

UNIVERSITÉ PARIS XI

FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : Pharmacologie - Toxicologie

ANNÉE : 2010

SÉRIE DOCTORAT N° 1070

THÈSE

Présentée
À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE
FACULTE DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY
UNIVERSITÉ PARIS XI
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

Etude des mécanismes mis en jeu lors d'une exposition à l'uranium appauvri sur le système de détoxification *in vivo* et *in vitro*

Par

Caroline Rouas

soutenue le 1^{er} octobre 2010

JURY :

Rapporteur :	Pr. Bruno Lacarelle
Rapporteur :	Pr. Pirouz Shirali
Examineur :	Dr. Alain Courtière
Examineur :	Dr. Philippe Voisin
Directeur de thèse :	Pr. Marc Pallardy
Tuteur de thèse :	Dr Yann Guéguen

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Professeur Bruno Lacarelle et le Professeur Pirouz Shiralli qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteur.

Je remercie le Docteur Alain Courtière d'avoir accepté d'être membre du jury en tant qu'examinateur.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur Philippe Voisin pour m'avoir accueilli au sein du service de radiobiologie et d'épidémiologie et pour m'avoir fait l'honneur de participer en tant qu'examinateur à l'évaluation de ma thèse.

Je remercie le Professeur Marc Pallardy pour le suivi qu'il m'a accordé et les conseils qu'il m'a donnés au cours de mes années d'étude de pharmacie et durant ma thèse.

Je tiens à adresser un grand merci au Docteur Yann Guéguen pour toute son aide, sa disponibilité et la confiance qu'il m'a accordée durant ces années de travail que nous avons partagées.

Je remercie les Docteurs Patrick Gourmelon et Patrick Laloï qui m'ont accueillie au sein du service ainsi que le Dr. Isabelle Dublineau pour son accueil au sein du LRTOX.

Je remercie les Docteurs Christine Linard, Jean-Marc Bertho, Philippe Lestaevél et Maâmar Souidi pour leurs encouragements de tous les jours.

Un immense merci à la témoin la plus fidèle de cette thèse, Line Grandcolas, qui m'a soutenue et apporté toute l'aide nécessaire (professionnelle et personnelle) au bon déroulement de cette thèse.

Un tout aussi grand merci à mes co-thésardes préférées, Hélène Bensoussan et Radjini Racine sans qui cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est. J'ai eu beaucoup de chance de pouvoir partager ces années avec vous. Hélène, la salle de culture cellulaire n'a vraiment plus été la même sans toi ! Et Radji, mon seul regret est que nous n'ayons pas pu partager une année de plus notre cher bureau !

Un grand merci à Cédric Baudelin, Stéphane Grison et Sandrine Querneé pour tous les bons moments que nous avons partagés et tous ceux qui sont immortalisés dans ce fameux film !

Un merci du fond du cœur à David Suhard et Christine Tessier pour leurs bons conseils et pour le super travail que nous avons réalisé avec nos petites cellules !

Merci à ceux qui m'ont apporté sourire et soutien au cours de ces quatre années passées ensemble : Johanna Stefani, Elise Grignard, Hanaâ Berradi, Emilie Tissandié, Marie-Cécile Faure, Elodie Roméro, Nicholas Synhaeve et Arnaud Montroussel

Un petit clin d'œil particulier à Rym Abderrahmani. Nos chemins se croisent depuis plusieurs années... et ce même au Népal ! Je te souhaite une bonne continuation dans ta carrière de Chercheuse ! J'ai une grande confiance en ton esprit scientifique et je sais qu'il te portera loin.

Je tiens à remercier Clémentine Poisson pour l'aide qu'elle m'a dernièrement apportée. Je te passe le flambeau : amuse-toi bien !

Un grand merci aussi à Tény Ebrahimian... Je suis contente d'avoir été témoin de ton entrée au LRTOX. Merci pour les discussions et les conseils que tu m'as donnés au cours de ces quatre ans !

Je remercie également tous ceux que j'ai croisés et appréciés au cours de cette thèse : Fabienne, Karl, Marco, Frédéric, Bernadette, Olivia, Carinne, Thierry, Marième, Céline, Anaïs, Naya, Sébastien, Delphine, Julie, Fabrice, Yseult, Grégoire, Audrey, Baptiste et Patricia.

J'adresse un grand merci à tous mes amis qui, sans toujours savoir de quoi mes journées été réellement faites ont toujours su m'apporter ce dont j'avais besoin !

Un immense merci à ma famille ! Vous êtes un appui de tous les jours... Vos conseils, vos encouragements et votre disponibilité m'ont grandement aidée à mener à bien ce travail

Enfin, je souhaite remercier celui qui met un rayon de soleil dans toutes mes journées. Ta présence et ton soutien de tous les jours ont donné à cette thèse une saveur bien douce. J'ai commencé cette thèse en mademoiselle Rouas et la finie en madame Arnold...c'est le plus beau de tous mes résultats !

Table des matières

<i>Abréviations</i>	<i>1</i>
<i>Résumé</i>	<i>3</i>
<i>Avant-propos</i>	<i>5</i>
<i>Introduction</i>	<i>11</i>
Uranium	13
A Généralités	13
1. Historique	13
2. Propriétés physicochimique et radiologique	13
3. Origine naturelle et utilisations	15
4. Sources d'exposition et concentrations de référence	17
B Biocinétique	19
1. Absorption	19
2. Distribution	21
3. Métabolisme	21
4. Elimination	21
C Toxicité de l'uranium	23
1. Effet sur le rein	23
a. Mécanisme	23
b. Toxicité aiguë	25
c. Toxicité chronique	27
2. Effet sur l'os	29
a. Effet sur la formation osseuse	29
b. Impact sur l'homéostasie de la vitamine D	31
c. Données épidémiologiques	31
3. Effet sur le foie	33
a. Accumulation	33
b. Toxicité hépatique	33
4. Effet sur le système nerveux central	39
a. Effet sur la cognition et le comportement	39
b. Effet sur les neurotransmetteurs	39
c. Données épidémiologiques	41
5. Effet sur la reproduction et le développement	41
a. Effet sur la fertilité	41
b. Effet sur le développement embryo-fœtal et sur le développement post natal	43
c. Effet sur le développement péri et post natal	45
d. Perturbations endocriniennes	45
6. Effet sur le poumon	47
7. Effet sur l'intestin	47
8. Effet génotoxique et cancérigène	49
D Mécanisme de la toxicité de l'uranium	51
1. Uranium et mortalité cellulaire	51
2. Localisation cellulaire de l'uranium	53

3.	Uranium et stress oxydant	57
Les mécanismes de détoxification de l'organisme		59
A	Le rein : organe d'épuration	59
1.	Présentation du rein	59
a.	Rappel anatomique et principales fonctions biologiques	59
b.	Fonctions de détoxification rénales	61
2.	Les néphrotoxicités induites par des xénobiotiques : cas de la gentamicine	63
a.	Historique de la gentamicine	65
b.	Structure	65
c.	Mécanisme d'action	65
d.	Propriétés pharmacologiques et indications	65
e.	Pharmacocinétique	67
f.	Toxicité	67
B	Le foie : organe de métabolisation	71
1.	Présentation du foie	71
a.	Rappel anatomique et principales fonctions biologiques	71
b.	Fonction de détoxification : métabolisme des xénobiotiques, notions sur les EMXs	73
2.	Hépatotoxicités induites par des xénobiotiques : cas du paracétamol	81
a.	Historique du paracétamol	81
b.	Structure et propriétés chimiques	81
c.	Mécanisme d'action	83
d.	Propriétés pharmacologiques et indications	83
e.	Pharmacocinétique	83
f.	Toxicité	85
Problématique		89
Matériels et Méthodes		95
Matériels		97
A	Modèle animal	97
B	Modèle cellulaire	97
1.	NRK-52e	97
2.	HEK-293	97
3.	HepG2	99
4.	Cellules hépatiques primaires d'origine humaine	99
C	Préparation des solutions	99
1.	Uranium appauvri	99
a.	Contamination animale	99
b.	Contamination cellulaire	101
2.	Solutions médicamenteuses des expérimentations animales	101
a.	Solution de paracétamol	101
b.	Solution de gentamicine	103
3.	Solutions de culture cellulaire	103
a.	Solution relative au milieu de culture	103
b.	Inducteur ou inhibiteur enzymatique	103
Méthodes		105
A	Modèles d'expérimentation	105
1.	Contamination animale	105
2.	Traitement médicamenteux	105
a.	Traitement unique au paracétamol	105
b.	Traitement au paracétamol selon un schéma thérapeutique	105
c.	Traitement à la gentamicine	107
3.	Contamination des modèles cellulaires	107
a.	Test de cytotoxicité	107
b.	Observation SIMS	107
c.	Test d'induction enzymatique	109

	d.	Test d'inhibition enzymatique	109
B		Techniques d'analyses <i>post mortem</i>	109
	1.	Prélèvements du matériel biologique	109
	2.	Techniques biochimiques	111
	a.	Dosage de l'uranium tissulaire	111
	b.	Dosage des médicaments	111
	c.	Technique de dosage des paramètres biochimiques classiques	113
	3.	Analyse histologique	113
	a.	Préparation et déshydratation des échantillons	113
	b.	Inclusion des tissus dans des blocs de paraffine et coupe histologique	113
	c.	Déparaffinage des lames et coloration Hématoxyline Eosine Safran (HES)	115
	d.	Lecture histologique des lames	115
	4.	Technique de quantification de l'expression génique	115
	a.	Extraction des ARN messagers tissulaires	115
	b.	Rétro-transcription (RT)	117
	c.	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel	117
	5.	Technique de quantification de l'expression protéique	119
	a.	Extraction de protéines tissulaires totales	119
	b.	Préparation de sous-fractions cellulaires	119
	c.	Mesure de la concentration protéique	121
	d.	Analyse protéique par la technique de western-immunoblotting	121
	6.	Technique de l'analyse des activités enzymatiques	123
	7.	Dosage ELISA	125
	a.	KIM-1	125
	b.	Bêta 2-microglobuline	125
C		Techniques d'analyse <i>in vitro</i>	125
	1.	Culture cellulaire	125
	a.	Mises en culture	125
	b.	Préparation des milieux de culture	127
	c.	Entretien des lignées cellulaires	127
	2.	Test de cytotoxicité	127
	a.	Mesure de la LDH	127
	b.	Mesure de l'activité des protéases : test cytotox-Glo	127
	3.	Préparations et analyse SIMS et MET	129
	a.	Préparation des cellules	129
	b.	Analyse SIMS	129
	4.	Techniques d'analyses moléculaires	131
	a.	Extraction d'ARNm à partir de cellules en culture	131
	b.	Dosage de l'activité CYP3A totale sur hépatocytes en culture	133
	c.	Dosage des activités CYP 450 sur microsomes de rat	133
		Analyses statistiques	133

Résultats **135**

Effet d'une contamination chronique par l'UA sur le rein : intégrité et fonction de détoxification **137**

A		Introduction	139
B		Cas d'un traitement à dose croissante de gentamicine.	141
	1.	Préambule	141
	a.	Contexte	141
	b.	Objectif	141
	c.	Stratégie expérimentale	141
	2.	Résultats / Discussion	143
	a.	Validation des expositions	143
	b.	Paramètres généraux de santé	145
	c.	Bilan de l'état général de l'animal	145
	3.	Résumé – Conclusion	159

Effet d'une contamination chronique à l'UA sur le foie : fonction de métabolisation des xénobiotiques _____ 161

