporation sous sorbonne
POUBELLE FIXATEUR	Solution de lavage Fixateur (glutaraldéhyde)	Tourie	Filière des métaux lourds
POUBELLE RESINE	Résine	Bécher plastique jetable après polymérisation de la résine à température ambiante sous hotte	Poubelle classique
POUBELLE VERRE	Pipettes pasteur	Flacon plastique	Filière U Fût verre
POUBELLE URANIUM NATUREL NON BIOLOGIQUE	Papier, gants, pipettes plastique	Sachets plastique	Filière U Fût Déchets compactables
POUBELLE SHAPE-SAFE + URANIUM NATUREL	Lames de rasoir	Shape-safe	Filière U Fût Déchets non compactables

IX. Articles

Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure

Helene Bensoussan, Line Grandcolas, Bernadette Dhieux-Lestaevel, Olivia Delissen, Claire-Marie Vacher, Isabelle Dublineau, Philippe Voisin, Patrick Gourmelon, Mohammed Taouis, Philippe Lestaevel

Publié dans *Toxicology* 261 (2009) 59–67



Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure

Helene Bensoussan^a, Line Grancolas^a, Bernadette Dhieux-Lestaavel^b, Olivia Delissen^b, Claire-Marie Vacher^c, Isabelle Dublineau^a, Philippe Voisin^a, Patrick Gourmelon^a, Mohammed Taouis^c, Philippe Lestaavel^{a,*}

^a Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Département de la Radioprotection de l'Homme, Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale, BP 17, F-92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France

^b Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Département de la Radioprotection de l'Homme, Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale, BP 166, 26702 Pierrelatte, France

^c Laboratoire de Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire, UMR 1197 INRA/Université Paris XI, IBAIC Bât. 447, Orsay 91405, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 February 2009

Received in revised form 20 April 2009

Accepted 21 April 2009

Available online 3 May 2009

Keywords:

Acetylcholine
Uranium exposure
Cerebral cortex
Hippocampus

ABSTRACT

Uranium is a heavy metal naturally present in the environment that may be chronically ingested by the population. Previous studies have shown that uranium is present in the brain and alters behaviour, notably locomotor activity, sensorimotor ability, sleep/wake cycle and the memory process, but also metabolism of neurotransmitters. The cholinergic system mediates many cognitive systems, including those disturbed after chronic exposure to uranium i.e., spatial memory, sleep/wake cycle and locomotor activity. The objective of this study was to assess whether these disorders follow uranium-induced alteration of the cholinergic system. In comparison with 40 control rats, 40 rats drank 40 mg/L uranyl nitrate for 1.5 or 9 months. Cortex and hippocampus were removed and gene expression and protein level were analysed to determine potential changes in cholinergic receptors and acetylcholine levels. The expression of genes showed various alterations in the two brain areas after short- and long-term exposure. Nevertheless, protein levels of the choline acetyltransferase enzyme (ChAT), the vesicular transporter of acetylcholine (VAcT) and the nicotinic receptor $\beta 2$ sub-unit (nAChR $\beta 2$) were unmodified in all cases of the experiment and muscarinic receptor type 1 (m1AChR) protein level was disturbed only after 9 months of exposure in the cortex (–30%). Acetylcholine levels were unchanged in the hippocampus after 1.5 and 9 months, but were decreased in the cortex after 1.5 months only (–22%). Acetylcholinesterase (AChE) activity was also unchanged in the hippocampus but decreased in the cortex after 1.5 and 9 months (–16% and –18%, respectively). Taken together, these data indicate that the cholinergic system is a target of uranium exposure in a structure-dependent and time-dependent manner. These cholinergic alterations could participate in behavioural impairments.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Uranium is a heavy metal naturally present in the environment since it is a component of the earth's crust. Underground water contains uranium at different concentrations depending on the soil's uranium content. Several civilian and military industries increase uranium concentration in the soil and underground water. Thus, populations could be chronically exposed to uranium through drinking water or food. The mean uranium daily intake in humans is 2.6 $\mu\text{g}/\text{day}$ (for a 70 kg man). Two thirds come from food and the remaining, one third essentially from drinking water (ATSDR, 1999). Many studies report that uranium is a chemotoxic heavy

metal (Priest, 2001; McClain, 2002; Sztajnkrzyer et al., 2004) like lead, mercury or cadmium. This chemotoxicity affects the kidneys and bones in particular (La Touche et al., 1987; Craft et al., 2004). But recently, a few studies have shown that the central nervous system is also sensitive to uranium as it crosses the blood–brain barrier (Lemercier et al., 2003) and accumulates in the brain (Pellmar et al., 1999a; Fitsanakis et al., 2006).

Furthermore, some behavioural disorders have been observed, such as increased of locomotor activity with increases in line crossing and rearing behaviour after 2-week and 6-month exposure to at 150 mg/L uranium in drinking water (Briner and Murray, 2005). Sensorimotor abilities were also affected with a deficit in inclined plane performance and grip time after 7 days of intra-muscular (IM) injections of 0.1 and 1 mg/kg uranium (Abou-Donia et al., 2001). A acute intra-peritoneal (IP) exposure to 144 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uranium affected sleeping since it decreased the time spent on paradoxical sleep

* Corresponding author. Tel.: +33 1 58 35 82 84; fax: +33 1 58 35 84 67.
E-mail address: philippe.lestaavel@irsn.fr (P. Lestaavel).

(Lestaevel et al., 2005b). Lastly, chronic exposure to uranium affects the memory process with increases in mean distance travelled and latency time in a Morris water maze (Albina et al., 2005).

Lipid oxidation levels increased in the brain after 2-week and 6-month exposure to 150 mg/L uranium in drinking water (Briner and Murray, 2005), and nitric oxide generation was impaired after 7 days of IM injection of 0.1 and 1 mg/kg uranium (Abou-Donia et al., 2001). Monoamine metabolism (dopamine and serotonin) in striata, frontal cortex and hypothalamus, plus acetylcholinesterase (AChE) activity in cerebellum were also altered after 1.5, 6 or 9 months of exposure to 40 mg/L uranium in drinking water (Bussy et al., 2006).

The central nervous system therefore seems to be a significant, but still neglected, target of chronic exposure to uranium. In this study we focused on an important neurotransmitter, acetylcholine (ACh). This cholinergic system is well known to play a leading role in synaptic plasticity, short-term memory and learning (Tsai et al., 2007; von Linstow Roloff et al., 2007). Moreover, it is a widespread system, which has numerous projections into the hippocampus and frontal cortex, two areas involved in memory.

We examined the *in vivo* effects on cholinergic metabolism of sub-chronic (1.5 months) and chronic (9 months) exposure to uranium at twice the maximum concentration found naturally (Huikuri and Salonen, 2000), as previously used in numerous studies (Houpert et al., 2005; Lestaevel et al., 2005b; Souidi et al., 2005; Bussy et al., 2006; Dublineau et al., 2006; Gueguen et al., 2006; Tissandie et al., 2006, 2007). Acetylcholine biosynthesis enzyme, ACh, breakdown enzymes, carriers, and nicotinic (nAChR) and muscarinic receptors (mAChR) involved in cholinergic metabolism were studied in terms of gene expression and protein levels in the hippocampus and the cerebral cortex.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Two-month-old male Sprague–Dawley rats ($n=80$) (Charles River, France), weighing 220 ± 7 g at the beginning of experiments, were divided into two groups of 40 rats each: control group and uranyl nitrate (UN) group.

Rats were housed under a 12 h/12 h light–dark cycle (light on from 8 am to 8 pm) at constant temperature (22 ± 1 °C). Water and food were supplied *ad libitum*. Body weight, food and water consumption were measured weekly. The study was conducted in accordance with French legislation and European legal requirements (Decree 86/609/EEC) concerning the protection of animals used for experimental purposes. Scientists certified by the French Ministry of Agriculture performed all procedures.

2.2. Chemicals

Anti-cholinergic receptor nicotinic beta2 antibody (AVARP13020.T100) was from Euromedex, Mundolsheim, France. Anti-C-terminal vesicular acetylcholine transporter antibody (V5387) was from Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France. Anti-choline acetyltransferase antibody (ab50412) was from Abcam, Cambridge, United Kingdom. Polyclonal antibody to muscarinic 1 acetylcholine receptor (SP5119P) was from Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Germany. Antilyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (036sc-25778) and secondary antibody anti-IgG rabbit (sc-2004) were from Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France.

2.3. Contamination

As source of uranium we used an extremely pure yellow powder of uranyl nitrate hexahydrate (47.4 mg of uranium for 100 mg of powder). For animal exposure, a solution of uranyl nitrate hexahydrate ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) was prepared to a uranium concentration of 40 mg L^{-1} . Uranyl nitrate (UN) was dissolved in mineral water (Evian, Danone, Paris, France). Taking into account the water intake of the rats, this concentration corresponded to a uranium dose of 2 mg/kg per day (uranium lethal dose *per os* for rats is 240 mg/kg (Domingo et al., 1987)). Half of the treated animals were exposed for 1.5 months and the remaining rats for 9 months (UN daily intake: 1 mg/rat/day) (AREVA-COGEMA, France). Control animals drank mineral water. Specific activity of UN is $1.4 \times 10^{-4} \text{ Bq/g}$ and its isotopic composition is $^{238}\text{U}=99.74\%$, $^{235}\text{U}=0.255\%$ and $^{234}\text{U}=0.0055\%$.

2.4. Brain region sampling

After chronic and sub-chronic exposure, rats were anaesthetised by inhalation (Technique et Equipement Médical (TEM), Limoges, France) of 95% air/5% isoflurane (Florène®, Abbott France, Rungis, France), and intracardiac puncture was carried out to take a blood sample. After decapitation, the brain was quickly removed and placed on ice. The hippocampus and cerebral entorhinal cortex were microdissected out according to Glowinski and Iversen (1966) and then stored at -80 °C until used.

2.5. Uranium levels in the hippocampus and cerebral cortex

Tissue samples were prepared by adding 8 mL of nitric acid 70% ultra-pure and 2 mL of hydrogen peroxide. Then, samples were mineralized using a 1000 W microwave (Ethos Touch; Milestone Microwave Laboratory Systems; Italy) with a 20-min ramp at 180 °C, followed by 10 min at 180 °C. Brain uranium content from hippocampus and cortex mineralized samples was determined using an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICPMS-VGPO, EXCELL, ThermoElectron, France), as previously described (Becker et al., 2005). For uranium, ICPMS limit detection was $10^{-4} \mu\text{g L}^{-1}$. Values were expressed as nanograms per gram of fresh brain region and presented as mean \pm SEM.

2.6. Real-time PCR

Total RNA from hippocampus and frontal cortex was isolated using the RNeasy Lipid Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed with BD Sprint™ PowerScript™ PrePrimed 96 plate (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Real-time PCR was performed on an Abi Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using SYBR (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Sixteen ng of template DNA were used for each reaction. Thermoprofile conditions were: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min and 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. For each sample, PCR fluorescent signals were normalised to the fluorescent signal obtained from the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT, Accession No. NM.012583.2) (Ropenga et al., 2004). PCR assays were done in duplicate. To make the comparison among each PCR run reliable, all the *Ct* values were determined at the threshold fluorescence value of 0.2. Primer sequences are shown in Table 1.

2.7. Immunoblotting

Twenty mg of selected brain regions were incubated in 400 μL of lysis buffer (Mammalian Cell Lysis Kit, Sigma) containing 40 μL of protease inhibitor cocktail containing 4-(2-aminoethyl)benzenesulphonyl fluoride (AEBSF), pepstatin A, E-64, bestatin, leupeptin, and aprotinin (P8340, Sigma) for 15 min at 4 °C. The resulting homogenates were clarified at $12,000 \times g$ for 20 min, supernatant protein concentration was measured using the Bradford method (Bradford, 1976) and aliquots were stored at -80 °C. Protein (100 μg) was subjected to SDS-PAGE and Western blotting using appropriate antibodies. Blots were revealed by enhanced chemiluminescence reagent (ECL Immobilon Western (WBKLS055); Millipore, Southampton, UK) using appropriate secondary antibodies.

2.8. Brain acetylcholine level, acetylcholinesterase activity and butyrylcholinesterase activity

Acetylcholine rates, acetylcholinesterase activity and butyrylcholinesterase (BuChE) activity in the hippocampus and frontal cortex were measured using the Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit (A12217, Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

For acetylcholine assay, an acetylcholine standard curve (0–125 μM) was prepared using kit products. Samples were diluted volume to volume in Tris–HCl buffer (final volume = 100 μL). Positive control was H_2O_2 solution (10 μM). Working solution was 400 μM Amplex Red reagent containing 2 U/mL HRP, 0.2 U/mL choline oxidase, 100 μM acetylcholine and buffer: 100 μL of this was added to samples. After 45 min at room temperature, protected from light, colorimetric measurements were performed at 595 nm.

For acetylcholinesterase assay, samples were diluted volume to volume in Tris–HCl buffer (final volume = 100 μL). Positive control was H_2O_2 solution (10 μM). Working solution was 200 μM Amplex Red reagent containing 2 U/mL HRP, 0.2 U/mL choline oxidase, 100 μM acetylcholine and buffer: 100 μL of this was added to samples. After 30 min at room temperature, protected from light, colorimetric measurements were made at 595 nm.

For butyrylcholinesterase assay, samples were diluted volume to volume in Tris–HCl buffer (final volume = 100 μL). Positive control was H_2O_2 solution (10 μM). Working solution was 200 μM Amplex Red reagent containing 2 U/mL HRP, 0.2 U/mL choline oxidase, 100 μM butyrylcholine and buffer: 100 μL of this was added to samples. After 25 min at room temperature, protected from light, colorimetric measurements were made at 595 nm.

Table 1
Nucleotide sequences of PCR primers.

Gene	Primer sequence	No. accession	Reference
HPRT	Forward: 5'-GCT CGA GAT GTC ATG AAG GAG A-3' Reverse: 5'-TCA GCG CTT TAA TGT AAT CCA GC-3'	NM.012583.2	Ropenga et al. (2004)
AChE	Forward: 5'-CCT GTG CGG GCA AAA TTG-3' Reverse: 5'-CCT GGA TCC CTC GCT GAA-3'	NM.172009.1	This study
BuChE	Forward: 5'-GAT GGA ATC CTG CCT TCC ACT CTT GC-3' Reverse: 5'-AGA ATG GAT GGG AGT AAT GCA TGG-3'	NM.022942.1	This study
ChAT	Forward: 5'-TTC TTG TTG CTT GTC ATC ATA TGT TTC-3' Reverse: 5'-CGG TGT GGT GTG TGA GCA TT-3'	XM.001061520.1	This study
VACHT	Forward: 5'-CGC GCT CAC CAC TTG TAA CAT-3' Reverse: 5'-CGG CCA TTG TGT GCT TCA-3'	NM.031663.2	This study
CHT1	Forward: 5'-CCC ATG CGC TTT CCA TAG AT-3' Reverse: 5'-AGG TGG CCT GTT TTT TGC AA-3'	NM.053521	This study
nAChR α 5	Forward: 5'-CAACATCCACCACCGTCTT-3' Reverse: 5'-GCAGCTTGGGAAGCTTGTG-3'	NM.017078.2	This study
m1AChR	Forward: 5'-CCT CCC AAA AGC TCC CCA-3' Reverse: 5'-TGT CCC GGA AGG CTT TGT-3'	NM.080773.1	This study
nAChR β 2	Forward: 5'-CTT CTA TTC CAA TGC TGT GGT CTC CTA TG-3' Reverse: 5'-AGC GGT ACG TCG AGG GAG GTG-3'	NM.019297.1	This study

2.9. Statistical analysis

PCR data were analysed by Student's *t*-test and other data by two-way ANOVA, using SigmaStat 3.0 software. Two-way ANOVA was followed by pairwise multiple comparison using the Holm–Sidak method. Differences were considered significant when **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

3. Results

3.1. Health parameters

Table 2 indicates the body weight and the consumption of water and food of the rats at the end of the experiment. Body weight, water and food consumption of the animals were not disturbed by short- and long-term exposure to uranium during (data not shown) and at the end of the experiment (Table 2).

3.2. Uranium levels in the hippocampus and cortex

Fig. 1 indicates uranium levels in the two brain areas. 1.5-month treatment did not induce brain accumulation of uranium in these two brain areas. Significant uranium accumulation was observed in the hippocampus (+20%, *p* < 0.05) and cortex (+50%, *p* < 0.05) compared to control after 9-month treatment.

Table 2

Health parameters of the animals. Mean body weight and consumption of water and food of the rats at the end of the experiment. No significant changes in body weight, and water and food consumption were noted during (data not shown) and at the end of the experiment. Student's *t*-test was used for statistical analysis. Data were expressed as mean \pm SEM (UN = uranyl nitrate).

	Control	UN
Body weight (g)		
1.5 months	495.2 \pm 33.7	505.1 \pm 36.1
9 months	600.8 \pm 43.2	582.8 \pm 54.5
Water consumption (mL)		
1.5 months	483.1 \pm 74.4	505.1 \pm 36.1
9 months	326.6 \pm 71.7	319.1 \pm 80.2
Food consumption (g)		
1.5 months	403.6 \pm 25.5	402.2 \pm 17.2
9 months	331.2 \pm 59.8	312.8 \pm 51.6

3.3. Acetylcholine level, acetylcholinesterase activity and butyrylcholinesterase activity in brain regions

Fig. 2 indicates ACh level, AChE activity and BuChE activity in the hippocampus and cortex after 1.5- and 9-month exposure. In the control groups, the comparison between 4.5-month-old (1.5-month exposure) and 12-month-old (9-month exposure) rats shows a clear decrease in ACh level and AChE activity, but no change in BuChE activity.

In the hippocampus, ACh level, AChE activity and BuChE activity were not significantly modified after sub-chronic and chronic exposure to UN. In the cortex, after 1.5-month exposure to UN, a significant decrease (–22%, *p* < 0.001) in ACh level was observed. By contrast, after 9 months, ACh level was similar to that observed in control rats. AChE activity was significantly decreased after 1.5 months (–18%, *p* < 0.001) and 9 months (–17%, *p* < 0.01) compared with the control group. BuChE activity remained unchanged

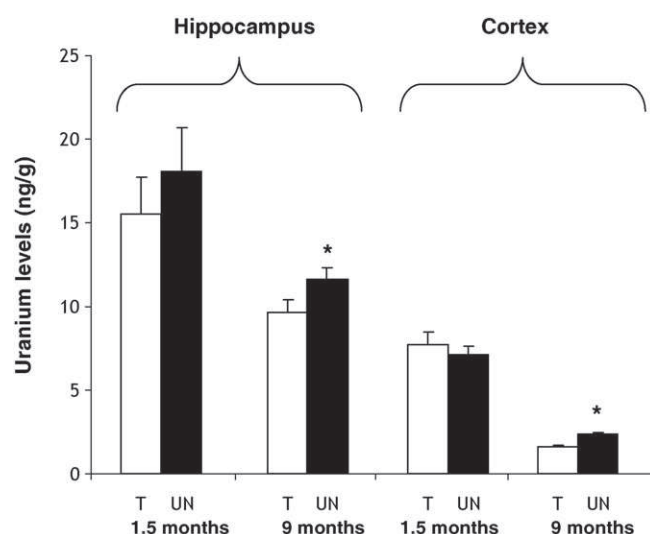


Fig. 1. Uranium levels in the hippocampus and cortex after sub-chronic and chronic exposure. Results were expressed as mean \pm SEM (*n* = 10, C = control, UN = uranyl nitrate). Student's *t*-test was used for statistics. **p* < 0.05.

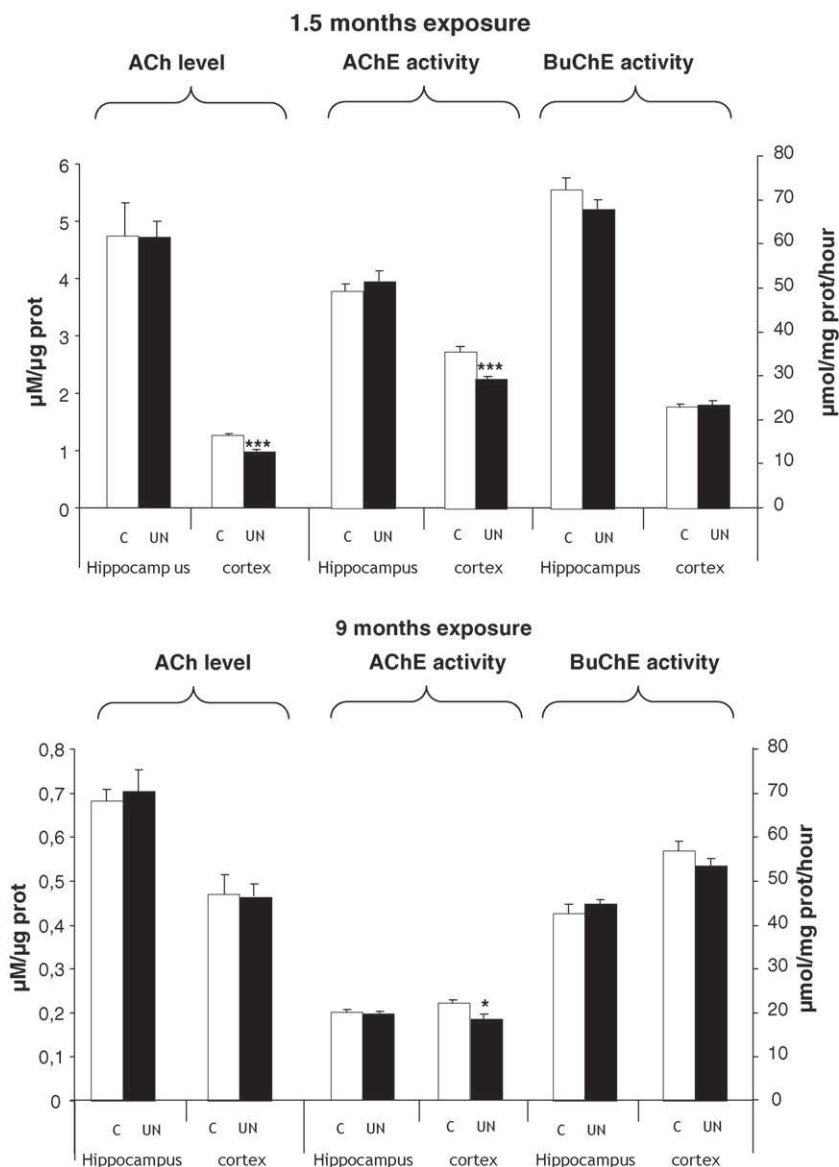


Fig. 2. Acetylcholine levels, acetylcholinesterase activity and butyrylcholinesterase activity in the hippocampus and cortex. Results were expressed as mean \pm SEM ($n = 10$, C = control, UN = uranyl nitrate). For statistical analysis, two-way ANOVA was followed by a pairwise multiple comparison procedure using Holm–Sidak method * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ significantly different from control value.

in the cortex after sub-chronic and chronic exposure to uranium (Fig. 2).

3.4. Gene expression levels

Fig. 3 indicates gene expression levels in the hippocampus and cortex at 1.5 months and 9 months of exposure. In the hippocampus, 1.5-month sub-chronic exposure increased expression of genes encoding butyrylcholinesterase (BuChE, Accession No. NM_022942.1) (+86%, $p < 0.05$), muscarinic receptor type 1 (m1AChR, Accession No. NM_080773.1) (+128%, $p < 0.01$) and nicotinic receptor $\beta 2$ sub-unit (nAChR $\beta 2$, Accession No. NM_019297.1) (+71%, $p < 0.05$). However, AChE (Accession No. NM_172009.1) (–25%, $p < 0.01$) and vesicular transporter of acetylcholine (VAcHT, Accession No. NM_031663.2) (–66%, $p < 0.01$) gene expression was decreased as compared with control. But gene expression of choline acetyltransferase (ChAT, Accession No. XM_001061520.1), choline high-affinity transporter (CHT1, Accession No. NM_053521) and nicotinic receptor $\alpha 5$ sub-unit

(nAChR $\alpha 5$, Accession No. NM_017078.2) was not modified. After 9 months of exposure to UN, m1AChR gene expression was significantly increased (+345%, $p < 0.05$), whereas AChE expression was significantly reduced (–45%, $p < 0.05$). Gene expression of ChAT, VAcHT, CHT1, BuChE, nAChR $\beta 2$ and nAChR $\alpha 5$ remained unchanged.

In the cortex, after 1.5-month sub-chronic exposure, decreases in CHT1 (–37%, $p < 0.05$) and BuChE (–48%, $p < 0.05$) mRNA contents were observed compared with controls. There was no modification of ChAT, VAcHT, AChE, m1AChR, nAChR $\beta 2$ and nAChR $\alpha 5$ gene expression. After 9 months of exposure, increases in AChE (+28%, $p < 0.01$) and m1AChR (+938%, $p < 0.05$) mRNA levels were observed, whereas ChAT, VAcHT, CHT1, BuChE, nAChR $\beta 2$ and nAChR $\alpha 5$ gene expressions were not altered.

3.5. Protein levels

Fig. 4 shows ChAT, VAcHT, nAChR $\beta 2$ and m1AChR protein levels in the hippocampus and cortex after 1.5-month and 9-month

Gene expression by qRT-PCR

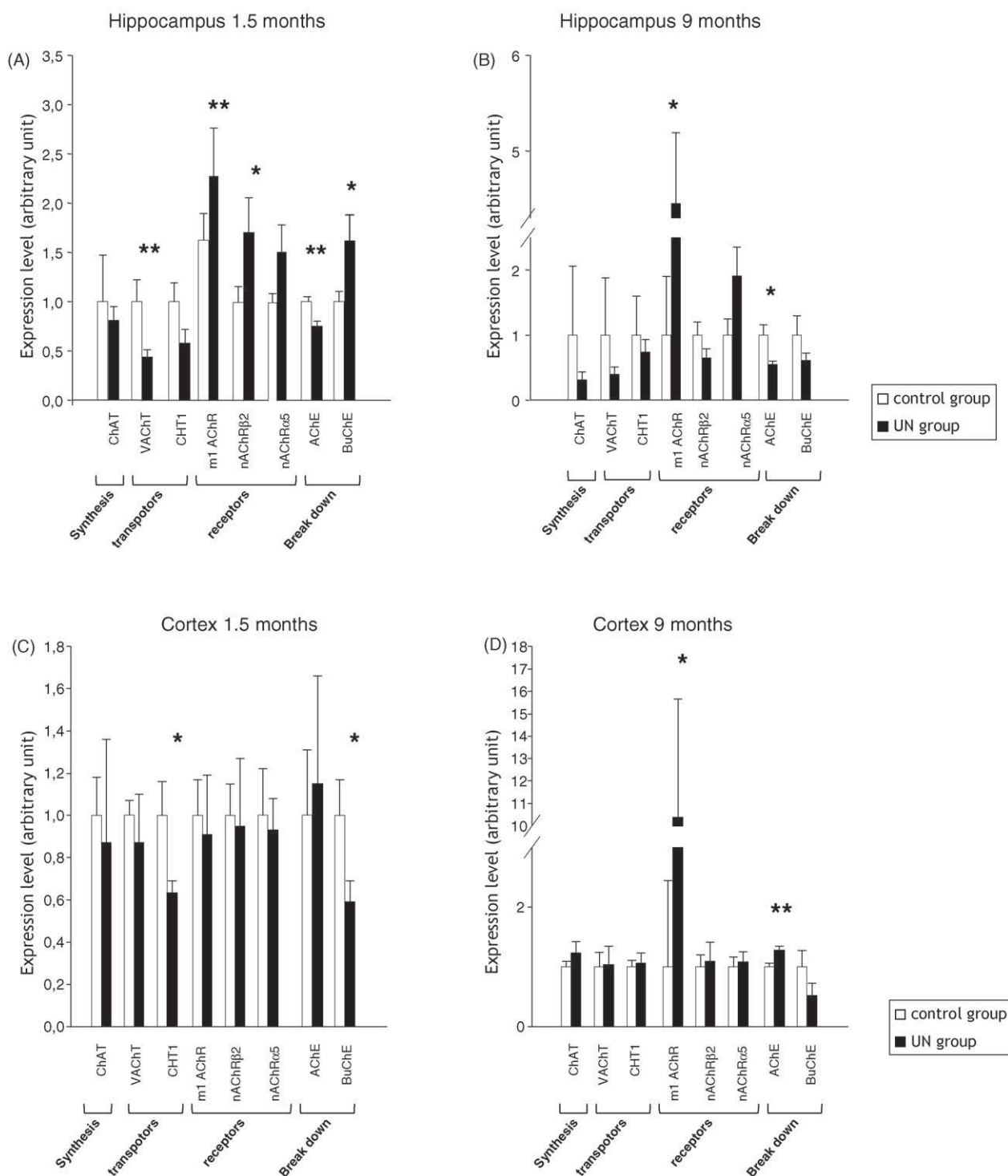


Fig. 3. Gene expression of cholinergic system metabolism in the hippocampus and cortex after sub-chronic and chronic exposure to uranyl nitrate. Relative mRNA expression level measured in the hippocampus after 1.5-month (A) and 9-month exposure (B), and in the cortex after 1.5-month (C) and 9-month exposure (D) by real-time PCR. Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 10$, C = control, UN = uranyl nitrate). Student's t -test was used for statistical analysis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ significantly different from control value.

exposure. Protein levels of ChAT, VAcHT and nAChRβ2 remained unaffected by sub-chronic and chronic exposure in the hippocampus and cortex. After 1.5 months of exposure, in the cortex only, protein levels of m1AChR were significantly reduced (-33% , $p < 0.01$). In other experiments, m1AChR protein levels were unaltered.

4. Discussion

Many experiments have shown the kidney as the most sensitive and the first affected organ after uranium exposure (Leggett, 1989; Taylor and Taylor, 1997). Uranium accumulated in the proximal tubules, where it could induce severe damage. In our experimental

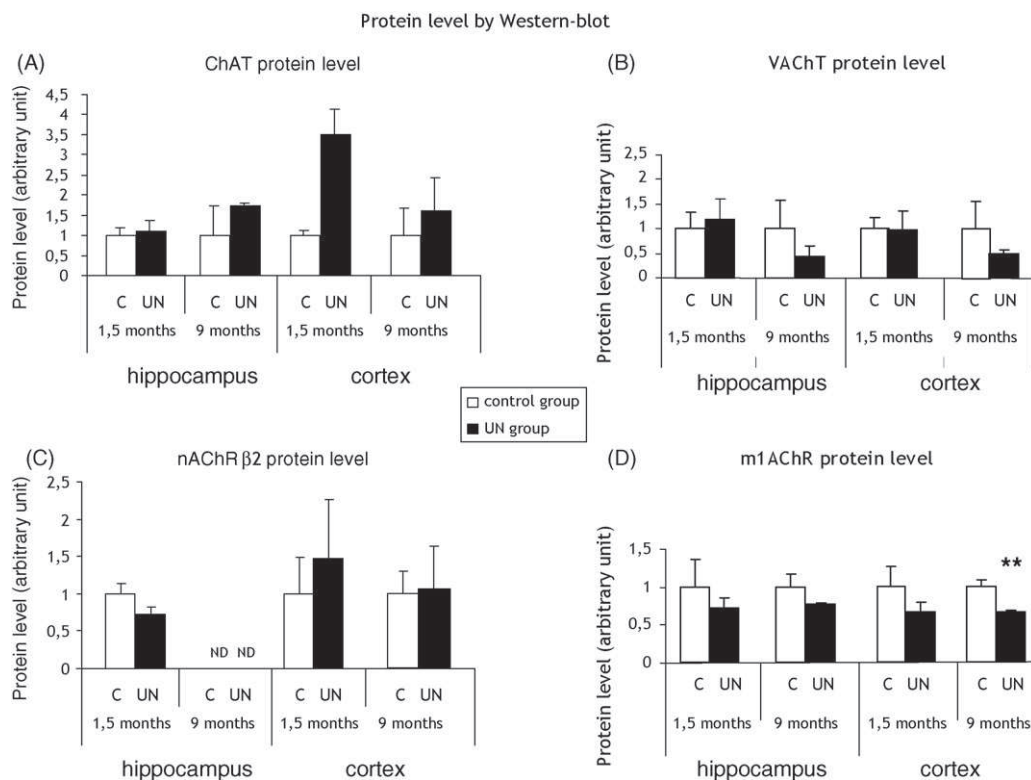


Fig. 4. Protein level of ChAT, VAcHT, nAChRβ2 and m1AChR in the hippocampus and cortex after 1.5- and 9-month exposure. Relative ChAT (A), VAcHT (B), nAChRβ2 (C) and m1AChR (D) protein levels measured in the hippocampus and cortex by Western blot after 1.5- and 9-month exposure. Blots were probed with antibodies against ChAT and GAPDH, VAcHT and GAPDH, nAChRβ2 and GAPDH or m1AChR and GAPDH. GAPDH was used for normalisation of sample loading. Bands were visualised by ECL and quantified by densitometry. Results were expressed as a relative level between control and uranyl nitrate groups. Data were expressed as means \pm SEM ($n=4-5$, C=control, UN=uranyl nitrate, ND=non-detected). For statistical analysis, two-way ANOVA was followed by a pairwise multiple comparison procedure using Holm–Sidak method.

conditions (40 mg/L), uranium concentration was less than 1.2 $\mu\text{g/g}$ of kidney (Paquet et al., 2006), which is the threshold of kidney damage (Diamond et al., 1989). Furthermore, even if we did no biochemical analysis of renal function, no alteration of the markers of kidney function, creatinine or urea have been observed in the same conditions as ours after 9-month exposure (Souidi et al., 2005). These data strongly suggest that uranium was used at non-nephrotoxic levels in the present study. Moreover, general health parameters, such as body weight and food and water consumption, were not modified, as demonstrated here and by others (Souidi et al., 2005; Bussy et al., 2006).