A	Introduction	163
B	Cas d'un traitement unique et à dose thérapeutique en paracétamol.	165
1.	Préambule	165
a.	Contexte	165
b.	Objectif	165
c.	Stratégie expérimentale	165
2.	Résultats / Discussion	167
a.	Paramètres généraux de santé	167
b.	Effets sur les enzymes du métabolisme des xénobiotiques hépatiques	169
c.	Dosage du paracétamol	183
3.	Résumé-Conclusion	185
C	Cas d'un traitement au paracétamol selon un schéma thérapeutique	187
1.	Préambule	187
a.	Contexte	187
b.	Objectif	187
c.	Stratégie expérimentale	187
2.	Résultats / Discussion	189
a.	Paramètres généraux de santé	189
b.	Effets sur les enzymes du métabolisme des xénobiotiques hépatiques	189
c.	Dosage du paracétamol	195
3.	Résumé-Conclusion	199

Effet de l'uranium *in vitro* : sur hépatocytes et cellules rénales en culture _____ 201

A	Introduction	203
B	Effet de l'uranium sur la viabilité cellulaire : détermination d'une concentration subtoxique	205
1.	Préambule	205
a.	Objectif	205
b.	Stratégie expérimentale	207
2.	Résultats – discussion	207
a.	Les cellules rénales	207
b.	Les cellules hépatiques : la lignée HepG2	213
c.	Discussion transverse	215
3.	Résumé – conclusion	217
C	Effets de l'uranium sur l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques	219
1.	Préambule	219
a.	Contexte	219
b.	Objectif	219
c.	Stratégie expérimentale	219
2.	Résultats – discussion	221
3.	Résumé- conclusion	229
D	Localisation de l'uranium à l'échelle cellulaire	231
1.	Préambule	231
a.	Contexte	231
b.	Objectif	231
c.	Stratégie expérimentale	231
2.	Résultats – discussion	233
3.	Résumé- conclusion	239

***Discussion et Perspectives* _____ 241**

Quels sont les effets de l'uranium appauvri sur les néphrotoxicités médicamenteuses ? _____ 245

Quels sont les effets de l'uranium appauvri sur le métabolisme des médicaments ? _____ 257

Par quel(s) mécanisme(s) l'uranium appauvri agit-t'il au niveau cellulaire ? _____ 283

Conclusion générale	295
Valorisations	301
Publications	301
A Publiées	301
B En cours de révision ou de rédaction	301
Communications	303
A Affichées	303
B Orales	303
Annexes	305
Annexe I a : Uranium : propriétés et effets biologiques après contamination interne	307
Annexe I b : Les néphrotoxicités induites par des xénobiotiques : causes, conséquences et outils d'évaluation	323
Annexe I c : Effect of nephrotoxic treatment with gentamicin on rats chronically exposed to uranium	349
Annexe I d : Acetaminophen induces xenobiotic-metabolizing enzymes in rat : impact of a uranium chronic exposure	365
Annexe I e : Distribution of soluble uranium in the nuclear cell compartment at subtoxic concentration	373
Annexe II : Fiches produits	391
A Paracetamol (Sigma-Aldrich, ref A7085)	391
B Gentamicine (sulphate) (Sigma-Aldrich, G3632)	391
C Uranium	392
D Dexaméthasone (Sigma-Aldrich, D1756)	393
E Rifampicine (Sigma-Aldrich, R3501)	394
F Isoniazide (Sigma-Aldrich, I3377)	394
Bibliographie	395

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Représentation des chaînes de désintégration de l'uranium	14
Figure 2 : Biocinétique de l'uranium et ses principaux organes cibles	18
Figure 3 : Précipité d'uranium dans les lysosomes d'ostéoblastes	52
Figure 4 : Proposition de mécanisme de cytotoxicité de l'uranium médiée par des espèces réactives de l'oxygène	56
Figure 5 : Schéma d'une coupe longitudinale de rein.	58
Figure 6 : Schéma de la coupe longitudinale d'un rein.	60
Figure 7 : Représentation schématique des fonctions glomérulaires et tubulaires dans la constitution des urines.	62
Figure 8 : Localisation rénale (A), tubulaire (B) et subcellulaire (C) des EMXs dans le rein	64
Figure 9 : Représentations 3D et plane du sulfate de gentamicine	66
Figure 10 : Schéma de certains mécanismes de la néphropathie induite par la gentamicine	68
Figure 11 : Structure fine du foie et organisation d'un lobule hépatique	70
Figure 12 : Schéma de la métabolisation d'un xénobiotique au niveau cellulaire	72
Figure 13 : schéma de la métabolisation d'un xénobiotique par les cytochromes P450	74
Figure 14 : Représentations 3D et plane du paracétamol	80
Figure 15 : Schéma du métabolisme hépatique du paracétamol chez le rat	82
Figure 16 : Schéma des hypothèses des voies de toxicité du paracétamol	84
Figure 17 : Schéma de l'hypothèse de l'implication des cellules de Küpffer dans la toxicité du paracétamol.	86
Figure 18 : Schéma du protocole expérimental « UA et traitement unique au paracétamol »	104
Figure 19 : Schéma du protocole expérimental « UA et traitement selon un schéma thérapeutique au paracétamol »	106
Figure 20 : Schéma du protocole expérimental « UA et traitement à la gentamicine»	106
Figure 21: Profil chromatographique de l'élution par HPLC du paracétamol et de ses métabolites majeurs	110
Figure 22 : Chromatogramme type du dosage de l'activité des CYP450 2A, 3A, 2B et 2C	122
Figure 23 : Schéma d'extraction des ARNm et des protéines du kit Qiagen AllPrep DNA/RNA/Protein	132
Figure 24 : Dosage de l'uranium dans le rein	142
Figure 25 : Dosage de la gentamicine urinaire	142
Figure 26 : Microphotographies représentatives des lésions rénales chez le rat, 24 heures après le dernier traitement à la gentamicine.	148
Figure 27 : Score des lésions rénales totales (A) et détail des types de dommages tubulo-interstitiels (B).	150
Figure 28 : Expression génique de KIM-1 dans le cortex rénal	152

Figure 29 : Expression protéique de KIM-1 dans le cortex rénal.	152
Figure 30 : Expression urinaire de KIM-1	154
Figure 31 : Expression génique de l'ostéopontine dans le cortex rénal	154
Figure 32 : Expression génique de la kallikréine dans le cortex rénal	156
Figure 33 : Expression génique et protéique d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques dans le cortex rénal	156
Figure 34 : Expression génique et protéique d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques au niveau hépatique	158
Figure 35 : Résumé des résultats obtenus lors du protocole « UA et traitement néphrotoxique à la gentamicine »	158
Figure 36 : Evolution des transaminases en fonction de la dose de paracétamol administré	164
Figure 37 : Expression génique et protéique des principales enzymes de phase II	168
Figure 38 : Détermination des concentrations plasmatiques des métabolites majeurs du paracétamol	170
Figure 39 : Dosage de l'activité de la glutathion-S-transférase hépatique	172
Figure 40 : Expression génique des principaux transporteurs de la phase III	174
Figure 41 : Expression génique et protéique des principales enzymes de phase I	176
Figure 42: Profil de l'expression protéique de CYP3A2 dans le foie	178
Figure 43 : Dosage de l'activité de la testostérone hydroxylase dans les microsomes hépatiques	180
Figure 44 : Détermination de la concentration plasmatique du paracétamol	182
Figure 45 : Résumé des résultats obtenus lors du protocole « UA et traitement unique au paracétamol »	184
Figure 46 : Expression génique et protéique des principales enzymes de phase II	190
Figure 47 : Expression protéique de GSTA dans le foie	192
Figure 48 : Dosage des concentrations plasmatiques des métabolites majeurs du paracétamol	192
Figure 49 : Expression génique des principales enzymes de phase I	194
Figure 50 : Analyse de l'expression protéique de CYP3A2 dans le foie	196
Figure 51 : Dosage de la concentration plasmatique du paracétamol	196
Figure 52 : Résumé des résultats obtenus lors du protocole « UA et traitement répété de paracétamol »	198
Figure 53 : Analyse de la mortalité cellulaire des cellules NRK-52e après incubation de 24, 48 et 72 h en présence de différentes concentrations de nitrate d'uranyle.	206
Figure 54 : Analyse de la mortalité cellulaire des cellules HEK-293 après incubation de 24, 48 et 72 h en présence de différentes concentrations de nitrate d'uranyle.	210
Figure 55 : Analyse de la mortalité cellulaire des cellules HepG2 après incubation de 24, 48 et 72 h en présence de différentes concentrations de nitrate d'uranyle.	212
Figure 56 : Microphotographies des cellules HepG2 incubées en présence de SVF durant les tests de cytotoxicité.	214
Figure 57 : Expression génique des isoformes de CYP3A chez HepG2 traités durant 24 heures à l'UA	220
Figure 58 : Expression génique des isoformes de CYP3A chez des hépatocytes humains traités durant 24	

heures à l'UA	222
Figure 59 : Activité enzymatique de CYP3A4 chez des hépatocytes humains traités durant 24 heures à l'UA.	224
Figure 60 : Activité enzymatique de CYP de microsomes de rat exposés à l'UA.	226
Figure 61 : Résumé des résultats obtenus sur l'induction génique de CYP3A lors de l'exposition des hépatocytes à l'uranium et/ou à un inducteur enzymatique	228
Figure 62 : Observation microscopique et SIMS de cellules HEK-293	230
Figure 63 : Observations microscopiques et SIMS de cellules HEK-293 exposées à différentes concentrations d'UA	232
Figure 64 : Observations microscopiques et SIMS de cellules HepG2 exposées à différentes concentrations d'UA	234
Figure 65 : observation par microscopie électronique de précipités d'UA chez les cellules HepG2 exposées à 100 µM d'UA	234
Figure 66 : Observations microscopiques et SIMS des ions calcium, sodium, potassium et uranium des cellules HepG2 exposées à 100 µM d'UA d'UA	236
Figure 67 : Superposition des images calcium et Uranium obtenue par l'utilisation du SIMS pour des cellules HepG2	236
Figure 68 : Détermination d'un rapport de quantification de l'U dans le noyau ou dans le cytoplasme	238
Figure 69 : Cinétique d'entrée de l'uranium dans les cellules HepG2	238
Figure 70 : Concentration d'uranium dans le rein en fonction de la concentration d'exposition.	246
Figure 71 : Concentration d'uranium dans le foie en fonction de la concentration d'exposition.	256
Figure 72 : Schéma de l'activation de PXR et de la transcription de CYP3A2	272
Figure 73 : Représentation des mouvements ioniques pour des cellules HEK293 exposées à des concentrations croissantes mais non cytotoxiques d'uranium.	288
Figure 74 : Représentation des hypothèses d'action de l'uranium sur les cellules	290
Figure 75 : Représentation du résumé des résultats obtenus	296

Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques physiques des différents isotopes de l'uranium	12
Tableau 2 : Composition et activité des trois types d'uranium	16
Tableau 3 : Etapes de déshydratation des échantillons biologiques par VIP	112
Tableau 4 : Etapes de déparaffinage des coupes avant coloration	112
Tableau 5 : Programmation des bains de la coloration Hématoxyline Eosine Safran	112
Tableau 6 : Critères d'évaluation des scores de lésions rénales	114
Tableau 7 : Séquences des amorces de PCR utilisées chez le rat	118
Tableau 8 : Composition des gels de polyacrylamide à 12 % pour Western-blot	120
Tableau 9 : Références des anticorps utilisés pour les Western-blot chez le rat	120
Tableau 10 : Composition des milieux de culture	126
Tableau 11 : Séquences des amorces de PCR utilisées chez le rat	130
Tableau 12 : Etude du poids final et de la perte de poids liée au traitement par la gentamicine.	144
Tableau 13 : Analyse des paramètres physiologiques, plasmatiques et urinaires.	146
Tableau 14 : Résultats de l'analyse des paramètres physiologiques et biochimiques des rats contaminés ou non par l'UA	166
Tableau 15 : Analyse des paramètres physiologiques et plasmatiques des rats après contamination par l'uranium et traitement répété au paracétamol	188
Tableau 16 : Distribution de l'uranium dans les différents organes en fonction de la durée de	244
Tableau 17 : Evolution des paramètres d'intégrité hépatique et rénale en fonction de la concentration d'uranium administrée	248
Tableau 18 : Expression et activité des enzymes du métabolisme des xénobiotiques après contamination par l'uranium appauvri en fonction la quantité administrée (0.2 à 120 mg/L d'eau de boisson).	260
Tableau 19 : Expression et activité des enzymes du métabolisme des xénobiotiques après contamination par l'uranium appauvri en fonction du temps de contamination (1 à 18 mois).	262

Abréviations

ABC : ATP-binding cassette	ICRP : international commission on radiological protection,
ADN : acide désoxyribonucléique	IM : intramusculaire
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire	IP : intrapéritonéale
AhR : Aryl hydrocarbon Receptor	IRSN : Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire
ALAT : alanine Amino Transférase	KIM-1 : Kidney injury molecule 1
AMM : autorisation de mise sur la marché	LDH : lactate déshydrogénase
APAP : paracétamol	MDR : multidrug resistance protein
APAP-gluc : APAP-glucuronide	MEM : Minimum Essential Medium
APAP-sul : APAP-sulfate	MET : microscopie à transmission électronique
ARE : antioxydant-responsive element	MRP2 : multidrug resistance-associated protein 2
ARNm : acide ribonucléique messenger	NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
ASAT : Aspartate Amino Transférase	NAG : N-Acetyl-β-D-glucosaminidase
ATP : adénosine triphosphate	NAPQI : N-acétyl-p-benzoquinone-imine
CAR : constitutive androstane receptor	PAPS : 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate
CIRC : centre international de recherche sur le cancer	PBS : phosphate buffer saline
CYP : cytochrome P450	pc : poids corporel
DL50 : dose létale 50%	PCR : polymerase chain reaction
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium	PS : Pénicilline/Streptomycine
DMSO : diméthylsulfoxyde	PXR : pregnane X receptor
DMT1 : divalent metal transporter 1	RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
DTT : Dithiothréitol	RT : transcription inverse
EDTA : acide éthylène diamine tetra acétique	RXR : retinoid X receptor
EMX : Enzymes du métabolisme des xénobiotiques	SC : sous-cutané
GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	ST : sulfotransférases
GSH : glutathion	SVF : Serum de veau foetal
GST : glutathion-S-transférases	TBS : Tris-buffered saline
HPLC : Chromatographie liquide haute performance	TCD : tube contourné distal
HPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	TCP : tube contourné proximal
HPβCD : 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrine	TfR : récepteur de la transferrine
IC50 : index de cytotoxicité de 50% des cellules	U : uranium
ICP-MS : inductively coupled plasma mass spectrophotometer	UA : uranium appauvri
	UGT : UDP-glucuronosyltransférases
	UN : uranium naturel
	VDR : vitamin D receptor
	XRE : xenobiotique-responsive element

Résumé

L'uranium (U) est un métal lourd naturellement présent dans la croûte terrestre. Le but de cette thèse est d'explorer, *in vivo* et *in vitro*, l'action de l'U sur les principaux protagonistes du système de détoxification de l'organisme : le rein et le foie avec notamment les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX). Dans le but de mimer une contamination chronique de l'organisme à une dose environnementale, le modèle *in vivo* est basé sur une exposition de 9 mois de rats males adultes à l'U (40 mg/L). *In vivo*, les résultats ont montré que nos conditions expérimentales n'induisent ni une néphrotoxicité ni une sensibilité du rein à exacerber une toxicité rénale induite par la gentamicine. Concernant le foie, l'U induit des modifications de l'expression génique de certains EMXs (dont particulièrement CYP3A). Ces modifications ne sont responsables de perturbations de la pharmacocinétique du paracétamol que lorsque ce dernier est administré à une dose hépatotoxique. Les résultats *in vitro* suggèrent que ces modifications des EMXs proviennent vraisemblablement d'un effet indirect de l'U couplé à des phénomènes d'adaptation de l'organisme impliquant des acteurs interagissant avec différentes cibles dont les EMX. Néanmoins, l'étude *in vitro* souligne le potentiel cytotoxique de l'U ainsi que sa présence dans les cellules (cytoplasme et noyau) sous forme soluble et/ou précipitée.

Uranium (U) is a heavy metal naturally presents in the environment. The aim of this work is to study effects of a U exposure on organs involved in the detoxification: the kidney and the liver (and notably the xenobiotics metabolizing enzymes (XME)). In order to mimic population chronic exposure, rats were contaminated during 9 months through the drinking water (40 mg/L). *In vivo* results show that U, in our experimental conditions, does not induce neither nephrotoxicity nor sensitivity to increase a renal toxicity induced by gentamicin. In the liver, U provokes impairments on the XME gene expression, particularly CYP3A. Nevertheless, paracetamol metabolism is modified only if it is administrated at a hepatotoxic dose. The *in vitro* results suggest an indirect effect of uranium on the XME, probably dependant of body adaptation mechanisms. Besides, *in vitro* studies were underline cytotoxic properties of U as well as the localisation of its soluble and/or precipitated forms in cytoplasmic and nuclear compartment.

Avant-propos

Avant-propos

Avant-propos

De nos jours, la pollution de l'environnement a une place majeure dans les préoccupations de l'opinion publique. Les polluants peuvent être d'origine naturelle ou anthropogénique de part l'essor démographique et l'expansion de l'industrialisation qui participent activement à la dégradation de l'environnement.

De plus en plus de démarches sont entreprises pour combler le manque de données scientifiques permettant d'estimer les risques d'exposition ou de co-exposition de la population à des polluants. Dans cette optique, l'institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN) a mis en place, depuis 2001, le programme ENVIRHOM dont l'objectif est de permettre une meilleure évaluation des risques liés à l'exposition chronique de radionucléides à la fois sur l'environnement et sur la santé humaine. L'un des axes de ce programme est d'évaluer les effets d'une contamination chronique à l'uranium sur les principales fonctions physiologiques (systèmes de détoxification, nerveux central, reproducteur, endocrinien, immunitaire, *etc.*).

L'uranium (U) est un métal lourd naturellement présent dans la croûte terrestre. Ses utilisations dans le cycle électronucléaire ou à des fins civiles et/ou militaires ont soulevé des inquiétudes concernant les risques pour la santé humaine. La contamination potentielle de la chaîne alimentaire (eau et aliments) par l'uranium est le principal risque d'exposition de la population.

L'organisme humain est fréquemment exposé à des composés exogènes potentiellement toxiques. Afin de s'en protéger, il est muni d'un système de détoxification (métabolisation, élimination) qui lui permet de biotransformer activement de nombreux médicaments, polluants chimiques et autres xénobiotiques. Le foie et le rein jouent un rôle central dans la biotransformation, le métabolisme et l'élimination par filtration de ces composés étrangers à l'organisme.

Les cibles majeures 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 qu'après ingestion chez le rat, l'uranium pouvait s'accumuler dans le foie et provoquer des perturbations des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX). Une contamination par l'uranium induirait-elle des modifications des processus de défense de l'organisme ?

Avant-propos

Avant-propos

Quelques rares études ont examiné les effets de l'uranium appauvri (UA) sur une famille primordiale des EMX : les cytochromes P450 (CYP). Ces études concernent principalement l'exposition à une dose élevée et toxique d'UA. Dans ces conditions, l'expression et l'activité des différentes isoformes des CYPs sont modifiées (Gueguen et al. 2006a) et la pharmacocinétique de certains médicaments est affectée (Moon et al. 2003; Pasanen et al. 1995). Néanmoins, les effets d'une contamination chronique par une dose non néphrotoxique d'UA sur les CYPs et le métabolisme de médicaments n'ont pas encore été clairement élucidés.

Par ailleurs, aucune étude n'a montré jusqu'à présent les effets d'une co-exposition à l'uranium et à un autre xénobiotique ayant également pour organe cible, le rein.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est d'étudier l'impact d'une contamination chronique à l'uranium sur deux acteurs clés de la détoxification : le foie et le rein. Au niveau du foie, nos travaux permettront d'évaluer l'impact des modifications des EMXs sur le métabolisme d'un médicament potentiellement hépatotoxique voire néphrotoxique après métabolisation par les CYPs : le paracétamol. Au niveau rénal, le modèle d'étude mis en place vise à mettre en évidence un potentiel effet synergique entre l'uranium et un médicament néphrotoxique, la gentamicine, et à évaluer les répercussions de cette co-exposition sur l'intégrité organique et fonctionnelle du rein. Enfin, dans le but d'estimer un effet direct ou indirect de l'uranium sur les EMXs, une approche *in vitro* menée sur des cellules hépatiques et rénales, a été réalisée.

Introduction

Tableau 1 : Caractéristiques physiques des différents isotopes de l'uranium

Isotope	Abondance naturelle (%)	Période radioactive (années)	Activité massique (Bq/g)	Emission principale pas désintégration (keV)	Propriétés particulières
²³² U	-	70	$8,2 \times 10^{11}$	α 5320 γ 57,8	
²³³ U	-	$1,6 \times 10^5$	$3,6 \times 10^8$	α 4824 γ 42,5	L'uranium 233 est un isotope largement utilisé dans les réactions nucléaires
²³⁴ U	0,0057	$2,5 \times 10^5$	$2,3 \times 10^8$	α 4775 γ 53,2	
²³⁵ U	0,719	$7,1 \times 10^8$	$8,0 \times 10^4$	α 4396 γ 53,2	L'uranium 235 est le seul noyau naturel aisément fissible et il présente donc un intérêt énergétique et nucléaire
²³⁶ U	-	$2,3 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	α 4495 γ 49,4	
²³⁸ U	99,275	$4,5 \times 10^9$	$1,2 \times 10^4$	α 4198 γ 49,4	L'uranium 238 est le plus courant des isotopes trouvés naturellement

Uranium

A Généralités

1. Historique

Le minerai d'uranium a été découvert par Martin Heinrich Klaproth en 1789. Ce n'est qu'en 1896, qu'Henri Becquerel découvre ses propriétés radioactives naturelles. Jusque là, le minerai d'uranium était utilisé dans la céramique et la faïence pour ses pigments colorés. Dans les années 1930, l'équipe d'Enrico Fermi met en évidence qu'un bombardement de l'uranium par des neutrons est à l'origine d'une émission d'énergie considérable. Cette découverte fait de l'uranium un objet de convoitise durant la seconde guerre mondiale. La fabrication de la première bombe atomique commence aux Etats-Unis en 1941 dans le cadre du projet Manhattan. En août 1945, deux bombes atomiques détruisent les villes de Hiroshima et de Nagasaki au Japon.

De la fin de la guerre à nos jours, l'utilisation civile de l'uranium s'est largement développée. La construction de centrales nucléaires a connu une expansion rapide notamment lors de la crise pétrolière de 1973.

2. Propriétés physicochimique et radiologique

De symbole U, l'uranium est le dernier élément naturel du tableau périodique de Mendeleïv. L'atome d'uranium possède 92 protons et 135 à 148 neutrons. Il fait partie de la famille des actinides. A l'état pur, l'uranium est un métal gris radioactif très dense (70% plus dense que le plomb).

L'atome d'uranium possède 6 électrons périphériques qui sont facilement extractibles et peut se présenter aux valences III, IV, V ou VI. Il se retrouve très souvent en combinaison avec d'autres éléments tels que l'oxygène, l'azote, le soufre ou le carbone. En solution aqueuse, l'U est préférentiellement en valence VI et peut former des complexes par l'intermédiaire de l'ion uranyle UO_2^{2+} .