In this study, uranium accumulation in the hippocampus and cortex was measured after sub-chronic and chronic exposure. This is in accordance with previous experiments. Studies on rats implanted with uranium pellets have shown an increase in uranium in the cerebral cortex, striata, midbrain and cerebellum after 3 months (Fitsanakis et al., 2006), in the cerebral cortex, midbrain and cerebellum after 6 months (Fitsanakis et al., 2006), and in the hippocampus after 18 months (Pellmar et al., 1999b) of uranium exposure. Experiments using the same route as in this paper, i.e. chronic ingestion, have shown an accumulation in striata after 1.5-month exposure, and in striata, hippocampus and cortex after a 9-month exposure (Bussy et al., 2006). It seemed that uranium was slow to accumulate in the hippocampus and cortex since no accumulation was detected in under 3 months of exposure. Uranium accumulation in brain raises some questions about uranium's effects on the central nervous system. There are several behavioural effects such as rearing and line crossing impairment, memory alterations or sensorimotor deficits (Abou-Donia et al., 2001; Albina et al., 2005; Briner and Murray, 2005), but these studies offered no explanation of these effects despite possible involvement of nitric oxide generation, lipid oxidation and very subtle alterations of neu-

rotransmitters such as dopamine or serotonin (Albina et al., 2005; Briner and Murray, 2005; Bussy et al., 2006). Thus, the central nervous system appears as a new target organ of uranium, but the behavioural impairments still involve unknown mechanisms.

In order to understand the action mechanism of uranium on brain, we investigated of the cholinergic system at a non-nephrotoxic level of uranium. The cholinergic system plays an important role in the sensorimotor and memory capacities (Torda and Wolff, 1944; Tsai et al., 2007; von Linstow Roloff et al., 2007). This study shows, for the first time, that the different components of the cholinergic system were altered by exposure to uranium, possibly accounting for some of the observed behavioural disorders.

Not all the components of the cholinergic system were perturbed by uranium exposure, such as gene expression and levels of choline acetyltransferase and vesicular ACh transporter. This suggests that not all the components of the cholinergic system have the same sensitivity to uranium. Acetylcholine, which is a neuromodulator involved in neuronal excitability and synaptic neuroplasticity, decreased significantly (-22%) in the cortex after sub-chronic exposure to uranium. This result is not in accordance with previous studies. It has been shown that UO_2^{2+} increases the spontaneous release of ACh *ex vivo* (Lin-Shiau et al., 1979). The stimulation of ACh exocytosis has also been observed with other heavy metals, such as lead and cadmium in rat brain synaptosomes (Suszkiw et al., 1984).

Muscarinic type 1 receptor is widespread in the hippocampus and cortex (Langmead et al., 2008), and is involved in learning, spatial and working memory (Wess, 2004), and in locomotor activity (Gerber et al., 2001). Gene expression of muscarinic receptor type 1 was strongly increased in the hippocampus after 1.5- and 9-month exposure and in the cortex after 9-month exposure. Besides, in the cortex after 9-month exposure, protein level of m1AChR decreased. This difference between protein level and

gene expression of m1AChR could be explained by increased of protein breakdown in proteasomes or decreased of protein stability. Similar results have been observed with other heavy metals such as lead and mercury. 21-day postnatal chronic exposure of rats to lead induced a decrease in mAChR density in the cortex (Finkelstein et al., 1998). After sub-chronic exposure to mercury, mAChR density decreased in the hippocampus, but not in the cortex (Coccini et al., 2000). The muscarinic receptor number was also decreased after chronic exposure to organophosphates, dichlorvos (Raheja and Gill, 2007). These data show that this type of muscarinic receptor is a target of exposure to heavy metals, including uranium. Sub-units $\alpha 5$ and $\beta 2$ of the nicotinic receptor are widespread in the brain and play a part in cognitive abilities (Decker and Majchrzak, 1992). In the present study, there was significantly increased $\beta 2$ sub-unit gene expression in the hippocampus after sub-chronic exposure. No change was observed in protein levels in the cortex after sub-chronic or chronic treatment. In hippocampus, nAChR $\beta 2$ is weak (Hill et al., 1993) with an age-related decrease (Ferrari et al., 1999; Tohgi et al., 1998). Protein levels remained unchanged after 1.5-month, but were not detected after 9-month exposure. To our knowledge, nicotinic receptors have never been studied after uranium exposure. Nevertheless, mercury chloride, zinc and aluminium modulate nicotinic receptor inhibition or excitation (Hsiao et al., 2001; Mirzozian and Luetje, 2002; Janhunen and Ahtee, 2007). These modulations were time-, concentration- and/or sub-unit-dependent. So it is conceivable that uranium modulates other nicotinic receptor sub-units.

Finally, acetylcholinesterase, which breaks down ACh, is well known as a neurotoxicity marker. Changes in AChE activity were observed in many cases after chronic exposure to heavy metal (Reddy et al., 2003; Tsai et al., 2007) or organophosphate (Kobayashi et al., 1980; Raheja and Gill, 2007). Exposure to uranium induced a significant decrease in AChE activity in the entorhinal cortex after short- and long-term exposure, but not in the hippocampus. In the same experimental conditions, AChE activity decreased in the cerebellum after 6-month exposure, but no change was seen in the hippocampus or frontal cortex after 1.5- and 9-month exposure (Bussy et al., 2006). These different results could mean that areas of the cortex differ in sensitivity to uranium. It is important to emphasize that AChE is impaired in all uranium exposure scenarios. Increases in AChE activity have been seen in the cortex after 7-day exposure to intra-muscular injection of 1 mg/kg uranium in rats (Abou-Donia et al., 2001) and in zebra fish brain after 20-day exposure to 100 $\mu\text{g/L}$ uranium in water (Barillet et al., 2007). AChE activity and AChE gene expression were not correlated in this study. This lack of correlation could be explained by the complex relation between mRNA and enzyme activity, but also by the resilience of the enzymatic mechanism, since post-transcription events, loss of functional molecules and minor post-translation changes do not affect AChE activity. All these results suggest that AChE is a target of uranium exposure and that the effect of uranium on AChE activity depends on species, region, time and dose.

Our work demonstrates that the hippocampus and cortex differ in sensitivity to uranium. In gene expression, uranium exposure perturbed the two cerebral structures, but differently. In terms of ACh levels and AChE activity, the cortex was more impaired than the hippocampus. And in the cortex, some compensatory mechanism seemed to play a part after 9 months of exposure. Furthermore, the age-related decreases in ACh level and AChE activity were noticeable between sub-chronic and chronic treatment, as previously described (Giacobini and Mussini, 1987; Takei and Kawamura, 1989; Giovannini et al., 1998). Those age effects were associated with increases in BuChE, which takes over from AChE. The compensatory role of BuChE maintains global cholinesterase activity in the hippocampus and cortex, as previously demonstrated (Perry et al., 1978a,b; Greig et al., 2001; Mesulam et al., 2002). It remains

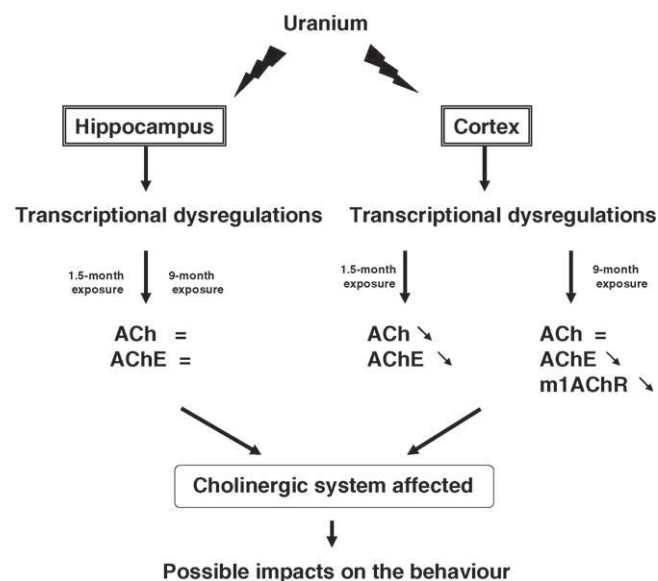


Fig. 5. Cholinergic system: hippocampus and cortex respond to uranium exposure. Exposure to uranyl nitrate (for 1.5 and 9 months) induces transcriptional alterations in the hippocampus so as to preserve ACh level. In the cortex, exposure leads to transcriptional but mainly translational alterations. Uranium slightly affects cholinergic system balance, which could induce behavioural effects.

to be seen how uranium disturbs the different components of the cholinergic system. Uranium could play a direct role in the cholinergic system, due to uranium accumulation in the brain (Pellmar et al., 1999a; Bussy et al., 2006; Fitsanakis et al., 2006). But it could also play an indirect role in other neurotransmitter systems due to the cholinergic neuron specificity; i.e. cholinergic neurons can modulate dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurotransmission (Janhunen and Ahtee, 2007).

All these results demonstrate that uranium-induced cholinergic alterations could be correlated with the effects on behaviour observed after uranium exposure (Briner and Murray, 2005). After uranium exposure, rapid eye movement (REM) sleep was increased (Lestaevl et al., 2005a), and the cholinergic system is directly involved in REM sleep regulation (Shiromani et al., 1988). Uranium exposure also impaired memory (Albina et al., 2005; Houpert et al., 2007), in which ACh and m1AChR play a role. For example, change in ACh levels or m1AChR altered of spatial memory (Wess, 2004; von Linstow Roloff et al., 2007; Watanabe et al., 2008). Finally, locomotor and sensorimotor performances, which may be linked to AChE and acetylcholine receptors (Abou-Donia et al., 2001; Gerber et al., 2001), were impaired after exposure to uranium (Abou-Donia et al., 2001; Briner and Murray, 2005). We found that the cholinergic system was impaired, with changes in ACh level, AChE activity and m1AChR expression after uranium exposure. Taken together, these data strongly suggest that the cholinergic system participates in the behavioural disorders previously described (Fig. 5).

In conclusion, this study shows for the first time that exposure to uranium impairs the cholinergic system, with a decline in ACh level and AChE activity. Furthermore, these disturbances are region- and time-dependent. They could participate in behavioural disorders observed after chronic exposure to uranium. It would be interesting to consider the effects of chronic exposure to various uranium doses at a critical period during development, since the developing central nervous system is very sensitive to environmental pollutants.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN) and the French General Delegation for Ordnance (DGA) (CER n° 2006-94-0920). The authors thank T. Loiseau and F. Voyer for animal care.

References

- Abou-Donia, M.B., Goldstein, L.B., Jones, K.H., Abdel-Rahman, A.A., Damodaran, T.V., Dechkovskaia, A.M., Bullman, S.L., Amir, B.E., Khan, W.A., 2001. Locomotor and sensorimotor performance deficit in rats following exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin, alone and in combination. *Toxicol. Sci.* 60, 305–314.
- Albina, M.L., Belles, M., Linares, V., Sanchez, D.J., Domingo, J.L., 2005. Restraint stress does not enhance the uranium-induced developmental and behavioral effects in the offspring of uranium-exposed male rats. *Toxicology* 215, 69–79.
- ATSDR, 1999. Toxicological profile. Atlanta, US, department of health and human services. Public health services. Agency for toxic Substances and Diseases Registry.
- Barillet, S., Adam, C., Palluel, O., Devaux, A., 2007. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 497–505.
- Becker, J.S.Z.M., Becker, J.S., Pickhardt, C., Damoc, E., Juhacz, G., Palkovits, M., Przybylski, M., 2005. Determination of phosphorus-, copper-, and zinc-containing human brain proteins by LA-ICPMS and MALDI-FTICR-MS. *Anal. Chem.* 77, 5851–5860.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Briner, W., 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, 135–144.
- Bussy, C., Lestaavel, P., Dhieux, B., Amourette, C., Paquet, F., Gourmelon, P., Houpert, P., 2006. Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *Neurotoxicology* 27, 245–252.
- Cocchini, T., Randine, G., Candura, S.M., Nappi, R.E., Prockop, L.D., Manzo, L., 2000. Low-level exposure to methylmercury modifies muscarinic cholinergic receptor binding characteristics in rat brain and lymphocytes: physiological implications and new opportunities in biologic monitoring. *Environ. Health Perspect.* 108, 29–33.
- Craft, E., Abu-Qare, A., Flaherty, M., Garofolo, M., Rincavage, H., Abou-Donia, M., 2004. Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 7, 297–317.
- Decker, M.W., Majchrzak, M.J., 1992. Effects of systemic and intracerebroventricular administration of mecamylamine, a nicotinic cholinergic antagonist, on spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 107, 530–534.
- Diamond, G.L., Morrow, P.E., Panner, B.J., Gelein, R.M., Baggs, R.B., 1989. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* 13, 65–78.
- Domingo, J.L., Llobet, J.M., Tomás, J.M., Corbella, J., 1987. Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 168–174.
- Dublineau, I., Grison, S., Linard, C., Baudelin, C., Dudoignon, N., Souidi, M., Marquette, C., Paquet, F., Aigueperse, J., Gourmelon, P., 2006. Short-term effects of depleted uranium on immune status in rat intestine. *J. Toxicol. Environ. Health A* 69, 1613–1628.
- Ferrari, R.P.P., Algeri, S., Agnati, L.F., Zoli, M., 1999. Subunit and region-specific decreases in nicotinic acetylcholine receptor mRNA in the aged rat brain. *Neurobiol. Aging* 20, 37–46.
- Finkelstein, Y., Markowitz, M.E., Rosen, J.F., 1998. Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 27, 168–176.
- Fitsanakis, V.A., Erikson, K.M., Garcia, S.J., Evje, L., Syversen, T., Aschner, M., 2006. Brain accumulation of depleted uranium in rats following 3- or 6-month treatment with implanted depleted uranium pellets. *Biol. Trace Elem. Res.* 111, 185–197.
- Gerber, D.J., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Huang, S.Y., Caron, M.G., Tonegawa, S., 2001. Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 15312–15317.
- Giacobini, E.M.T., Mussini, I., 1987. Aging of cholinergic synapses in the avian iris Part I—Biochemical studies. *Neurobiol. Aging* 8, 123–129.
- Giovannini, M.G.B.L., Kopf, S.R., Pepeu, G., 1998. Acetylcholine release from the frontal cortex during exploratory activity. *Brain Res.* 784, 218–227.
- Glowinski, J., Iversen, L.L., 1966. Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [³H]norepinephrine, [³H]dopamine and [³H]dopa in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13, 655–669.
- Greig, N.H.U.T., Yu, Q., Zhu, X., Holloway, H.W., Perry, T., Lee, B., Ingram, D.K., Lahiri, D.K., 2001. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res. Opin.* 17, 159–165.
- Gueguen, Y., Souidi, M., Baudelin, C., Dudoignon, N., Grison, S., Dublineau, I., Marquette, C., Voisin, P., Gourmelon, P., Aigueperse, J., 2006. Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch. Toxicol.* 80, 187–195.
- Hill Jr., J.A.Z.M., Bourgeois, J.P., Changeux, J.P., 1993. Immunocytochemical localization of a neuronal nicotinic receptor: the beta 2-subunit. *J. Neurosci.* 13, 1551–1568.
- Houpert, P., Bizot, J.C., Bussy, C., Dhieux, B., Lestaavel, P., Gourmelon, P., Paquet, F., 2007. Comparison of the effects of enriched uranium and 137-cesium on the behaviour of rats after chronic exposure. *Int. J. Radiat. Biol.* 83, 99–104.
- Houpert, P., Lestaavel, P., Bussy, C., Paquet, F., Gourmelon, P., 2005. Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat. *Neurotoxicology* 26, 1015–1020.
- Hsiao, B., Dweck, D., Luetje, C.W., 2001. Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc. *J. Neurosci.* 21, 1848–1856.
- Huikuri, P., Salonen, L., 2000. Removal of uranium from Finnish groundwaters in domestic use with a strong base anion resin. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 245, 385–393.
- Janhunen, S., Ahtee, L., 2007. Differential nicotinic regulation of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways: implications for drug development. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31, 287–314.
- Kobayashi, H., Yuyama, A., Matsusaka, N., Takeno, K., Yanagiya, I., 1980. Effect of methylmercury on brain acetylcholine concentration and turnover in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 54, 1–8.
- La Touche, Y.D., Willis, D.L., Dawydiak, O.I., 1987. Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health Phys.* 53, 147–162.
- Langmead, C.J., Watson, J., Reavill, C., 2008. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol. Ther.* 117, 232–243.
- Leggett, R.W., 1989. The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys.* 57, 365–383.
- Lemercier, V., Millot, X., Ansoborlo, E., Menetrier, F., Flury-Herard, A., Rousselle, C., Scherrmann, J.M., 2003. Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiat. Prot. Dosimetry* 105, 243–245.
- Lestaavel, P., Bussy, C., Paquet, F., Dhieux, B., Clarencon, D., Houpert, P., Gourmelon, P., 2005a. Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 27, 835–840.
- Lestaavel, P., Houpert, P., Bussy, C., Dhieux, B., Gourmelon, P., Paquet, F., 2005b. The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 212, 219–226.
- Lin-Shiau, S.Y., Fu, W.M., Lee, C.Y., 1979. Effects of uranyl ions on neuromuscular transmission of chick biventer cervicis muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 241, 332–343.
- McClain, D.E., 2002. Depleted uranium: a radiochemical toxicant? *Mil. Med.* 167, 125–126.
- Mesulam, M.M.G.A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E.G., Lockridge, O., 2002. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110, 627–639.
- Mirzoian, A., Luetje, C.W., 2002. Modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by mercury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 560–567.
- Paquet, F., Houpert, P., Blanchardon, E., Delissen, O., Maubert, C., Dhieux, B., Moreels, A.M., Frelon, S., Gourmelon, P., 2006. Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys.* 90, 139–147.
- Pellmar, T.C., Fuciarelli, A.F., Ejniak, J.W., Hamilton, M., Hogan, J., Strocko, S., Emond, C., Mottaz, H.M., 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., Hogan, J.B., 1999b. Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments. *Neurotoxicology* 20, 785–792.
- Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G., Tomlinson, B.E., 1978a. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 4, 273–277.
- Perry, E.K., Tomlinson, B.E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P.H., Perry, R.H., 1978b. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br. Med. J.* 2, 1457–1459.
- Priest, N.D., 2001. Toxicity of depleted uranium. *Lancet* 357, 244–246.
- Raheja, G., Gill, K.D., 2007. Altered cholinergic metabolism and muscarinic receptor linked second messenger pathways after chronic exposure to dichlorvos in rat brain. *Toxicol. Ind. Health.* 23, 25–37.
- Reddy, G.R., Basha, M.R., Devi, C.B., Suresh, A., Baker, J.L., Shafeek, A., Heinz, J., Chetty, C.S., 2003. Lead induced effects on acetylcholinesterase activity in cerebellum and hippocampus of developing rat. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21, 347–352.
- Ropenga, A., Chapel, A., Vandamme, M., Griffiths, N.M., 2004. Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat. *Radiat. Res.* 161, 597–602.
- Shiromani, P.J., Armstrong, D.M., Berkowitz, A., Jeste, D.V., Gillin, J.C., 1988. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactive somata in the feline brainstem: implications for REM sleep generation. *Sleep* 11, 1–16.
- Souidi, M., Gueguen, Y., Linard, C., Dudoignon, N., Grison, S., Baudelin, C., Marquette, C., Gourmelon, P., Aigueperse, J., 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* 214, 113–122.
- Suszkiw, J., Toth, G., Murawsky, M., Cooper, G.P., 1984. Effects of Pb²⁺ and Cd²⁺ on acetylcholine release and Ca²⁺ movements in synaptosomes and subcellular fractions from rat brain and Torpedo electric organ. *Brain Res.* 323, 31–46.
- Sztajnkrzyer, M.D., Otten, E.J., 2004. Chemical and radiological toxicity of depleted uranium. *Mil. Med.* 169, 212–216.

- Taylor, D.M., Taylor, S.K., 1997. Environmental uranium and human health. *Rev. Environ. Health* 12, 147–157.
- Takei, N.N.I., Kawamura, H., 1989. Age-related decline of acetylcholine release evoked by depolarizing stimulation. *Neurosci. Lett.* 101, 186–196.
- Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J.M., Grandcolas, L., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Souidi, M., 2007. In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 266–272.
- Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J.M., Paquet, F., Aigueperse, J., Souidi, M., 2006. Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Arch. Toxicol.* 80, 473–480.
- Tohgi, H.U.K., Yoshimura, M., Nagane, Y., Mihara, M., 1998. Alterations with aging and ischemia in nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha4 and beta2 messenger RNA expression in postmortem human putamen. Implications for susceptibility to parkinsonism. *Brain Res.* 791, 186–190.
- Torda, C., Wolff, H.G., 1944. Effect of blood serum from patients with myasthenia gravis on the synthesis of acetylcholine in vitro. *J. Clin. Invest.* 23, 649–656.
- Tsai, F.S., Peng, W.H., Wang, W.H., Wu, C.R., Hsieh, C.C., Lin, Y.T., Feng, I.C., Hsieh, M.T., 2007. Effects of luteolin on learning acquisition in rats: involvement of the central cholinergic system. *Life Sci.* 80, 1692–1698.
- von Linstow Roloff, E., Harbaran, D., Micheau, J., Platt, B., Riedel, G., 2007. Dissociation of cholinergic function in spatial and procedural learning in rats. *Neuroscience* 146, 875–889.
- Watanabe, T., Iwasaki, K., Ishikane, S., Naitou, T., Yoshimitsu, Y., Yamagata, N., Ozdemir, M.B., Takasaki, K., Egashira, N., Mishima, K., Fujiwara, M., 2008. Spatial memory impairment without apoptosis induced by the combination of beta-amyloid oligomers and cerebral ischemia is related to decreased acetylcholine release in rats. *J. Pharmacol. Sci.* 106, 84–91.
- Wess, J., 2004. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 423–450.

Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats

Philippe Lestaevel¹, Elodie Romero¹, Bernadette Dhieux, Helene Bensoussan, Hanaa Berradi, Isabelle Dublineau, Philippe Voisin, Patrick Gourmelon

Publié dans Toxicology 258 (2009) 1–9

¹ : les deux premiers auteurs ont contribué à part égale à cet article.



Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats

P. Lestaevel*, E. Romero¹, B. Dhieux, H. Ben Soussan, H. Berradi, I. Dublineau, P. Voisin, P. Gourmelon

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Direction de la RadioProtection de l'Homme, Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie, Laboratoire de RadioToxicologie Expérimentale. IRSN, B.P. n° 17, F 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2008
Received in revised form 17 December 2008
Accepted 18 December 2008
Available online 31 December 2008

Keywords:

Antioxidant enzymes
Iron
Lipid peroxidation
Nitric oxide
Reactive oxygen species

ABSTRACT

Uranium is not only a heavy metal but also an alpha particle emitter. The main toxicity of uranium is expected to be due to chemiotoxicity rather than to radiotoxicity. Some studies have demonstrated that uranium induced some neurological disturbances, but without clear explanations. A possible mechanism of this neurotoxicity could be the oxidative stress induced by reactive oxygen species imbalance. The aim of the present study was to determine whether a chronic ingestion of uranium induced anti-oxidative defence mechanisms in the brain of rats. Rats received depleted (DU) or 4% enriched (EU) uranyl nitrate in the drinking water at $2 \text{ mg}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ for 9 months. Cerebral cortex analyses were made by measuring mRNA and protein levels and enzymatic activities. Lipid peroxidation, an oxidative stress marker, was significantly enhanced after EU exposure, but not after DU. The gene expression or activity of the main antioxidant enzymes, *i.e.* superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), increased significantly after chronic exposure to DU. On the contrary, oral EU administration induced a decrease of these antioxidant enzymes. The NO-ergic pathway was almost not perturbed by DU or EU exposure. Finally, DU exposure increased significantly the transporters (Divalent-Metal-Transporter1; DMT1), the storage molecule (ferritin) and the ferroxidase enzyme (ceruloplasmin), but not EU. These results illustrate that oxidative stress plays a key role in the mechanism of uranium neurotoxicity. They showed that chronic exposure to DU, but not EU, seems to induce an increase of several antioxidant agents in order to counteract the oxidative stress. Finally, these results demonstrate the importance of the double toxicity, chemical and radiological, of uranium.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Uranium is a ubiquitous environmental trace metallo-element which is found in small amounts in food and water supplies as a non-essential inorganic component. In addition to this natural exposure, uranium has also several civilian and military applications that could cause dispersion in the environment (Bleise et al., 2003). Uranium is best known in its enriched form, which is used for nuclear power plants and nuclear weapons. Uranium is enriched by increasing the proportion of the more radioactive isotopes. The by-product of this process, which depletes uranium of its most radioactive isotopes, is called depleted uranium (DU). It is about 40% less radioactive than natural uranium, but retains all of its chemical properties (WHO, 2001). Uranium is not only a heavy metal with chemiotoxicant properties, but also an alpha particle emitter

radionuclide with radiotoxicant properties (Priest, 2001; Houpert et al., 2005). Chronic exposure to uranium may result in the manifestation of toxicity in many parts of the body, whatever the route of exposure, *i.e.* inhalation or ingestion (Craft et al., 2004). Actually, uranium exposure is well known to cause damages to kidney function, the primary reservoir for uranium with bone (Diamond et al., 1989).

Until recently, reports looking for *in vivo* neurological effects following chronic exposure to uranium had been sparse. Pellmar et al. (1999) have reported that uranium chronically released from embedded fragments accumulated in brain after long-term exposure and caused electrophysiological disturbances in hippocampal slices of rat (Pellmar et al., 1999). Another experimental study has shown that after chronic ingestion of enriched uranium (40 mg L^{-1}), several neurological disorders, such as behavioural impairments or sleep wake pattern disturbances, could be observed (Houpert et al., 2005; Lestaevel et al., 2005). It has also shown significant locomotor impairment in rat at long-term after repeated exposure to 0.1 or 1 mg of uranyl acetate $\text{kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ during 7 days (Abou-Donia et al., 2002). Finally, Briner and Murray (2005) reported locomotor activ-

* Corresponding author. Tel.: +33 1 58 35 82 84 fax: +33 1 58 35 84 67.

E-mail address: philippe.lestaevel@irsn.fr (P. Lestaevel).

¹ The two first authors have the same contribution of the present paper.

ity disturbances after 2 weeks and 6 months of chronic exposure to high concentration of uranium (150 mg L^{-1}) (Briner and Murray, 2005).

These data raised the possibility that some neurological disturbances occur in the brain after a chronic exposure to uranium, but the mechanism of action of this toxicity has not been elucidated yet. The toxic mechanisms of uranium must be more than one and could include binding to DNA, transcriptional factors that alter gene expression, or involvement of reactive oxygen species (ROS). The sources of reactive oxygen species (ROS) in the brain are numerous, such as nitric oxide synthase, P450 enzymes or iron. These reactive species could inflict significant oxidative damage notably on membrane lipids and cause lipid peroxidation. Previous studies have demonstrated correlations between lipid peroxidation and behavioural impairments or uranium concentration in the brain after chronic exposure to uranium (Briner and Murray, 2005; Linares et al., 2007). The brain is particularly susceptible to oxidative damage because it has a high rate of oxidative metabolism, high concentrations of polyunsaturated fatty acids, low to moderate levels of antioxidant enzymes and high iron content.

Since a possible mechanism of uranium neurotoxicity could be the oxidative stress due to ROS imbalance, the aim of the present study was to determine whether a chronic ingestion of uranyl nitrate through drinking water ($2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) over a 9-month period induced anti-oxidative defence mechanisms in the brain of rats. This $2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ corresponds to 40 mg L^{-1} in the drinking water of animals, which was twice the highest concentration found in the environment in some underground water (Juntunen, 1991). This dosage of uranium doesn't induce nephrotoxicity (Souidi et al., 2005). As irradiation is known to induce ROS (Yilmaz and Yilmaz, 2006), the enriched uranium (EU), with its radiotoxic component, must normally induce more ROS than depleted uranium (DU) and consequently a different response. DU and EU-4% were used in order to distinguish chemical from radiological effects. This study was conducted on the entorhinal cortex that plays an important role in memory consolidation and memory optimization in sleep. Cells have developed several anti-oxidative defence mechanisms in order to control the redox state of the cell, an essential parameter for normal physiological and biochemical functioning. The catalytic activities and gene expression of the main antioxidant enzymes, namely superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) were measured in the cerebral cortex. Since nitric oxide (NO) plays a central role in the oxidative stress, the NO-ergic pathway was also studied. The gene expression of the two enzymes responsible for the synthesis of NO, inducible NO synthase (iNOS) and neuronal NO synthase (nNOS), their enzyme activity and the level of catabolism products of NO, *i.e.* nitrites/nitrates (NO_x^-) were measured. Furthermore, iron is one of the most important transition metals involved in the formation of oxygen-free radicals and consequent tissue oxidative stress. Consequently, iron metabolism was apprehended by measuring expression of its storage molecule (ferritin), transporter (Divalent-Metal-Transporter1, DMT1), and ferroxidase enzyme (ceruloplasmin).

Table 1
Primers sequences used for quantitative real-time PCR.

	FW	RW
CAT	GAG AGG AAA CGC CTG TGT GAG	AAG AGC CTG GAC TCG GGC CC
Mn-SOD	ACG CGA CCT ACG TGA ACA ATCT	CAG TGC AGG CTG AAG AGC AA
CuZn-SOD	GAT TAA CTG AAG GCG AGC AT	CCG CCA TGT TTC TTA GAG T
GPx	TGC AAT CAG TTC GGA CAT CA	ACC ATT CAC CTC GCA CTT C
nNOS	GCT AAT GGT GTG GCC ATT GAC	GGT TCT ATC TCT TTG AGC AGT TCG T
iNOS	CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT	CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG
Ceruloplasmin	ATG TGA TGG CTA TGG GCA ATG	TTC CCC TGT GCT TGT ATT GG
Ferritin	TCG CAG GTC CGC CAG AAC TA	AAG GAA GAT TCG GCC ACC TC
DMT1	GAT TCC AGA CGA TGG TGC TT	GTG AAG GCC CAG AGT TTA CG
HPRT	CTCGAGATGTCATGAAGGAGA	TCAGCGCTTTAATGTAATCCAGC

2. Materials and methods

2.1. Animals

Forty two Sprague–Dawley male rats (Charles River, France), weighing 250 g each, were divided into two groups: a control group ($n = 14$) and an experimental group ($n = 28$). Animals were housed in pairs, with a 12-h light/12-h dark cycle (light on: 08:00/20:00) and a temperature of $22 \pm 1^\circ \text{C}$. Food and water were delivered *ad libitum*. Animals experiments were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety and conducted in accordance with the recommendations of the European Animal Care Commission (act no. 87-848).

2.2. Exposure

The rats in the experimental groups were exposed to depleted uranyl nitrate hexahydrate (DU) (AREVA, France) or 4% enriched uranyl nitrate hexahydrate (EU) (AREVA, France) in their drinking water for 9 months, at $2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$. Controls animals drank no contaminated water. Each group contained 14 animals.

2.3. Tissue collections

Animals were anesthetized by inhalation of 95%air/5% isoflurane (Forène, Abobott France). After intracardiac puncture of blood, they were killed by decapitation. The brain was next dissected on ice and entorhinal cortex was rapidly removed, frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C until processed for studies.

For immunohistochemistry, rats ($n = 4$ for each group) were sacrificed by exsanguination. They were perfused *in situ* with a paraformaldehyde 4% mixture. After perfusion, the head was quickly removed and immersed in the same solution. After 24 h, the brain was removed and left in paraformaldehyde 4% until dehydration and paraffin inclusion (between 48 and 72 h).

2.4. Uranium concentrations

Samples of kidneys and cortex of rats were collected, digested with HNO_3 , and then analyzed for uranium content by Kinetics Phosphorescence Analysis (KPA) according to previously reported methods (Hedaya et al., 1997).

2.5. Lipid peroxidation

Hydroperoxides were determined using a commercial kit supplied by Cayman Chemical. This lipid hydroperoxide assay kit measures the hydroperoxides directly utilizing the redox reactions with ferrous ions to produce ferric ions. The resulting ferric ions are detected using thiocyanate ion as the chromogen. Each assay was performed in duplicate, and data were expressed as μM .