Introduction

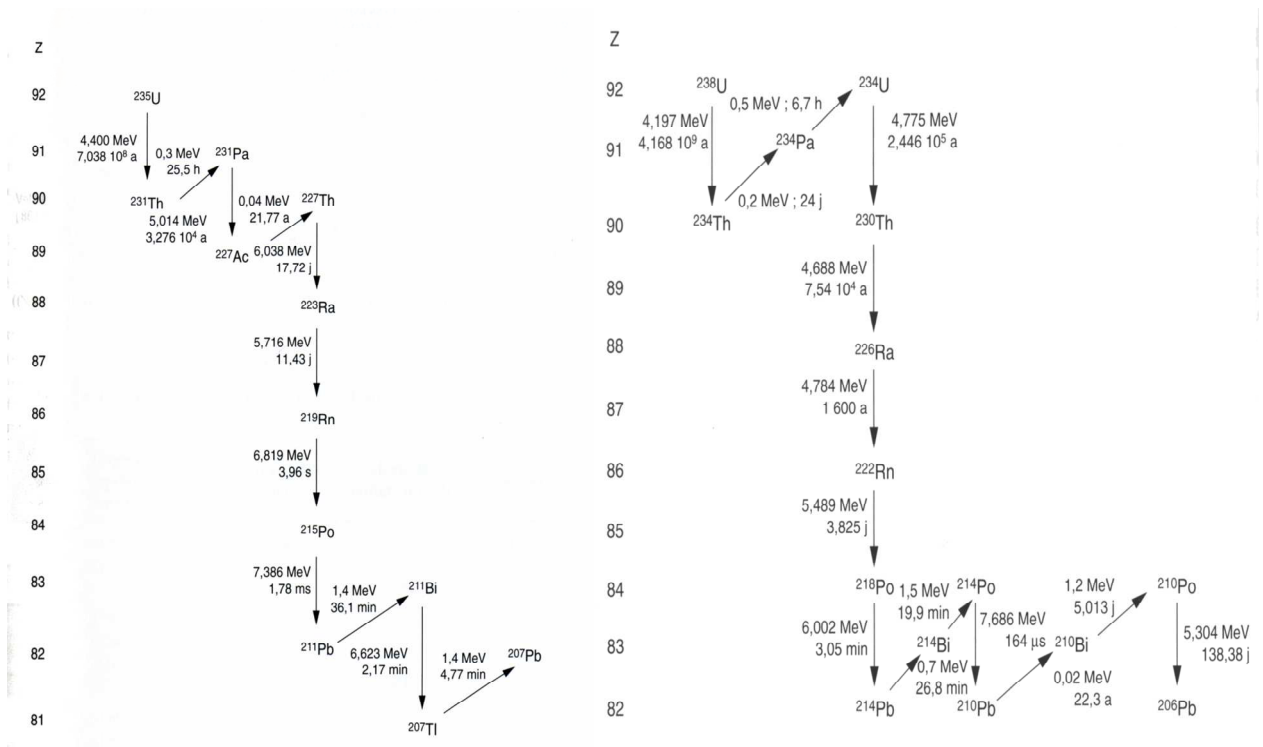


Figure 1 : Représentation des chaînes de désintégration de l'uranium

(d'après Métivier, 2001)

Introduction

L'uranium possède 17 isotopes de nombres de masse compris entre 227 et 242. Seuls l'²³⁸U, l'²³⁵U et l'²³⁴U existent à l'état naturel. Les proportions entre les trois isotopes sont généralement : ²³⁸U : 99,28%, ²³⁵U : 0,71% et ²³⁴U : 0,0054% (Tableau 1).

La figure 1 représente les chaînes de désintégration de l'²³⁵U et de l'²³⁸U qui conduisent à des noyaux de plomb stables. Il est à noter que l'²³⁴U est, quant à lui, un produit de décroissance de l'²³⁸U. Par ailleurs, la désintégration de l'uranium est à l'origine de la production de radon et de thorium.

L'uranium appartient aux radionucléides émetteurs principalement de particules *alpha* (α) mais également *gamma* (γ). En raison du faible pouvoir pénétrant des rayonnements *alpha*, l'exposition externe à l'uranium présente un risque mesuré (les rayonnements sont arrêtés par l'épiderme de la peau). Cependant, en cas de contamination interne, l'uranium peut être responsable d'une irradiation des cellules et des tissus ; d'autant plus que sa demi-vie est très longue.

3. Origine naturelle et utilisations

L'uranium est un métal présent dans tous les milieux naturels. Il est l'élément le plus lourd naturellement présent sur Terre. La dose moyenne d'uranium dans la croûte terrestre est estimée entre 0,003 et 11 mg/kg (Anke et al. 2009). Sa présence dans l'environnement provient essentiellement de l'érosion des roches où la répartition des teneurs est très hétérogène. En effet, la distribution de l'uranium dans la croûte terrestre dépend, entre autre, des origines géologiques des terrains (Anke et al. 2009). Alors que l'OMS estime la concentration dans l'eau de boisson du plomb à environ 5µg/L (WHO 2003) et celle du cadmium à 1 µg/L (WHO 2004b) celle de l'uranium est estimée entre 0,05 et 4 µg/L en fonction des territoires (WHO 2004a). Certaines régions sont donc naturellement plus riches en uranium que d'autres. Les territoires du Nouveau-Mexique et de l'Australie centrale possèdent des concentrations d'uranium pouvant excéder les 20 µg/L (Hakonson-Hayes et al. 2002; WHO 2004a). La concentration maximale (20 mg/L) a été recensée en Finlande, dans des eaux de puits (Juntunen 1991; Salonen 1994).

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

	Composition isotopique			Activité spécifique
	^{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%	$1,4 \cdot 10^4 \text{Bq/g}$

Introduction

Les propriétés radioactives de l'uranium sont à l'origine d'une exploitation civile et militaire de par, notamment, le processus d'enrichissement. L'uranium peut, en effet, être enrichi en isotope 235 à hauteur de 4% en vue d'obtenir un combustible pour les centrales nucléaires et être à l'origine de production d'électricité. L'enrichissement en isotope 235 de l'uranium peut également atteindre jusqu'à 90%. Dans ce cas son utilisation est militaire (arme nucléaire, telle que la bombe atomique). L'enrichissement de l'uranium en isotope 235 lui confère une radioactivité plus importante que celle observée dans l'uranium naturel (UN).

L'uranium appauvri, sous-produit de l'enrichissement de l'uranium, est un résidu de l'industrie nucléaire. Il est disponible en grande quantité et bon marché. Il est très prisé pour sa dureté et sa densité (19 g/cm³, 70% plus dense que le plomb). Il est ainsi utilisé pour le lestage d'ailes d'avion ou de quilles de bateaux, dans l'industrie de l'armement (blindage des tanks, têtes d'obus) ou encore pour la fabrication de boucliers de protection utilisés dans la médecine nucléaire. L'appauvrissement de l'UA en isotope 235 lui confère une radioactivité légèrement moins importante que celle observée pour l'UN. Les propriétés chimiques sont néanmoins inchangées (Tableau 2).

4. Sources d'exposition et concentrations de référence

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'uranium est présent dans l'environnement (sol, eau) et contamine potentiellement la chaîne alimentaire (Anke et al. 2009; Hakonson-Hayes et al. 2002). A ces apports géologiques s'ajoutent des apports résultant de l'activité industrielle : exploitation de gisements (Markich et al. 2002), utilisation d'engrais phosphatés contenant des teneurs élevées en uranium puisque ce dernier se lie aux ions phosphates (Saueia and Mazzilli 2006), utilisation militaire d'UA conduisant à un enrichissement des territoires bombardés (Danesi et al. 2003; Di Lella et al. 2005; Milacic and Simic 2009).

Une étude récente, menée en Europe et explorant différents scénarios d'exposition, a estimé que l'exposition globale à l'uranium varie entre 0,05 et 0,45 µg/kg (AFSSA 2010). La part de l'exposition hydrique est d'environ 80% et l'apport journalier en uranium par les aliments est estimé entre 1 et 4 µg/j. Dans ce récent rapport, l'AFSSA s'accorde avec le rapport de l'OMS (WHO 2004a) et retient la valeur limite dans l'eau à 15µg/L (AFSSA 2010).

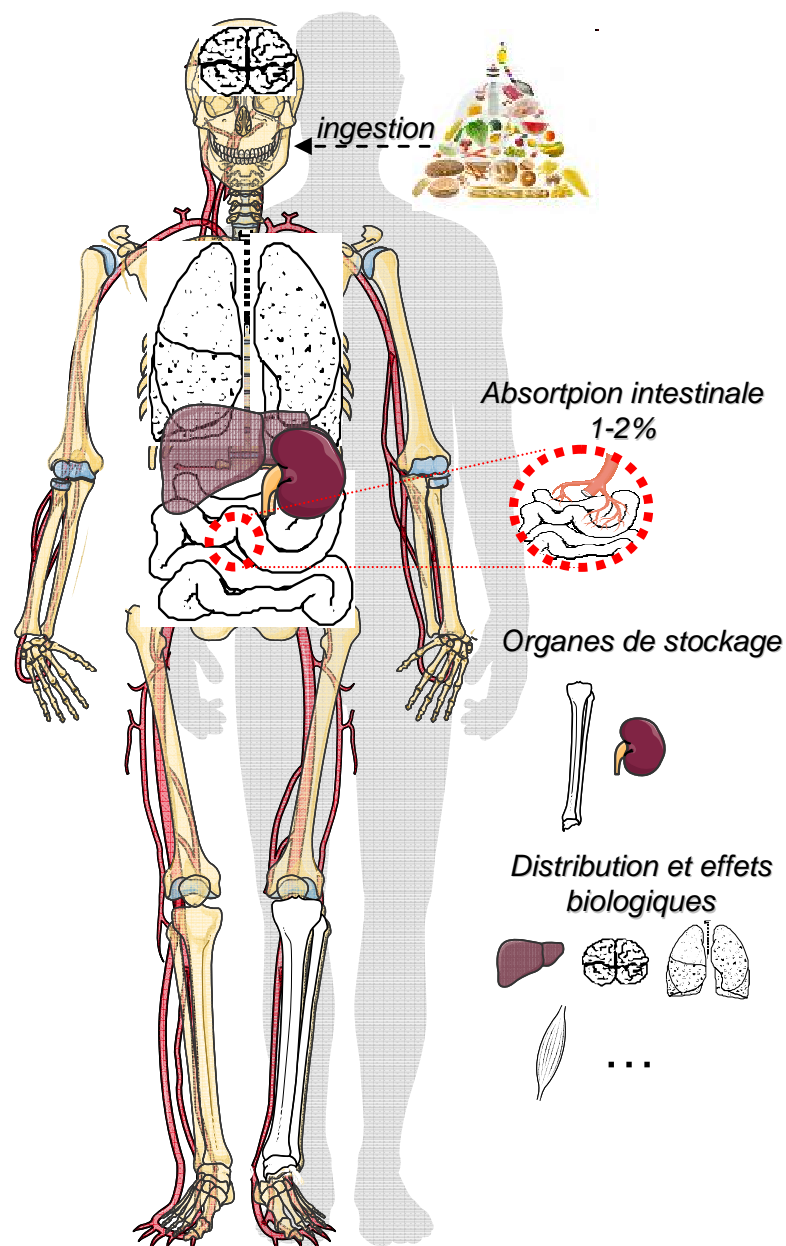


Figure 2 : Biocinétique de l'uranium et ses principaux organes cibles

L'uranium est distribué par le sang depuis son absorption (intestin grêle) jusqu'aux différents tissus de l'organisme. Le rein est chronologiquement le premier organe cible de la toxicité de l'uranium. Il est également le lieu de stockage du radioélément à court terme (quelques jours à quelques semaines). L'os constitue le tissu de stockage de l'uranium à long terme (quelques mois à quelques années). L'uranium est distribué également dans de nombreux autres organes dont le foie, le SNC, les muscles lors d'ingestion, et les poumons lors d'inhalation.

B Biocinétique

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

La figure 2 schématise la biocinétique de l'uranium.

1. 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 dépendant de la consommation hydrique et alimentaire. Il touche ainsi la population dans sa globalité. L'absorption de l'uranium a lieu au niveau de l'intestin grêle (Dublineau et al. 2005) et dépend de nombreux facteurs avec notamment une hétérogénéité inter-espèces. Par exemple, chez le rat le taux d'absorption intestinale est de 0,4-1% contre 1-2% chez l'Homme (La Touche et al. 1987; Sullivan 1980; Tracy et al. 1992). D'une manière générale, l'uranium hydrosoluble est mieux absorbé que la forme insoluble. La commission internationale de la protection radiologique (ou international commission on radiological protection, ICRP) indique que la fraction d'absorption intestinale des formes solubles de l'uranium est de 2% contre 0,2% pour les formes insolubles. La fraction d'absorption gastro-intestinale peut également varier en fonction des conditions du régime alimentaire (Sullivan et al. 1986).

Les travailleurs du cycle du nucléaire ont un risque d'exposition supplémentaire à l'uranium. Ils sont en effet potentiellement exposés au composé par inhalation voire par contamination *via* les blessures. Peu de données sont disponibles sur le coefficient de transfert lors de l'absorption pulmonaire. Cependant, en raison des systèmes de protection respiratoire individuelle des travailleurs, la contamination est rare et à très faibles doses. La contamination percutanée est également 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 (Petitot et al. 2004; Tymen et al. 2000; Ubios et al. 1997).

Introduction

2. Distribution

Le taux d'absorption intestinale chez l'Homme étant proche de 2%, la majorité de l'uranium ingéré est éliminé très rapidement de l'organisme directement dans les fèces.

Cependant, après absorption, l'uranium est présent sous forme d'ion uranyle (UO_2^{2+}) dans le sang. En raison de sa grande affinité avec les groupes phosphates, carboxyles et hydroxyles, l'uranium se lie à certaines protéines telles que la transferrine ou l'albumine (Cooper et al. 1982). Après absorption, l'uranium est rapidement distribué de manière hétérogène dans l'organisme (Craft et al. 2004; Paquet et al. 2006; Pellmar et al. 1999). Entre 70 et 80% de la fraction absorbée est éliminée dans les 24 premières heures *via* les urines. Une portion de l'uranium filtré au niveau du glomérule n'est cependant pas excrétée dans les urines mais est réabsorbée par le tube contourné proximal. Il s'accumule ainsi dans le rein qui devient alors la première cible des effets toxiques (Craft et al. 2004; La Touche et al. 1987; Leggett 1989).

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).

3. Métabolisme

A l'heure actuelle, aucune donnée en rapport avec le métabolisme propre de l'uranium au niveau du foie n'est connue.

4. Elimination

La majorité de l'uranium ingéré (>90 %) est directement éliminée dans les fèces et n'est pas absorbée (Sztajnkrzyer and Otten 2004; WHO 2001). Par ailleurs, la plus grande partie de ce qui est absorbé (>70%) est éliminée dans les urines durant les 24 premières heures. On considère que 85% de la quantité absorbée est éliminée dans les 3 premiers mois. La demi-vie biologique du composé est comprise entre 300 et 5000 jours en raison notamment de la rétention osseuse (Craft et al. 2004; La Touche et al. 1987; Paquet et al. 2006; Pellmar et al. 1999; Sztajnkrzyer and Otten 2004).

Introduction

C Toxicité de l'uranium

L'uranium est un composé chimique qui possède également des propriétés radioactives. La toxicité radiologique varie en fonction de son isotopie et de son degré d'enrichissement en isotope 235. A l'inverse, quel que soit l'isotope considéré, le risque chimique reste identique. Pour l'UA et l'UN, la toxicité chimique serait prépondérante (Craft et al. 2004; Sztajnkrzyca et al. 2004). L'UA et l'UN étant de composition (chimique et radiologique) proche, l'étude des effets toxiques de l'UA permet donc d'évaluer le risque auquel la population générale est exposée.

La dose létale 50 (DL50) de l'uranium (dose qui induit 50% de mortalité des animaux après exposition unique) est estimée à 204 mg/kg chez le rat après exposition orale unique par gavage. L'exposition aiguë à de fortes doses d'uranium se manifeste chez le rongeur par une altération de l'état général de l'animal (perte de poids, hypothermie, tremblements, hémorragies oculaires et nasales, myosis, exophtalmie) (Domingo et al. 1987). Les premiers signes de la toxicité de l'uranium apparaissent au niveau du rein. Les effets sur les autres organes (foie, cerveau, organes reproducteurs et os) apparaissent plus tardivement. Pour une revue générale sur les effets de l'uranium, voir l'annexe la (Souidi et al. 2009)

1. Effet sur le rein

Le rein est connu comme étant la cible majeure de l'uranium. La néphrotoxicité est le premier symptôme d'une intoxication à l'uranium. Après exposition à forte dose (10 mg/kg, sc ou 210 mg/kg, *per os*), la mort des animaux est attribuée à une néphrite tubulaire aiguë (Domingo et al. 1987).

a. Mécanisme

Les mécanismes exacts de la toxicité de l'uranium restent à l'heure actuelle mal connus. On sait cependant que du fait de son rôle épurateur, le rein est continuellement exposé à l'uranium. En effet, l'uranium est filtré à travers la membrane glomérulaire et passe au niveau du tubule contourné proximal (TCP). A ce niveau, les ions uranyles peuvent être réabsorbés par les cellules épithéliales de la bordure en brosse. Une fois dans la cellule, il a été observé la formation de précipités d'uranium sous forme d'aiguilles de phosphate d'uranyle. La plupart des études attribue la présence de ces précipités au fait que l'uranium est présent dans les lysosomes et précipite du fait de la baisse du pH (Galle 1997; Leggett 1989).

Introduction

Cependant, l'entrée de l'uranium par endocytose est actuellement discutée et des travaux tendent à dire que l'uranium pourrait rentrer dans les cellules par l'intermédiaire de transporteur(s).

b. Toxicité aiguë

Depuis plus de 30 ans, des études montrent qu'une injection IV de nitrate d'uranyle (25 mg/kg) induit, chez le rat, une polyurie voire une oligurie (Blantz 1975). Lors de cette étude, les auteurs suggèrent deux mécanismes : un lié à une atteinte tubulaire et à la fuite des solutés absorbés à travers la membrane endommagée et l'autre à une atteinte structurelle glomérulaire. Depuis, les études se sont multipliées et les connaissances des mécanismes d'atteinte rénale liée à une exposition à l'uranium se sont affinées. Chez le rongeur, que l'exposition soit par injection sous-cutanée (10 mg/kg de nitrate d'uranyle) ou intrapéritonéale (0,66 ou 1,32 mg/kg de fluorure d'uranyle), les lésions rénales touchent préférentiellement les deux tiers distaux du tube contourné proximal (Diamond et al. 1989; Haley 1982; Haley et al. 1982).

Histologiquement, l'uranium induit une perte focale de la bordure en brosse du TCP ainsi qu'une augmentation de la présence de vacuoles dès la première heure consécutive à l'injection sc de nitrate d'uranyle (10 mg/kg). Dans ce même protocole, mais 5 jours après le traitement, l'apparition de foyers nécrotiques est notée (Haley 1982). Ce type d'atteinte est observé chez le rongeur mais aussi chez le lapin traité par injection intraveineuse d'acétate d'uranyle (2 mg/kg) (Kobayashi et al. 1984). A titre indicatif, Diamond et son équipe ont estimé la concentration minimale induisant une atteinte rénale entre 0,7 et 1,4 µg d'uranium par gramme de rein chez le rat (Diamond et al. 1989).

Biochimiquement, un certain nombre de marqueurs témoignent de l'atteinte rénale. Une corrélation a ainsi été démontrée, chez le rat, entre la dose d'U injecté (IM), la concentration d'U au niveau du rein et des urines suite à cette injection et la concentration urinaire du N-acétylglucosamine (NAG) et sanguine de l'urée et de la créatinine (Fukuda et al. 2006). Le traitement en sc par l'UA (11,5 mg/kg) induit chez le rat, une augmentation de la créatinine et de l'urée plasmatique (Gueguen et al. 2006a). De même, après un traitement au fluorure d'uranyle, les atteintes histologiques précédemment décrites sont associées à une protéinurie et une enzymurie (Diamond et al. 1989). Par ailleurs, une diminution de taux de filtration glomérulaire est observée quelques heures après injection intraveineuse de 25 mg/kg de nitrate d'uranyle (Blantz 1975) ou 1 semaine après injection sous cutanée de 10 mg/kg (Haley et al. 1982). Une augmentation de la clairance de la créatinine associée à une augmentation de la créatinine

Introduction

plasmatique est consécutive à l'injection IV d'acétate d'uranyle (2 mg/kg) chez le lapin (Kobayashi et al. 1984). Le caractère réversible de la lésion est montré à travers différents modèles (Diamond et al. 1989; Haley et al. 1982; Kobayashi et al. 1984). Malgré une régénération tubulaire, une fibrose interstitielle et une infiltration de cellules mononuclées indiquent des conséquences chroniques de l'atteinte rénale (Haley et al. 1982).

Bien que la majorité des effets concernent l'atteinte du tubule proximal, l'atteinte glomérulaire a également été décrite après traitement au nitrate d'uranyle (Haley 1982). Après contamination au fluorure d'uranium, l'anse de Henlé ainsi que les tubes collecteurs sont également affectés (Diamond et al. 1989).

c. Toxicité chronique

En cas de contamination chronique (*per os* ou par implantation en intra- musculaire), les atteintes principales sont décrites au niveau du TCP avec notamment l'apparition de vacuoles et de vésicules chez le rat (Gilman et al. 1998; Ortega et al. 1989; Zhu et al. 2009b) ou chez le lapin (Taylor and Taylor 1997). Il a ainsi été montré une dégénérescence de l'épithélium associée à une perte focale de la bordure en brosse (Taylor et al. 1997; Zhu et al. 2009b) Des atteintes glomérulaires et de l'interstitium ont également été notées chez le rat (Gilman et al. 1998; Zhu et al. 2009b).

Biochimiquement, une augmentation de l'urée et de la créatinine plasmatiques ainsi que de la β 2-microglobuline et de l'albumine urinaires a été observée chez les rats ayant subi, par intervention chirurgicale, une mise en place d'implants d'uranium appauvri dans le muscle gastrique (Zhu et al. 2009b). Par ailleurs, d'après une étude menée chez le rat exposé à l'uranium *via* son eau de boisson (40 mg/L), l'exposition à l'uranium est responsable d'une augmentation tubulaire des vésicules d'inclusion d'oxyde de fer (Donnadieu-Claraz et al. 2007).

Des travaux de toxico-génomique menés sur la souris exposée au nitrate d'uranyle soit par l'eau de boisson (80 mg/L) soit par injection IP (5 mg/kg) montrent des perturbations de l'expression génique de plus de 200 gènes dont certains impliqués dans le stress oxydant, la transduction des signaux cellulaires, le métabolisme et le catabolisme ou encore le transport cellulaire (Taulan et al. 2006; Taulan et al. 2004). Par ailleurs, des études menées chez des rats contaminés durant 9 mois à de l'U *via* leur eau de boisson (40 mg/L) montre une augmentation de l'expression génique d'EMXs (CYP3A1, CYP2B1) ainsi que de PXR, un récepteur nucléaire sollicité dans leur expression (Souidi et al. 2005).

Introduction

Introduction

Sur ce même modèle, il a également été montré une diminution de l'expression génique de CYP24A1 impliqué dans le catabolisme de la vitamine D (Tissandie et al. 2007).