Oxidative damage has been also assessed with 4-hydroxynonenol (4-HNE) immunohistochemistry using a polyclonal antibody (Calbiochem). 4-HNE is a cytotoxic aldehyde released from polyunsaturated fatty acid side chains as a product of lipid peroxidation. Coronal sections ($7 \mu\text{m}$) were treated to remove endogenous peroxidase and non-specific binding sites were blocked (blocker was 10% Normal Goat Serum (Vector) and 0.5% bovine serum albumin (Sigma) in 50 mM phosphate buffer solution) before applying the primary antibody (1:1000, made up in blocking serum). After 24 h at 4°C , the sections were washed in 50 mM phosphate buffer saline (PBS) ($2 \times 10 \text{ min}$). The secondary antibody (biotinylated goat anti-rabbit, 1:100, Vector laboratories) was applied for 1 h followed by 1 h with the avidin/biotinylated horseradish peroxidase complex (ABC elite kit, Vector Laboratories). The sections were developed in 3,3'-diaminobenzidine solution (Chemicon) for 5 min then dehydrated and mounted for light microscopy analysis.

2.6. mRNA extraction and RT-PCR experiment

The mRNA of CAT, Mn-SOD, CuZn-SOD, GPx, iNOS, nNOS, ceruloplasmin, ferritin, DMT1 and the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphorybosyltransferase (HPRT) was measured by real time RT-PCR.

Total mRNA was prepared with the Rneasy total isolation kit (Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity and quantity measurement was determined by using Agilent 2100 Bioanalyzer.

The cDNA was produced from 1 µg of total mRNA by reverse transcription with 200 U of superscript reverse transcriptase (Invitrogen, France) in a 20 µl reaction containing 1X superscript buffer (Invitrogen), 1 mM 2-deoxynucleotide 5'-triphosphate, 20 ng random hexamer, 10 mM DTT and 20 U Rnase inhibitor. After incubation for 50 min at 42 °C, the reaction was terminated by denaturing enzyme for 10 min at 70 °C. PCR amplification of CAT, Mn-SOD, CuZn-SOD, GPx, ceruloplasmin, ferritin, and DMT1 used Syber PCR master mix. Primers sequences were designed with Primer Express software (Applied Biosystems). Sequences for the forward and reverse primers used in the present study are listed in Table 1. Optimized PCR used the Abi Prism 7700 Sequence detection system (Qiagen). PCR fluorescent signals were normalized to fluorescent signal obtained by the housekeeping gene HPRT for each sample.

We used the comparative $\Delta\Delta C_T$ -method (Brink et al., 2000) for the relative mRNA quantification. Each sample was monitored for fluorescent dyes and signals were regarded as significant if the fluorescence intensity exceeded statistically (10-fold) the standard deviation of the baseline fluorescence, defined as threshold cycles (C_T). C_T were selected in the line in which all samples were in logarithmic phase.

2.7. Determination of SOD, CAT and GPx activities

The tissues were homogenized in ice-cold 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 1 mM EDTA. The homogenates were centrifuged at 10 000 g for 15 min at 4 °C, and the supernatants were collected for analyses. Protein concentrations were determined by Bradford method using bovine serum albumin as a standard.

SOD, CAT and GPx activities were determined using commercial kits supplied by Cayman Chemical.

SOD activity is assessed by using a tetrazolium salt for detection of superoxide radicals generated by xanthine oxydase and hypoxanthine. The SOD assay measures all three types of SOD (Cu/Zn-, Mn-, and Fe-SOD). One unit of SOD is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50% dismutation of the superoxide radical. Each assay was performed in duplicate, and enzyme units were recorded as U mg⁻¹ protein.

For CAT activity, the method is based on the reaction of the enzyme with methanol in the presence of an optimal concentration of H₂O₂. The formaldehyde produced is measured spectrophotometrically with 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (Purpald) as the chromogen (Wheeler et al., 1990). Purpald specifically forms a bicyclic hetero cycle with aldehydes, which upon oxidation changes from colorless to a purple color. Each assay was performed in duplicate, and CAT activity was expressed in nmol of formaldehyde min⁻¹ mg⁻¹ protein.

GPx activity was indirectly measured by a coupled reaction with glutathione reductase (GR). Oxidized glutathione (GSSH), produced upon reduction of hydroperoxide by GPx, is recycled to its reduced state by GR, and NADPH. The oxidation of NADPH to NADP⁺ is accompanied by a decrease in absorbance at 340 nm. The rate of decrease in the A₃₄₀ is directly proportional to the GPx activity in the sample (Paglia and Valentine, 1967). Each assay was performed in duplicate, and enzyme units were recorded as nmol NADPH oxidized min⁻¹ mg⁻¹ protein.

2.8. NOS activities

Total NOS activity was measured by the conversion of L-[¹⁴C] arginine to L-[¹⁴C] citrulline as described previously (Iadecola et al., 1995). Briefly, brain samples were homogenized with 10 volumes of ice-cold homogenization buffer (250 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, pH 7.4) and centrifuged for 15 min at 10 000 g at 4 °C. Supernatants (10 µl) were then incubated for 60 min at 37 °C with 40 µl of reaction mixture containing 10 mM NADPH, 6 mM CaCl₂, 50 µCi/ml L-[¹⁴C] arginine in reaction buffer (50 mM Tris-HCl, 6 µM BH₄, 2 µM flavin adenine dinucleotide, 2 µM flavin adenine mononucleotide, pH 7.4) and 40 µl of distilled water. The reaction was stopped by adding 400 µl of ice-cold stop buffer (50 mM HEPES and 5 mM EDTA, pH 5.5) and applied to DOWEX AG50WX8-400 columns to remove L-[¹⁴C] arginine. Columns were eluted and L-[¹⁴C] citrulline was measured by scintillation counting.

For iNOS activity, which is Ca²⁺ independent, CaCl₂ was substituted by distilled water. Activity for cNOS was calculated by subtracting the iNOS activity from total NOS activity.

2.9. Levels of NO metabolites (NO_x⁻)

Brain samples were homogenized in PBS (pH 7.4) and centrifuged at 10 000 g for 20 min at 4 °C. The supernatant fraction was used to determine the levels of NO metabolites (NO_x⁻) by assaying nitrite (NO₂⁻) plus nitrate (NO₃⁻). Nitrate was reduced to nitrite with nitrate reductase. Three hours after incubation at room temperature, the concentration of this final form was determined by a colorimetric assay based on the Griess reaction, as previously described (Ricart-Jané et al., 2002). The absorbance was read at 550 nm and data were expressed in µM.

2.10. Protein analysis of Mn-SOD and CAT

Mn-SOD and CAT proteins were semi-quantified by Western blot. Tissues (50 mg) extracted from cerebral cortex were homogenized in cold lysis buffer containing protease inhibitor (Sigma, France). After 20-min incubation on ice, samples were centrifuged at 12 500 g at 4 °C. Supernatants were aliquoted and stored at -80 °C. Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

For each sample, 150 µg of total protein was subjected to 10%-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) electrophoresis and blotted onto a nitrocellulose membrane. After blocking with milk, the membrane was incubated with a primary antibody to Mn-SOD or CAT. Anti Mn-SOD and anti-CAT polyclonal rabbit antibody (Abcam, France) were diluted at 1:3000 and 1:4000, respectively. Second antibodies to Mn-SOD or CAT were conjugated with peroxidase. Chemiluminescence was detected according to manufacturer's protocol (ECL, Biorad, France). Band densities were quantified using LAS 3000 apparatus (Fujifilm) and normalized to total amount of control protein (GAPDH).

2.11. Statistical analysis

All data are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM) for 8–10 animals. Comparisons between groups used Student's *t* test for non-paired data. Differences were considered significant when *p* < 0.05 or *p* < 0.01.

3. Results

3.1. Physiological parameters

The DU- or EU-treated animals did not differ significantly from controls concerning brain weight (DU: 2.17 ± 0.04 g; EU: 2.18 ± 0.04 g; control: 2.14 ± 0.04 g) and body weight (DU: 698 ± 16 g; EU: 694 ± 22 g; control: 696 ± 11 g) after 9 months of exposure. Chronic ingestion of uranium did not affect significantly food intake and water consumption (data not shown).

3.2. Uranium concentrations

The levels of uranium in the kidneys of rats exposed to DU or EU were significantly increased (+1320% and +1614%) in comparison with control rats (DU: 99 ± 9 ng g⁻¹, *p* < 0.01; EU: 120 ± 11 ng g⁻¹, *p* < 0.01; control: 7 ± 2 ng g⁻¹).

In the cerebral cortex, uranium level was also significantly increased after chronic exposure to DU (+50%) or EU (+106%) compared to control (DU: 2.4 ± 0.1 ng g⁻¹, *p* < 0.05; EU: 3.3 ± 0.7 ng g⁻¹, *p* < 0.01; control: 1.6 ± 0.1 ng g⁻¹). No significant difference was observed between DU and EU groups.

3.3. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation, determined by the direct measurement of hydroperoxides, was not significantly increased more in the cortex of DU-exposed rats than in control rats (32.6 ± 5.4 µM versus 21.3 ± 1.1 µM, *p* = 0.07). After EU exposure, hydroperoxide concentration was significantly increased in comparison with control group (37.0 ± 2.9 µM versus 21.3 ± 1.1 µM, *p* < 0.01).

A direct correlation was observed between lipid peroxidation and uranium levels in the entorhinal cortex (Fig. 1).

Fig. 2 shows 4-HNE immunoreactivity in the entorhinal cortex of rats in three experimental groups. Negligible levels of 4-HNE-antibody immunostaining were observed in cortex of control rats. The entorhinal cortex from DU rats exhibited a diffuse pattern of 4-HNE-antibody immunostaining. There was also an increase of neuronal 4-HNE immunoreactivity in the entorhinal cortex of EU-4% rats.

3.4. Gene expression, activities and protein abundance of antioxidant enzymes

Relative mRNA levels of the antioxidant enzymes CuZn-SOD, Mn-SOD, GPx and CAT in the cerebral cortex were quantified by

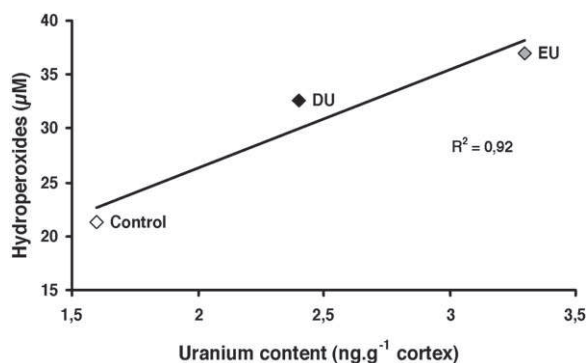


Fig. 1. Correlation between hydroperoxides and uranium content in the entorhinal cortex after 9 months of exposure. Hydroperoxides are expressed in μM . Uranium concentrations are expressed in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ of cortex.

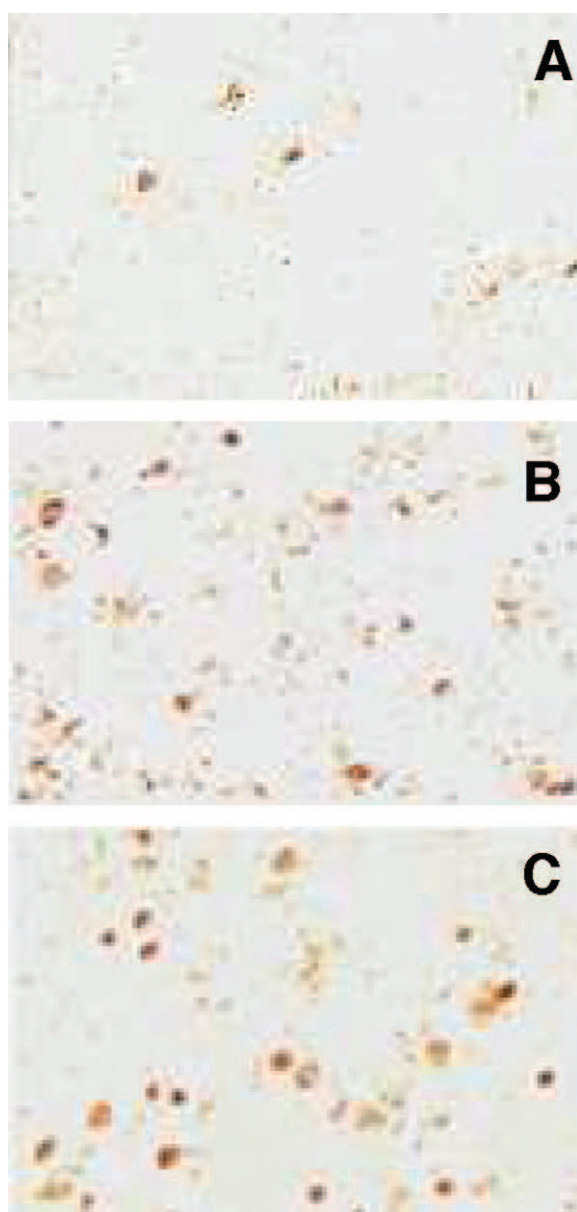


Fig. 2. 4-HNE immunohistochemistry in panel A showing minimum staining in entorhinal cortex of control rats and in panel B and C showing strongly 4-HNE immunopositive neurons in the cortex of DU (B) or EU-4% (C) rats. Staining was present within cell bodies. Original magnification: A–C: $\times 20$.

real-time RT-PCR (Fig. 3). The relative mRNA level of the control group was set as one (1.0). In comparison to control, current results show that a chronic exposure to DU significantly induces the gene expression of CuZn-SOD ($\times 3.6$, $p < 0.01$), Mn-SOD ($\times 3.3$, $p < 0.05$) and GPx ($\times 3.0$, $p < 0.05$) (Fig. 3A). On the other hand, mRNA level of CAT was not significantly modified by DU exposure compared to control group (Fig. 3A). In 9-month EU-exposed rats, no significant decreases in the cortical mRNA levels of CuZn-SOD, Mn-SOD and GPx were observed in comparison to control (Fig. 3C). Finally, EU exposure induced a significant decrease in the mRNA levels of CAT (0.6-fold lower than the control, $p < 0.05$) compared to control (Fig. 3C).

Antioxidant enzyme activities (SOD, CAT and GPx) were also determined. Chronic ingestion of DU during a 9-month period resulted in a significant increase in the CAT activity (+18%, $p < 0.05$) in the cerebral cortex of the exposed animals when compared to control (Fig. 3B). On the other hand, no significant differences among these two groups were observed in SOD and GPx activities (Fig. 3B). By contrast, after EU exposure, SOD and GPx activities were significantly decreased in comparison with the control group (–59 and –45%, respectively, $p < 0.05$), while no significant effect on CAT activity was reported (Fig. 3D).

Finally, protein abundances of Mn-SOD and CAT were measured with regard to GAPDH. Exposure to DU or EU had no significant effect on cortical Mn-SOD and CAT protein abundance in exposed rats compared to the control group (Fig. 4).

3.5. NO-ergic pathway

The NO-ergic pathway was investigated by measuring the gene expression of NOS. Chronic exposure to DU during 9 months caused a significant increase of mRNA levels of iNOS as compared to control (2.8-fold higher than the control, $p < 0.05$) (Fig. 5A). In contrast, DU had no significant effect on nNOS mRNA level in the entorhinal cortex (Fig. 5A). In our experimental conditions, no significant effect of EU was reported for iNOS and nNOS mRNA levels in this cerebral structure (Fig. 5C).

The enzymatic activities of NOS were also determined in the entorhinal cortex after chronic exposure to DU or EU. No significant effect was reported for iNOS and nNOS activities between exposed and control animals (Fig. 5B and D).

Finally, in order to evaluate the consequences of uranium-exposure on NO catabolism, NO_x^- levels were measured in cerebral cortex. DU- or EU-exposure did not induce significant effect on NO_x^- levels (DU: $42.6 \pm 6.0 \mu\text{M}$; EU: $36.6 \pm 2.5 \mu\text{M}$; control: $35.1 \pm 3.3 \mu\text{M}$).

3.6. Iron metabolism

DU exposure during a 9-month period resulted in a statistically significant increase in the mRNA levels of ferritin ($\times 2.2$, $p < 0.05$), divalent metal transporter (DMT1) ($\times 10.0$, $p < 0.05$) and ceruloplasmin ($\times 4.6$, $p < 0.05$) in exposed rats compared to controls (Fig. 6A). In 9-month EU-exposed rats, mRNA levels of ferritin, DMT1 and ceruloplasmin were not significantly modified in comparison to control (Fig. 6B).

4. Discussion

While each metal may have its own mechanism of action, the generation of reactive oxygen species (ROS) by metals and the resulting effects on cell signaling appear to result from a common mechanism. Among oxidative damage induced by ROS, the lipid membrane is a preferential target, causing lipid peroxidation. In the present study, lipid peroxidation, visualised with 4-HNE immunohistochemistry and quantified by the direct measure of

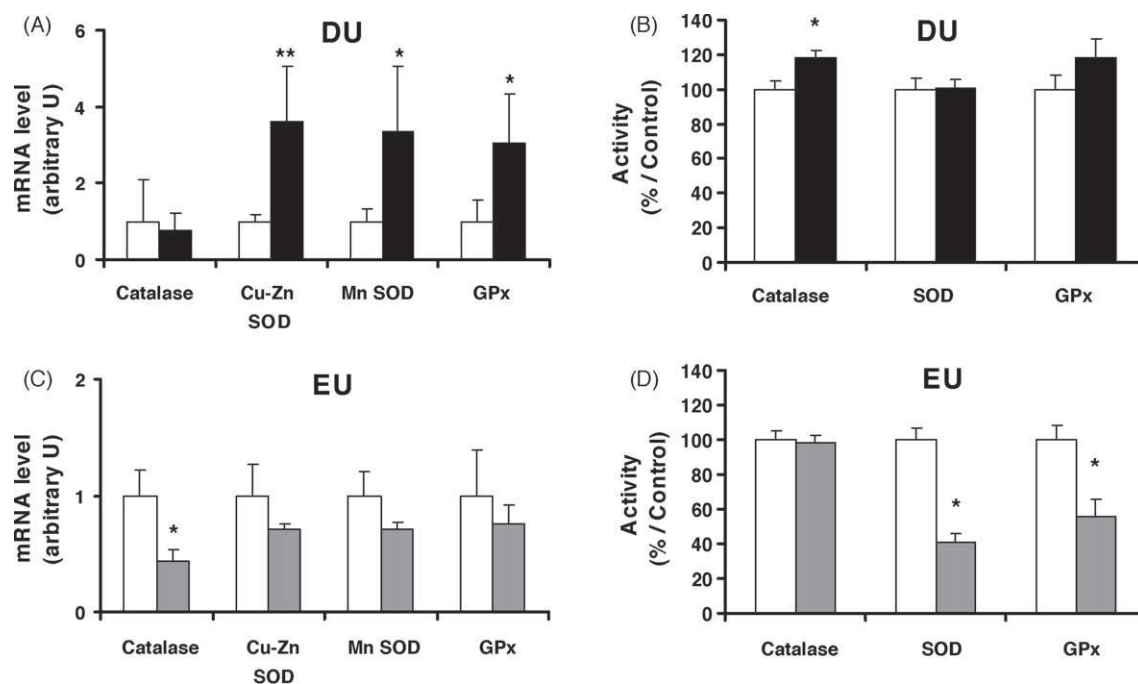


Fig. 3. Gene expression of catalase (CAT), Cu-Zn-superoxide dismutase (CuZn-SOD), Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD) and glutathione peroxidase (GPx) and enzymatic activities of CAT, SOD and GPx in the entorhinal cortex of rats exposed to DU (A and B) or EU-4% (C and D) for 9 months (40 mg of uranium L⁻¹ of drinking water). Control rats drank mineral water. Gene expressions were expressed as a ratio to the reference gene HPRT. Control values were normalized to 1 for gene expression. Activities were expressed as a percent of the control. Data are expressed as mean \pm SEM; $n=8-10$ for each group of rats; white: control; black: DU; grey: EU-4%; * significantly different from control ($p < 0.05$); ** significantly different from control ($p < 0.01$).

hydroperoxides, was increased after uranium exposure and was correlated with uranium content in brain. This result is in accordance with a previous study that has demonstrated an oxidation of brain lipids after DU exposure, only after 2 weeks (Briner and Murray, 2005), against 9 months in the present study. Recent reports have also demonstrated that lipid peroxidation, determined as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels, was increased in the brain of rats chronically exposed to ura-

nium for 3 months or acute exposed to intraperitoneal injection of uranyl nitrate (Linares et al., 2007; Ghosh et al., 2007). Moreover, in the present study, the lipid peroxidation seems to be more pronounced after EU than after DU. All these results suggest that the imbalance of ROS and the lipid peroxidation might be a possible mechanism to explain central effects of uranium and notably impairments of some behaviour (Briner and Murray, 2005).

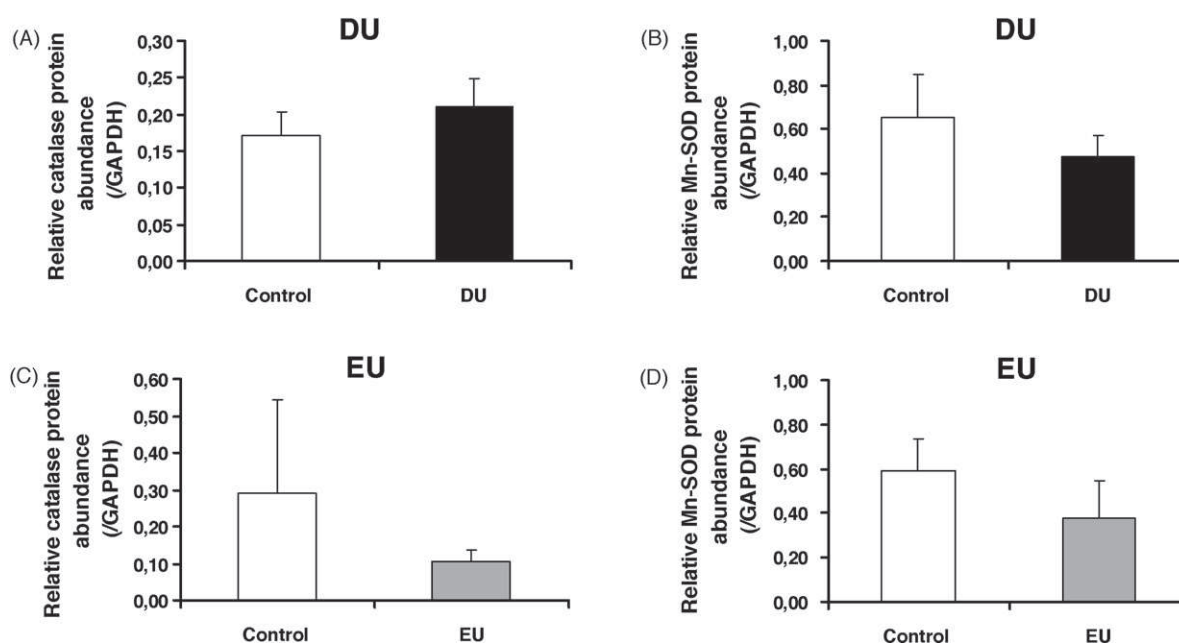


Fig. 4. Protein levels of catalase (CAT) (A and C) and Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD) (B and D) analysed by Western-blot analysis in the entorhinal cortex of rats exposed to DU or EU for 9 months (40 mg of uranium L⁻¹ of drinking water). GAPDH was used as a loading control. Data are expressed as mean \pm SEM of the target protein band intensity as compared with GAPDH band intensity; $n=4$ for each group of rats; white: control; black: DU; grey: EU-4%.

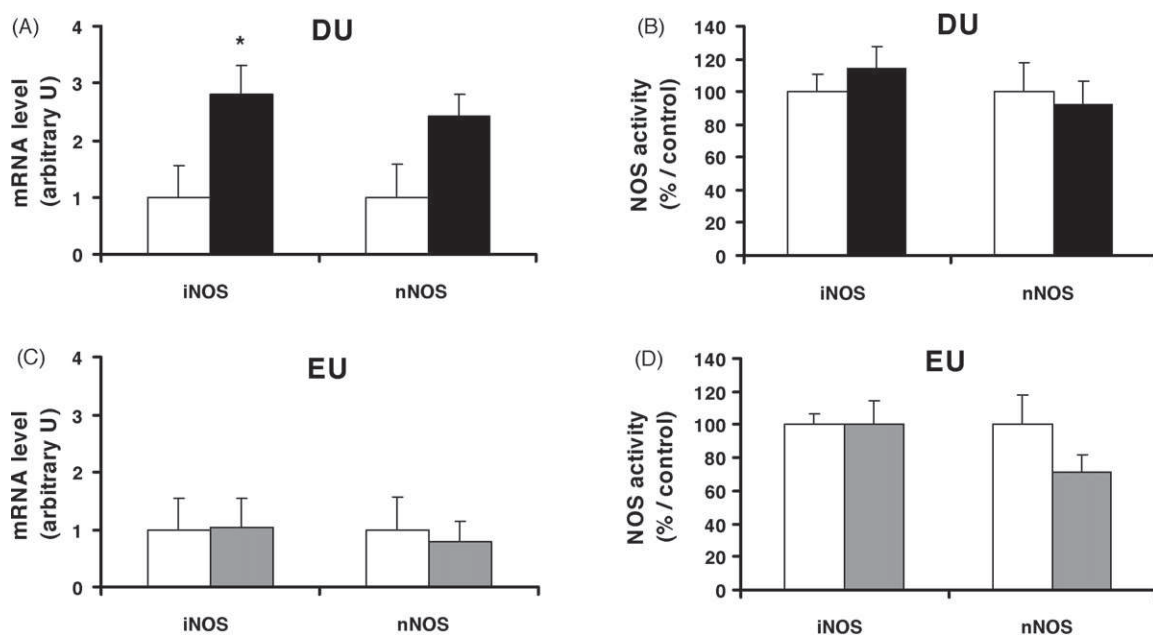


Fig. 5. Gene expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and enzymatic activities of iNOS and nNOS in the entorhinal cortex of rats exposed to DU (A and B) or EU-4% (C and D) for 9 months (40 mg of uranium L^{-1} of drinking water). Control rats drank mineral water. Gene expressions were expressed as a ratio to the reference gene HPRT. Control values were normalized to 1 for gene expression. Activities were expressed as a percent of the control. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 8-10$ for each group of rats; white: control; black: DU; grey: EU-4%; * significantly different from control ($p < 0.05$).

Cells attempt to neutralize the ROS with several antioxidants, and these defence systems are closely interrelated. The catalase (CAT) is one enzyme of this antioxidant system that can convert hydrogen peroxide to molecular oxygen and water. After chronic exposure to EU, mRNA levels of CAT were significantly decreased, but without any effect on its activity and protein level. The study of

CAT after chronic exposure to EU had never been made previously. After DU exposure, the results obtained in the present study demonstrated no effect on gene expression or protein concentration of CAT, but a significant up-regulation of its activity in the cerebral cortex of rats exposed to DU. This result is not in accordance with a previous study that has found no significant effect on CAT activity in cortex of rats exposed to uranium for 3 months (Linares et al., 2007). These variations might be due to the fact that the study of Linares and our study were performed with different times of exposure (3 months versus 9 months) and with different doses of uranium (10, 20 and 40 mg $kg^{-1} day^{-1}$ versus 2 mg $kg^{-1} day^{-1}$). These results suggest that uranium induced a time and a dose selective response, in order to adapt to particular oxidative status of uranium exposure. However, other metals, such as lead, iron or cadmium, seem to have the same enzyme-activating capacity as uranium in the cerebral cortex (Correa et al., 2004; De Lima et al., 2005; Shukla et al., 1996). The increase of CAT activity in the cerebral cortex of rats exposed to DU may represent a compensatory response to oxidative stress. The CAT protects the cells from hydrogen peroxide and plays an important role in adaptation to oxidant stress (Mates and Sanchez-Jimenez, 1999). It could be suggested that the enhancement of CAT activity in experimental animals is a brain response to increase the detoxification process and to prevent oxidant toxicity of uranium.

The superoxide dismutase (SOD) is considered one the first lines of defence against deleterious effects of oxyradicals in the cell by catalyzing the dismutation of superoxide radicals to hydrogen peroxide and molecular oxygen (Romeu et al., 2002). Glutathione peroxidase (GPx) converts glutathione from its reduced form to its oxidative form when this enzyme converts hydrogen peroxide into hydrogen oxide. After EU exposure, a significant down-regulation of SOD and GPx activities in the cerebral cortex was observed for the first time. These reductions of antioxidant enzymes would reflect an adverse effect of EU on the antioxidant system. The oxidative stress generated by EU could be explained, or at least maintained, by the loss of antioxidant defence capacity of the cells to counteract the rising oxygen radicals in the cells. After DU exposure, relative mRNA levels of Cu-Zn SOD, Mn SOD and GPx increased significantly in the cerebral cortex of rats. In our knowledge, no in vivo data

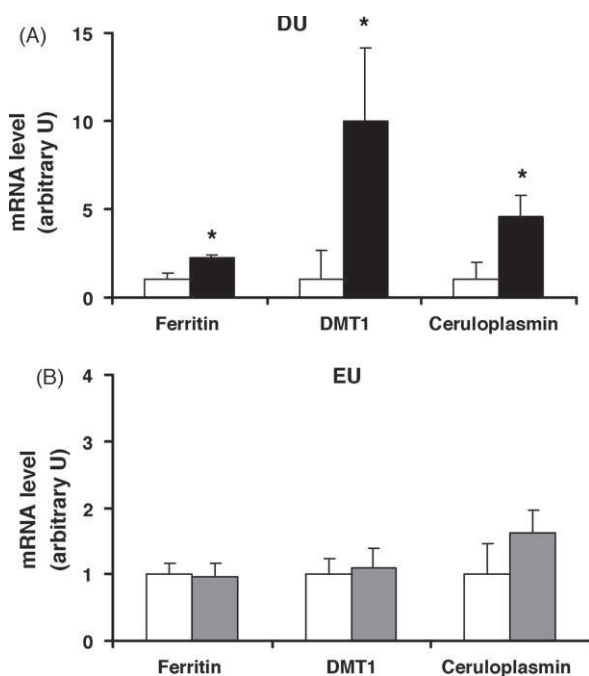


Fig. 6. Gene expression of ferritin, Divalent-Metal-Transporter1 (DMT1) and ceruloplasmin in the entorhinal cortex of rats exposed to DU (A) or EU-4% (B) for 9 months (40 mg of uranium L^{-1} of drinking water). Control rats drank mineral water. For genes gene expressions, data were expressed as a ratio to the reference gene HPRT. Control values were normalized to 1 for gene expression. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 8-10$ for each group of rats; white: control; black: DU; grey: EU-4%; * significantly different from control ($p < 0.05$).

on genes expression of SOD and GPx in the brain after DU exposure are available. These results suggest that neurotoxic adverse effects of DU could be prevented/decreased by inducing synthesis of new protein, with an up-regulation in the gene expression of SOD and GPx. However, analysis of SOD and GPx failed to identify any consistent changes in their protein concentrations and/or activities, after DU exposure during 9 months. The same kind of results on SOD and GPx activities have been previously demonstrated in the hippocampus of rats exposed to uranyl acetate for 3 months (Linares et al., 2007). The absence of correlation between gene expression and enzymatic activity of antioxidant enzymes has been also previously observed after exposure to other metals, such as Cu, Cd or Zn (Hansen et al., 2006). This lack of correlation could be explained by the alteration of post-transcription events such as translation and transport of gene products. It could result in loss of functional molecules, minor post-transductional changes, and, finally, a lack of changes in SOD and GPx activities.

Nitric oxide (NO) is a pleiotropic free radical with many well-known physiological functions, which play a key role in oxidative stress. NO has protective or regulatory functions in the cells at a low concentration while toxic effects at higher concentration. It can react with superoxide to produce the damaging free radical peroxynitrite. Our results have shown a significant increased iNOS gene expression after chronic exposure to DU, not after EU. In our knowledge, only one paper reported effects of uranium on NO-ergic pathway at central level. Abou-Donia et al. (2002) have demonstrated that repeated administration of 0.1 mg kg^{-1} uranyl acetate during 7 days increased nitrite levels in rat brain (Abou-Donia et al., 2002). These results indicate that uranium may involve some changes in NO-ergic pathway. The protective or the adverse effects of NO on uranium toxicity should depend on its concentration in tissue. In our experimental conditions, no significant changes in cortical NOS activities and NO_x^- levels were observed in the uranium-groups compared to the controls. So, iNOS gene expression increased perhaps only to maintain NO concentration at physiological level. The NO physiological concentration is 3–5 nM in the brain. At this concentration, NO mediates biological actions ranging from vasodilatation, neurotransmission, inhibition of platelet adherence. It is the “protective effect” of NO on uranium toxicity, as it was previously demonstrated for other metals, such as cadmium (Poliandri et al., 2006). In conclusion, EU has any effect on the NO-ergic pathway, and NO could constitute a beneficial response to oxidative stress induced by DU.