Chez l'Homme, des études épidémiologiques ont été menées sur des populations consommant de l'eau de puits dont la teneur en uranium était supérieure aux recommandations. L'augmentation de l'excrétion urinaire du glucose ainsi que l'augmentation de la phosphatase alcaline et de la β 2-microglobuline témoignent d'une atteinte tubulaire potentielle chez les populations exposées (Zamora et al. 1998; Zamora et al. 2009). Une augmentation transitoire de la β 2-microglobuline a également été rapportée chez un enfant exposé à l'uranium *via* l'eau de puits (entre 866 et 1160 $\mu\text{g/L}$) (Magdo et al. 2007). Une autre étude menée sur une population de 325 personnes exposées à l'eau contenant de l'uranium (moyenne d'exposition 28 $\mu\text{g/L}$) a montré une corrélation entre la concentration d'uranium dans l'eau, celle retrouvée dans les urines et une augmentation de l'excrétion du calcium et du phosphate (Kurttio et al. 2002). Ces effets n'ont cependant pas été retrouvés dans des travaux postérieurs menés par la même équipe sur la même cohorte (Kurttio et al. 2006). Les études de Selden montrent également l'absence de variation de certains marqueurs de néphrotoxicité (dont la β 2-microglobuline) malgré l'exposition de la population étudiée à des concentrations d'uranium variant entre 0,2 et 470 $\mu\text{g/L}$ (Selden et al. 2009).

Par ailleurs, bien qu'une étude conclue en l'absence de contamination de l'organisme des militaires des suites de l'exposition aux obus (à tête d'uranium) durant les conflits du Golfe et des Balkans (Cazoulat et al. 2008), un suivi des vétérans souligne une tendance non significative à des dysfonctionnements tubulaires rénaux attribuables à l'uranium (McDiarmid et al. 2009; McDiarmid et al. 2006).

2. Effet sur l'os

L'os est l'organe de stockage de l'uranium à long terme (Pellmar et al. 1999; Zhu et al. 2009a). 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 (Leggett 1994; Neuman et al. 1949; Priest et al. 1982). L'uranium se dépose préférentiellement sur les zones osseuses en croissance et les zones de calcification (Priest et al. 1982).

a. Effet sur la formation osseuse

La plupart des études s'accordent à dire que le principal effet de l'uranium sur l'os est une diminution de sa formation et une augmentation de la résorption osseuse.

Introduction

Introduction

Ceci a été décrit chez le rat après implantation sous cutanée (SC) de poudre UO_2 (0,125 mg/kg) (Diaz Sylvester et al. 2002), injection intrapéritonéale (IP) de nitrate d'uranyle (2 mg/kg) (Guglielmotti et al. 1985; Ubios et al. 1991; Ubios et al. 1994) ou injection intramusculaire (IM) d'uranium appauvri (0,2 à 2 mg/kg) (Fukuda et al. 2006). Par ailleurs, l'injection intrapéritonéale de nitrate d'uranyle (576 $\mu\text{g}/\text{kg}$) chez des rats provoque l'apparition d'un stress oxydant dans l'os qui se manifeste par un processus de peroxydation lipidique et des dommages histopathologiques (Ghosh et al. 2007).

En contamination chronique, une inhibition de la formation osseuse a également été observée chez des rats qui ont été exposés durant 30 jours à 0,125 mg/kg d'uranium en implant sous-cutané (Diaz Sylvester et al. 2002). Par ailleurs, il est décrit que chez le rat, la présence de l'uranium dans l'os est proportionnelle à la quantité administrée (Arruda-Neto et al. 2004).

A l'échelle de la cellule, il a été montré que l'uranium active deux marqueurs de la formation osseuse et de la minéralisation (ostéocalcine et sialoprotéine osseuse) à des concentrations non-cytotoxique alors qu'il les inhibe à concentration cytotoxique (Milgram et al. 2008a). En parallèle, l'équipe de Miller a également mis en évidence que l'uranium est susceptible de transformer les cellules (ostéoblastes) en un phénotype tumorigène (Miller et al. 1998a; Miller et al. 2001).

b. Impact sur l'homéostasie de la vitamine D

Les effets décrits ci-dessus sont soutenus par des modifications observées chez le rat, du taux de la forme active de la vitamine D (jouant un rôle crucial dans la minéralisation osseuse) et des CYPs qui y sont associés aussi bien en cas d'exposition aiguë à l'UA (injection intra-gastrique, 204 mg/kg) (Tissandie et al. 2006) qu'en cas d'exposition chronique par ingestion (9 mois, 40 mg/L) (Tissandie et al. 2007).

c. Données épidémiologiques

Chez l'Homme, une étude menée sur une population (146 hommes et 142 femmes) exposée à l'uranium par l'eau de boisson (24 $\mu\text{g}/\text{L}$) durant environ 13 ans suggère une corrélation entre la consommation d'uranium et une activité de remodelage osseux notamment avec l'augmentation de certains marqueurs de l'activité osseuse (ostéocalcine, télopeptide Cterminal du collagène de type-1) (Kurttio et al. 2005).

Introduction

Par ailleurs, il apparaît que la concentration de l'uranium dans l'os et le remodelage osseux qui en découle dépendent de l'âge de l'individu ainsi que de son statut métabolique (Lariviere et al. 2007).

3. Effet sur le foie

a. Accumulation

De nombreuses études rapportent l'accumulation de l'uranium dans le foie. Cette accumulation est décrite aussi bien après injection (Bulman 1980), implantation de fragments d'uranium appauvri (Pellmar et al. 1999; Zhu et al. 2009a) qu'après exposition *per os* (Gilman et al. 1998; Ortega et al. 1989; Paquet et al. 2006).

Par ailleurs, les concentrations d'uranium ont été radio-chimiquement déterminées dans des échantillons de poumon, de rein, de foie et d'os issus de l'autopsie d'un homme de 50 ans, travailleur dans la sphère de l'uranium durant 26 ans. Un ratio de 63 : 2,8 : 1 a été rapporté pour les quantités présentes dans l'os, le foie et les reins (Kathren et al. 1989). Cependant, dans les études expérimentales de contamination interne chronique, la quantité d'uranium retenue dans le foie apparaît le plus souvent comme inférieure à celle retrouvée dans le rein et l'os (La Touche et al. 1987; Pellmar et al. 1999). Néanmoins, après ingestion par l'eau de boisson d'acétate d'uranyle, il apparaît que le foie est un des premiers organes d'accumulation. En effet, alors que l'uranium n'est pas détectable ni dans l'os, ni dans d'autres organes (cerveau, rate, thyroïde, etc.), on note sa présence dans le foie (ainsi que dans les reins et dans le muscle), pour une exposition de 4 semaines à 2 mg/kg/j d'acétate d'uranyle. A une dose supérieure (4 mg/kg/j), l'uranium est présent dans beaucoup plus de tissus : cœur, poumon, thyroïde et l'os (Ortega et al. 1989).

Il est également décrit des variations de concentrations tissulaires en fonction du temps de contamination. Après contamination chronique par l'eau de boisson de nitrate d'uranyle (40 mg/L), on note une concentration hépatique maximale 312 jours (environ 10 mois) après le début de la contamination avec une augmentation de 50 fois entre le 186^{ème} et le 312^{ème} jour (Paquet et al. 2006).

b. Toxicité hépatique

Le bilan hépatique n'est pas systématiquement effectué lors des études de toxicité de l'uranium. Certaines d'entre elles mettent en évidence une atteinte organique mais également fonctionnelle du foie.

Introduction

■ Toxicité organique

Toxicité aiguë

Une diminution du poids du foie a été mise en évidence après injection aiguë d'uranium chez le rat en intra-vasculaire (5 mg/kg ; (Moon et al. 2003)) ou en sous-cutanée (11,5 mg/kg ; (Gueguen et al. 2006a)). Par ailleurs, il a été montré une augmentation des transaminases (Alanine-aminotransférase (ALAT) et Aspartate Aminotransférase (ASAT)) après injection sous-cutanée d'uranium chez le rat (Gueguen et al. 2006a) et après ingestion par l'alimentation chez la souris (Ozmen and Muhittin 1998).

Toxicité chronique

Très peu d'études dressent un bilan hépatique lors des études de toxicité chronique de l'uranium. Cependant, 64 jours à 80 mg/kg d'acétate d'uranyle *via* son eau de boisson induit une diminution du poids du foie chez la souris. Concernant les transaminases, deux études rapportent une diminution des transaminases en cas d'exposition à l'uranium *via* l'eau de boisson durant 4 semaines (Ortega et al. 1989) ou durant 9 mois (Souidi et al. 2005). Il est important de noter que la diminution des transaminases n'est pas un marqueur d'hépatotoxicité mais plutôt d'un déficit en vitamine B6. Ces études ne montrent pas d'analyses complémentaires qui pourraient expliquer cette diminution.

■ Toxicité fonctionnelle

Toxicité aiguë

Une série d'étude a été menée sur le rat afin d'évaluer les impacts d'une insuffisance rénale induite par l'uranium sur la cinétique de métabolisation de certains xénobiotiques au niveau hépatique. Les animaux ont ainsi été traités par injection IV d'uranium à des doses induisant une néphrotoxicité. Ces études ont mis en évidence que, dans ces conditions, l'uranium est responsable de la modification de l'expression génique de certaines enzymes du métabolisme des xénobiotiques et de la pharmacocinétique de xénobiotiques dont le métabolisme dépend de ces enzymes (Chung and Lee 2006; Chung et al. 2003; Lin and Levy 1982; Moon et al. 2003; Yu et al. 2002).

Introduction

Introduction

Par ailleurs, une diminution de l'activité totale des CYP3A associée à une augmentation de l'expression génique de CYP3A1 a été décrite chez des rats traités par injection sous-cutanée de nitrate d'uranyle (11,5 mg/kg) (Gueguen et al. 2006a). L'instillation intratrachéale de dioxyde d'uranium (9,3 kBq) chez le rat induit également des modifications de l'activité des CYP2A1, 2A2 et 2D9 (Pasanen et al. 1995). D'autre part, un traitement unique *per os* de nitrate d'uranyle (204 mg/kg) perturbe le métabolisme de la vitamine D3 par modulation génique de la CYP2R1 et par augmentation de l'activité de la CYP27A1 (Tissandie et al. 2006).

Toxicité chronique

Les effets décrits en condition de traitement aiguë sur le métabolisme hépatique de la vitamine D3 ne sont pas retrouvés en cas d'exposition chronique de 9 mois au nitrate d'uranyle *via* l'eau de boisson (40 mg/L) (Tissandie et al. 2007). Cependant, des diminutions de l'expression génique et de l'activité de la CYP7A1, protéine impliquée dans le catabolisme du cholestérol hépatique sont observées dans les mêmes conditions de contamination chronique (Racine et al. 2010). Toujours sur le même modèle de contamination, les expressions géniques de deux enzymes majeures du métabolisme des xénobiotiques (CYP3A1 et CYP3A2) et de leur récepteur nucléaire (PXR), sont augmentées (Souidi et al. 2005). L'hypothèse d'une modification de la pharmacocinétique d'un médicament a été étudiée chez des rats contaminés de manière chronique à l'uranium et recevant une injection de paracétamol à une dose hépatotoxique (400 mg/kg). Une élimination plus lente du paracétamol plasmatique a été observée chez les animaux contaminés par l'uranium. De plus, des altérations histologiques rénales et une augmentation des marqueurs biochimiques d'une atteinte hépatique ont été constatées plus fréquemment chez les animaux contaminés. Ceci confirme qu'un traitement chronique à de faibles doses d'uranium tend à perturber le métabolisme d'un médicament (Gueguen et al. 2007).