Iron, in virtue of its ability to participate directly as a donor or acceptor in electron-transfer reactions, is an essential trace element for cell function. This property makes iron the most common cofactor within the oxygen handling biological machinery (Crichton and Ward, 1992). Additional roles for iron have been described in neurons, such as its participation in neurotransmitter metabolism (Nelson, 1997). However, the very property that enables iron to participate in oxygen metabolism explains its potential damaging effects: if not handled properly by the cell, iron interacts with molecular oxygen, generating ROS through Haber-Weiss and Fenton reactions (Halliwell and Gutteridge, 1997). Moreover, several data indicate that uranium may interfere at different steps of iron metabolism. For example, Berradi et al. (2008) have recently demonstrated that iron transporters, notably DMT1, were protein targets for uranium in kidney (Berradi et al., 2008). Another study has demonstrated a complexation of ferritin with actinides such as uranium, neptunium and plutonium (Den Auwer et al., 2005). Binding experiments have also demonstrated that ceruloplasmin was able to bind metals, such as uranium (Vidaud et al., 2005). In this study, chronic exposure to EU had no effect on iron metabolism, but DU perturbed this metabolism at three steps:

transport, storage and oxidation. Firstly, free iron is imported into the cell via the divalent metal transporter (DMT1). Its gene expression increased significantly after exposure to DU during 9 months. Similar results have been previously observed after manganese exposure (Wang et al., 2006). The consequence of this increase could be an increase of intracellular iron. mRNA levels of ferritin in the cerebral cortex were increased in DU-exposed rats. Previous studies have also demonstrated interactions between heavy metals and ferritin. For example, ferritin protein levels increased in the brain of rats chronically exposed to manganese (Reaney and Smith, 2005). The increases of ferritin could sequester excess intracellular iron in order to prevent excessive production of ROS, which consequently limits oxidative stress. It is in accordance with a previous study demonstrating that ferritin transcription is sensitive to oxidative stress (Theil, 2007). Next, iron needs an oxidation to exit from the cell and to reach blood. Ceruloplasmin plays an important role in the egress of iron from cells (Taylor et al., 2005). The present study shown for the first time that mRNA levels of ceruloplasmin were dramatically increased in the cerebral cortex after chronic exposure to DU. To date, no publications reported effects of metal exposure on ceruloplasmin mRNA levels. There is increasing experimental evidence that ceruloplasmin can function as a superoxide dismutase, and can eventually function as an extracellular protective enzyme of superoxide radicals (Leelakunakorn et al., 2005). So, if the activity, as the gene expression, of ceruloplasmin increased after DU exposure, we could hypothesize that it is in order to protect the cerebral cortex from oxidative stress.

The radiotoxicity of uranium, related to its chemical properties, led us to study the chronic effects of two types of uranium, DU with its predominantly chemical toxicity, and EU-4% with increased radiological activity, in order to determine the respective radiological and chemical effects of uranium. Since many years, assessment of the health risk from acute or chronic uranium exposure is based on its chemical toxicity rather than its radiological toxicity. In fact, uranium exposure is well known to cause damages to kidney function, a natural target organ for many other heavy metals (WHO, 2001). On the contrary, the uranium radiological hazard has been poorly investigated. The worse radiological effect of uranium ingestion is expected to be bone cancer, in analogy with the effects of other bone-seeking alpha particle emitter (Ellender et al., 2001; Miller et al., 2002). The radiological versus chemical effects of uranium have been dealt with in a few rare studies. Published results include an exploration of the differences in uranium accumulation in rat central nervous system as shown in relation to isotopy (Houpert et al., 2005). In rats, EU-4% induced an increased of anxiety and rapid-eye-movement sleep, but DU did not (Houpert et al., 2005; Lestaevel et al., 2005). The results of the present study demonstrated different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between DU and EU in chronically exposed rats (Fig. 7). After DU exposure, the gene expression or activity of CAT, SOD and GPx increased. Similar results were observed after exposure to heavy metals (De Lima et al., 2005; Shukla et al., 1996; Correa et al., 2004). This result suggests that DU effect on antioxidant enzymes was mainly due to the chemical toxicity of its element. On the contrary, EU decreased gene expression of CAT, and decreased SOD and GPx activities. These antioxidant enzymes perturbations observed after EU exposure could have radiological origins. Concerning the iron metabolism, significant anti-oxidant effects were observed after DU but not after EU exposure. Given these results, chronic exposure to DU, but not EU, seems to induce several mechanisms in order to counteract the oxidative stress, with an increase of antioxidant agents, such as antioxidant enzymes or ferritin. This is confirmed by the quantification of lipid peroxidation, an oxidative stress marker, which was significantly increased after EU exposure, but not after DU. This lipid peroxidation after EU exposure was correlated to higher uranium levels in the cerebral cortex than after DU exposure. Consequently,

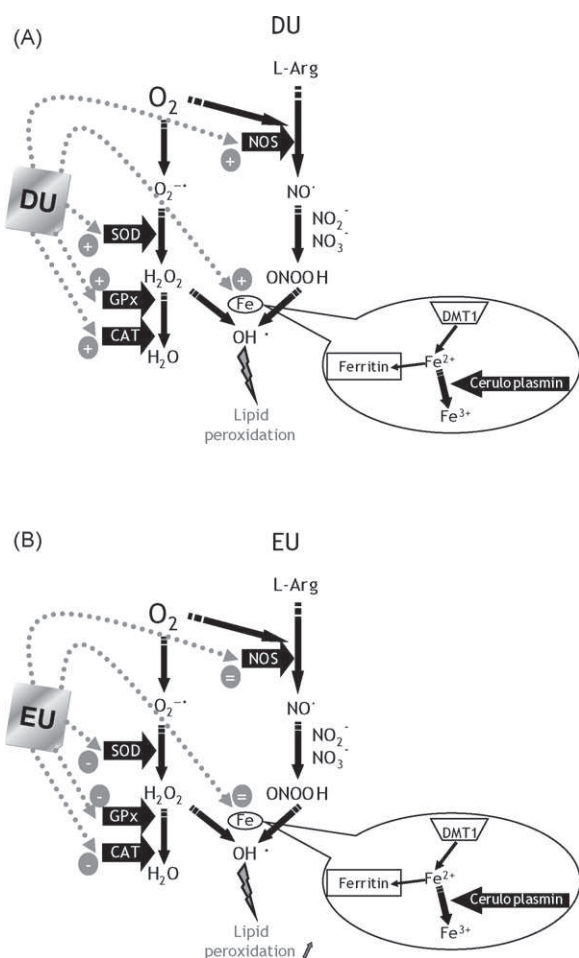


Fig. 7. Oxidative stress in the brain: different pattern of response to depleted (A) or enriched (B) uranium after chronic exposure. Depleted uranium (DU) exposure induces anti-oxidant effect via an increase of antioxidant enzymes, iron metabolism and NO-ergic pathway. Enriched uranium (EU) exposure induces pro-oxidant effects via a decrease of antioxidant enzymes. Abbreviations: L-Arg=L-Arginine; NOS = nitric oxide synthase; SOD = superoxide dismutase; GPx = glutathione peroxidase; CAT = catalase; DMT1 = Divalent-Metal-Transporter1.

we could suggest that chemical activity of uranium induces a compensatory response following the daily intake of uranium to limit oxidative stress and radiological activity of uranium facilitates, or at least does not inhibit, this oxidative stress. This could explain the decrease of short term memory, the increase of anxiety and the increase of rapid-eye-movement-sleep observed after EU chronic exposure and not observed after DU at 40 mg L⁻¹ (Houpert et al., 2005; Lestaavel et al., 2005). This link between behavioural modifications and lipid peroxidation has been previously demonstrated in other experimental conditions, such as after lead exposure (De Lima et al., 2005).

In conclusion, this study confirms that uranium is a neuro-active substance in animals, in spite of very low levels of uranium in the brain. The oxidative stress via the imbalance of pro-/anti-oxidant systems is undoubtedly a mechanism that could explain central effects of uranium. Moreover, chemical and radiological toxicity of uranium has differential central effects. After chronic exposure, DU induced an increase of antioxidant systems and EU induced rather a decrease of these systems. The DU response could be interpreted as a defensive mechanism towards free radical damage to cerebral tissue. Effects of uranium may vary with the length of exposure. It might be worthwhile to determine if the compensatory response observed after DU exposure still exists with shorter uranium exposure times.

Conflict of interest statement

None.

Acknowledgements

We thank T. Loiseau and F. Voyer for care of animals. This work is part of the Envirhom program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.

References

- Abou-Donia, M.B., Dechkovskaia, A.M., Goldstein, L.B., Shah, D.U., Bullman, S.L., Khan, W.A., 2002. Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 881–890.
- Berradi, H., Bertho, J.M., Dudoignon, N., Mazur, A., Grandcolas, L., Baudelin, C., Grison, S., Voisin, P., Gourmelon, P., Dublineau, I., 2008. Renal anemia induced by chronic ingestion of depleted uranium in rats. *Toxicol. Sci.* 103, 397–408.
- Bleise, A., Danesi, P.R., Burkart, W., 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J. Environ. Radioact.* 64, 93–112.
- Briner, W., 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, 135–144.
- Brink, N., Szamel, M., Young, A.R., Wittern, K.P., Bergemann, J., 2000. Comparative quantification of IL-1beta, IL-10, IL-10r, TNFalpha and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. *Inflamm. Res.* 49, 290–296.
- Correa, M., Roig-Navarro, A.F., Aragon, C.M., 2004. Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice. *Life Sci.* 74, 2009–2021.
- Craft, E., Abu-Qare, A., Flaherty, M., Garofolo, M., Rincavage, H., Abou-Donia, M., 2004. Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 7, 297–317.
- Crichton, R.R., Ward, R.J., 1992. Iron metabolism—new perspectives in view. *Biochemistry* 31, 11255–11264.
- De Lima, M.N., Polydoro, M., Laranja, D.C., Bonatto, F., Bromberg, E., Moreira, J.C., Dal-Pizzol, F., Schroder, N., 2005. Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2521–2528.
- Den Auwer, C., Llorens, I., Moisy, P., Vidaud, C., Goudard, F., Barbot, C., Solari, P.L., et al., 2005. Actinide uptake by transferrin and ferritin metalloproteins. *Radiochim. Acta* 93, 699–703.
- Diamond, G.L., Morrow, P.E., Panner, B.J., Gelein, R.M., Baggs, R.B., 1989. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* 13, 65–78.
- Ellender, M., Harrison, J.D., Pottinger, H., Thomas, J.M., 2001. Induction of osteosarcoma and acute myeloid leukaemia in CBA/H mice by the alpha-emitting nuclides, uranium-233, plutonium-239 and americium-241. *Int. J. Radiat. Biol.* 77, 41–52.
- Ghosh, S., Kumar, A., Pandey, B.N., Mishra, K.P., 2007. Acute exposure of uranyl nitrate causes lipid peroxidation and histopathological damage in brain and bone of Wistar rat. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 26, 255–261.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1997. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J. Neurochem.* 69, 1330–1331.
- Hansen, B.H., Romma, S., Garmo, O.A., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., 2006. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 143, 263–274.
- Hedaya, M.A., Birkenfeld, H.P., 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., Lestaavel, P., Bussy, C., Paquet, F., Gourmelon, P., 2005. Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat. *Neurotoxicology* 26, 1015–1120.
- Iadecola, C., Xu, X., Zhang, F., el-Fakahany, E.E., Ross, M.E., 1995. Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 52–59.
- Juntunen, R. Uranium and radon in wells drilled into bedrock in southern Finland. 1991. Report of Investigation 98. Espoo: Geologian Tutkimuskeskus (in Finnish).
- Leelakunakorn, W., Sriworawit, R., Soontaros, S., 2005. Ceruloplasmin oxidase activity as a biomarker of lead exposure. *J. Occup. Health* 47, 56–60.
- Lestaavel, P., Bussy, C., Paquet, F., Dhieux, B., Clarençon, D., Houpert, P., Gourmelon, P., 2005. Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 27, 835–840.
- Linares, V., Sanchez, D.J., Belles, M., Albina, L., Gomez, M., Domingo, J.L., 2007. Pro-oxidant effects in the brain of rats concurrently exposed to uranium and stress. *Toxicology* 236, 82–91.
- Mates, J.M., Sanchez-Jimenez, F., 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front. Biosci.* 4, D339–345.
- Miller, A.C., Xu, J., Stewart, M., Brooks, K., Hodge, S., Shi, L., Page, N., 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, 275–278.
- Nelson, N., 1997. Homeostasis of energy conduction, neurotransmitters, cytotoxic compounds and metal ions. *J. Exp. Biol.* 200, 331–333.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158–169.
- Pellmar, T.C., Fuciarelli, A.F., Ejnik, J.W., Hamilton, M., Hogan, J., Strocko, S., Emond, C., Mottaz, H.M., Landauer, M.R., 1999. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol. Sci.* 49, 29–39.
- Poliandri, A.H., Esquifino, A.I., Cano, P., Jiménez, V., Lafuente, A., Cardinali, D.P., Duvilanski, B.H., 2006. In vivo protective effect of melatonin on cadmium-induced changes in redox balance and gene expression in rat hypothalamus and anterior pituitary. *J. Pineal Res.* 41, 238–246.
- Priest, N.D., 2001. Toxicity of depleted uranium. *Lancet* 357, 244–246.
- Reaney, S.H., Smith, D.R., 2005. Manganese oxidation state mediates toxicity in PC12 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205, 271–281.
- Ricart-Jané, D., Llobera, M., Lopez-Tejero, D., 2002. Anticoagulants and other pre-analytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Greiss method. *Nitric Oxide* 6, 178–185.
- Romeu, M., Mulero, M., Giralt, M., Folch, J., Nogues, M.R., Torres, A., Fortuno, A., Sureda, F.X., Cabre, M., Paternain, J.L., Mallol, J., 2002. Parameters related to oxygen free radicals in erythrocytes, plasma and epidermis of the hairless rat. *Life Sci.* 71, 1739–1749.
- Shukla, A., Shukla, G.S., Srimal, R.C., 1996. Cadmium-induced alterations in blood-brain barrier permeability and its possible correlation with decreased microvessel antioxidant potential in rat. *Hum. Exp. Toxicol.* 15, 400–405.
- Souidi, M., Gueguen, Y., Linard, C., Dudoignon, N., Grison, S., Baudelin, C., Marquette, C., Gourmelon, P., Aigueperse, J., 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* 214, 113–122.
- Taylor, A.B., Stoj, C.S., Ziegler, L., Kosman, D.J., Hart, P.J., 2005. The copper-iron connection in biology: structure of the metallo-oxidase Fet3p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15459–15464.
- Theil, E.C., 2007. Coordinating responses to iron and oxygen stress with DNA and mRNA promoters: the ferritin story. *Biometals*.
- Vidaud, C., Dedieu, A., Basset, C., Plantevin, S., Dany, I., Pible, O., Quemeneur, E., 2005. Screening of human serum proteins for uranium binding. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 946–953.
- Wang, X., Li, G.J., Zheng, W., 2006. Upregulation of DMT1 expression in choroidal epithelia of the blood-CSF barrier following manganese exposure in vitro. *Brain Res.* 1097, 1–10.
- Wheeler, C.R., Salzman, J.A., Elsayed, N.M., Omaye, S.T., Korte, D.W., 1990. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal. Biochem.* 184, 193–199.
- WHO, 2001. Depleted Uranium: Sources, Exposure and Health Effects - Full Report. In WHO, 2001 (WHO/SDE/PHE/01.1). World Health Organization, Department of Protection of the Human Environment, Geneva.
- Yilmaz, S., Yilmaz, E., 2006. Effects of melatonin and vitamin E on oxidative antioxidative status in rats exposed to irradiation. *Toxicology* 222, 1–7.

Uranium: propriétés et effets biologiques après contamination interne

Mamaar Souidi, Emilie Tissandie, Radjini Racine, Helene Bensoussan, Caroline Rouas, Elise Grignard, Isabelle Dublineau, Patrick Gourmelon, Philippe Lestaevel, Yann Guegen

Publié dans Annales de Biologie Clinique 67 (1) (2009) 23-38

Uranium : propriétés et effets biologiques après contamination interne

Uranium: properties and biological effects after internal contamination

M. Souidi
E. Tissandie
R. Racine
H. Ben Soussan
C. Rouas
E. Grignard
I. Dublineau
P. Gourmelon
P. Lestaevel
Y. Gueguen

Institut de radioprotection
et de sûreté nucléaire,
Direction de la radioprotection
de l'homme,
IRSN, Fontenay-aux-Roses
<maamar.souidi@irsn.fr>

Résumé. L'uranium est un radionucléide présent dans l'environnement depuis l'origine de la terre. A cet uranium d'origine naturelle viennent s'ajouter des apports plus récents résultant des activités industrielles et militaires de l'homme. La toxicité de l'uranium résulterait d'une combinaison de ses propriétés chimiques (métal lourd) et radiologiques (émission de rayonnements ionisants). La toxicité aiguë se manifeste chez l'animal par une importante perte de poids et des signes d'atteinte rénale et cérébrale. Une altération de la formation osseuse, une modification du système reproducteur et des effets carcinogènes sont également couramment observés. A contrario, les effets biologiques d'une exposition chronique à de faibles doses sont peu connus. Cependant, les résultats de différentes études récentes suggèrent que la contamination chronique à faible niveau par l'uranium induirait des effets biologiques subtils mais significatifs dans des organes qui ne sont pas connus pour être des organes sensibles à la contamination par l'uranium. C'est le cas du système nerveux central par exemple puisque, récemment, ont été montrées une altération de la mémoire à court terme et une augmentation du niveau d'anxiété, associées à la présence d'uranium dans différentes structures cérébrales chez l'animal (essentiellement rongeur). La grande nouveauté dans la connaissance des effets d'une contamination chronique par l'uranium est la mise en évidence d'effets biologiques de l'uranium sur plusieurs métabolismes majeurs de l'organisme, incluant le métabolisme des médicaments, des hormones stéroïdiennes, de la vitamine D et du fer. Ces données scientifiques récentes suggèrent que l'uranium pourrait participer à l'augmentation des risques sanitaires liés à la pollution de l'environnement.

Mots clés : *uranium, contamination chronique, contamination aiguë*

Abstract. Uranium is a radionuclide present in the environment since the origin of the Earth. In addition to natural uranium, recent deposits from industrial or military activities are acknowledged. Uranium's toxicity is due to a combination of its chemical (heavy metal) and radiological properties (emission of ionizing radiations). Acute toxicity induces an important weight loss and signs of renal and cerebral impairment. Alterations of bone growth, modifications of the reproductive system and carcinogenic effects are also often seen. On the contrary, the biological effects of a chronic exposure to low doses are unwell known. However, results from different recent studies suggest that a chronic contamination with low levels of uranium induces subtle but significant levels. Indeed, an internal contamination of rats for several weeks leads to detection of uranium in many cerebral structures, in association with an alteration of short-term memory and an increase of anxiety level. Biological effects of uranium on the metabolisms of xenobiotics, steroid hormones and vitamin D

Article reçu le 30 juillet 2008,
accepté le 7 octobre 2008

Tirés à part : M. Souidi

were described in the liver, testis and kidneys. These recent scientific data suggest that uranium could participate to increase of health risks linked to environmental pollution.

Key words: uranium, chronic contamination, acute exposure

La pollution de l'environnement est devenue l'une des préoccupations majeures du public. Tous les milieux (aquatique, atmosphérique et terrestre) sont concernés par cette pollution, qu'elle soit d'origine anthropique (émissions des moteurs ou des usines, stations d'épuration, etc.) ou naturelle (éruption volcanique, érosion, etc.). La croissance démographique et l'augmentation de l'activité industrielle contribuent pour une part considérable à la contamination de l'environnement. Parmi les nombreuses causes de pollution, nous pouvons citer par exemple l'utilisation d'engrais ou d'insecticides par l'industrie agricole, les rejets d'hydrocarbures (dégazage, marée noire) ou l'émission de métaux lourds (cadmium, mercure, plomb, etc.) autour des sites d'activités liés à la métallurgie. Cette pollution incessante, à laquelle chacun est exposé, peut avoir un impact sur la santé humaine. Parmi ces polluants, certains sont des perturbateurs endocriniens et peuvent avoir un impact sur l'équilibre hormonal de l'espèce humaine. On peut citer par exemple les résidus de dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) ou le chlordane, des insecticides qui sont des agonistes des estrogènes et de la progestérone et altèrent la fertilité ; les dithiocarbamates, des fongicides qui perturbent la synthèse de neurotransmetteurs comme l'adrénaline ; le cadmium, un métal lourd qui perturbe le métabolisme de la vitamine D ; ou les dioxines, qui diminuent le taux d'hormones thyroïdiennes. Ainsi, l'augmentation de la prévalence de certaines maladies dans les pays industrialisés soumis à cette pollution, telles que les cancers ou les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, est au cœur de l'actualité médicale et aussi sociale et médiatique. Les résultats de la recherche scientifique laissent donc à penser que ces maladies pourraient être également la conséquence d'une altération lente et progressive de notre environnement par l'utilisation de substances chimiques et radiologiques. L'exposition à l'uranium, qui possède une double toxicité (chimique et radiologique) pourrait participer à l'augmentation des risques potentiels émergents liés à une contamination éventuelle de l'environnement.

L'uranium est un radionucléide présent sur la terre depuis son origine. Il est retrouvé aussi bien dans le sol, l'air et l'eau que dans l'ensemble de la chaîne alimentaire en raison de ce dépôt naturel. A cette provenance naturelle de l'uranium s'ajoutent des apports résultant des activités

industrielles de l'homme. En effet, depuis le XX^e siècle, les sources d'exposition à l'uranium ont considérablement augmenté du fait des activités humaines (centrales nucléaires, exploitation des mines d'uranium, déchets radioactifs, etc.). En dehors des activités industrielles liées au cycle du combustible du nucléaire qui expose une population bien identifiée (les travailleurs du nucléaire), les émissions des industries de retraitement participent aussi à l'augmentation de l'exposition du public. Par ailleurs, l'utilisation d'obus contenant de l'uranium lors des derniers conflits internationaux a conduit à l'augmentation du taux de dissémination de ce radioélément dans l'environnement. Ces différentes situations peuvent donc contribuer à augmenter la probabilité d'exposition de l'homme, et induire donc d'éventuels effets délétères en termes de santé humaine.

Cette revue propose donc de faire une synthèse des connaissances sur l'uranium, en partant de ses propriétés, puis de sa dispersion dans l'environnement, suivi par sa biocinétique d'entrée et de distribution, ainsi que ses effets biologiques induits dans différents organes comme les reins, l'os, le système nerveux central, les gonades, le foie, les poumons, le système digestif, dans le cas d'une contamination aiguë puis après contamination chronique à faible dose.

Les radionucléides dans l'environnement

Les radionucléides existent naturellement ou sont produits artificiellement dans les réacteurs nucléaires. Les radionucléides naturels se divisent en deux catégories : les radionucléides primordiaux, qui étaient présents au moment de la formation de la terre, et les radionucléides cosmogéniques, produits en permanence par le bombardement des molécules gazeuses de l'atmosphère terrestre par les rayons cosmiques. Le potassium 40, l'uranium 238 et le thorium 232 sont les principaux radionucléides primordiaux. Ces éléments, ainsi que leurs descendants radioactifs, sont présents dans les roches, les sols et se retrouvent à l'état de traces dans les eaux et les végétaux. Les quatre principaux radionucléides cosmogéniques sont le carbone 14, le béryllium 7, le sodium 22 et le tritium. Ils sont déposés sur la terre par l'action du brassage atmosphérique, des précipitations et de la pesanteur. Les radionu-

cléides d'origine artificielle sont utilisés pour les activités médicales (technétium 99m, thallium 201, iode 131, etc.) et dans l'industrie nucléaire civile et militaire (plutonium 239, strontium 90, césium 137, etc.) [1].

Parmi ces radionucléides, l'uranium représente une source de contamination potentiellement importante pour la population.

L'uranium

Propriétés et utilisations

Découvert en 1789 par le chimiste allemand Martin Klaproth, l'uranium est l'élément le plus lourd présent naturellement dans les roches, les sols et l'eau. Sa propriété radioactive a été mise en évidence une centaine d'années plus tard, en 1896, par le physicien français Henri Becquerel.

La concentration moyenne de l'uranium dans la croûte terrestre est de 2 mg/kg [2]. Elle varie en fonction de la constitution des roches. On rencontre l'uranium sous différentes formes minéralogiques, aussi bien dans les terrains granitiques que sédimentaires. Il se combine, par exemple avec l'oxygène dans l'uraninite et la pechblende, deux des principaux minerais d'uranium, constitués d'oxyde uraneux (UO₂).

De symbole U, l'uranium est le dernier élément naturel du tableau périodique de Mendeleïev. Il possède le plus grand numéro atomique ($Z = 92$) et fait partie de la famille des actinides. 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 et forme différents complexes par l'intermédiaire de l'ion uranyle UO₂²⁺. Dans les fluides biologiques, il est présent uniquement sous forme d'ion uranyle principalement complexé avec les ions carbonate ou citrate [3].

L'uranium possède 17 isotopes avec des nombres de masse compris entre 227 et 242. Parmi ces isotopes, trois seulement sont présents à l'état naturel : l'uranium 238 (²³⁸U, 99,28 %) ; l'uranium 235 (²³⁵U, 0,718 %) et l'uranium 234 (²³⁴U, 0,0054 %). Ces isotopes, tous radioactifs, se désintègrent principalement par émission de rayonnements α et possèdent des périodes très longues (tableau 1). D'autres isotopes peuvent être induits artificiellement, l'uranium 233 ou 236.

L'uranium 235 est le seul noyau naturel aisément fissible et il présente donc un intérêt énergétique et militaire. Les deux applications principales de la fission sont les réacteurs nucléaires producteurs d'électricité et les armes nucléaires. La plupart des réacteurs nucléaires utilisent de l'uranium dit enrichi (UE). L'enrichissement consiste

donc à augmenter la teneur en ²³⁵U de l'uranium naturel (UN, 0,7 % ²³⁵U) jusqu'à un niveau compris entre 3 et 5 % en vue de l'utiliser comme combustible ou jusqu'à un niveau supérieur à 90 % en vue de l'utiliser comme explosif. Le mélange restant après séparation de l'UE est appelé uranium appauvri (UA) car il contient très peu de ²³⁵U (0,3 % en moyenne). Il possède les mêmes propriétés chimiques que l'UN mais est 60 % moins radioactif (tableau 2). C'est à la fois un résidu de l'industrie nucléaire, disponible en très grande quantité et bon marché, et un matériau employé pour des utilisations non nucléaires. En effet, la fabrication d'une tonne d'UE à 3,5 % à partir d'UN entraîne la production de plus de quatre tonnes d'UA. Sa forte densité (19 g/cm³, environ 1,7 fois celle du plomb) et son prix favorisent son utilisation par rapport aux autres métaux de densité comparable comme l'iridium, l'osmium ou le tungstène, malgré sa radioactivité. Ses propriétés ont conduit à l'utiliser dans de nombreuses applications civiles et militaires : contre-poids ou lest dans les avions, boucliers de protection contre les rayonnements dans le matériel médical utilisé pour les radiothérapies et dans les conteneurs servant aux transports des matières radioactives, blindage dans les plaques de char d'assaut et plus particulièrement composant de projectile d'armes de guerre [4, 5].

Sources d'exposition

L'alimentation et l'eau potable constituent les deux principales sources d'exposition chronique à l'uranium (figure 1). L'homme ingère quotidiennement 1-2 μ g d'uranium (sous forme d'uranyl) dans l'alimentation et à 1,5 μ g dans l'eau de boisson [2]. Certaines régions sont naturellement riches en uranium. Ainsi, certaines populations de Finlande sont exposées à un taux d'UN dans leur eau de

Tableau 1. Caractéristiques des isotopes de l'uranium naturel.

Isotope	Périodes de décroissance	Masse relative (%)	Activité (Bq) pour 1 g d'uranium	Activité (%)
²³⁸ U	4,5 milliards d'années	99,28	12,4.10 ³	48,2
²³⁵ U	0,7 milliard d'années	0,72	5,8.10 ²	2,3
²³⁴ U	0,25 million d'années	5,40.10 ⁻³	12,5.10 ³	49,5

Tableau 2. Composition et activité des 3 types d'uranium.

	Masse d' ²³⁵ U (%)	Activité spécifique (kBq/g)
Uranium naturel	0,7	25
Uranium enrichi	3	42
Uranium appauvri	0,3	14

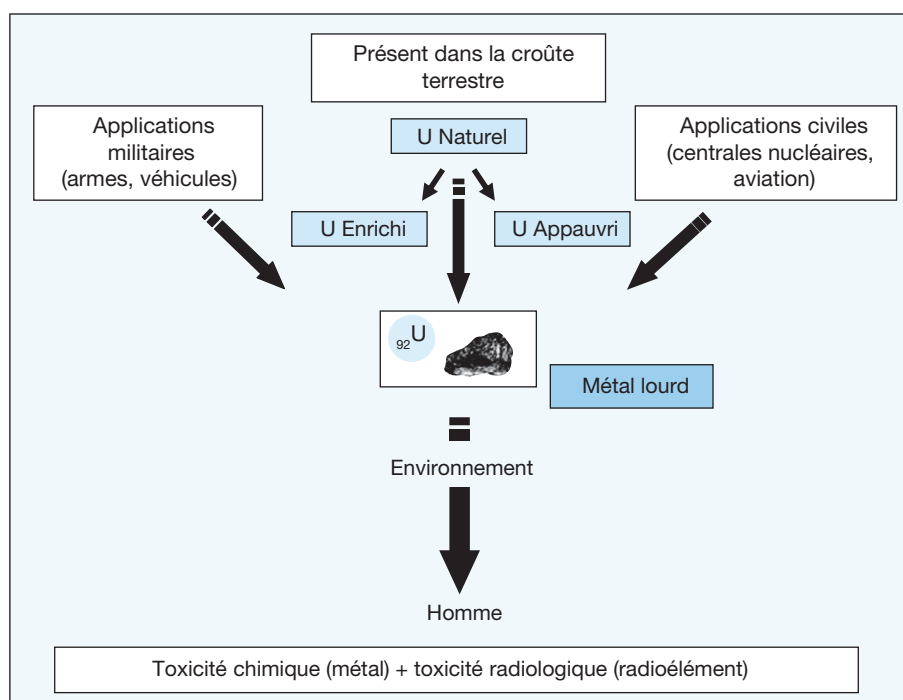


Figure 1. Sources d'exposition à l'uranium : origine naturelle et activité humaine.

boisson 100 à 1 000 fois plus élevé que la moyenne [6]. Des concentrations d'uranium de 1,2 mg/L ont été détectées dans les eaux destinées ou non à la consommation humaine au Nouveau-Mexique [7], de 0,7 mg/L au Canada [8] et atteignant 20 mg/L en Finlande [9]. La combustion du charbon et des carburants constitue l'une des principales sources de contamination de l'air par l'uranium. On a signalé les teneurs en uranium suivantes dans l'atmosphère locale : New York, 0,4 ng/m³ [10] et Royaume-Uni, 0,02 ng/m³ [11]. La fumée de cigarette (deux paquets par jour) est responsable d'un apport individuel équivalent à 0,05 µg d'uranium par jour [12]. Si l'on suppose que le volume quotidien d'air respiré atteint 20 m³ et que la concentration moyenne d'uranium dans l'air de la ville est de 0,1 ng/m³, la dose quotidienne d'uranium inspirée par l'individu s'élève à environ 2,0 ng. A cette exposition naturelle, vient s'ajouter une exposition à l'UA et beaucoup plus rarement à l'UE du fait de l'activité humaine. Les résidus miniers laissés par le broyage et le traitement du minerai d'uranium ainsi que l'utilisation d'armes à l'UA lors des derniers conflits internationaux (Bosnie, Kosovo, Afghanistan, Irak, etc.) participent à la contamination de l'environnement et augmentent les sources d'exposition des populations locales [2, 13, 14]. De plus, certains engrais phosphatés employés dans l'agriculture présentent des teneurs élevées en uranium [15, 16].

Biocinétique

Le préambule à toute étude de toxicologie est la mise en place d'étude de biocinétique et de distribution dans les tissus, permettant de connaître le devenir biologique du toxique dans l'organisme.

Absorption

Les différents modes de pénétration de l'uranium dans l'organisme sont l'ingestion, l'inhalation et la blessure cutanée [17]. La contamination par inhalation concerne principalement des personnes à leur poste de travail dans l'industrie électronucléaire, ou des soldats exposés à des projectiles contenant de l'UA. En revanche, l'ingestion est la voie la plus fréquente pour l'exposition du public ; elle est due à la consommation d'eau ou d'aliments contaminés.

Après ingestion, une faible quantité d'uranium est absorbée au niveau du tractus gastro-intestinal. Chez l'homme, le taux d'absorption intestinale est estimé à environ 1-1,5 % [18]. Les études réalisées chez l'animal montrent que ce taux varie en fonction de l'espèce, du régime alimentaire, de l'âge, de la forme physico-chimique du sel d'uranium et de la solubilité du composé [19-22]. Chez le rat, des études récentes ont montré que le taux de résorption était de 0,4 % dans le cas d'une ingestion d'eau contaminée par du nitrate d'uranyle [23].