Introduction

4. Effet sur le système nerveux central

Il est aujourd'hui admis qu'il existe un passage de l'uranium du sang vers le compartiment cérébral. Les mécanismes de ce passage sont cependant mal connus. Du fait de la non-altération de la barrière hémato-encéphalique, Lemerrier et son équipe font l'hypothèse d'un passage parenchymateux ou vasculaire (Lemerrier et al. 2003). De récents travaux ont également mis en évidence une accumulation selon un gradient rétro-orbital de l'uranium après inhalation du composé chez le rat. Les auteurs suggèrent un transfert direct des voies nasales vers les bulbes olfactifs (Tournier et al. 2009). Par ailleurs, Fitsankis et al. émettent l'hypothèse d'un transfert par des transporteurs tels que TfR (récepteur de la transferrine) ou DMT-1 (divalent metal transporter 1) (Fitsanakis et al. 2006).

a. Effet sur la cognition et le comportement

Chez l'animal, sur le plan cognitif, une exposition aiguë à l'uranium (1 mg/kg d'UA, IM) induit une altération transitoire de la mémoire chez le rat (Barber et al. 2007). Au niveau comportemental, l'ingestion par l'eau de boisson d'UA (75 ou 150 mg/L) durant 2 semaines provoque chez les rats des modifications neuromotrices (Briner and Murray 2005). D'autres effets sont décrits sur la coordination motrice des rats avec injection répétée de 0,1 ou 1 mg d'acétate d'uranyle durant 7 jours (Abou-Donia et al. 2002). Les études menées par Arfsten sont cependant contradictoires puisqu'elles ne mettent pas en évidence de changement de comportement chez des rats, 150 jours après la pose d'implants d'uranium (1x20mm) (Arfsten et al. 2007). Il semble que les effets soient plus nombreux en cas d'exposition à l'uranium enrichi. En effet, une exposition chronique à l'UE (40 mg/L, enrichissement d'environ 4 %) induit une action délétère sur la mémoire à court terme (Houpert et al. 2005) et des perturbations transitoires du cycle veille/sommeil (Lestaevel et al. 2005). Ces effets ne sont pas décrits avec une contamination à l'UA.

b. Effet sur les neurotransmetteurs

A l'échelle moléculaire, les effets de l'uranium sur les neurotransmetteurs ont été étudiés sur différents modèles. Une diminution réversible de la dopamine striatale est observée chez des rats, 3 jours après injection IM d'UA (1 mg/kg). Le taux de dopamine redevient normal au 7^{ème} jour (Barber et al. 2007). L'exposition par ingestion d'UA (40 mg/L) perturbe le turn-over des monoamines dès 1,5 mois d'exposition (Bussy et al. 2006).

Introduction

Concernant l'acétylcholinestérase, son activité augmente dans le cortex des rats traités par injection IM (7 jours) d'acétate d'uranyle (1 mg/kg) (Abou-Donia et al. 2002). Par ailleurs, dans le cortex de rats exposés durant 1,5 ou 9 mois à de l'uranium appauvri *via* l'eau de boisson, l'activité de l'acétylcholinestérase diminue ainsi que le taux de l'acétylcholine (Bensoussan et al. 2009).

c. Données épidémiologiques

Chez l'Homme, une étude de cohorte sur les vétérans de la guerre du Golf a permis de montrer l'apparition de troubles cognitifs 7 ans après leurs premières expositions à l'uranium. Ces troubles sont corrélés à la présence d'uranium dans les urines (McDiarmid et al. 2000). Cependant, des études complémentaires menées 12, 13, 14 ou 16 après l'exposition, n'ont pas confirmé ces effets (McDiarmid et al. 2009; McDiarmid et al. 2007; McDiarmid et al. 2006; Squibb and McDiarmid 2006). Par ailleurs, une étude montre un syndrome extrapyramidal avec des troubles de la marche et des myalgies chez un homme de 44 ans souffrant de ces symptômes depuis 6 ans. L'examen clinique a mis en évidence de l'uranium dans les selles. En l'absence d'autre cause apparente, les symptômes ont été associés au fait que l'individu était quotidiennement exposé à l'uranium, provenant d'un presse papier que le patient manipulait quotidiennement (Goasguen et al. 1982).

Par ailleurs, une association entre la mortalité par accident cérébro-vasculaire et l'exposition au radon chez les mineurs d'uranium a très récemment été montrée (Nusinovici et al. 2010).

5. Effet sur la reproduction et le développement

a. Effet sur la fertilité

Chez la souris femelle, bien qu'aucune altération histologique ne soit décrite sur les ovaires (Feugier et al. 2008; Raymond-Whish et al. 2007), la toxicité de l'U se traduit principalement par une atteinte des ovocytes. Dans la même espèce, les femelles contaminées chroniquement à du nitrate d'uranyle, la maturation morphologiques des ovocytes est modifiée à des doses d'exposition supérieures à 2,5 mg/kg/jour (Kundt et al. 2009) ou 10 mg/L (équivalent à 0,5 mg/kg/j) (Feugier et al. 2008). De la même manière, *in vitro*, la maturation des ovocytes est ralentie lorsque ces derniers sont mis en culture avec 1 mM d'acétate d'uranyle durant 72 heures (Arnault et al. 2008).

Introduction

Introduction

Par ailleurs, une étude menée chez la souris contaminée à l'UA par l'eau de boisson (entre 0,5 et 28 mg/L) montre une diminution du nombre de follicules primaires ainsi qu'une augmentation du poids de l'utérus (Raymond-Whish et al. 2007).

Chez le mâle, de l'uranium s'accumule dans les testicules de rat, 18 mois après implantation sous cutanée du composé (Pellmar et al. 1999). Chez la souris, une contamination chronique à l'acétate d'uranyle *via* l'eau de boisson (64j ; 80 mg/kg/j) induit des atteintes interstitielles ainsi qu'une vacuolisation des cellules de Leydig sans altérer les fonctions testiculaires (Llobet et al. 1991). Chez des rats exposés durant 16 semaine à une dose moindre de nitrate d'uranyle 0,07 mg/kg/j, il a été noté des lésions testiculaires ainsi qu'une diminution du poids des testicules (Malenchenko et al. 1978). Aucune modification de la qualité du sperme (concentration et mobilité des spermatozoïdes) n'est observée chez des rats exposés à l'uranium implanté en sous-cutanée durant 150 jours (Arfsten et al. 2006).

Les rares études épidémiologiques existantes ne montrent pas d'effet toxique majeur de l'uranium sur la fonction de reproduction, notamment chez les mineurs d'uranium en Namibie (Zaire et al. 1997). La présence d'uranium dans le sperme de vétérans de la guerre du Golfe blessés par des éclats d'obus a cependant été rapportée (McDiarmid et al. 2000)

b. Effet sur le développement embryo-fœtal et sur le développement post natal

Une diminution du taux de gestation et une embryo-léthalité sont décrites pour des doses élevées d'uranium chez la souris (80 mg/kg, *per os*) (Llobet et al. 1991) et chez le rat (20 mg/kg/j, *per os*) (Linares et al. 2005; Paternain et al. 1989). Les études d'Arfsten ne décrivent cependant pas de perturbation de l'implantation intra-utérine de l'embryon, de la taille de la portée ou du sex-ratio chez le rat (Arfsten et al. 2009). En revanche, une diminution du poids du fœtus ainsi que des malformations fœtales sont observées en cas de traitement du 6^{ème} au 15^{ème} jour de gestation par une injection SC d'acétate d'uranyle de souris gestantes (0,5 à 2 mg/kg/j) (Bosque et al. 1993) ou de rates gestantes (0,830 mg/kg/j) (Albina et al. 2003). *In vitro*, la présence d'uranium (26 µg/mL) dans le milieu de culture d'embryon de souris au stade pré-implantatoire induit un retard de développement de l'embryon ainsi que des altérations de la prolifération des blastomères (Kundt et al. 2000).

Introduction

Très peu de données épidémiologiques existent sur des corrélations éventuelles entre l'exposition à l'uranium et la prévalence de problème lors du développement embryofœtal ou post natal. Néanmoins, aucune corrélation n'a été établie entre l'exposition à l'uranium appauvri présent sur les régions de Bosnie et Herzégovine, anciens territoires de conflits armés, et la prévalence des malformations congénitales (Sumanovic-Glamuzina et al. 2003).

c. Effet sur le développement péri et post natal

Il n'existe que peu d'études sur les effets post-natals de l'uranium. Une première montre l'absence d'effet relevant de l'uranium sur le développement post-natal et le comportement des descendants de femelles contaminées durant la gestation et la lactation par de l'acétate d'uranyle (40 et 80 mg/kg/j) (Sanchez et al. 2006).

Préalablement à cette étude, l'équipe de Paternain montrait une diminution systématique du poids chez les souriceaux descendants de souris mâles et femelles contaminés par de l'acétate d'uranyle en gavage avant l'accouplement puis durant la gestation et la lactation (25 mg/kg/j) (Paternain et al. 1989). Le comportement et le développement des jeunes rats ne sont quant à eux pas perturbés par une contamination par l'acétate d'uranyle de 40 ou 80 mg/kg/j par eau de boisson, initiée 4 semaines avant l'accouplement et finalisée à la fin de la lactation (Albina et al. 2005).

Dans une étude de contamination multi-générationnelle les rats parents (F0) ont été contaminés par de l'uranium appauvri (4 ou 40 mg/kg/j) durant 4 mois, et les souriceaux (F1) ont également été contaminés durant 4 mois aux mêmes doses d'uranium. Le dosage de l'uranium au niveau du rein et des ovaires montre une accumulation plus importante chez les animaux F1. Des anomalies au niveau du sperme sont plus marquées chez la génération F1 que chez les parents (Hao et al. 2009). Par ailleurs, on sait aujourd'hui que l'uranium passe dans le lait maternel (Wappelhorst et al. 2002).

d. Perturbations endocriniennes

Une étude menée chez la souris contaminées à l'uranium appauvri par l'eau de boisson (entre 0,5 et 28 mg/L) montre une action du composé sur l'équilibre oestrogénique (Raymond-Whish et al. 2007). Par ailleurs, l'ingestion de 40 mg/L d'uranium appauvri pendant 9 mois ne provoque pas de perturbation du métabolisme des hormones stéroïdiennes chez le rat mâle, contrairement à l'uranium enrichi à 4% dans les mêmes conditions (Grignard et al. 2008).

Introduction

6. Effet sur le poumon

Le système respiratoire est la cible des contaminations par voie aérienne. Les effets pulmonaires de l'uranium sont la résultante d'une inhalation de composés volatils et particulaires. Seules les particules les plus fines atteignent les structures alvéolaires. Si le composé d'uranium est insoluble, les particules persistent dans l'arbre alvéolaire.

Dans le cas d'une accumulation pulmonaire, le poumon peut être non seulement confronté à la toxicité chimique de l'uranium, mais aussi à sa toxicité radiologique qui peut devenir non négligeable à long terme. Les effets toxiques de l'uranium au niveau pulmonaire concernent principalement la population exposée par des activités professionnelles liées à l'extraction minière de l'uranium.

Des expositions chroniques par inhalation quotidienne durant 6 heures d'hexafluorure d'uranium (13 mg/m^3) pendant 30 jours induisent des œdèmes pulmonaires et des réactions inflammatoires au niveau des bronches et des alvéoles pouvant être à l'origine d'emphysème chez le rongeur (ATSDR 1999). La fibrose pulmonaire induite par l'uranium est souvent associée à un mécanisme inflammatoire. Il a ainsi été montré *in vitro*, sur une lignée cellulaire de macrophages alvéolaires exposés à $50 \text{ }\mu\text{M}$ d'uranium, une augmentation de la sécrétion du $\text{TNF}\alpha$ (Gazin et al. 2004). De plus, l'exposition chronique à des aérosols d'uranium naturel (oxydes d'uranium) induit des tumeurs pulmonaires chez le rat par prolifération cellulaire et par induction de nécrose et fibrose (Mitchel et al. 1999).

7. Effet sur l'intestin

Les effets de l'uranium sur le système digestif restent à l'heure actuelle méconnus. On sait que l'uranium passe la barrière intestinale au niveau de l'intestin grêle et que le passage se fait probablement de manière trans-cellulaire (Dublineau et al. 2005). Les deux composants principaux de la paroi intestinale (épithélium et muscles lisses) sont susceptibles d'être touchés par les effets de l'uranium (Newey et al. 1966). Par ailleurs, le statut immunitaire de l'intestin est également impacté chez le rat après contamination chronique à l'uranium appauvri (40 mg/L) par une accumulation du radionucléide dans les plaques de Peyer associée à une augmentation de la densité des neutrophiles et une diminution des mastocytes et des macrophages intestinaux (Dublineau et al. 2007).