L'intestin grêle est le lieu principal de résorption et de transfert de l'uranium depuis le bol alimentaire vers le compartiment sanguin [24]. Par ailleurs, cette étude indique que la voie de passage majoritaire est la voie transcellulaire (à plus de 80 %), ce qui pose la question des transporteurs impliqués dans le transport de l'uranium à travers l'intestin grêle. Aucune donnée expérimentale ne permet actuellement de répondre à cette question, d'autant que la nature de ces transporteurs dépend de la nature physicochimique de l'uranium dans le fluide gastro-intestinal.

Distribution et rétention

Une fois dans le sang, l'uranium est rapidement distribué aux organes cibles et majoritairement excrété par les urines. L'uranium plasmatique est associé à des molécules de faible poids moléculaire comme les ions carbonate ou citrate, ou bien lié à des protéines plasmatiques telles que la transferrine ou l'albumine [25, 26]. Quelques jours après son passage dans la circulation générale, la charge systémique d'uranium se retrouve principalement dans l'os et au niveau du cortex rénal (environ 90 %) et une partie beaucoup plus faible dans les tissus mous (poumons, rate, foie, etc.) [27] (figure 2). L'os représente le site de stockage à long terme de l'uranium qui se trouve essentiellement concentré à proximité des zones vascularisées et des zones de calcification active. Le comportement de l'uranium dans le squelette est comparable à celui

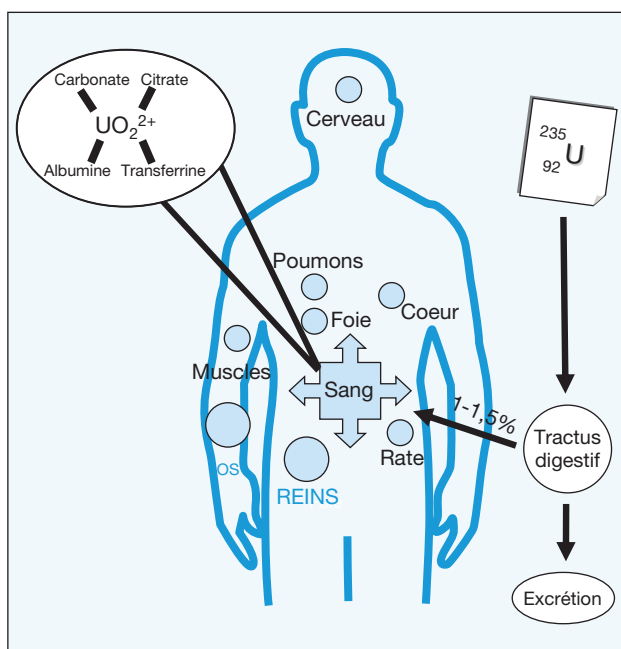


Figure 2. Distribution de l'uranium dans l'organisme.

des éléments alcalino-terreux [28]. Sa fixation à la surface de l'os se fait par échange d'ions uranyle UO_2^{2+} avec les ions Ca^{2+} présents dans les cristaux d'hydroxyapatite [19, 29]. Dans les cellules tubulaires proximales du rein, l'uranium précipite sous forme de phosphate d'uranyle. Ces microprécipités insolubles sont alors déversés dans la lumière du néphron et éliminés dans les urines sous forme de grains submicroscopiques [30].

Des travaux menés sur le rat contaminé de façon chronique à l'uranium (1 mg par jour) montrent que ce radionucléide s'accumule dans la plupart des organes (reins, squelette, intestin, cerveau, muscle, foie...) selon un processus complexe [31]. L'ingestion chronique d'uranium conduit à un profil irrégulier, caractérisé par des pics d'accumulation à 3, 10 et 19 mois de contamination, entrecoupés de retour à des niveaux d'accumulation peu élevés.

Excrétion et élimination

Après ingestion, la majeure partie de l'uranium n'est pas résorbée et est éliminée *via* les fèces [32]. En revanche, l'excrétion de l'uranium solubilisé qui circule dans le sang est essentiellement urinaire. La mesure de l'uranium urinaire permet de suivre l'élimination d'une partie de l'uranium ayant été absorbé. Environ la moitié de l'uranium absorbé est éliminée dans les urines dès le premier jour, 70 % sont éliminés dans les 10 jours et 85 % après trois mois [33]. Avec une demi-vie de rétention allant de 300 à 5 000 jours, l'élimination de l'uranium stocké dans les os est beaucoup plus lente [32]. Ainsi une fraction de l'uranium absorbé reste piégée dans l'os pendant plusieurs dizaines d'années.

Toxicité

L'os et le rein étant respectivement les organes de stockage à long terme et à court terme de l'uranium, ils ont été décrits comme les premières cibles de la toxicité de l'uranium. La néphrite est effectivement le principal signe clinique dû à l'uranium mais de nombreux autres tissus sont affectés suite à la contamination par l'uranium.

L'uranium possède une double toxicité : une toxicité chimique due à sa nature de métal lourd et une toxicité radiologique due à sa nature de radioélément. La toxicité radiologique varie en fonction de son isotopie et de son degré d'enrichissement en ^{235}U . À l'inverse, quel que soit l'isotope considéré, le risque chimique reste identique. Lors d'une contamination par de l'uranium naturel ou appauvri, la toxicité chimique est prépondérante. En revanche, plus l'activité spécifique du composé uranifère est importante (comme c'est le cas pour l'uranium enrichi), plus le risque radiotoxique est à prendre en considération. Pour les risques chimiques et radiologiques, deux types d'effets sont

à distinguer : les effets de toxicité dite aiguë qui correspondent à une exposition à une forte dose pendant un temps court et les effets de toxicité dite chronique qui correspondent à une exposition à long terme mais à des doses plus faibles.

Il est généralement admis que le rein, organe de stockage à court terme, est le siège de la chimiotoxicité de l'uranium et que l'os, tissu de rétention à long terme, est la cible de la radiotoxicité. Cependant, certaines études décrivent des effets neurotoxiques, hépatotoxiques, génotoxiques et embryonnaires qui pourraient également jouer un rôle non négligeable dans la toxicité de ce radionucléide.

Toxicité à forte dose

Effets sur le rein

L'effet néphrotoxique de l'uranium est dû essentiellement à ses propriétés chimiotoxiques. La dose létale 50 (DL50) par voie orale est de 204 mg/kg chez le rat et de 242 mg/kg chez la souris (tableau 3). C'est la toxicité rénale (néphrite tubulaire aiguë) qui entraîne la mort de l'animal [34]. Chez l'homme, la DL50 pour une prise orale d'uranium soluble dépasse plusieurs grammes d'uranium par kg [35].

A forte dose, l'uranium est capable d'induire des néphropathies sévères affectant surtout les tubules proximaux,

Tableau 3. Synthèse des effets toxiques de l'uranium.

		Doses	Effets toxiques	Références
Reins	Données animales	120 à 240 µg d'U/kg de poids corporel (injections intrapéritonéales multiples)	Atteintes tubulaires	Diamond <i>et al.</i> 1989
		2 mg d'U/kg de poids corporel (injection intraveineuse)	Atteintes glomérulaires	Kobayashi <i>et al.</i> 1984
		10 mg d'U/kg de poids corporel (injection sous-cutanée)	Atteintes tubulaires et glomérulaires	Domingo <i>et al.</i> 1987
		10 mg d'U/kg de poids corporel (injection sous-cutanée)	Atteintes tubulaires et glomérulaires	Haley <i>et al.</i> 1982
		204 mg/kg de poids corporel (administration intragastrique)	Modifications du métabolisme de la vitamine D	Tissandière <i>et al.</i> 2006
Os	Données <i>in vitro</i>	25 mg d'U/kg de poids corporel (injection intraveineuse)	Atteintes tubulaires et glomérulaires	Blantz 1975
		Traitement de cellules ostéoblastiques humaines avec 10 à 250 µM d'U	Transformation en cellules cancéreuses	Miller <i>et al.</i> 1998
	Données animales	2 mg d'U/kg de poids corporel (injection intrapéritonéale)	Inhibition formation osseuse	Gluglielmotti <i>et al.</i> 1985
		0,2 à 2 mg d'U/kg de poids corporel (injection intramusculaire)	Inhibition formation osseuse et augmentation résorption osseuse	Fukuda <i>et al.</i> 2006
Système nerveux central	Données animales	0,8 et 2 mg d'U/kg de poids corporel (injection intrapéritonéale)	Inhibition formation osseuse et augmentation résorption osseuse	Ubios <i>et al.</i> 1991
		10 ou 210 mg d'U/kg de poids corporel (administration orale ou sous-cutanée)	Signes cliniques de neurotoxicité	Domingo <i>et al.</i> 1987
		144 µg d'U/kg de poids corporel (injection intrapéritonéale)	Abaissement de la quantité de sommeil paradoxal	Lestaevél <i>et al.</i> 2005b
Reproduction	Données animales	Implants sous-cutanés contenant 99,25% d'U	Modifications de l'électrophysiologie de l'hippocampe	Pellmar <i>et al.</i> 1999b
		5 à 50 mg d'U/kg de poids corporel/jour pendant la période de gestation (administration orale)	Toxicité maternelle et fœtale	Domingo <i>et al.</i> 1989
		10 à 80 mg d'U/kg de poids corporel/jour pendant 64 jours (administration orale)	Altération du tissu interstitiel dans les testicules et vacuolisation des cellules de Leydig	LLobet <i>et al.</i> 1991
Foie	Données animales	5 à 25 mg d'U/kg de poids corporel/jour pendant 14 à 60 jours (administration orale)	Perturbation croissance et développement et augmentation létalité embryonnaire	Paternain <i>et al.</i> 1989
		10 ou 210 mg d'U/kg de poids corporel (administration orale ou sous-cutanée)	Modifications histologiques	Domingo <i>et al.</i> 1987
		Inhalation de poussières d'U à 19±8 mg U/m ³ (6 h par jour, 5 jours par semaine pendant 1 à 11 mois)	Nécroses focales	Cross <i>et al.</i> 1981
		11,5 mg d'U/kg de poids corporel (injection sous-cutanée)	Atteinte fonction hépatique	Gueguen <i>et al.</i> 2006b
Système gastro-intestinal	Données animales	0,1 à 2 mg d'U/kg de poids corporel (administration intratrachéale)	Atteinte fonction hépatique	Pasanen <i>et al.</i> 1995
		204 mg d'U/kg de poids corporel (administration intragastrique)	Perturbation du système immunitaire intestinal	Dublineau <i>et al.</i> 2006

mais également les structures glomérulaires [28, 36, 37]. Des études histologiques et morphologiques révèlent une altération de l'architecture de l'épithélium glomérulaire [37] et une nécrose cellulaire au niveau de l'épithélium tubulaire proximal [36]. Malgré cette nécrose rénale, l'épithélium tubulaire est capable de se régénérer. Après injection répétée de fluorure d'uranyle UO_2F_2 (à une dose de 0,66 ou 1,32 mg U/kg de poids corporel), une étude histologique chez le rat révèle une nécrose massive des tubules proximaux (au niveau des segments terminaux) suivie d'une régénération de l'épithélium après l'arrêt du traitement [36]. Cependant, les cellules lésées sont apparemment remplacées par des nouvelles cellules structurellement différentes et dépourvues de certaines capacités fonctionnelles [22]. Une étude réalisée *in vitro* montre qu'à forte concentration, l'uranium peut déclencher l'apoptose par activation des caspases 3 et 9 (protéases à cystéine) activées par des signaux intrinsèques *via* la mitochondrie [38].

Une exposition aiguë à l'uranium se caractérise également par des anomalies fonctionnelles telles que la polyurie, l'enzymurie, la protéinurie et l'élévation sanguine de la créatinine et de l'urée [34, 36, 39, 40]. La sévérité et la réversibilité des lésions dépendent de la concentration d'uranium dans les reins et du temps d'exposition. En 1959, la Commission internationale de protection radiologique a recommandé une concentration maximale admissible en uranium de 3 $\mu\text{g/g}$ de rein. Cependant, cette valeur seuil est aujourd'hui très discutée. En effet, des nécroses cellulaires des tubules proximaux accompagnées d'une protéinurie et d'une enzymurie sont observées chez des animaux contenant des concentrations d'uranium dans les reins bien inférieures à la dose recommandée (0,7 à 1,4 $\mu\text{g U/g}$ de poids de rein) [36]. L'administration aiguë d'UA (204 mg/kg) à des rats perturbe également le métabolisme rénal de la vitamine D aboutissant à des variations de son taux plasmatique [41].

L'un des mécanismes de toxicité de l'uranium au niveau rénal pourrait être dû à l'acidité accrue du tubule proximal entraînant la dissociation du complexe d'uranium et les ions uranyles peuvent alors se combiner avec des composants de la membrane luminale [42, 43]. Dans la cellule, les ions uranyles s'accumulent principalement dans les lysosomes pour former des aiguilles de phosphate d'uranyle, mais également dans les mitochondries [30, 44].

Effets sur l'os

L'os étant le site de stockage à long terme de l'uranium, il est la cible potentielle de la radiotoxicité et de la chimio-toxicité. Des cancers osseux (ostéosarcomes) ont été observés chez les animaux exposés à l'uranium présentant des activités spécifiques élevées (^{232}U ou ^{233}U). En revan-

che, aucun cancer n'a été décrit chez l'animal après incorporation d'UN [22].

Des études réalisées *in vitro* ont montré que l'UA sous forme soluble transforme des cellules ostéoblastiques humaines (cellules cubiques situées à la surface externe et interne du tissu osseux en croissance et impliquées dans la formation osseuse) en cellules cancéreuses [45].

In vivo, l'uranium est capable d'inhiber la formation osseuse et d'augmenter la résorption osseuse. Ces effets sont attribués aux propriétés chimiotoxiques de l'uranium [46-48]. Ubios *et al.* observent chez le rat la diminution de la formation de l'os cortical couplée à une augmentation de la résorption osseuse, 14 jours après injection intrapéritonéale de nitrate d'uranyle (UNO_3) (2 mg/kg de poids corporel). Les auteurs suggèrent que l'uranium pourrait contribuer à l'ostéoporose ou à d'autres pathologies osseuses chez les individus exposés.

Effets sur le système nerveux central

Chez l'homme, la neurotoxicité de l'uranium n'a pas été clairement démontrée. Cependant, une étude révèle des troubles du comportement tels que des états de dépression ou d'agitation chez des travailleurs exposés à de fortes doses d'uranium [49].

Chez l'animal, l'administration orale ou sous-cutanée d'acétate d'uranium (10-210 mg U/kg) conduit à l'apparition de signes cliniques de neurotoxicité tels que tremblements, hypothermie, et un myosis [34]. De plus, un abaissement de la quantité de sommeil paradoxal est observé chez le rat après une injection subnéphrotoxique d'UA (144 $\mu\text{g/kg}$) [50]. A une dose néphrotoxique (576 $\mu\text{g/kg}$), l'injection d'uranium provoque au niveau du système nerveux central une oxydation lipidique et des dommages histopathologiques [51].

L'accumulation de l'uranium dans le cerveau est mise en évidence chez des rats implantés avec des fragments d'UA simulant des blessures d'éclat d'obus [52]. L'uranium est capable de traverser la barrière hématoencéphalique et se distribue de façon hétérogène dans les structures cérébrales [52-54]. Sa distribution est dépendante de la dose [52]. Ainsi l'uranium se concentre préférentiellement dans certaines structures, notamment au niveau du cervelet, du mésencéphale, de l'hippocampe et du cortex où il pourrait induire un effet toxique. Chez les rats portant des implants sous-cutanés d'UA, Pellmar *et al.* constatent des modifications de l'électrophysiologie de l'hippocampe et suggèrent que ces effets pourraient être une conséquence directe de l'accumulation d'uranium dans cette structure [55].

Effets sur la reproduction

La toxicité de l'uranium sur le développement et la reproduction a été observée principalement chez la souris

lorsque l'uranium est administré par voie orale ou par injection [56]. L'ingestion d'uranium pendant l'organogénèse induit une toxicité maternelle et fœtale. En effet, Domingo *et al.* [57] rapportent une réduction de la prise de poids, une diminution de la prise alimentaire et une augmentation du poids du foie chez les souris femelles après gavage pendant la période de gestation (quantités d'uranium comprises entre 5 et 50 mg d'acétate d'uranyle/kg/jour). Chez le fœtus, ils constatent également l'apparition de malformations (palatoschisis ou fissures congénitales du palais et malformations du sternum). Les auteurs décrivent des troubles de l'ossification voire une absence d'ossification du squelette.

Aucun effet sur la fertilité n'est mis en évidence après administration d'uranium à des doses comprises entre 5 et 25 mg/kg/jour [58]. En revanche, une diminution du nombre de nouveau-nés due à une augmentation de la mortalité *in utero*, une augmentation de la létalité des embryons ainsi qu'une perturbation de la croissance et du développement des souriceaux ont été notées pour les doses d'uranium les plus élevées. Malgré l'absence d'effet constaté sur la spermatogénèse, Llobet *et al.* [59] rapportent des altérations du tissu interstitiel dans les testicules et une vacuolisation des cellules de Leydig chez les souris mâles exposées à l'uranium *via* l'eau de boisson pendant 64 jours avant l'accouplement (quantités d'acétate d'uranyle comprises entre 10 et 80 mg d'uranium/kg/jour).

Effets sur le foie

Quelques études récentes montrent que le foie serait également le siège de la toxicité de l'uranium. Des modifications histologiques telles que l'apparition de lésions après exposition à de fortes doses d'uranium sont décrites [34]. Des nécroses focales sont observées au niveau du foie chez le hamster après une exposition aiguë et à forte dose à l'uranium [60]. Une élévation des taux plasmatiques des transaminases ALAT ou TGP (alanine amino transférase ou transaminase glutamique pyruvique) et ASAT ou TGO (aspartate amino transférase ou transaminase glutamique oxalo-acétique) traduisant une altération de la perméabilité membranaire et éventuellement une nécrose hépatique est observée après injection sous-cutanée d'uranium chez le rat [34, 61]. Des anomalies fonctionnelles telles que la diminution des triglycérides sont également décrites [61]. Au niveau moléculaire, l'inhalation de dioxyde d'uranium induit une modification de l'activité d'enzymes de type cytochromes P450 (CYPs) hépatiques impliquées dans le catabolisme de la testostérone [62]. D'autre part, dans le foie, l'activité de la CYP27A1 qui assure le métabolisme du cholestérol et de la vitamine D, ainsi que l'activité et l'expression des CYP3A impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques sont aussi perturbées chez le rat quelques jours

après l'administration d'UA [61] ce qui peut conduire à l'altération du métabolisme de certains médicaments [63, 64].

Effets sur les poumons

Lors d'une contamination par inhalation, les poumons constituent la première cible biologique potentielle pour l'uranium. Divers effets ont été décrits sur les poumons après exposition aiguë par l'uranium : réaction inflammatoire, stress oxydatif, effet génotoxique, ou modification de l'expression des cytochromes P450 [62, 65, 66]. Le développement d'une réaction inflammatoire constitue l'effet majeur induit par les particules d'uranium, que ce soit après instillation intratrachéale [62] ou inhalation [66]. L'analyse histologique a pu mettre en évidence que les cellules inflammatoires sont présentes à proximité des agrégats de particules d'uranium [62, 65]. Cette réaction inflammatoire s'accompagne de l'induction de différentes cytokines pro- (IL-8, TNF α) et anti-inflammatoires (IL-10) [66]. L'induction d'une réaction inflammatoire par l'uranium peut expliquer la diminution de l'activité enzymatique de certains cytochromes P450 à trois jours post-instillation, ces enzymes étant connues comme sensibles à l'inflammation [62]. La question se pose de la réversion ou du maintien de cette réaction inflammatoire sur le long terme. D'autre part, il est à noter qu'aucune donnée n'est disponible sur les éventuels effets à court terme d'une exposition aiguë à l'uranium sur les poumons dans le cas d'autre mode de contamination, blessure ou ingestion.

Afin de décrire au mieux les mécanismes d'action de l'uranium dans les poumons, différents auteurs ont étudié l'effet de l'uranium *in vitro* sur des cultures cellulaires de macrophages impliqués dans l'épuration pulmonaire [67-71]. L'ensemble de ces résultats permet de construire une proposition de succession d'événements pour expliquer les différents effets observés de l'uranium. La première étape est l'incorporation d'uranium par les macrophages qui se fait dans les 2 heures qui suivent l'exposition [69]. Cette incorporation conduit à l'induction de la voie transcellulaire passant par la *jun* kinase impliquée dans la régulation de l'apoptose [67, 70]. L'apparition de cellules soit en apoptose, soit en nécrose pro-apoptotique est observée dès 6 heures post-exposition [68, 69]. Enfin, l'activation de la voie JNK induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α ou IL-6 [67, 70, 71].

Par ailleurs, une étude réalisée sur une lignée de cellules épithéliales de rat a mis en évidence l'induction d'un stress oxydatif suivi par une diminution des défenses anti-oxydantes dès 30 minutes après exposition à l'uranium [72]. Cet effet oxydant de l'uranium est suivi dans les 24 heures par une diminution de la prolifération de ces cellules, qui est attribuée à une diminution des défenses antioxydantes.

Enfin, parmi les effets induits par l'uranium régulièrement cités figurent les effets génotoxiques. A notre connaissance, une seule étude a montré un effet génotoxique visualisé par un test de comet sur les macrophages alvéolaires 24 heures après inhalation aiguë, mais seulement pour la dose la plus forte [66]. Cela semble indiquer que l'uranium n'induit pas d'effet marqué en termes de génotoxicité à court terme après inhalation aiguë.

Effets sur le système digestif

Le système digestif est probablement à l'heure actuelle le système physiologique pour lequel les éventuels effets de l'uranium sont les moins bien connus, alors que ce système constitue la voie d'entrée des toxiques lors d'une exposition par ingestion. Le tractus gastro-intestinal a développé un certain nombre de mécanismes de défense immunologiques et non immunologiques afin de pouvoir répondre à l'entrée de toxiques dans l'organisme *via* la voie orale. Les éventuels effets de l'uranium sur ces deux types de défense sont très peu décrits dans la littérature, même si quelques études se sont attachées à décrire l'absorption gastro-intestinale d'uranium [18, 20, 27, 73]. Les premières études portant sur l'effet d'une exposition aiguë à forte dose d'uranium ont été réalisées en 1966 [74], puis en 1985-1986 [75, 76]. Ces études ont mis en évidence que les deux composantes principales de la paroi intestinale, à savoir l'épithélium et les muscles lisses intestinaux, étaient touchées par une contamination par l'uranium. En effet, une inhibition du transporteur de sucres dans le jéjunum de rat a été rapportée [74, 76], ainsi qu'une stimulation des contractions du muscle longitudinal d'iléon de cochon d'Inde [75]. Ces études indiquent donc que l'uranium, en tout cas à forte dose, peut avoir une action sur différents types de transporteurs présents dans l'intestin. Plus récemment, une étude a été réalisée à court terme après administration intragastrique de nitrate d'uranium afin d'évaluer la toxicité de ce radionucléide sur l'épithélium intestinal [77]. Les résultats de cette étude montrent une absence de modification dans les processus de prolifération, de différenciation et d'apoptose au niveau de l'épithélium iléal. Par ailleurs, le statut immunitaire de l'intestin a également été estimé *via* la quantification d'un certain nombre de cellules immunitaires (lymphocytes cytotoxiques, lymphocytes helper, neutrophiles) et de l'expression génique et protéique de cytokines pro- et anti-inflammatoires [77]. Une diminution du taux protéique de CCL-2, la chimiokine attractante pour les macrophages, ainsi qu'une augmentation du taux d'ARNm d'IFN γ est respectivement observée à 1 et 3 jours post-contamination. En revanche, aucune modification dans la localisation et la densité des populations cellulaires observées n'a été notée. En conclusion, cette étude montre que les propriétés de barrière et d'im-

munité mucosale de l'intestin ne sont que peu touchées à court terme par une administration orale d'uranium appauvri à forte dose, malgré le fait que le segment étudié, l'iléon, soit le site privilégié de passage de l'uranium en cas d'administration orale [24]. Cependant, les modifications induites par l'uranium sur les taux de cytokines et chimiokines de la muqueuse intestinale suggèrent qu'à long terme, et dans le cas d'une contamination chronique, des effets pourraient être observés sur le statut immunitaire de l'intestin.

In vitro, une seule étude a été effectuée [78]. Les auteurs ont comparé des cellules épithéliales de côlon à différents niveaux de différenciation, afin d'estimer la toxicité cellulaire de l'uranium sur ces cellules, ainsi que l'effet génotoxique de l'uranium. Un effet génotoxique est observé dans les cellules prénéoplastiques et hautement transformées, mais non dans les cellules normales. Il semble notamment que le gène TP53 suppresseur de tumeurs soit sensible à l'acétate d'uranium, en tout cas pour de fortes concentrations.

Toxicité à faible dose

Comparées aux connaissances acquises après exposition aiguë, peu de données sont disponibles sur les effets biologiques d'une contamination chronique à l'uranium (*tableau 4*). Pourtant ces expositions par ingestion chronique de faibles quantités *via* l'alimentation et l'eau de boisson constituent le principal mode d'exposition de la population.

Effets sur les deux principaux organes cibles d'uranium : l'os et le rein

Les données obtenues chez l'homme démontrent que même pour des apports quotidiens faibles, l'ingestion d'uranium peut altérer la fonction rénale. Ainsi, dans une étude canadienne (concentrations moyennes d'uranium dans l'eau de 0,71 $\mu\text{g/L}$, 16,6 $\mu\text{g/L}$ et 14,7 $\mu\text{g/L}$), une association statistiquement significative a été observée entre l'exposition à l'uranium (concentrations dans l'eau, durée d'exposition) et l'albumine urinaire, indicateur d'un dysfonctionnement rénal [79]. De plus, Zamora *et al.* [80] montrent dans une population de la Nouvelle-Ecosse (concentrations moyennes d'uranium dans l'eau de 2 à 781 $\mu\text{g/L}$), une corrélation positive des phosphatases alcalines et de la bêta-2-microglobuline urinaires avec l'augmentation d'incorporation d'uranium évoquant une atteinte des tubules proximaux. Enfin, une autre étude a permis d'observer des effets tubulaires (calciurie, phosphaturie et polyurie) associés à la présence d'uranium dans l'eau potable [81]. Cependant, aucun signe d'atteinte glomérulaire n'a été mis en évidence lors de ces études. Chez l'homme, des effets toxiques sur l'os ont été égale-

Tableau 4. Synthèse des effets biologiques induits après contamination chronique à l'uranium chez l'homme et l'animal.

		Doses	Effets toxiques	Références
Reins	Données animales	0,96 à 600 mg d'U/l d'eau de boisson pendant 91 jours	Atteintes tubulaires et glomérulaires	Gilman <i>et al.</i> 1998a
		40 mg d'U/l d'eau de boisson	Atteintes tubulaires	Donnadieu-Claraz <i>et al.</i> 2007
		40 mg d'U/l d'eau de boisson	Modifications du métabolisme de la vitamine D	Tissandié <i>et al.</i> 2007a; 2007b
	Données humaines	2 à 781 g d'U/l d'eau de boisson	Atteintes tubulaires	Zamora <i>et al.</i> 1998
		28 g d'U/l d'eau de boisson	Atteintes tubulaires	Kurtio <i>et al.</i> 2002
		0,71, 16,6 ou 14,7 g d'U/l d'eau de boisson	Atteintes tubulaires	Mao <i>et al.</i> 1995
Os	Données animales	0,125 mg de U/kg de poids corporel pendant 30 jours (implantation sous-cutanée)	Inhibition formation osseuse	Diaz Sylvester <i>et al.</i> 2002
	Données humaines	27 g d'U/l d'eau de boisson	Augmentation turnover osseux	Kurtio <i>et al.</i> 2005
Foie	Données animales	1 à 9 mg d'U/kg de poids corporel/jour dans eau de boisson pendant 4 semaines	Atteinte fonction hépatique	Ortega <i>et al.</i> 1989
		0,96 à 600 mg d'U/l d'eau de boisson pendant 91 jours	Lésions histologiques	Gilman <i>et al.</i> 1998b
		40 mg d'U/l d'eau de boisson	Modifications du métabolisme des xénobiotiques	Souidi <i>et al.</i> 2005 ; Gueguen <i>et al.</i> 2007
Système nerveux central	Données animales	40 mg d'U/l d'eau de boisson	Modification comportement	Houpert <i>et al.</i> 2005
		40 mg d'U/l d'eau de boisson	Augmentation sommeil paradoxal	Lestaevel <i>et al.</i> 2005
	Données humaines	Soldats exposés à U à partir de fragments d'obus	Perturbation neurotransmission	Bussy <i>et al.</i> 2006
Gonades	Données animales	40 mg d'U/l d'eau de boisson	Déficits neurocognitifs	Mc Diarmid <i>et al.</i> 2000
		0,5 à 60 g U/l d'eau de boisson	Augmentation testostérone	Grignard <i>et al.</i> 2007
			Modification de la maturation folliculaire ovarienne	Raymond-Whish <i>et al.</i> 2007

ment mis en évidence. Une étude épidémiologique réalisée en Finlande révèle une association entre le taux d'uranium dans l'eau potable et l'augmentation des phases de résorption/synthèse de l'os. En effet, les auteurs observent l'augmentation d'un marqueur de la résorption osseuse (télopeptide C-terminal du collagène de type-I, CTX) et d'un marqueur de la formation osseuse (ostéocalcine) [82].

Chez l'animal, l'ingestion d'uranium pendant 91 jours à une concentration de 0,96 mg de nitrate d'uranyle (UNO₃) par litre d'eau de boisson induit des lésions au niveau du rein, caractéristiques de la toxicité de l'uranium [83]. Ces lésions concernent les tubules contournés proximaux (vacuolisation cytoplasmique, vésicule nucléaire, dilatation tubulaire) mais aussi les glomérules. Cette étude impliquant des animaux exposés à des concentrations allant de 0,96 à 600 mg/L d'uranium indique que les modifications histopathologiques observées au niveau du rein sont dépendantes de la dose ingérée. Chez le rat, l'analyse microscopique des tubules proximaux révèle une augmentation du nombre de vésicules contenant des granules d'oxyde de fer après ingestion chronique d'UA. Le nombre de ces vésicules augmente avec la durée d'exposition à l'uranium. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que l'uranium rentrerait en compétition avec le fer,

entraînant ainsi une excrétion préférentielle de l'uranium et une surcharge en fer dans la cellule tubulaire [84]. De plus, des modifications du métabolisme rénal de la vitamine D sont observées chez le rat après ingestion chronique d'UA ou d'UE contenu dans l'eau de boisson (40 mg/L) [85, 86]. Plus particulièrement, l'exposition à l'uranium modifie l'expression du récepteur à la vitamine D, VDR (*Vitamin D Receptor*), qui intervient dans la réponse biologique de cette vitamine, ainsi que le taux circulant de vitamine D dont la régulation est essentiellement rénale.

Lors d'une exposition chronique, le tissu osseux peut contenir 66 à 75 % de la charge corporelle en uranium [19, 22]. Chez le rat, la contamination chronique par implantation sous-cutanée de poudre de dioxyde d'uranium UO₂ révèle une inhibition de la formation osseuse [87], comme il a été décrit après intoxication aiguë à l'uranium. Par ailleurs, Miller *et al.* suggèrent qu'une exposition à long terme à l'UA pourrait provoquer des cancers osseux chez l'homme [88].

Effets sur le système nerveux central

Au niveau du système nerveux central, des troubles neurologiques ont été observés chez de nombreux vétérans à la suite de la guerre du Golfe ; ces troubles sont rassem-

blés sous la terminologie « Syndrome de la guerre du Golfe ». Ils sont la conséquence de facteurs multiples parmi lesquels figure l'uranium appauvri [89].

Plusieurs études expérimentales suggèrent que le cerveau constituerait une cible privilégiée de la toxicité de l'uranium. Son accumulation cérébrale est hétérogène d'une structure cérébrale à l'autre et dose-dépendante [31, 52]. Après ingestion de 40 mg/L d'UA pendant plusieurs mois (soit 1 mg/jour/rat), des perturbations des systèmes de neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique sont observées chez le rat [90]. Dans ces conditions expérimentales (40 mg/L d'uranium), l'uranium appauvri n'induit pas d'effet sur l'anxiété ou le sommeil paradoxal chez le rat [91-93]. En revanche, l'uranium enrichi à 4,26 % en ^{235}U provoque une augmentation de la quantité de sommeil paradoxal, une baisse de la mémoire à court terme et une hausse de l'anxiété [91-93]. D'autres équipes ont démontré que l'uranium appauvri est capable d'augmenter l'activité locomotrice et de perturber la mémoire spatiale [94, 95].

Les mécanismes d'action par lesquels l'uranium exerce ces effets centraux sont totalement inconnus. Néanmoins, lors d'une étude comportementale, des auteurs ont montré chez le rat mâle une augmentation de la peroxydation lipidique dans le cerveau suggérant une atteinte des membranes cellulaires par augmentation du stress oxydant et des radicaux libres [94]. Par ailleurs, Linares *et al.* ont également démontré l'existence d'une corrélation entre la concentration en uranium dans l'hippocampe et une augmentation de l'activité enzymatique de deux enzymes anti-oxydantes, la super-oxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) dans cette région du cerveau [96]. Ces résultats expérimentaux suggèrent que le stress oxydant jouerait un rôle important dans le mécanisme d'action neurotoxique de l'uranium, mais ce n'est sans doute pas le seul.

Effets sur les organes sexuels

Chez l'homme, et plus précisément chez les vétérans de la guerre du Golfe, présentant des fragments d'uranium dans le muscle suite à des blessures, plusieurs études n'ont pas permis de mettre en évidence, quel que soit le taux d'uranium excrété, des modifications de la fonction reproductrice (pas de modifications des taux plasmatiques hormonaux (testostérone, FSH, LH), ni des paramètres spermatiques [97-99]. En revanche, une étude épidémiologique réalisée en Namibie sur des mineurs d'uranium a montré une diminution de leur taux de testostérone [100]. Afin de mimer des situations de contamination des populations *via* l'eau de boisson, des études ont été réalisées sur des rongeurs. Chez la souris femelle, des contaminations avec des doses de 0,5 µg/L à 28 mg/L (doses retrouvées dans l'eau de boisson de certaines régions des États-

Unis) montrent que l'uranium peut être considéré comme un perturbateur endocrinien. En effet, il modifie le développement et la maturation folliculaire ovarienne, accélère l'ouverture vaginale et augmente le poids de l'utérus [101]. Ces effets sont bloqués par un anti-estrogène, montrant ainsi l'implication des récepteurs aux estrogènes. Par ailleurs, une étude récente a montré qu'une contamination de rats mâles par de l'UE (40 mg/L) perturbe le métabolisme des hormones stéroïdiennes testiculaires [102]. En effet, il a été mis en évidence une augmentation du taux de testostérone plasmatique, ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes codant pour des enzymes de synthèse des hormones stéroïdiennes et pour des récepteurs nucléaires modulant l'expression de ces enzymes. Cependant, une contamination identique (40 mg/L) par de l'UA n'induit aucune modification de ces paramètres. Dans cette étude, il semblerait que le métabolisme testiculaire des hormones stéroïdiennes soit plus sensible à l'UE possédant une double toxicité (chimique et radiologique) qu'à l'UA (toxicité essentiellement chimique).

Ces différents résultats semblent indiquer que le système reproducteur est sensible à des contaminations environnementales par de l'uranium. Cependant, cette sensibilité diffère en fonction de la voie de contamination, du modèle et du sexe.

Effets sur le foie

Le foie est également une cible biologique de l'uranium après une exposition chronique. Une augmentation du taux des transaminases TGO et TGP [103], ainsi que des lésions histologiques au niveau du foie [104] sont observées chez le rat lors de contaminations chroniques par ingestion d'uranium contenu dans l'eau de boisson. Tout comme lors d'une exposition aiguë, les cytochromes P450, qui sont prépondérantes dans le foie, sont des cibles d'une exposition chronique par l'UA. Récemment, il a été montré qu'après une contamination chronique de neuf mois par de l'UA (40 mg/L), l'expression de certaines enzymes de la phase I (CYP3A) est augmentée dans le foie, alors que l'expression des enzymes de la phase II (GST, UGT) et des transporteurs de la phase III (MDR1, MRP2) du métabolisme des xénobiotiques ne varient pas [105, 106]. En conséquence, il a été émise l'hypothèse que la pharmacocinétique - donc la biodisponibilité - des médicaments pourrait être modifiée et conduire à une toxicité médicamenteuse ou une inefficacité thérapeutique lors d'un traitement médicamenteux chez des individus exposés à l'uranium. Cette hypothèse a été testée avec un traitement par le paracétamol (500 mg/kg) [105], un médicament potentiellement hépatotoxique. Dans cette étude il a été décrit que les animaux contaminés par l'UA éliminaient moins rapidement le paracétamol plasmatique. De plus, l'administration de paracétamol aux rats

contaminés par l'UA augmente les transaminases plasmatiques (TGO, TGP) plus rapidement que pour les animaux non contaminés. Dans le foie, les activités des CYPs sont également diminuées pour les animaux contaminés par rapport aux animaux témoins. Ces études confirment que le métabolisme des xénobiotiques (médicaments) est altéré lors d'une exposition chronique par l'UA.

Effets sur les poumons

Lors d'une contamination essentiellement par inhalation, les poumons constituent la première cible biologique pour l'uranium. En effet, après contamination interne les particules d'uranium insoluble s'accumulent dans les poumons et les ganglions lymphatiques [107-109]. Dans ce cas, le poumon pourrait être non seulement confronté à la toxicité chimique, mais aussi à la toxicité radiologique qui pourrait devenir non négligeable à long terme.

Après contamination interne, les particules d'uranium atteignent principalement deux cibles cellulaires au niveau pulmonaire, les macrophages et les cellules épithéliales [110]. L'interaction entre uranium et cellules épithéliales peut être directe et entraîner des dommages biologiques sur l'épithélium [110], conduisant à une altération de la fonction respiratoire. Les macrophages sont impliqués dans l'épuration des particules d'uranium et dans leur rétention dans le compartiment alvéolaire [111]. Après phagocytose de l'uranium par les macrophages, il se concentre essentiellement au niveau des lysosomes [112, 113]. Ainsi, les macrophages sont responsables de la redistribution de ce radionucléide dans le poumon et la formation de zones d'accumulation [114, 115] pouvant induire des œdèmes pulmonaires et une inflammation des bronches et des alvéoles. De plus, des études ont rapporté que des expositions chroniques de longue durée à des oxydes d'uranium induisent une prolifération cellulaire et des zones de fibrose et/ou de nécrose [107, 108, 116]. Récemment, une étude chez l'animal a mis en évidence un effet d'une contamination interne par l'uranium sur le système de détoxification des xénobiotiques au niveau pulmonaire [106]. En effet, Cette étude montre qu'une contamination chronique par ingestion d'uranium induit une modification au niveau génique de l'expression de la CYP3A2 impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques ainsi qu'un des facteurs de transcription associé CAR. Ces différentes études montrent clairement que le poumon est une cible biologique de l'uranium après contamination chronique par inhalation ou ingestion.

Chez l'homme, des études sur des 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 [117-119]. Les effets cancérigènes observés sont expliqués plutôt par l'irradiation de l'épithélium

bronchique. Des études complémentaires chez l'animal et d'autres études épidémiologiques chez l'homme sont nécessaires afin de répondre plus précisément sur l'impact d'une contamination interne chronique sur le poumon.

Effets sur l'intestin

Les études effectuées à court terme sur le système digestif ont montré que l'uranium n'avait que peu d'effets sur les propriétés intestinales, excepté à forte dose et *in vitro* [74]. Le nombre d'études portant sur les conséquences (en termes de bioaccumulation et d'effets biologiques) à plus ou moins long terme d'une contamination chronique d'uranium est relativement faible. En ce qui concerne les phénomènes de bioaccumulation dans l'intestin, une étude exhaustive, réalisée à différents temps de contamination par l'uranium sur de nombreux organes, a montré qu'une ingestion chronique d'uranium appauvri conduisait à une accumulation de ce radionucléide dans l'intestin grêle dès le premier mois d'exposition, suivie par une décroissance régulière au fur et à mesure de la contamination [31]. Une étude plus précise en termes d'accumulation a mis en évidence que l'uranium était plus particulièrement localisé au niveau des plaques de Peyer, follicules lymphoïdes insérés dans la paroi intestinale [120]. Cependant, cette accumulation ne s'accompagne pas d'effets biologiques marqués, comme l'indique l'absence de modification du taux d'ARNm des cytokines dans les plaques de Peyer et des processus apoptotique et prolifératif. Paradoxalement, divers effets sont observés au niveau de la muqueuse malgré une accumulation moindre d'uranium [121]. Un des effets observés les plus significatifs en termes d'éventuelle conséquence est la modification de la densité de certaines populations de cellules immunitaires sans modifier leur localisation. Ainsi, une augmentation du nombre de neutrophiles est observée dès trois mois de contamination, effet qui se maintient à neuf mois d'exposition. Une diminution du nombre de mastocytes et de macrophages est également observée après contamination (respectivement à 6 et 9 mois). Ces changements dans la densité cellulaire de neutrophiles (augmentation) et macrophages (diminution) pourraient conduire à la suppression de certains mécanismes de défense ou à l'inverse à l'induction d'une hypersensibilité. Il est par ailleurs intéressant de noter que cette étude met en évidence une inhibition de la voie NOergique, similaire à ce qui a été observé dans le cas d'une exposition au plomb dans différents organes [122].

Conclusion

L'uranium occupe une place unique parmi les actinides. En raison de ses caractéristiques chimiques, il se comporte comme un composé néphrotoxique, indépendamment de

ses propriétés radioactives. De plus, en fonction de son isotopie ou de son degré d'enrichissement en ^{235}U , il est considéré comme un composé radiotoxique. Nos connaissances sur la toxicité de l'uranium proviennent d'observations faites chez l'homme, mais surtout d'études sur l'animal qui montrent que l'os et le rein sont les deux principaux organes cibles de l'uranium. Néanmoins, une exposition chronique à l'uranium affecte de nombreuses fonctions physiologiques (physiologie rénale et hépatique, métabolisme osseux), ainsi que le système nerveux central et le système reproducteur. De plus, des modifications de l'homéostasie phosphocalcique et de certains métabolismes (vitamine D, hormones stéroïdiennes et médicaments) sont décrites chez l'animal après contamination à l'uranium. Ainsi, l'exposition chronique à une faible quantité d'uranium est responsable d'atteintes de systèmes biologiques qui ne sont pas forcément corrélés à l'accumulation tissulaire de ce radioélément ; la question de l'effet systémique ou direct reste donc encore sans réponse.

L'exposition à l'uranium induit ainsi chez le rat adulte des modifications subtiles mais significatives de plusieurs systèmes physiologiques. La question subséquente à l'observation de ces effets est de savoir si ces modifications sont les signes précurseurs de l'apparition d'une pathologie observable sur le plan clinique, ou si elles sont plutôt le reflet d'une adaptation de la physiologie des organes à cette exposition chronique. Les études présentées étant réalisées chez un modèle rongeur représentatif d'une population adulte et 'saine', une des manières de répondre à cette interrogation serait d'évaluer les effets de l'uranium sur d'autres populations, soit chez des individus en croissance dont l'exposition à ce radionucléide se fait de façon simultanée à la mise en place des grands systèmes physiologiques, soit chez des individus ayant des prédispositions à des pathologies particulières.

Remerciements. Les auteurs de cet article ont une pensée émue pour l'amie Françoise Pluchet, qui nous a quittés prématurément.

Références

- MacKenzie AB. Environmental radioactivity : experience from the 20th century--trends and issues for the 21st century. *Sci Total Environ* 2000 ; 249 : 313-29.
- ATSDR. *US, department of health and human services. Public health service. Toxicological profile for uranium.* Atlanta : Agency for toxic Substances and Disease Registry, 1999.
- Madic C, Genet M. Propriétés physiques et chimiques de l'uranium. In : Métivier H, ed. *L'uranium de l'environnement à l'homme.* Paris : EDP Sciences, 2001 : 43-81.
- Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. Depleted uranium--the growing concern. *J Appl Toxicol* 2002 ; 22 : 149-52.
- Bleise A, Danesi PR, Burkart W. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU) : a general overview. *J Environ Radioact* 2003 ; 64 : 93-112.
- Auvinen A, Kurttio P, Pekkanen J, Pukkala E, Ilus T, Salonen L. Uranium and other natural radionuclides in drinking water and risk of leukemia : a case-cohort study in Finland. *Cancer Causes Control* 2002 ; 13 : 825-9.
- Hakonson-Hayes AC, Fresquez PR, Whicker FW. Assessing potential risks from exposure to natural uranium in well water. *J Environ Radioact* 2002 ; 59 : 29-40.
- Moss M. Uranium in drinking water-report on clinical studies in Nova-Scotia. In : Brown SS, Savory J, eds. *Chemical toxicology and clinical chemistry of metals.* Londres : Academic Press, 1983 : 149-52.
- Juntunen R. *Etela-Suomen Kallioporakaivojen uraani-ja radon-tutkimukset (Uranium and radon in wells drilled into bedrock in southern Finland). Report of investigation 98.* Espoo : Geologian Tutkimuskeskus, 1991.
- Welford GA, Baird R. Uranium levels in human diet and biological material. *Health Phys* 1967 ; 13 : 1327.
- Hamilton EI. Uranium content of normal blood. *Nature (London)* 1970 ; 227 : 501.
- Lucas HF, Markun F. Thorium and uranium in blood, urine and cigarettes. ANL-7760, Part 2. Argonne Natl. Lab., Argonne, IL. 1970: 47-52.
- Di Lella LA, Nannoni F, Protano G, Riccobono F. Uranium contents and (235)U/(238)U atom ratios in soil and earthworms in western Kosovo after the 1999 war. *Sci Total Environ* 2005 ; 337 : 109-18.
- Shawky S. Depleted uranium : an overview of its properties and health effects. *East Mediterr Health J* 2002 ; 8 : 432-9.
- Cantaluppi C, Degetto S. Civilian and military uses of depleted uranium : environmental and health problems. *Ann Chim* 2000 ; 90 : 665-76.
- Saueia CH, Mazzilli BP. Distribution of natural radionuclides in the production and use of phosphate fertilizers in Brazil. *J Environ Radioact* 2006 ; 89 : 229-39.
- Craft E, Abu-Qare A, Flaherty M, Garofolo M, Rincavage H, Abou-Donia M. Depleted and natural uranium : chemistry and toxicological effects. *J Toxicol Environ Health B* 2004 ; 7 : 297-317.
- Leggett RW, Harrison JD. Fractional absorption of ingested uranium in humans. *Health Phys* 1995 ; 68 : 484-98.
- Leggett RW. Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium. *Health Phys* 1994 ; 67 : 589-610.
- Sullivan MF. Absorption of actinide elements from the gastrointestinal tract of neonatal animals. *Health Phys* 1980 ; 38 : 173-85.
- Sullivan MF, Ruemmler PS, Ryan JL, Buschbom RL. Influence of oxidizing or reducing agents on gastrointestinal absorption of U, Pu, Am, Cm and Pm by rats. *Health Phys* 1986 ; 50 : 223-32.
- Wrenn ME, Durbin PW, Howard B, et al. Metabolism of ingested U and Ra. *Health Phys* 1985 ; 48 : 601-33.
- Frelon S, Houpert P, Lepetit D, Paquet F. The chemical speciation of uranium in water does not influence its absorption from the gastrointestinal tract of rats. *Chem Res Toxicol* 2005 ; 18 : 1150-4.
- Dublineau I, Grison S, Baudelin C, et al. Absorption of uranium through the entire gastrointestinal tract of the rat. *Int J Radiat Biol* 2005 ; 81 : 473-82.

25. Cooper JR, Stradling GN, Smith H, Ham SE. The behaviour of uranium-233 oxide and uranyl-233 nitrate in rats. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1982 ; 41 : 421-33.
26. Pellmar TC, Hogan JB, Benson KA, Laudauer MR. *Toxicological evaluation of depleted uranium in rats : six-month evaluation point*. In : Special publication. Bethesda, MD : Armed forces Radiobiology Research Institute, 1998 : 98-101.
27. La Touche YD, Willis DL, Dawydiak OI. Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health Phys* 1987 ; 53 : 147-62.
28. Priest ND. Toxicity of depleted uranium. *Lancet* 2001 ; 357 : 244-6.
29. Priest ND, Howells GR, Green D, Haines JW. Uranium in bone : metabolic and autoradiographic studies in the rat. *Hum Toxicol* 1982 ; 1 : 97-114.
30. Galle P. Uranium. In : Galle P, ed. *Toxiques nucléaires*. Paris : Masson, 1998 : 186-205.
31. Paquet F, Houpert P, Blanchardon E, et al. Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys* 2006 ; 90 : 139-47.
32. OMS (WHO). Department of Protection of the Human Environment. Depleted uranium : sources, exposure and health effects. In : World Health Organization, ed. *Full Report. In WHO 2001 (WHO/SDE/PHE/01.1)*. Genève : WHO, 2001.
33. Leggett RW, Pellmar TC. The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J Environ Radioact* 2003 ; 64 : 205-25.
34. Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, Corbella J. Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bull Environ Contam Toxicol* 1987 ; 39 : 168-74.
35. Kathren RL, Burklin RK. Acute chemical toxicity of uranium. *Health Physics* 2008 ; 94 : 170-9.
36. Diamond GL, Morrow PE, Panner BJ, Gelein RM, Baggs RB. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam Appl Toxicol* 1989 ; 13 : 65-78.
37. Kobayashi S, Nagase M, Honda N, Hishida A. Glomerular alterations in uranyl acetate-induced acute renal failure in rabbits. *Kidney Int* 1984 ; 26 : 808-15.
38. Thiebault C, Carriere M, Milgram S, Simon A, Avoscan L, Gouget B. Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicol Sci* 2007 ; 98 : 479-87.
39. Blantz RC. The mechanism of acute renal failure after uranyl nitrate. *J Clin Invest* 1975 ; 55 : 621-35.
40. Haley DP, Bulger RE, Doby DC. The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1982 ; 41 : 181-92.
41. Tissandié E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Paquet F, Aigueperse J, Souidi M. Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Arch Toxicol* 2006 ; 80 : 473-80.
42. Dounce AL, Roberts E, Wills JM. Catalasuria as a sensitive test for uranium poisoning. In : Voegtlin C, Hodge HC, eds. *Pharmacology and toxicology of uranium compounds. Volume I*. New York : Mc Graw-Hill, 1949 : 889-950.
43. Durbin PW. Metabolic model for uranium. In : Moore RH, ed. *Biokinetics and analysis in man; United States Uranium Registry; USUR 05*. NEHF 1984 ; 47 : F1-F65.
44. Leggett RW. The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys* 1989 ; 57 : 365-83.
45. Miller AC, Blakely WF, Livengood D, et al. Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride. *Environ Health Perspect* 1998 ; 106 : 465-71.
46. Fukuda S, Ikeda M, Chiba M, Kaneko K. Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium. *Radiat Prot Dosimetry* 2006 ; 118 : 307-14.
47. Guglielmotti MB, Ubios AM, Cabrini RL. Alveolar wound healing alteration under uranyl nitrate intoxication. *J Oral Pathol* 1985 ; 14 : 565-72.
48. Ubios AM, Guglielmotti MB, Steimetz T, Cabrini RL. Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ Res* 1991 ; 54 : 17-23.
49. Howland JW. Studies on human exposure to uranium compounds. In : Voegtlin H, Hodge C, eds. *Pharmacology and toxicology of uranium*. New York : McGraw-Hill Book Company, 1949 : 993-1017.
50. Lestaevael P, Houpert P, Bussy C, Dhieux B, Gourmelon P, Paquet F. The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 2005 ; 212 : 219-26.
51. Ghosh S, Kumar A, Pandley BN, Mishra KP. Acute exposure of uranyl nitrate causes lipid peroxidation and histopathological damage in brain and bone of wistar rat. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2007 ; 26 : 255-61.
52. Pellmar TC, Fuciarelli AF, Ejniak JW, et al. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci* 1999 ; 49 : 29-39.
53. Barber DS, Ehrich MF, Jortner BS. 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* 2005 ; 68 : 99-111.
54. Lemercier V, Millot X, Ansoborlo E, et al. Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiat Prot Dosimetry* 2003 ; 105 : 243-5.
55. Pellmar TC, Keyser DO, Emery C, Hogan JB. Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments. *Neurotoxicology* 1999 ; 20 : 785-92.
56. Domingo JL. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium : a review. *Reprod Toxicol* 2001 ; 15 : 603-9.
57. Domingo JL, Paternain JL, Llobet JM, Corbella J. The developmental toxicity of uranium in mice. *Toxicology* 1989 ; 55 : 143-52.
58. Paternain JL, Domingo JL, Ortega A, Llobet JM. The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicol Environ Saf* 1989 ; 17 : 291-6.
59. Llobet JM, Sirvent JJ, Ortega A, Domingo JL. Influence of chronic exposure to uranium on male reproduction in mice. *Fundam Appl Toxicol* 1991 ; 16 : 821-9.
60. Cross FT, Palmer RF, Busch RH, Filipy RE, Stuart BO. Development of lesions in Syrian golden hamsters following exposure to radon daughters and uranium ore dust. *Health Phys* 1981 ; 41 : 135-53.
61. Gueguen Y, Souidi M, Baudelin C, et al. Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch Toxicol* 2006 ; 80 : 187-95.
62. Pasanen M, Lang S, Kojo A, Kosma VM. Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environ Res* 1995 ; 70 : 126-33.
63. Chung W, Kim EJ, Lee I, Kim SG, Lee MG, Kim SH. Effects of recombinant human growth hormone on the pharmacokinetics of intravenous chlorzoxazone in rats with acute renal failure induced by uranyl nitrate. *Life Sci* 2003 ; 73 : 253-63.

64. Moon YJ, Lee AK, Chung HC, *et al.* Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats. *Drug Metab Dispos* 2003 ; 31 : 776-84.
65. Lang S, Kosma VM, Kumlin T, *et al.* Distribution and short-term effects of intratracheally instilled neutron-irradiated UO₂ particles in the rat. *Environ Res* 1994 ; 65 : 119-31.
66. Monleau M, De Méo M, Paquet F, Chazel V, Duménil G, Donnadieu-Claraz M. Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicol Sci* 2006 ; 89 : 287-95.
67. Gazin V, Kerdine S, Grillon G, Pallardy M, Raoul H. Uranium induces TNF alpha secretion and MAPK activation in a rat alveolar macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004 ; 194 : 49-59.
68. Lizon C, Fritsch P. Chemical toxicity of some actinides and lanthanides towards alveolar macrophages : an in vitro study. *Int J Radiat Biol* 1999 ; 75 : 1459-71.
69. Kalinich JF, Ramakrishnan N, Villa V, McClain DE. Depleted uranium-uranyl chloride induces apoptosis in mouse J774 macrophages. *Toxicology* 2002 ; 179 : 105-14.
70. Wan B, Fleming JT, Schultz TW, Sayler GS. In vitro immune toxicity of depleted uranium : effects on murine macrophages, CD4⁺ T cells, and gene expression profiles. *Environ Health Perspect* 2006 ; 114 : 85-91.
71. Zhou J, Zhou L, Yang J. Studies on effects of cytokine released from alveolar macrophage induced by mineral dust on lung fibroblast. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 1998 ; 32 : 336-9.
72. Periyakaruppan A, Kumar F, Sarkar S, Sharma CS, Ramesh GT. Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells. *Arch Toxicol* 2007 ; 81 : 389-95.
73. Tracy BL, Quinn JM, Lahey J, *et al.* Absorption and retention of uranium from drinking water by rats and rabbits. *Health Phys* 1992 ; 62 : 65-73.
74. Newey H, Sanford PA, Smyth DH. The effect of uranyl nitrate on intestinal transfer of hexoses. *J Physiol* 1966 ; 186 : 493-502.
75. Fu WM, Lin-Shiau SY. Mechanism of rhythmic contractions induced by uranyl ion in the ileal longitudinal muscle of guinea-pig. *Eur J Pharmacol* 1985 ; 113 : 199-204.
76. Rodriguez-Yoldi MJ, Ponz F. Uranyl action on sugar transport across rat jejunum. *Rev Esp Fisiol* 1986 ; 42 : 359-64.
77. Dublineau I, Grison S, Linard C, *et al.* Short-term effects of depleted uranium on immune status in rat intestine. *J Toxicol Environ Health A* 2006 ; 69 : 1613-28.
78. Knobel Y, Gleit M, Weise A, *et al.* Uranyl nitrate, a stabilized salt of uranium, is genotoxic in nontransformed human colon adenoma cell line LT97. *Toxicol Sci* 2006 ; 93 : 286-97.
79. Mao Y, Desmeules M, Schaubel D, *et al.* Inorganic components of drinking water and microalbuminuria. *Environ Res* 1995 ; 71 : 135-40.
80. Zamora ML, Tracy BL, Zielinski JM, Meyerhof DP, Moss MA. Chronic ingestion of uranium in drinking water : a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol Sci* 1998 ; 43 : 68-77.
81. Kurttio P, Auvinen A, Salonen L, *et al.* Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 2002 ; 110 : 337-42.
82. Kurttio P, Komulainen H, Leino A, Salonen L, Auvinen A, Saha H. Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 2005 ; 113 : 68-72.
83. Gilman AP, Villeneuve DC, Secours VE, *et al.* Uranyl nitrate : 91-day toxicity studies in the New Zealand white rabbit. *Toxicol Sci* 1998 ; 41 : 129-37.
84. Donnadieu-Claraz M, Bonnehogne M, Dhieux B, *et al.* Chronic exposure to uranium leads to iron accumulation in rat kidney cells. *Radiat Res* 2007 ; 167 : 454-64.
85. Tissandié E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, *et al.* In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D(3) metabolism in rat. *Biochim Biophys Acta* 2007 ; 1770 : 266-72.
86. Tissandié E, Gueguen Y, Lobaccaro JMA, *et al.* Enriched uranium affects the expression of vitamin D receptor and retinoid X receptor in rat kidney. *J Ster Biochem Mol Biol* 2008 ; 110 : 263-8.
87. Diaz Sylvester PL, Lopez R, Ubios AM, Cabrini RL. Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation. *Arch Environ Health* 2002 ; 57 : 320-5.
88. Miller AC, Xu J, Stewart M, Prasanna PG, Page N. 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. *Mil Med* 2002 ; 167 : 54-6.
89. McDiarmid MA, Keogh JP, Hooper FJ, *et al.* Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans. *Environ Res* 2000 ; 82 : 168-80.
90. Bussy C, Lestaevél P, Dhieux B, *et al.* Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *Neurotoxicology* 2006 ; 27 : 245-52.
91. Houpert P, Lestaevél P, Bussy C, Paquet F, Gourmelon P. Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat. *Neurotoxicology* 2005 ; 26 : 1015-20.
92. Lestaevél P, Bussy C, Paquet F, *et al.* Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicol Teratol* 2005 ; 27 : 835-40.
93. Houpert P, Bizot JC, Bussy C, *et al.* Comparison of the effects of enriched uranium and 137-cesium on the behaviour of rats after chronic exposure. *Int J Radiat Biol* 2007 ; 83 : 99-104.
94. Briner W, Murray J. Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats. *Neurotoxicol Teratol* 2005 ; 27 : 135-44.
95. Bellés M, Albina ML, Linares V, Gomez M, Sanchez DJ, Domingo JL. Combined action of uranium and stress in rat. I. Behavioral effects. *Toxicol Lett* 2005 ; 158 : 176-85.
96. Linares V, Sanchez DJ, Belles M, Albina L, Gomez M, Domingo JL. Pro-oxidant effects in the brain of rats concurrently exposed to uranium and stress. *Toxicology* 2007 ; 236 : 82-91.
97. McDiarmid MA, Engelhardt SM, Oliver M, *et al.* Health surveillance of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium : updating the cohort. *Health Phys* 2007 ; 93 : 60-73.
98. McDiarmid MA, Engelhardt SM, Oliver M, *et al.* Biological monitoring and surveillance results of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium. *Int Arch Occup Environ Health* 2006 ; 79 : 11-21.
99. Squibb KS, McDiarmid MA. Depleted uranium exposure and health effects in Gulf War veterans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006 ; 361 : 639-48.
100. Zaire R, Notter M, Riedel W, Thiel E. Unexpected rates of chromosomal instabilities and alterations of hormone levels in Namibian uranium miners. *Radiat Res* 1997 ; 147 : 579-84.
101. Raymond-Whish S, Mayer LP, O'Neal T, *et al.* Drinking water with uranium below the U.S. EPA water standard causes estrogen receptor-dependent responses in female mice. *Environ Health Perspect* 2007 ; 115 : 1711-6.
102. Grignard E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Voisin P, Gourmelon P, Souidi M. Effets de contaminations chroniques par ingestion de césium

137 ou d'uranium sur la stéroïdogénèse testiculaire chez le rat. 6^e Congrès National de Radioprotection, Reims, France, du 19 au 21 Juin 2007.

103. Ortega A, Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, Paternain JL. Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 1989 ; 42 : 935-41.

104. Gilman AP, Villeneuve DC, Secours VE, *et al.* Uranyl nitrate : 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci* 1998 ; 41 : 117-28.

105. Gueguen Y, Grandcolas L, Baudelin C, *et al.* Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium. *Toxicology* 2007 ; 229 : 62-72.

106. Souidi M, Gueguen Y, Linard C, *et al.* In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* 2005 ; 214 : 113-22.

107. Leach LJ, Maynard EA, Hodge HC, *et al.* A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO₂) dust. I. Retention and biologic effect in the monkey, dog and rat. *Health Phys* 1970 ; 18 : 599-612.

108. Leach LJ, Yuile CL, Hodge HC, Sylvester GE, Wilson HB. A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO₂) dust. II. Post-exposure Retention and biologic effect in the monkey, dog and rat. *Health Phys* 1973 ; 25 : 239-58.

109. Morrow PE, Gibb FR, Leach LJ. The clearance of uranium dioxide dust from the lungs following single and multiple inhalation exposures. *Health Phys* 1966 ; 12 : 1217-23.

110. Schins RP, Borm PJ. Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity. *Ann Occup Hyg* 1999 ; 43 : 7-33.

111. Tasat DR, De Rey BM. Cytotoxic effect of uranium dioxide on rat alveolar macrophages. *Environ Res* 1987 ; 44 : 71-81.

112. Berry JP, Zhang L, Galle P, Ansoborlo E, Henge-Napoli MH, Donnadiou-Claraz M. Role of alveolar macrophage lysosomes in metal detoxification. *Microsc Res Tech* 1997 ; 36 : 313-23.

113. Morris KJ, Townsend KM, Batchelor AL. Studies of alveolar cell morphometry and mass clearance in the rat lung following inhalation of an enriched uranium dioxide aerosol. *Radiat Environ Biophys* 1989 ; 28 : 141-54.

114. Batchelor AL, Jenner TJ, Papworth DG. Influence of macrophages on microdistribution of inhaled UO₂ aerosol in rat lung. *Phys Med Biol* 1982 ; 37 : 249-66.

115. Morris KJ, Barker CL, Batchelor AL, Khanna P. Dosimetric implication of pulmonary macrophage clusters observed within lungs of rats that have inhaled enriched UO₂ particles. *Environ Health Perspect* 1992 ; 97 : 201-8.

116. Mitchel RE, Jackson JS, Heinmiller B. Inhaled uranium ore dust and lung cancer risk in rat. *Health Phys* 1999 ; 76 : 145-551.

117. Archer VE, Renzetti AD, Doggett RS, Jarvis JQ, Colby TV. Chronic diffuse interstitial fibrosis of the lung in uranium miners. *J Occup Environ Med* 1998 ; 40 : 460-74.

118. Baysson H, Tirmarche M, Tymen G, *et al.* Indoor radon and lung cancer in France. *Epidemiology* 2004 ; 15 : 709-16.

119. Vacquier B, Caer S, Rogel A, *et al.* Mortality risk in the French cohort of uranium miners : extended follow-up 1946-1999. *Occup Environ Med* 2008 (sous presse).

120. Dublineau I, Grison S, Grandcolas L, *et al.* Absorption, accumulation and biological effects of depleted uranium in Peyer's patches of rats. *Toxicology* 2006 ; 227 : 227-69.

121. Dublineau I, Grandcolas L, Grison S, *et al.* Modifications of inflammatory pathways in rat intestine following chronic ingestion of depleted uranium. *Toxicol Sci* 2007 ; 98 : 458-68.

122. Carmignani M, Volpe AR, Boscolo P, *et al.* Catecholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sci* 2000 ; 68 : 401-15.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abou-Donia MB, Goldstein LB, Jones KH, Abdel-Rahman AA, Damodaran TV, Dechkovskaia AM, Bullman SL, Amir BE and Khan WA, 2001. Locomotor and sensorimotor performance deficit in rats following exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin, alone and in combination. *Toxicol Sci.* 60, 305-14.
- Al-Badrany YM and Mohammad FK, 2007. Effects of acute and repeated oral exposure to the organophosphate insecticide chlorpyrifos on open-field activity in chicks. *Toxicol Lett.* 174, 110-6.
- Albina ML, Belles M, Linares V, Sanchez DJ and Domingo JL, 2005. Restraint stress does not enhance the uranium-induced developmental and behavioral effects in the offspring of uranium-exposed male rats. *Toxicology.* 215, 69-79.
- Anderson R and Higgins GA, 1997. Absence of central cholinergic deficits in ApoE knockout mice. *Psychopharmacology (Berl).* 132, 135-44.
- Andrews JS, Jansen JH, Linders S and Princen A, 1994. Effects of disrupting the cholinergic system on short-term spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 115, 485-94.
- Anthony ML, Gartland KP, Beddell CR, Lindon JC and Nicholson JK, 1994. Studies of the biochemical toxicology of uranyl nitrate in the rat. *Arch Toxicol.* 68, 43-53.
- Araujo DM, Lapchak PA, Meaney MJ, Collier B and Quirion R, 1990. Effects of aging on nicotinic and muscarinic autoreceptor function in the rat brain: relationship to presynaptic cholinergic markers and binding sites. *J Neurosci.* 10, 3069-78.
- Araujo DM, Lapchak PA, Robitaille Y, Gauthier S and Quirion R, 1988. Differential alteration of various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of human brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 50, 1914-23.
- Arendt T, Henning D, Gray JA and Marchbanks R, 1988. Loss of neurons in the rat basal forebrain cholinergic projection system after prolonged intake of ethanol. *Brain Res Bull.* 21, 563-9.
- Arfsten DP, Wilfong ER, Bekkedal MY, Johnson EW, McInturf SM, Eggers JS, Schaeffer DJ and Still KR, 2007. Evaluation of the effect of implanted depleted uranium (DU) on adult rat behavior and toxicological endpoints. *J Toxicol Environ Health A.* 70, 1995-2010.
- Arruda-Neto JD, Guevara MV, Nogueira GP, Saiki M, Cestari AC, Shtejer K, Deppman A, Pereira Filho JW, Garcia F, Geraldo LP, Gouveia AN, Guzman F, Mesa J, Rodriguez O, Semmler R and Vanin VR, 2004. Long-term accumulation of uranium in bones of Wistar rats as a function of intake dosages. *Radiat Prot Dosimetry.* 112, 385-93.
- ATSDR (1999). Toxicological profile. Atlanta, US, department of health and human services. Public health services. Agency for toxic Substances and Diseases Registry, Toxicological profile for uranium
- Atwood T, Payne VS, Zhao W, Brown WR, Wheeler KT, Zhu JM and Robbins ME, 2007. Quantitative magnetic resonance spectroscopy reveals a potential relationship between radiation-induced changes in rat brain metabolites and cognitive impairment. *Radiat Res.* 168, 574-81.
- Atzori M, Kanold P, Pineda JC and Flores-Hernandez J, 2003. Dopamine-acetylcholine interactions in the modulation of glutamate release. *Ann N Y Acad Sci.* 1003, 346-8.
- Avale ME, Faure P, Pons S, Robledo P, Deltheil T, David DJ, Gardier AM, Maldonado R, Granon S, Changeux JP and Maskos U, 2008. Interplay of beta2* nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 15991-6.
- Awad el Karim MA, Hamed AS, Elhaimi YA and Osman Y, 1986. Effects of exposure to lead among lead-acid battery factory workers in Sudan. *Arch Environ Health.* 41, 261-5.
- Bachman ES, Berger-Sweeney J, Coyle JT and Hohmann CF, 1994. Developmental regulation of adult cortical morphology and behavior: an animal model for mental retardation. *Int J Dev Neurosci.* 12, 239-53.

- Banerjee C, Nyengaard JR, Wevers A, de Vos RA, Jansen Steur EN, Lindstrom J, Pilz K, Nowacki S, Bloch W and Schroder H, 2000. Cellular expression of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor protein in the temporal cortex in Alzheimer's and Parkinson's disease--a stereological approach. *Neurobiol Dis.* 7, 666-72.
- Barber DS, Ehrich MF and Jortner BS, 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.
- Barber DS, Hancock SK, McNally AM, Hinckley J, Binder E, Zimmerman K, Ehrich MF and Jortner BS, 2007. Neurological effects of acute uranium exposure with and without stress. *Neurotoxicology.*
- Bear MF and Singer W, 1986. Modulation of visual cortical plasticity by acetylcholine and noradrenaline. *Nature.* 320, 172-6.
- Beeson D (2008). Acetylcholine receptors and the congenital myasthenic syndromes. *Nicotinic Acetylcholine Receptors 2008*, Hinxton, UK.
- Benson K (1997). Evaluation of the health risks of embedded depleted uranium (DU) shrapnel on pregnancy and offspring development.
- Beracochea D, Durkin TP and Jaffard R, 1986. On the involvement of the central cholinergic system in memory deficits induced by long term ethanol consumption in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 24, 519-24.
- Berlin M and Rudell B (1979). Uranium, Friberg L. eds. *Handbook on the toxicology of metals*,
- Berr C, Lambert JC, Sazdovitch V, Amouyel P, Chartier-Harlin MC, Mohr M, Heldt N, Kiesmann M and Hauw JJ, 2001. Neuropathological epidemiology of cerebral aging: a study of two genetic polymorphisms. *Neurobiol Aging.* 22, 227-35.
- Berridge MV and Tan AS, 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* 303, 474-82.
- Bielarczyk H, Tian X and Suszkiw JB, 1996. Cholinergic denervation-like changes in rat hippocampus following developmental lead exposure. *Brain Res.* 708, 108-15.
- Bjelland I, Tell GS, Vollset SE, Konstantinova S and Ueland PM, 2009. Choline in anxiety and depression: the Hordaland Health Study. *Am J Clin Nutr.*
- Bleise A, Danesi PR and Burkart W, 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J Environ Radioact.* 64, 93-112.
- Blokland A, 1995. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res Brain Res Rev.* 21, 285-300.
- Boice JD, Jr., Bigbee WL, Mumma MT and Blot WJ, 2003. Cancer incidence in municipalities near two former nuclear materials processing facilities in Pennsylvania. *Health Phys.* 85, 678-90.
- Boice JD, Jr., Bigbee WL, Mumma MT, Heath CW, Jr. and Blot WJ, 2009. Cancer incidence in municipalities near two former nuclear materials processing facilities in Pennsylvania--an update. *Health Phys.* 96, 118-27.
- Boice JD, Jr., Cohen SS, Mumma MT, Chadda B and Blot WJ, 2007. Mortality among residents of Uravan, Colorado who lived near a uranium mill, 1936-84. *J Radiol Prot.* 27, 299-319.
- Bonfante-Cabarcas R, Bravo I, Nello C, Gutierrez-Reyes E, Loureiro Dos Santos NE and Moreno-Yanes JA, 2002. Pharmacological doses of Zn²⁺ induce a muscarinic cholinergic supersensitivity. *J Biomed Sci.* 9, 639-44.

- Bosboom JL, Stoffers D and Wolters E, 2003. The role of acetylcholine and dopamine in dementia and psychosis in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 185-95.
- Bosque MA, Domingo JL, Llobet JM and Corbella J, 1993. Embryotoxicity and teratogenicity of uranium in mice following subcutaneous administration of uranyl acetate. *Biol Trace Elem Res.* 36, 109-18.
- Bourjeily N and Suszkiw JB, 1997. Developmental cholinotoxicity of lead: loss of septal cholinergic neurons and long-term changes in cholinergic innervation of the hippocampus in perinatally lead-exposed rats. *Brain Res.* 771, 319-28.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.
- Briner W and 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.
- Brioni JD, O'Neill AB, Kim DJ and Decker MW, 1993. Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. *Eur J Pharmacol.* 238, 1-8.
- Bronfman FC, Tesseur I, Hofker MH, Havekens LM and Van Leuven F, 2000. No evidence for cholinergic problems in apolipoprotein E knockout and apolipoprotein E4 transgenic mice. *Neuroscience.* 97, 411-8.
- Burghaus L, Schutz U, Krempel U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Wevers A, Lindstrom J and Schroder H, 2000. Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. *Brain Res Mol Brain Res.* 76, 385-8.
- Burghaus L, Schutz U, Krempel U, Lindstrom J and Schroder H, 2003. Loss of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha4 and alpha7 in the cerebral cortex of Parkinson patients. *Parkinsonism Relat Disord.* 9, 243-6.
- Bussy C (2005). Effets chimiques et radiologiques d'une ingestion chronique d'uranium sur le cerveau du rat. Effets sur les neurotransmissions dopaminergiques, sérotoninergiques et cholinergique. Toxicologie. Paris, Université Paris 7 - Denis Diderot: 204.
- Bussy C, Lestaevél P, Dhieux B, Amourette C, Paquet F, Gourmelon P and Houpert P, 2006. Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *Neurotoxicology.* 27, 245-52.
- Buttini M, Yu GQ, Shockley K, Huang Y, Jones B, Masliah E, Mallory M, Yeo T, Longo FM and Mucke L, 2002. Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation. *J Neurosci.* 22, 10539-48.
- Calabresi P, Picconi B, Parnetti L and Di Filippo M, 2006. A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance. *Lancet Neurol.* 5, 974-83.
- Cantaluppi C and Degetto S, 2000. Civilian and military uses of depleted uranium: environmental and health problems. *Ann Chim.* 90, 665-76.
- Cao W, Burkholder T, Wilkins L and Collins AC, 1993. A genetic comparison of behavioral actions of ethanol and nicotine in the mirrored chamber. *Pharmacol Biochem Behav.* 45, 803-9.
- Carafoli E, Tiozzo R, Pasquali-Ronchetti I and Laschi R, 1971. A study of Ca²⁺ metabolism in kidney mitochondria during acute uranium intoxication. *Lab Invest.* 25, 516-27.
- Castoldi AF, Candura SM, Costa P, Manzo L and Costa LG, 1996. Interaction of mercury compounds with muscarinic receptor subtypes in the rat brain. *Neurotoxicology.* 17, 735-41.
- Castoldi AF, Coccini T, Ceccatelli S and Manzo L, 2001. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res Bull.* 55, 197-203.

- Cha JH, Frey AS, Alsdorf SA, Kerner JA, Kosinski CM, Mangiarini L, Penney JB, Jr., Davies SW, Bates GP and Young AB, 1999. Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354, 981-9.
- Chang Q and Gold PE, 2003. Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. *J Neurosci.* 23, 3001-5.
- Chao KF and Lin-Shiau SY, 1995. Enhancement of a slow potassium current component by uranyl nitrate and its relation to the antagonism on beta-bungarotoxin in the mouse motor nerve terminal. *Neuropharmacology.* 34, 165-73.
- Chapman S and Michaelson DM, 1998. Specific neurochemical derangements of brain projecting neurons in apolipoprotein E-deficient mice. *J Neurochem.* 70, 708-14.
- Checkoway H, Pearce N, Crawford-Brown DJ and Cragle DL, 1988. Radiation doses and cause-specific mortality among workers at a nuclear materials fabrication plant. *Am J Epidemiol.* 127, 255-66.
- Cheeta S, Irvine E and File SE, 2001. Social isolation modifies nicotine's effects in animal tests of anxiety. *Br J Pharmacol.* 132, 1389-95.
- Chez MG, Aimonovitch M, Buchanan T, Mrazek S and Tremb RJ, 2004. Treating autistic spectrum disorders in children: utility of the cholinesterase inhibitor rivastigmine tartrate. *J Child Neurol.* 19, 165-9.
- Clementi F, Cabrini D, Gotti C and Sher E, 1986. Pharmacological characterization of cholinergic receptors in a human neuroblastoma cell line. *J Neurochem.* 47, 291-7.
- Colloby SJ, Pakrasi S, Firbank MJ, Perry EK, Piggott MA, Owens J, Wyper DJ, McKeith IG, Burn DJ, Williams ED and O'Brien JT, 2006. In vivo SPECT imaging of muscarinic acetylcholine receptors using (R,R) 123I-QNB in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. *Neuroimage.* 33, 423-9.
- Conn PJ, Jones CK and Lindsley CW, 2009. Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 30, 148-55.
- Cooper JR, Stradling GN, Smith H and Ham SE, 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.
- Costa LG and Fox DA, 1983. A selective decrease of cholinergic muscarinic receptors in the visual cortex of adult rats following developmental lead exposure. *Brain Res.* 276, 259-66.
- Costa LG and Guizzetti M, 1999. Muscarinic cholinergic receptor signal transduction as a potential target for the developmental neurotoxicity of ethanol. *Biochem Pharmacol.* 57, 721-6.
- 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.
- Cressant A, Besson M, Suarez S, Cormier A and Granon S, 2007. Spatial learning in Long-Evans Hooded rats and C57BL/6J mice: different strategies for different performance. *Behav Brain Res.* 177, 22-9.
- Dalley JW, McGaughy J, O'Connell MT, Cardinal RN, Levita L and Robbins TW, 2001. Distinct changes in cortical acetylcholine and noradrenaline efflux during contingent and noncontingent performance of a visual attentional task. *J Neurosci.* 21, 4908-14.
- Day J, Damsma G and Fibiger HC, 1991. Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav.* 38, 723-9.
- de Castro BM, Pereira GS, Magalhaes V, Rossato JI, De Jaeger X, Martins-Silva C, Leles B, Lima P, Gomez MV, Gainetdinov RR, Caron MG, Izquierdo I, Cammarota M, Prado VF and Prado MA, 2009. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter causes learning deficits in mice. *Genes Brain Behav.* 8, 23-35.

- Devlin RB, Ghio AJ, Kehrl H, Sanders G and Cascio W, 2003. Elderly humans exposed to concentrated air pollution particles have decreased heart rate variability. *Eur Respir J Suppl.* 40, 76s-80s.
- Di Lella LA, Nannoni F, Protano G and Riccobono F, 2005. Uranium contents and (235)U/(238)U atom ratios in soil and earthworms in western Kosovo after the 1999 war. *Sci Total Environ.* 337, 109-18.
- Diamond GL, Morrow PE, Panner BJ, Gelein RM and Baggs RB, 1989. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam Appl Toxicol.* 13, 65-78.
- Diaz Sylvester PL, Lopez R, Ubios AM and Cabrini RL, 2002. Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation. *Arch Environ Health.* 57, 320-5.
- Dimberg Y and Larkfors L, 1994. Effects of irradiation on cholinergic neurons and nerve growth factor mRNA in mouse foetal brain aggregation cultures. *Int J Radiat Biol.* 66, 793-800.
- Dineley KT (2008). Loss of alpha 7 nicotinic receptor triggers cholinergic and hippocampal neurodegeneration in a mouse model of Alzheimer's disease *Nicotinic Acetylcholine Receptors 2008*, Hinxton, UK.
- Diserbo M, Agin A, Lamproglou I, Mauris J, Staali F, Multon E and Amourette C, 2002. Blood-brain barrier permeability after gamma whole-body irradiation: an in vivo microdialysis study. *Can J Physiol Pharmacol.* 80, 670-8.
- Donnadieu-Claraz M, Bonnehogne M, Dhieux B, Maubert C, Cheynet M, Paquet F and Gourmelon P, 2007. Chronic exposure to uranium leads to iron accumulation in rat kidney cells. *Radiat Res.* 167, 454-64.
- Doyle P, Maconochie N, Roman E, Davies G, Smith PG and 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.
- Dublineau I, Grandcolas L, Grison S, Baudelin C, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J and Gourmelon P, 2007. Modifications of inflammatory pathways in rat intestine following chronic ingestion of depleted uranium. *Toxicol Sci.* 98, 458-68.
- Dublineau I, Grison S, Baudelin C, Dudoignon N, Souidi M, Marquette C, Paquet F, Aigueperse J and Gourmelon P, 2005. Absorption of uranium through the entire gastrointestinal tract of the rat. *Int J Radiat Biol.* 81, 473-82.
- Dunnett SB, Whishaw IQ, Jones GH and Bunch ST, 1987. Behavioural, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acids injected into nucleus basalis magnocellularis of rats. *Neuroscience.* 20, 653-69.
- Dupree EA, Cragle DL, McLain RW, Crawford-Brown DJ and Teta MJ, 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.
- Durbin PWW, M. (1976). Metabolism and effects of uranium in animals. Conference of occupational health experience with uranium.
- Dygert HP (1949). *Pharmacology and Toxicology of Uranium compounds*. New-York, McGraw-Hill Book Inc.
- Engin E and Treit D, 2007. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behav Pharmacol.* 18, 365-74.
- Fadda F, Cocco S and Stancampiano R, 2000. Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats. *Neuroreport.* 11, 2265-9.
- Ferrari R, Pedrazzi P, Algeri S, Agnati LF and Zoli M, 1999. Subunit and region-specific decreases in nicotinic acetylcholine receptor mRNA in the aged rat brain. *Neurobiol Aging.* 20, 37-46.

- Feugier A, Frelon S, Gourmelon P and Claraz M, 2008. Alteration of mouse oocyte quality after a subchronic exposure to depleted Uranium. *Reprod Toxicol.* 26, 273-7.
- Finkelstein Y, Markowitz ME and Rosen JF, 1998. Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects. *Brain Res Brain Res Rev.* 27, 168-76.
- Fisenne IM and Perry PM, 1985. Isotopic U concentration in human blood from New York City donors. *Health Phys.* 49, 1272-5.
- Fitsanakis VA, Erikson KM, Garcia SJ, Evje L, Syversen T and Aschner M, 2006. Brain accumulation of depleted uranium in rats following 3- or 6-month treatment with implanted depleted uranium pellets. *Biol Trace Elem Res.* 111, 185-97.
- Flicker C, Dean RL, Watkins DL, Fisher SK and Bartus RT, 1983. Behavioral and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to the cerebral cortex in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 18, 973-81.
- Frelon S, Houpert P, Lepetit D and Paquet F, 2005. The chemical speciation of uranium in water does not influence its absorption from the gastrointestinal tract of rats. *Chem Res Toxicol.* 18, 1150-4.
- Friedman JI, 2004. Cholinergic targets for cognitive enhancement in schizophrenia: focus on cholinesterase inhibitors and muscarinic agonists. *Psychopharmacology (Berl).* 174, 45-53.
- Fujita M, Ichise M, Zoghbi SS, Liow JS, Ghose S, Vines DC, Sangare J, Lu JQ, Cropley VL, Iida H, Kim KM, Cohen RM, Bara-Jimenez W, Ravina B and Innis RB, 2006. Widespread decrease of nicotinic acetylcholine receptors in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 59, 174-7.
- Fukuda S, Ikeda M, Chiba M and Kaneko K, 2006. Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium. *Radiat Prot Dosimetry.* 118, 307-14.
- Fuller PM, Saper CB and Lu J, 2007. The pontine REM switch: past and present. *J Physiol.* 584, 735-41.
- Fushiki S, Hyodo-Taguchi Y, Kinoshita C, Ishikawa Y and Hirobe T, 1997. Short- and long-term effects of low-dose prenatal X-irradiation in mouse cerebral cortex, with special reference to neuronal migration. *Acta Neuropathol.* 93, 443-9.
- Galle P (1998). Uranium. Paris, Masson, Toxiques nucléaires,
- Garcia-Arenas G, Ramirez-Amaya V, Balderas I, Sandoval J, Escobar ML, Rios C and Bermudez-Rattoni F, 2004. Cognitive deficits in adult rats by lead intoxication are related with regional specific inhibition of cNOS. *Behav Brain Res.* 149, 49-59.
- Gardner EB, Boitano JJ, Mancino NS and D'Amico DP, 1975. Environmental enrichment and deprivation: effects on learning, memory and exploration. *Physiol Behav.* 14, 321-7.
- 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.
- Ghosh S, Kumar A, Pandey BN and Mishra KP, 2007. Acute exposure of uranyl nitrate causes lipid peroxidation and histopathological damage in brain and bone of Wistar rat. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 26, 255-61.
- Giacobini E, Mattio T and Mussini I, 1987. Aging of cholinergic synapses in the avian iris. Part I--Biochemical studies. *Neurobiol Aging.* 8, 123-9.
- Gilman AP, Moss MA, Villeneuve DC, Secours VE, Yagminas AP, Tracy BL, Quinn JM, Long G and Valli VE, 1998a. Uranyl nitrate: 91-day exposure and recovery studies in the male New Zealand white rabbit. *Toxicol Sci.* 41, 138-51.
- Gilman AP, Villeneuve DC, Secours VE, Yagminas AP, Tracy BL, Quinn JM, Valli VE, Willes RJ and Moss MA, 1998b. Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci.* 41, 117-28.

- Giovannini MG, Bartolini L, Kopf SR and Pepeu G, 1998. Acetylcholine release from the frontal cortex during exploratory activity. *Brain Res.* 784, 218-27.
- Glowinski J and Iversen LL, 1966. Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. *J Neurochem.* 13, 655-69.
- Goasguen J, Lapresle J, Ribot C and Rocquet G, 1982. [Chronic neurological syndrome resulting from intoxication with metallic uranium (author's transl)]. *Nouv Presse Med.* 11, 119-21.
- Gordon I, Grauer E, Genis I, Sehayek E and Michaelson DM, 1995. Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci Lett.* 199, 1-4.
- Gottfries CG, 1990. Neurochemical aspects on aging and diseases with cognitive impairment. *J Neurosci Res.* 27, 541-7.
- Gotti C, Cabrini D, Sher E and Clementi F, 1987. Effects of long-term in vitro exposure to aluminum, cadmium or lead on differentiation and cholinergic receptor expression in a human neuroblastoma cell line. *Cell Biol Toxicol.* 3, 431-40.
- Gotti C, Moretti M, Bohr I, Ziabreva I, Vailati S, Longhi R, Riganti L, Gaimarri A, McKeith IG, Perry RH, Aarsland D, Larsen JP, Sher E, Beattie R, Clementi F and Court JA, 2006. Selective nicotinic acetylcholine receptor subunit deficits identified in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies by immunoprecipitation. *Neurobiol Dis.* 23, 481-9.
- Gourmelon P, Marquette C, Agay D, Mathieu J and Clarencon D, 2005. Involvement of the central nervous system in radiation-induced multi-organ dysfunction and/or failure. *BJR Suppl.* 27, 62-8.
- Granon S, Faure P and Changeux JP, 2003. Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 9596-601.
- Granseth B, Odermatt B, Royle SJ and Lagnado L, 2006. Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron.* 51, 773-86.
- Greig NH, Utsuki T, Yu Q, Zhu X, Holloway HW, Perry T, Lee B, Ingram DK and Lahiri DK, 2001. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr Med Res Opin.* 17, 159-65.
- Grignard E, Gueguen Y, Grison S, Lobaccaro JM, Gourmelon P and Souidi M, 2008. Contamination with depleted or enriched uranium differently affects steroidogenesis metabolism in rat. *Int J Toxicol.* 27, 323-8.
- Gu Q and Singer W, 1993. Effects of intracortical infusion of anticholinergic drugs on neuronal plasticity in kitten striate cortex. *Eur J Neurosci.* 5, 475-85.
- Guan ZZ, Zhang X, Ravid R and Nordberg A, 2000. Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 74, 237-43.
- Gueguen Y, Grandcolas L, Baudelin C, Grison S, Tissandie E, Jourdain JR, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P and Souidi M, 2007. Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium. *Toxicology.* 229, 62-72.
- Gueguen Y, Souidi M, Baudelin C, Dudoignon N, Grison S, Dublineau I, Marquette C, Voisin P, Gourmelon P and Aigueperse J, 2006. Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch Toxicol.* 80, 187-95.
- Ha DH, Robertson RT and Weiss JH, 1998. Distinctive morphological features of a subset of cortical neurons grown in the presence of basal forebrain neurons in vitro. *J Neurosci.* 18, 4201-15.
- Haenninen H, Hernberg S, Mantere P, Vesanto R and Jalkanen M, 1978. Psychological performance of subjects with low exposure to lead. *J Occup Med.* 20, 683-9.

- Hahn FF, Roszell LE, Daxon EG, Guilmette RA and Parkhurst MA, 2009. Radiological risk assessment of Capstone depleted uranium aerosols. *Health Phys.* 96, 352-62.
- Hamilton EI, 1971. The concentration and distribution of uranium in human skeletal tissues. *Calcif Tissue Res.* 7, 150-62.
- Hankin MH, Hoover F and Goldman D, 1993. Cues intrinsic to the retina induce nAChR gene expression during development. *J Neurobiol.* 24, 1099-110.
- Harold D, Peirce T, Moskvina V, Myers A, Jones S, Hollingworth P, Moore P, Lovestone S, Powell J, Foy C, Archer N, Walter S, Edmonson A, McIlroy S, Craig D, Passmore PA, Goate A, Hardy J, O'Donovan M, Williams J, Liddell M, Owen MJ and Jones L, 2003. Sequence variation in the CHAT locus shows no association with late-onset Alzheimer's disease. *Hum Genet.* 113, 258-67.
- Harvey VL and Dickenson AH, 2009. Behavioural and electrophysiological characterisation of experimentally induced osteoarthritis and neuropathy in C57Bl/6 mice. *Mol Pain.* 5, 18.
- Hilker R, Thomas AV, Klein JC, Weisenbach S, Kalbe E, Burghaus L, Jacobs AH, Herholz K and Heiss WD, 2005. Dementia in Parkinson disease: functional imaging of cholinergic and dopaminergic pathways. *Neurology.* 65, 1716-22.
- Hill JA, Jr., Zoli M, Bourgeois JP and Changeux JP, 1993. Immunocytochemical localization of a neuronal nicotinic receptor: the beta 2-subunit. *J Neurosci.* 13, 1551-68.
- Himmelheber AM, Sarter M and Bruno JP, 2000. Increases in cortical acetylcholine release during sustained attention performance in rats. *Brain Res Cogn Brain Res.* 9, 313-25.
- Hindin R, Brugge D and Panikkar B, 2005. Teratogenicity of depleted uranium aerosols: a review from an epidemiological perspective. *Environ Health.* 4, 17.
- Hironaka N, Tanaka K, Izaki Y, Hori K and Nomura M, 2001. Memory-related acetylcholine efflux from rat prefrontal cortex and hippocampus: a microdialysis study. *Brain Res.* 901, 143-50.
- Hodges H, Katzung N, Sowinski P, Hopewell JW, Wilkinson JH, Bywaters T and Rezvani M, 1998. Late behavioural and neuropathological effects of local brain irradiation in the rat. *Behav Brain Res.* 91, 99-114.
- Hohmann CF and Berger-Sweeney J, 1998. Cholinergic regulation of cortical development and plasticity. New twists to an old story. *Perspect Dev Neurobiol.* 5, 401-25.
- Hohmann CF, Brooks AR and Coyle JT, 1988. Neonatal lesions of the basal forebrain cholinergic neurons result in abnormal cortical development. *Brain Res.* 470, 253-64.
- Hohmann CF, Kwiterovich KK, Oster-Granite ML and Coyle JT, 1991a. Newborn basal forebrain lesions disrupt cortical cytodifferentiation as visualized by rapid Golgi staining. *Cereb Cortex.* 1, 143-57.
- Hohmann CF, Pert CC and Ebner FF, 1985. Development of cholinergic markers in mouse forebrain. II. Muscarinic receptor binding in cortex. *Brain Res.* 355, 243-53.
- Hohmann CF, Potter ED and Levey AI, 1995. Development of muscarinic receptor subtypes in the forebrain of the mouse. *J Comp Neurol.* 358, 88-101.
- Hohmann CF, Wilson L and Coyle JT, 1991b. Efferent and afferent connections of mouse sensory-motor cortex following cholinergic deafferentation at birth. *Cereb Cortex.* 1, 158-72.
- Hornung RW, Deddens J and 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.
- Hoshi F, Kobayashi H, Yuyama A and Matsusaka N, 1991. Effects of triethyl lead on various cholinergic parameters in the rat brain in vitro. *Jpn J Pharmacol.* 55, 27-33.

- Houpert P, Bizot JC, Bussy C, Dhieux B, Lestaevel P, Gourmelon P and Paquet F, 2007a. Comparison of the effects of enriched uranium and 137-cesium on the behaviour of rats after chronic exposure. *Int J Radiat Biol.* 83, 99-104.
- Houpert P, Frelon S, Lestaevel P, Bussy C, Gourmelon P and Paquet F, 2007b. Parental exposure to enriched uranium induced delayed hyperactivity in rat offspring. *Neurotoxicology.* 28, 108-13.
- Houpert P, Frelon S, Monleau M, Bussy C, Chazel V and Paquet F, 2007c. Heterogeneous Accumulation of Uranium in the Brain of Rats. *Radiat Prot Dosimetry.*
- Houpert P, Lestaevel P, Amourette C, Dhieux B, Bussy C and Paquet F, 2004. Effect of U and 137Cs chronic contamination on dopamine and serotonin metabolism in the central nervous system of the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 82, 161-6.
- Houpert P, Lestaevel P, Bussy C, Paquet F and Gourmelon P, 2005. Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat. *Neurotoxicology.* 26, 1015-20.
- Howland JW (1949). Studies on human exposures to uranium compounds. New-York, Pharmacology and Toxicology of Uranium
- Hursh JB, Neuman WR, Toribara T, Wilson H and Waterhouse C, 1969. Oral ingestion of uranium by man. *Health Phys.* 17, 619-21.
- Ikarashi Y, Harigaya Y, Tomidokoro Y, Kanai M, Ikeda M, Matsubara E, Kawarabayashi T, Kuribara H, Younkin SG, Maruyama Y and Shoji M, 2004. Decreased level of brain acetylcholine and memory disturbance in APPsw mice. *Neurobiol Aging.* 25, 483-90.
- Inouye M, Takahashi S, Kubota Y, Hayasaka S and Murata Y, 2000. Similarity between the effects of carbon-ion irradiation and X-irradiation on the development of rat brain. *J Radiat Res (Tokyo).* 41, 303-11.
- Irvine EE, Cheeta S and File SE, 1999. Time-course of changes in the social interaction test of anxiety following acute and chronic administration of nicotine. *Behav Pharmacol.* 10, 691-7.
- Janhunen S and Ahtee L, 2007. Differential nicotinic regulation of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways: implications for drug development. *Neurosci Biobehav Rev.* 31, 287-314.
- Jankowska A, Madziar B, Tomaszewicz M and Szutowicz A, 2000. Acute and chronic effects of aluminum on acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in differentiated and nondifferentiated SN56 cholinergic cells. *J Neurosci Res.* 62, 615-22.
- Jensh RP, Eisenman LM and Brent RL, 1995. Postnatal neurophysiologic effects of prenatal X-irradiation. *Int J Radiat Biol.* 67, 217-27.
- Jett DA, Kuhlmann AC, Farmer SJ and Guilarte TR, 1997. Age-dependent effects of developmental lead exposure on performance in the Morris water maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 57, 271-9.
- Johnston MV, Hohmann C and Blue ME, 1995. Neurobiology of Rett syndrome. *Neuropediatrics.* 26, 119-22.
- Jortner BS, 2008. Effect of stress at dosing on organophosphate and heavy metal toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 233, 162-7.
- Juliano SL, Ma W, Bear MF and Eslin D, 1990. Cholinergic manipulation alters stimulus-evoked metabolic activity in cat somatosensory cortex. *J Comp Neurol.* 297, 106-20.
- Juntunen R (1991). uranium and radon in wells drilled into bedrock in southern Finland. Gottingen, Geological survey of Finland: 20.
- Kalinich JF, Ramakrishnan N, Villa V and McClain DE, 2002. Depleted uranium-uranyl chloride induces apoptosis in mouse J774 macrophages. *Toxicology.* 179, 105-14.

- Kathren RL and Moore RH, 1986. Acute accidental inhalation of U: a 38-year follow-up. *Health Phys.* 51, 609-19.
- Kleinfeld O, Diebler MF, Chapman S, Oron L and Michaelson DM, 1998. The effects of apolipoprotein E deficiency on brain cholinergic neurons. *Int J Dev Neurosci.* 16, 755-62.
- Knobel Y, Gleit M, Weise A, Osswald K, Schaferhenrich A, Richter KK, Claussen U and Pool-Zobel BL, 2006. Uranyl nitratotriacetate, a stabilized salt of uranium, is genotoxic in nontransformed human colon cells and in the human colon adenoma cell line LT97. *Toxicol Sci.* 93, 286-97.
- Krzywkowski P, Ghribi O, Gagne J, Chabot C, Kar S, Rochford J, Massicotte G and Poirier J, 1999. Cholinergic systems and long-term potentiation in memory-impaired apolipoprotein E-deficient mice. *Neuroscience.* 92, 1273-86.
- Kumar A and Schliebs R, 1992. Postnatal laminar development of cholinergic receptors, protein kinase C and dihydropyridine-sensitive calcium antagonist binding in rat visual cortex. Effect of visual deprivation. *Int J Dev Neurosci.* 10, 491-504.
- Kurttio P, Auvinen A, Salonen L, Saha H, Pekkanen J, Makelainen I, Vaisanen SB, Penttila IM and 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 and Saha H, 2005. Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect.* 113, 68-72.
- La Touche YD, Willis DL and Dawydiak OI, 1987. Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health Phys.* 53, 147-62.
- Lam KS, Aman MG and Arnold LE, 2006. Neurochemical correlates of autistic disorder: a review of the literature. *Res Dev Disabil.* 27, 254-89.
- Lang S, Kosma VM, Kumlin T, Halinen A, Salonen RO, Servomaa K, Rytomaa T and Ruuskanen J, 1994. Distribution and short-term effects of intratracheally instilled neutron-irradiated UO₂ particles in the rat. *Environ Res.* 65, 119-31.
- Lang S and Raunemaa T, 1991. Behavior of neutron-activated uranium dioxide dust particles in the gastrointestinal tract of the rat. *Radiat Res.* 126, 273-9.
- Lange KW, Wells FR, Jenner P and Marsden CD, 1993. Altered muscarinic and nicotinic receptor densities in cortical and subcortical brain regions in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 60, 197-203.
- Lariviere D, Packer AP, Marro L, Li C, Chen J and Cornett RJ, 2007. Age dependence of natural uranium and thorium concentrations in bone. *Health Phys.* 92, 119-26.
- Laurier D, Valenty M and Tirmarche M, 2001. Radon exposure and the risk of leukemia: a review of epidemiological studies. *Health Phys.* 81, 272-88.
- Lawrence AD and Sahakian BJ, 1998. The cognitive psychopharmacology of Alzheimer's disease: focus on cholinergic systems. *Neurochem Res.* 23, 787-94.
- Leach LJ, Maynard EA, Hodge HC, Scott JK, Yuile CL, Sylvester GE and Wilson HB, 1970. A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO₂) dust. I. Retention and biologic effect in the monkey, dog and rat. *Health Phys.* 18, 599-612.
- Leach LJ, Yuile CL, Hodge HC, Sylvester GE and Wilson HB, 1973. A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO₂) dust. II. Postexposure retention and biologic effects in the monkey, dog and rat. *Health Phys.* 25, 239-58.
- Lee M, Martin-Ruiz C, Graham A, Court J, Jaros E, Perry R, Iversen P, Bauman M and Perry E, 2002. Nicotinic receptor abnormalities in the cerebellar cortex in autism. *Brain.* 125, 1483-95.
- Leggett RW, 1989. The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys.* 57, 365-83.

- Leggett RW, 1994. Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium. *Health Phys.* 67, 589-610.
- Leggett RW and Harrison JD, 1995. Fractional absorption of ingested uranium in humans. *Health Phys.* 68, 484-98.
- Leggett RW and Pellmar TC, 2003. The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J Environ Radioact.* 64, 205-25.
- Lemercier V, Millot X, Ansoborlo E, Menetrier F, Flury-Herard A, Roussele C and Scherrmann JM, 2003. Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiat Prot Dosimetry.* 105, 243-5.
- Lestaevel P, Bussy C, Paquet F, Dhieux B, Clarencon D, Houpert P and Gourmelon P, 2005. Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 27, 835-40.
- Lestaevel P, Romero E, Dhieux B, Ben Soussan H, Berradi H, Dublineau I, Voisin P and Gourmelon P, 2009. Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats. *Toxicology.* 258, 1-9.
- Lin-Shiau SY and Fu WM, 1986. Antagonistic action of uranyl nitrate on presynaptic neurotoxins from snake venoms. *Neuropharmacology.* 25, 95-101.
- Lin-Shiau SY, Fu WM and Lee CY, 1979. Effects of uranyl ions on neuromuscular transmission of chick biventer cervicis muscle. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 241, 332-43.
- Lin RH, Fu WM and Lin-Shiau SY, 1988. Presynaptic action of uranyl nitrate on the phrenic nerve-diaphragm preparation of the mouse. *Neuropharmacology.* 27, 857-63.
- Livak KJ and Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25, 402-8.
- Llobet JM, Sirvent JJ, Ortega A and Domingo JL, 1991. Influence of chronic exposure to uranium on male reproduction in mice. *Fundam Appl Toxicol.* 16, 821-9.
- Loko F. AEK, YOVO KOKOU S., ADJOKO N., GANDONOU N., ZOHON I., 2007. Détermination des activités acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase sanguines de base chez les travailleurs agricoles en milieu cotonnier au Bénin. *Journal des Sciences.* 7,
- Loullis CC, Dean RL, Lippa AS, Meyerson LR, Beer B and Bartus RT, 1983. Chronic administration of cholinergic agents: effects on behavior and calmodulin. *Pharmacol Biochem Behav.* 18, 601-4.
- Luppi P, Lain KY, Jeyabalan A and DeLoia JA, 2007. The effects of cigarette smoking on circulating maternal leukocytes during pregnancy. *Clin Immunol.* 122, 214-9.
- Machreki-Ajmi M, Ketata I, Ladhar-Chaabouni R and Hamza-Chaffai A, 2008. The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers in *Cerastoderma glaucum*. *Ecotoxicology.* 17, 1-11.
- Malenchenko AF, Barkun NA and Guseva GF, 1978. Effect of uranium on the induction and course of experimental autoimmune orchitis and thyroiditis. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 22, 268-77.
- Martin-Ruiz CM, Lee M, Perry RH, Baumann M, Court JA and Perry EK, 2004. Molecular analysis of nicotinic receptor expression in autism. *Brain Res Mol Brain Res.* 123, 81-90.
- Martin C, Martin S, Viret R, Denis J, Mirguet F, Diserbo M, Multon E and Lamproglou I, 2001. Low dose of the gamma acute radiation syndrome (1.5 Gy) does not significantly alter either cognitive behavior or dopaminergic and serotonergic metabolism. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 47, 459-65.
- Martin F, Earl R and Tawn EJ, 1991. A cytogenetic study of men occupationally exposed to uranium. *Br J Ind Med.* 48, 98-102.

- Mason ST and Fibiger HC, 1979. Possible behavioural function for noradrenaline--acetylcholine interaction in brain. *Nature*. 277, 396-6.
- Matter JM, Matter-Sadzinski L and Ballivet M, 1990. Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor genes in the developing chick visual system. *Embo J*. 9, 1021-6.
- McCarley RW, 2007. Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Med*. 8, 302-30.
- McDiarmid MA, Engelhardt SM, Dorsey CD, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Cernich A, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Albertini R, Gudi R and Squibb KS, 2009. Surveillance results of depleted uranium-exposed Gulf War I veterans: sixteen years of follow-up. *J Toxicol Environ Health A*. 72, 14-29.
- McDiarmid MA, Engelhardt SM, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Cernich A, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Albertini R, Gudi R, Jacobson-Kram D and Squibb KS, 2007. Health surveillance of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium: updating the cohort. *Health Phys*. 93, 60-73.
- McDiarmid MA, Engelhardt SM, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Kabat M, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Albertini RJ, Gudi R, Jacobson-Kram D, Thorne CD and Squibb KS, 2006. Biological monitoring and surveillance results of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium. *Int Arch Occup Environ Health*. 79, 11-21.
- McDiarmid MA, Hooper FJ, Squibb K, McPhaul K, Engelhardt SM, 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, 123-4.
- McDonald-Taylor CK, Singh A and Gilman A, 1997. Uranyl nitrate-induced proximal tubule alterations in rabbits: a quantitative analysis. *Toxicol Pathol*. 25, 381-9.
- McGeoghegan D and Binks K, 2000. The mortality and cancer morbidity experience of workers at the Springfields uranium production facility, 1946-95. *J Radiol Prot*. 20, 111-37.
- McIntyre CK, Pal SN, Marriott LK and Gold PE, 2002. Competition between memory systems: acetylcholine release in the hippocampus correlates negatively with good performance on an amygdala-dependent task. *J Neurosci*. 22, 1171-6.
- Messiha FS, 1978. Anti-depressant action of caesium chloride and its modification of chlorpromazine toxicity in mice. *Br J Pharmacol*. 64, 9-12.
- Mesulam M, Guillozet A, Shaw P and Quinn B, 2002a. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiol Dis*. 9, 88-93.
- Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG and Lockridge O, 2002b. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*. 110, 627-39.
- Miki T, Yokoyama T, Sumitani K, Wang ZY, Yang W, Kusaka T, Matsumoto Y, Warita K, Lee NS, Fukui Y and Takeuchi Y, 2007. The effect of prenatal X-irradiation on the developing cerebral cortex of rats. II: A quantitative assessment of glial cells in the somatosensory cortex. *Int J Dev Neurosci*. 25, 293-7.
- Milacic S, 2008. Health investigations of depleted-uranium clean-up workers. *Med Lav*. 99, 366-70.
- Milgram S, Carriere M, Malaval L and Gouget B, 2008a. Cellular accumulation and distribution of uranium and lead in osteoblastic cells as a function of their speciation. *Toxicology*. 252, 26-32.
- Milgram S, Carriere M, Thiebault C, Malaval L and Gouget B, 2008b. Cytotoxic and phenotypic effects of uranium and lead on osteoblastic cells are highly dependent on metal speciation. *Toxicology*. 250, 62-9.

- Milgram SC, M.; Thiebault, C.; Berger, P.; Khodja, H.; Gouget, B., 2007. Cell-metal interactions: a comparison of natural uranium to other common metals in renal cells and bone osteoblasts. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 260, 254-258.
- Miller EK, Erickson CA and Desimone R, 1996. Neural mechanisms of visual working memory in prefrontal cortex of the macaque. *J Neurosci.* 16, 5154-67.
- Minnema DJ, Michaelson IA and Cooper GP, 1988. Calcium efflux and neurotransmitter release from rat hippocampal synaptosomes exposed to lead. *Toxicol Appl Pharmacol.* 92, 351-7.
- Mirzoian A and Luetje CW, 2002. Modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by mercury. *J Pharmacol Exp Ther.* 302, 560-7.
- Mitchel RE, Jackson JS and Heinmiller B, 1999. Inhaled uranium ore dust and lung cancer risk in rats. *Health Phys.* 76, 145-55.
- Mizuno T, Endo Y, Arita J and Kimura F, 1991. Acetylcholine release in the rat hippocampus as measured by the microdialysis method correlates with motor activity and exhibits a diurnal variation. *Neuroscience.* 44, 607-12.
- Monleau M, Bussy C, Lestaevel P, Houpert P, Paquet F and Chazel V, 2005. Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations. *Neurosci Lett.* 390, 31-6.
- Monleau M, De Meo M, Paquet F, Chazel V, Dumenil G and Donnadiou-Claraz M, 2006. Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicol Sci.* 89, 287-95.
- Moon YJ, Lee AK, Chung HC, Kim EJ, Kim SH, Lee DC, Lee I, Kim SG and Lee MG, 2003. Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats. *Drug Metab Dispos.* 31, 776-84.
- Moss M, 1983a. Uranium in drinking water - report on clinical studies in Nova-Scotia. *Chemical toxicology and clinical chemistry of metals.* 149-152.
- Author. Uranium in drinking water - report on clinical studies in Nova-Scotia. *Journal.* 1983b.volume, (issue): pages
- Muir JL, 1996. Attention and stimulus processing in the rat. *Brain Res Cogn Brain Res.* 3, 215-25.
- Muir JL, Everitt BJ and Robbins TW, 1994. AMPA-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain: a significant role for the cortical cholinergic system in attentional function. *J Neurosci.* 14, 2313-26.
- Muller D (2002). Etude *in vitro* de la reabsorption tubulaire proximale de l'uranium - Conséquences fonctionnelles. *Biologie-Santé.* Bordeaux, Université Victor Segalen Bordeaux 2: 191.
- Nakata H, Yoshimine T, Murasawa A, Kumura E, Harada K, Ushio Y and Hayakawa T, 1995. Early blood-brain barrier disruption after high-dose single-fraction irradiation in rats. *Acta Neurochir (Wien).* 136, 82-6; discussion 86-7.
- Nastuk WL, 1967. Activation and inactivation of muscle postjunctional receptors. *Fed Proc.* 26, 1639-46.
- Neuman WF, Neuman MW and et al., 1949. The deposition of uranium in bone; ion competition studies. *J Biol Chem.* 179, 341-8.
- Niles AL, Moravec RA, Eric Hesselberth P, Scurria MA, Daily WJ and Riss TL, 2007. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal Biochem.* 366, 197-206.
- Nowak G, Szewczyk B, Wieronska JM, Branski P, Palucha A, Pilc A, Sadlik K and Piekoszewski W, 2003. Antidepressant-like effects of acute and chronic treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats. *Brain Res Bull.* 61, 159-64.

- Oishi N, Hashikawa K, Yoshida H, Ishizu K, Ueda M, Kawashima H, Saji H and Fukuyama H, 2007. Quantification of nicotinic acetylcholine receptors in Parkinson's disease with (123)I-5IA SPECT. *J Neurol Sci.* 256, 52-60.
- Orsetti M, Casamenti F and Pepeu G, 1996. Enhanced acetylcholine release in the hippocampus and cortex during acquisition of an operant behavior. *Brain Res.* 724, 89-96.
- Ortega A, Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM and Paternain JL, 1989. Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats. *Bull Environ Contam Toxicol.* 42, 935-41.
- Ouagazzal AM, Kenny PJ and File SE, 1999. Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. *Psychopharmacology (Berl).* 144, 54-60.
- Paquet F, Houpert P, Blanchardon E, Delissen O, Maubert C, Dhieux B, Moreels AM, Frelon S and Gourmelon P, 2006. Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys.* 90, 139-47.
- Pasanen M, Lang S, Kojo A and Kosma VM, 1995. Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environ Res.* 70, 126-33.
- Paschoa AS, 1998. Potential environmental and regulatory implications of naturally occurring radioactive materials (NORM). *Appl Radiat Isot.* 49, 189-96.
- Passeti F, Dalley JW, O'Connell MT, Everitt BJ and Robbins TW, 2000. Increased acetylcholine release in the rat medial prefrontal cortex during performance of a visual attentional task. *Eur J Neurosci.* 12, 3051-8.
- Pasternak G, Becker CE, Lash A, Bowler R, Estrin WJ and Law D, 1989. Cross-sectional neurotoxicology study of lead-exposed cohort. *J Toxicol Clin Toxicol.* 27, 37-51.
- Paternain JL, Domingo JL, Ortega A and Llobet JM, 1989. The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicol Environ Saf.* 17, 291-6.
- Pellmar TC, Fuciarelli AF, Ejnik JW, Hamilton M, Hogan J, Strocko S, Emond C, Mottaz HM and Landauer MR, 1999a. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci.* 49, 29-39.
- Pellmar TC, Keyser DO, Emery C and Hogan JB, 1999b. Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments. *Neurotoxicology.* 20, 785-92.
- Pellmar TCH, J.B.; Benson, K.A.; Landauer, M.R. (1998). Toxicological evaluation of depleted uranium in rats: Six months evaluation point. Bethesda, Armed forces radiobiology research institut.
- Pepeu G and Giovannini MG, 2004. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. *Learn Mem.* 11, 21-7.
- Periyakaruppan A, Kumar F, Sarkar S, Sharma CS and Ramesh GT, 2007. Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells. *Arch Toxicol.* 81, 389-95.
- Perry EK, Morris CM, Court JA, Cheng A, Fairbairn AF, McKeith IG, Irving D, Brown A and Perry RH, 1995. Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Lewy body dementia and Alzheimer's disease: possible index of early neuropathology. *Neuroscience.* 64, 385-95.
- Perry EK, Perry RH, Blessed G and Tomlinson BE, 1978a. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 4, 273-7.
- Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bergmann K, Gibson PH and Perry RH, 1978b. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br Med J.* 2, 1457-9.
- Petitot F, Moreels AM and Paquet F, 2004. In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig. *Can J Physiol Pharmacol.* 82, 133-9.

- Picconi B, Passino E, Sgobio C, Bonsi P, Barone I, Ghiglieri V, Pisani A, Bernardi G, Ammassari-Teule M and Calabresi P, 2006. Plastic and behavioral abnormalities in experimental Huntington's disease: a crucial role for cholinergic interneurons. *Neurobiol Dis.* 22, 143-52.
- Poleszak E, Wlaz P, Kedzierska E, Radziwon-Zaleska M, Pilc A, Fidecka S and Nowak G, 2005. Effects of acute and chronic treatment with magnesium in the forced swim test in rats. *Pharmacol Rep.* 57, 654-8.
- Poongodi GL, Suresh N, Gopinath SC, Chang T, Inoue S and Inoue Y, 2002. Dynamic change of neural cell adhesion molecule polysialylation on human neuroblastoma (IMR-32) and rat pheochromocytoma (PC-12) cells during growth and differentiation. *J Biol Chem.* 277, 28200-11.
- Priest ND, 2001. Toxicity of depleted uranium. *Lancet.* 357, 244-6.
- Quik M and McIntosh JM, 2006. Striatal $\alpha 6^*$ nicotinic acetylcholine receptors: potential targets for Parkinson's disease therapy. *J Pharmacol Exp Ther.* 316, 481-9.
- Racine R, Gueguen Y, Gourmelon P, Veysièrè G and Souidi M, 2009. Modifications of the Expression of Genes Involved in Cerebral Cholesterol Metabolism in the Rat Following Chronic Ingestion of Depleted Uranium. *J Mol Neurosci.* 38, 159-165.
- Ragozzino ME, Unick KE and Gold PE, 1996. Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: augmentation by glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 4693-8.
- Ray MA, Graham AJ, Lee M, Perry RH, Court JA and Perry EK, 2005. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in autism: an immunohistochemical investigation in the thalamus. *Neurobiol Dis.* 19, 366-77.
- Raymond-Whish S, Mayer LP, O'Neal T, Martinez A, Sellers MA, Christian PJ, Marion SL, Begay C, Propper CR, Hoyer PB and Dyer CA, 2007. Drinking water with uranium below the U.S. EPA water standard causes estrogen receptor-dependent responses in female mice. *Environ Health Perspect.* 115, 1711-6.
- Reader TA, Parisi M and De Robertis E, 1973. Reactivity to acetylcholine developed by artificial membranes containing a protein from *Electrophorus electricus*: the effect of uranyl ions. *Biochem Biophys Res Commun.* 53, 10-7.
- Reddy GR, Devi BC and Chetty CS, 2007. Developmental lead neurotoxicity: alterations in brain cholinergic system. *Neurotoxicology.* 28, 402-7.
- Redrobe JP and Bourin M, 1999. The effect of lithium administration in animal models of depression: a short review. *Fundam Clin Pharmacol.* 13, 293-9.
- Ridley RM, Thornley HD, Baker HF and Fine A, 1991. Cholinergic neural transplants into hippocampus restore learning ability in monkeys with fornix transections. *Exp Brain Res.* 83, 533-8.
- Rogel A, Carre N, Amoros E, Bonnet-Belfais M, Goldberg M, Imbernon E, Calvez T and Hill C, 2005. Mortality of workers exposed to ionizing radiation at the French National Electricity Company. *Am J Ind Med.* 47, 72-82.
- Ropenga A, Chapel A, Vandamme M and Griffiths NM, 2004. Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat. *Radiat Res.* 161, 597-602.
- Rossino P, Defilippi P, Silengo L and Tarone G, 1991. Up-regulation of the integrin $\alpha 1/\beta 1$ in human neuroblastoma cells differentiated by retinoic acid: correlation with increased neurite outgrowth response to laminin. *Cell Regul.* 2, 1021-33.
- Rossner S, Kues W, Witzemann V and Schliebs R, 1993. Laminar expression of m1-, m3- and m4-muscarinic cholinergic receptor genes in the developing rat visual cortex using in situ hybridization histochemistry. Effect of monocular visual deprivation. *Int J Dev Neurosci.* 11, 369-78.

- Rossner S, Kumar A, Witzemann V and Schliebs R, 1994. Development of laminar expression of the m2 muscarinic cholinergic receptor gene in rat visual cortex and the effect of monocular visual deprivation. *Brain Res Dev Brain Res.* 77, 55-61.
- Rouas C (2008). Effets d'une contamination chronique à l'uranium sur le métabolisme du paracétamol chez le rat. *Pharmacie*. Chatenay-Malabry, Faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry de l'université paris-sud 11: 71.
- Sabolic I, 2006. Common mechanisms in nephropathy induced by toxic metals. *Nephron Physiol.* 104, p107-14.
- Sarter M and Bruno JP, 2000. Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents. *Neuroscience.* 95, 933-52.
- Saueia CH and Mazzilli BP, 2006. Distribution of natural radionuclides in the production and use of phosphate fertilizers in Brazil. *J Environ Radioact.* 89, 229-39.
- Savas A, Warnke PC, Ginap T, Feuerstein TJ and Ostertag CB, 2001. The effects of continuous and single-dose radiation on choline uptake in organotypic tissue slice cultures of rabbit hippocampus. *Neurol Res.* 23, 669-75.
- Scarr E and Dean B, 2009. Role of the cholinergic system in the pathology and treatment of schizophrenia. *Expert Rev Neurother.* 9, 73-86.
- Schmitz C, Grolms N, Hof PR, Boehringer R, Glaser J and Korr H, 2002. Altered spatial arrangement of layer V pyramidal cells in the mouse brain following prenatal low-dose X-irradiation. A stereological study using a novel three-dimensional analysis method to estimate the nearest neighbor distance distributions of cells in thick sections. *Cereb Cortex.* 12, 954-60.
- Schubauer-Berigan MK, Daniels RD and Pinkerton LE, 2009. Radon exposure and mortality among white and American Indian uranium miners: an update of the Colorado Plateau cohort. *Am J Epidemiol.* 169, 718-30.
- Selevan SG, Rice DC, Hogan KA, Euling SY, Pfahles-Hutchens A and Bethel J, 2003. Blood lead concentration and delayed puberty in girls. *N Engl J Med.* 348, 1527-36.
- Sellin AK, Shad M and Tamminga C, 2008. Muscarinic agonists for the treatment of cognition in schizophrenia. *CNS Spectr.* 13, 985-96.
- Shao Z and Suszkiw JB, 1991. Ca²⁺(+)-surrogate action of Pb²⁺ on acetylcholine release from rat brain synaptosomes. *J Neurochem.* 56, 568-74.
- Shawky S, Amer HA, Hussein MI, el-Mahdy Z and Mustafa M, 2002. Uranium bioassay and radioactive dust measurements at some uranium processing sites in Egypt--health effects. *J Environ Monit.* 4, 588-91.
- Shi L, Adams MM, Long A, Carter CC, Bennett C, Sonntag WE, Nicolle MM, Robbins M, D'Agostino R and Brunso-Bechtold JK, 2006. Spatial learning and memory deficits after whole-brain irradiation are associated with changes in NMDA receptor subunits in the hippocampus. *Radiat Res.* 166, 892-9.
- Shiromani PJ, Armstrong DM, Berkowitz A, Jeste DV and Gillin JC, 1988. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactive somata in the feline brainstem: implications for REM sleep generation. *Sleep.* 11, 1-16.
- Sienkiewicz ZJ, Saunders RD and Butland BK, 1992. Prenatal irradiation and spatial memory in mice: investigation of critical period. *Int J Radiat Biol.* 62, 211-9.
- Sikov MR and Mahlum DD, 1966. Cross-placental passage of actinides in the rat. BNWL-480. BNWL Rep. 42-3.

- Silasi G, Diaz-Heijtz R, Besplug J, Rodriguez-Juarez R, Titov V, Kolb B and Kovalchuk O, 2004. Selective brain responses to acute and chronic low-dose X-ray irradiation in males and females. *Biochem Biophys Res Commun.* 325, 1223-35.
- Slater TF, Sawyer B and Straeuli U, 1963. Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim Biophys Acta.* 77, 383-93.
- Smith R, Chung H, Rundquist S, Maat-Schieman ML, Colgan L, Englund E, Liu YJ, Roos RA, Faull RL, Brundin P and Li JY, 2006. Cholinergic neuronal defect without cell loss in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 15, 3119-31.
- Souidi M, Gueguen Y, Linard C, Dudoignon N, Grison S, Baudelin C, Marquette C, Gourmelon P, Aigueperse J and 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.* 214, 113-22.
- Spangler EL, Wenk GL, Chachich ME, Smith K and Ingram DK, 1990. Complex maze performance in rats: effects of noradrenergic depletion and cholinergic blockade. *Behav Neurosci.* 104, 410-7.
- Squibb KS and McDiarmid MA, 2006. Depleted uranium exposure and health effects in Gulf War veterans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361, 639-48.
- Stancampiano R, Cocco S, Cugusi C, Sarais L and Fadda F, 1999. Serotonin and acetylcholine release response in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Neuroscience.* 89, 1135-43.
- Stearns DM, Yazzie M, Bradley AS, Coryell VH, Shelley JT, Ashby A, Asplund CS and Lantz RC, 2005. Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis.* 20, 417-23.
- Steinlein OK and Bertrand D, 2008. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from the genetic analysis to neurological diseases. *Biochem Pharmacol.* 76, 1175-83.
- Stephens SH, Logel J, Barton A, Franks A, Schultz J, Short M, Dickenson J, James B, Fingerlin TE, Wagner B, Hodgkinson C, Graw S, Ross RG, Freedman R and Leonard S, 2009. Association of the 5'-upstream regulatory region of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit gene (CHRNA7) with schizophrenia. *Schizophr Res.* 109, 102-12.
- Steriade M, Datta S, Pare D, Oakson G and Curro Dossi RC, 1990. Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci.* 10, 2541-59.
- Stoehr JD, Mobley SL, Roice D, Brooks R, Baker LM, Wiley RG and Wenk GL, 1997. The effects of selective cholinergic basal forebrain lesions and aging upon expectancy in the rat. *Neurobiol Learn Mem.* 67, 214-27.
- Su S, Jin Y, Zhang W, Yang L, Shen Y, Cao Y and Tong J, 2006. Aberrant promoter methylation of p16(INK4a) and O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase genes in workers at a Chinese uranium mine. *J Occup Health.* 48, 261-6.
- Sullivan MF, 1980a. Absorption of actinide elements from the gastrointestinal tract of neonatal animals. *Health Phys.* 38, 173-85.
- Sullivan MF, 1980b. Absorption of actinide elements from the gastrointestinal tract of rats, guinea pigs and dogs. *Health Phys.* 38, 159-71.
- Sullivan MF, Ruemmler PS, Ryan JL and Buschbom RL, 1986. Influence of oxidizing or reducing agents on gastrointestinal absorption of U, Pu, Am, Cm and Pm by rats. *Health Phys.* 50, 223-32.
- Sun X, Tian X and Suszkiw JB, 1997a. Reduction of choline acetyltransferase mRNA in the septum of developing rat exposed to inorganic lead. *Neurotoxicology.* 18, 201-7.
- Sun X, Tian X and Suszkiw JB, 1997b. Reduction of vesicular acetylcholine transporter mRNA in the rat septum following lead exposure. *Neuroreport.* 8, 891-4.

- Suszkiv J, Toth G, Murawsky M and Cooper GP, 1984. Effects of Pb²⁺ and Cd²⁺ on acetylcholine release and Ca²⁺ movements in synaptosomes and subcellular fractions from rat brain and Torpedo electric organ. *Brain Res.* 323, 31-46.
- Takai N, Sun XZ, Ando K, Mishima K and Takahashi S, 2004. Ectopic neurons in the hippocampus may be a cause of learning disability after prenatal exposure to X-rays in rats. *J Radiat Res (Tokyo)*. 45, 563-9.
- Takei N, Nihonmatsu I and Kawamura H, 1989. Age-related decline of acetylcholine release evoked by depolarizing stimulation. *Neurosci Lett.* 101, 182-6.
- Tasat DR, Orona NS, Mandalunis PM, Cabrini RL and Ubios AM, 2007. Ultrastructural and metabolic changes in osteoblasts exposed to uranyl nitrate. *Arch Toxicol.* 81, 319-26.
- Taulan M (2004). Conséquences moléculaires des expositions à l'uranium (aigue et chronique) via l'étude du transcriptome murin. Biologie Santé, Génétique. Montpellier, Université Montpellier I: 117.
- Taulan M, Paquet F, Argiles A, Demaille J and Romey MC, 2006. Comprehensive analysis of the renal transcriptional response to acute uranyl nitrate exposure. *BMC Genomics.* 7, 2.
- Taylor DM and Taylor SK, 1997. Environmental uranium and human health. *Rev Environ Health.* 12, 147-57.
- Telle-Lamberton M, Bergot D, Gagneau M, Samson E, Giraud JM, Neron MO and Hubert P, 2004. Cancer mortality among French Atomic Energy Commission workers. *Am J Ind Med.* 45, 34-44.
- Thiebault C, Carriere M, Milgram S, Simon A, Avoscan L and Gouget B, 2007. Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicol Sci.* 98, 479-87.
- Thiel CM, Huston JP and Schwarting RK, 1998. Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience.* 85, 1253-62.
- Tirmarche M, Baysson H and Telle-Lamberton M, 2004. [Uranium exposure and cancer risk: a review of epidemiological studies]. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 52, 81-90.
- Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Grandcolas L, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P and Souidi M, 2007. In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat. *Biochim Biophys Acta.* 1770, 266-72.
- Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Paquet F, Aigueperse J and Souidi M, 2006. Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Arch Toxicol.* 80, 473-80.
- Tohgi H, Utsugisawa K, Yoshimura M, Nagane Y and Mihara M, 1998. Age-related changes in nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha4 and beta2 messenger RNA expression in postmortem human frontal cortex and hippocampus. *Neurosci Lett.* 245, 139-42.
- Tomasek L, Darby SC, Swerdlow AJ, Placek V and Kunz E, 1993. Radon exposure and cancers other than lung cancer among uranium miners in West Bohemia. *Lancet.* 341, 919-23.
- Toth GP, Cooper GP and Suszkiv JB, 1987. Effects of divalent cations on acetylcholine release from digitonin-permeabilized rat cortical synaptosomes. *Neurotoxicology.* 8, 507-16.
- Tournier BB, Frelon S, Tournalias E, Agez L, Delissen O, Dublineau I, Paquet F and Petitot F, 2009. Role of the olfactory receptor neurons in the direct transport of inhaled uranium to the rat brain. *Toxicol Lett.*
- Trnovec T, Kallay Z and Bezek S, 1990. Effects of ionizing radiation on the blood brain barrier permeability to pharmacologically active substances. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 19, 1581-7.
- Tsai FS, Peng WH, Wang WH, Wu CR, Hsieh CC, Lin YT, Feng IC and Hsieh MT, 2007. Effects of luteolin on learning acquisition in rats: involvement of the central cholinergic system. *Life Sci.* 80, 1692-8.

- Tumilowicz JJ, Nichols WW, Cholon JJ and Greene AE, 1970. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res.* 30, 2110-8.
- Tymen H, Gerasimo P and Hoffschir D, 2000. Contamination and decontamination of rat and human skin with plutonium and uranium, studied with a Franz's chamber. *Int J Radiat Biol.* 76, 1417-24.
- Ubios AM, Guglielmotti MB, Steimetz T and Cabrini RL, 1991. Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ Res.* 54, 17-23.
- Ubios AM, Marzorati M and Cabrini RL, 1997. Skin alterations induced by long-term exposure to uranium and their effect on permeability. *Health Phys.* 72, 713-5.
- Vacquier B, Rogel A, Leuraud K, Caer S, Acker A and Laurier D, 2009. Radon-associated lung cancer risk among French uranium miners: modifying factors of the exposure-risk relationship. *Radiat Environ Biophys.* 48, 1-9.
- van der Zee EA and Luiten PG, 1999. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol.* 58, 409-71.
- Verma SK, Kumar V and Gill KD, 2009. An acetylcholinesterase-independent mechanism for neurobehavioral impairments after chronic low level exposure to dichlorvos in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 92, 173-81.
- Verret L, Leger L, Fort P and Luppi PH, 2005. Cholinergic and noncholinergic brainstem neurons expressing Fos after paradoxical (REM) sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci.* 21, 2488-504.
- Vietti KR and Lasley SM, 2007. Stimulus-evoked glutamate release is diminished by acute exposure to uranium in vitro. *Neurotoxicol Teratol.* 29, 607-12.
- Vijverberg HP, Oortgiesen M, Leinders T and van Kleef RG, 1994. Metal interactions with voltage- and receptor-activated ion channels. *Environ Health Perspect.* 102 Suppl 3, 153-8.
- Vnek N, Kromer LF, Wiley RG and Rothblat LA, 1996. The basal forebrain cholinergic system and object memory in the rat. *Brain Res.* 710, 265-70.
- von Linstow Roloff E, Harbaran D, Micheau J, Platt B and Riedel G, 2007. Dissociation of cholinergic function in spatial and procedural learning in rats. *Neuroscience.* 146, 875-89.
- Wappelhorst O, Kuhn I, Heidenreich H and Markert B, 2002. Transfer of selected elements from food into human milk. *Nutrition.* 18, 316-22.
- Whishaw IQ, O'Connor WT and Dunnett SB, 1985. Disruption of central cholinergic systems in the rat by basal forebrain lesions or atropine: effects on feeding, sensorimotor behaviour, locomotor activity and spatial navigation. *Behav Brain Res.* 17, 103-15.
- White NM and McDonald RJ, 2002. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem.* 77, 125-84.
- White SB, E., 1983. Removing uranium by current municipal water treatment processes. *Journal of American Water Works Association.* 75, 374-380.
- WHO (2001). Depleted uranium: Sources, Exposure and Health Effects. Geneva, World Health Organisation, Departement of Protection of the Human Environment.
- Wrenn ME, Durbin PW, Howard B, Lipsztein J, Rundo J, Still ET and Willis DL, 1985. Metabolism of ingested U and Ra. *Health Phys.* 48, 601-33.
- Xu H, Yang HJ, Zhang Y, Clough R, Browning R and Li XM, 2009. Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mice exposed to cuprizone. *Behav Neurosci.* 123, 418-29.

- Zaire R, Griffin CS, Simpson PJ, Papworth DG, Savage JR, Armstrong S and Hulten MA, 1996. Analysis of lymphocytes from uranium mineworkers in Namibia for chromosomal damage using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mutat Res.* 371, 109-13.
- Zaire R, Notter M, Riedel W and Thiel E, 1997. Unexpected rates of chromosomal instabilities and alterations of hormone levels in Namibian uranium miners. *Radiat Res.* 147, 579-84.
- Zamora ML, Tracy BL, Zielinski JM, Meyerhof DP and Moss MA, 1998. Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol Sci.* 43, 68-77.