Introduction

8. Effet génotoxique et cancérigène

In vivo, une augmentation des cassures double-brin d'ADN des cellules issues d'un lavage broncho-alvéolaire a été observée après inhalation de particules de dioxyde d'uranium (Monleau et al. 2006). Une étude menée sur des rats, ayant subi par intervention chirurgicale l'implantation d'uranium en sous cutané (sc), a montré que les urines excrétées et contenant de l'uranium possèdent des propriétés génotoxiques (test d'Ames positif) (Miller et al. 1998b).

Par ailleurs, l'administration *per os* d'uranium appauvri (4-40 mg/kg/j) chez des rats durant 4 mois a induit des désordres génétiques notamment sur la formation des spermatozoïdes qui se sont répercutés sur la descendance directe des animaux (Hao et al. 2009). Enfin, une réaction d'hyperprolifération cellulaire avec l'apparition d'un sarcome du muscle a été observée après implantation d'uranium appauvri chez le rat (2,5 x 2,5 mm) (Hahn et al. 2002). Il a été recensé plus tard, que ces mêmes implants pouvaient induire des tumeurs malignes des tissus mous adjacents (Hahn et al. 2009).

De nombreuses études *in vitro* évoquent la capacité de l'uranium à induire des aberrations chromosomiques. Miller et al. ont démontré que l'uranium appauvri (50µM) est à l'origine de la formation de micronoyaux sur des cellules ostéoblastiques humaines immortalisées (HOS) dès 24 heures d'exposition (Miller et al. 2003). L'effet génotoxique a également été retrouvé sur d'autres cellules dont des cellules rénales de rat (NRK-52e) où l'effet est décrit comme dépendant de la concentration en uranium (Thiebault et al. 2007).

La composition isotopique de l'uranium peut également faire varier le profil génotoxique de l'atteinte tel que cela a été décrit sur des fibroblastes de souris (Darolles et al. 2010). Par ailleurs, l'uranium appauvri (10 µM, 24h) induit le changement du phénotype de cellules HOS en un phénotype tumorigène (Miller et al. 1998a). Enfin, l'activité spécifique de l'uranium (analysée en faisant varier la composition isotopique mais à quantité égale d'uranium) est corrélée à une augmentation de la fréquence des noyaux dicentriques sur des cellules HOS. Ceci suggère un rôle, du moins à l'échelle cellulaire, de la portion radiotoxicologique de l'uranium dans ses effets biologiques et génotoxiques (Miller et al. 2002).

A l'échelle humaine, les populations qui ont un risque d'exposition maximal sont les travailleurs dans la sphère d'activité liée à l'U. Concernant les mineurs, il a été suggéré dès 1970 que les rayonnements α provenant de la dégradation du radon dans les mines d'uranium renforcent l'effet fibrogénique de la silice dans les poumons (Trapp et al. 1970).

Introduction

Introduction

Le radon est un gaz omniprésent dans les mines d'uranium puisqu'il provient de sa dégradation. Des études menées chez des mineurs d'uranium montrent des corrélations entre l'exposition à l'U et l'augmentation du nombre de cancer des poumons et des reins (Vacquier et al. 2008) ou encore avec l'apparition d'aberrations chromosomiques dans les lymphocytes circulants (Wolf et al. 2004; Zaire et al. 1996). Une augmentation du risque de cancers du foie, de la vésicule biliaire et de myélomes dans cette population demande à être confirmée (Tomasek et al. 1993).

Concernant les travailleurs de la sphère du nucléaire, une corrélation entre l'exposition à l'uranium et l'augmentation de la mortalité suite à des cancers de la plèvre a été établie (Guseva Canu et al. 2009).

Les populations vivant ou travaillant sur les anciens territoires de guerre sont également particulièrement exposées. Une altération de l'ADN associée à une variation de la formule leucocytaire a également été décrite chez des nettoyeurs des territoires serbes et monténégrins après la guerre des Balkans (11 personnes). Un bilan médical mené 4 ans après l'exposition a cependant montré une diminution de ces altérations bien qu'elles restent plus fréquentes qu'en période de pré-exposition (Milacic et al. 2009).

Enfin, concernant les populations consommant de l'eau naturellement riche en uranium ou habitant à proximité des centrales nucléaires, aucune corrélation n'a été établie entre la consommation du composé et l'apparition des cancers gastriques (Auvinen et al. 2005), de la vessie, du rein (Kurttio et al. 2006), du foie, du sein ou encore avec l'apparition de lymphome ou de leucémie (Boice et al. 2009; Boice et al. 2007).

D'un point de vue réglementaire et selon les monographies du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), l'UA appartient à la catégorie 3 « Inclassable quant à leur cancérogénicité pour l'Homme ».

D Mécanisme de la toxicité de l'uranium

1. Uranium et mortalité cellulaire

L'uranium possède des propriétés cytotoxiques. La majorité des études a été menée sur des cellules d'origine rénale ou osseuse modélisant ainsi les deux organes cibles de l'uranium. Globalement, la concentration qui induit 50% de mortalité (IC50) est aux environs de 500 μM d'uranium. Les IC50 de l'acétate d'uranyle après 24 heures.

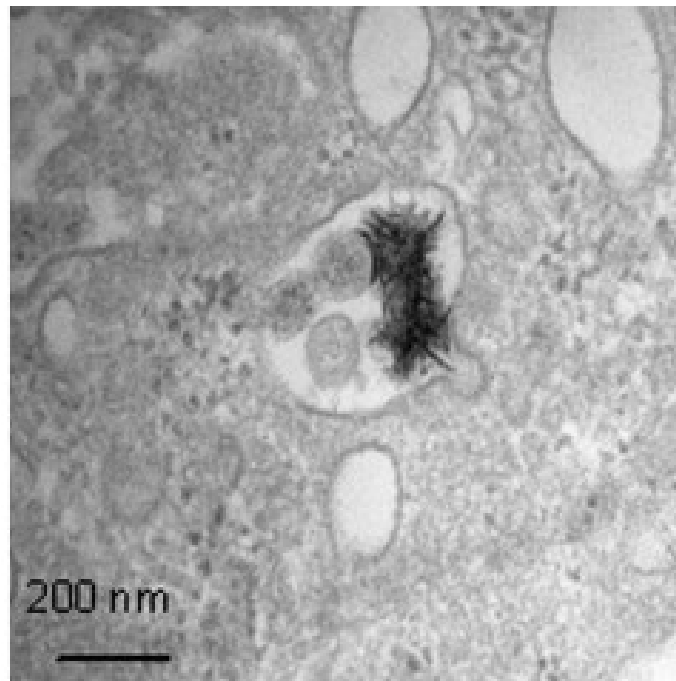


Figure 3 : Précipité d'uranium dans les lysosomes d'ostéoblastes

Les ostéoblastes (ROS 17/2.8) ont été mis en culture avec 400 μM de carbonate d'uranium durant 24 heures (Selon Milgram et al., 2008b).

Introduction

d'exposition sur HEK-293 et HK-2 (cellules rénales d'origine humaine) sont de respectivement 500 μM (Prat et al. 2005) et 650 μM (Carriere et al. 2004). Pour les cellules rénales d'origine de rat (NRK-52), l'IC50 est entre 500 et 600 μM après 24 heures d'exposition à l'uranium appauvri sous forme bicarbonatée en fonction des études (Carriere et al. 2005; Thiebault et al. 2007). Pour les cellules rénales d'origine porcine (LLC-PK1), l'IC50 est légèrement plus élevée. Elle se situe aux environs de 700 μM après 24 heures d'exposition à du bicarbonate d'uranium (Mirto et al. 1999; Muller et al. 2006).

Concernant les cellules osseuses, la IC50 est estimée à 400 μM pour des cellules ROS 17/2.8 (cellules issues d'un ostéosarcome de rat) exposées durant 24 heures à du nitrate d'uranium (Milgram et al. 2008a). Ces variations de sensibilité à l'uranium ont été attribués à la fois à la différence de robustesse des modèles cellulaires mais également à la spéciation du composé (Carriere et al. 2004; Milgram et al. 2008a). L'équipe de Milgram montre ainsi que les IC50 de l'uranium-carbonate et de l'uranium-citrate sont de 400 et 250 μM respectivement (Milgram et al. 2008a).

Par ailleurs, en comparaison avec d'autres métaux et quelque soit sa spéciation, l'IC50 de l'uranium est supérieure à celle du cadmium ou du zinc aussi bien pour des cellules osseuses (ROS 17/2.8) que rénales (NRK-52E). Elle est néanmoins inférieure à celle du nickel pour ces deux types cellulaires (Milgram et al. 2008b)

2. Localisation cellulaire de l'uranium

Une corrélation existe entre la cytotoxicité induite par l'uranium et l'internalisation du composé dans les cellules du moins pour des cellules osseuses (ROS 17/2.8) (Milgram et al. 2008b) et rénales (NRK-52E) (Carriere et al. 2005). Les techniques d'imagerie employées jusqu'à présent de type microscopie à transmission électronique (MET) ou microscopie électronique à balayage (SEM) ont permis de mettre en évidence la présence d'uranium sous forme précipitée aussi bien dans les espaces intracellulaires qu'extracellulaires (Figure 3).

Les précipités d'uranium ont été retrouvés dans différents modèles cellulaires : cellules rénales (Carriere et al. 2008; Ghadially et al. 1982a; Mirto et al. 1999), osseuses (Milgram et al. 2008b) mais également dans des macrophages de souris (Kalinich and McClain 2001) et des cellules lymphoblastoïdes humaines (Ghadially et al. 1982c). L'apparition de ces précipités est décrite pour des concentrations d'uranium élevées et supérieures aux concentrations minimales induisant une cytotoxicité. L'équipe de Milgram décrit en effet la présence d'uranium dans les cellules exposées à 400 μM d'uranium alors qu'à cette

Introduction

Introduction

concentration 50% des cellules ne sont déjà plus viables (Milgram et al. 2008b). Par ailleurs, il est suggéré qu'une partie de l'uranium responsable de la cytotoxicité serait sous forme soluble dans la cellule.

A l'échelle cellulaire, les précipités observés sont décrits au niveau du cytoplasme (Carriere et al. 2005; Mirto et al. 1999). Certaines études précisent que ces précipités sont localisés au niveau des lysosomes et que l'acidification du milieu lysosomal pourrait participer à la formation des précipités (Milgram et al. 2008b). Dans les années 1980, le précipité d'uranium dans les lysosomes était nommé « uranosome » par l'équipe de Ghadially. Cette même équipe a décrit la composition de ces uranosomes dans différents modèles cellulaires. Une analyse en rayon X leur a permis de mettre en évidence en plus de la présence de l'uranium, celle du potassium, du phosphate, du calcium et du soufre (Ghadially et al. 1982a; Ghadially et al. 1982b; Ghadially et al. 1982c). Par ailleurs, les études actuelles soulignent que les précipités sont composés d'uranium complexé à des groupements sulphates (Carriere et al. 2005; Carriere et al. 2008; Mirto et al. 1999; Muller et al. 2006).

La présence de l'uranium en intracellulaire soulève la question de son mécanisme d'entrée. Plusieurs hypothèses sont actuellement émises. La première serait que l'uranium (soluble ou précipité) entre dans la cellule par endocytose puis se retrouve dans les vésicules lysosomales. Du fait de l'acidification du milieu environnant, l'uranium soluble précipiterait. La seconde hypothèse est que l'uranium entrerait dans la cellule par l'intermédiaire de transporteurs. L'équipe de Muller a ainsi mis en évidence, sur les cellules LLC-PK1, le rôle d'un transport de l'uranium *via* les transporteurs de type NaPi-IIa (cotransporteur de phosphate dépendant du sodium) (Muller et al. 2006; Muller et al. 2008). Par ailleurs, une étude de transcriptomique menée sur des HEK-293 montrent que 25% des gènes modulés par l'exposition à de l'acétate d'uranyle sont impliqués dans les voies de transduction et de trafic cellulaire, notamment dans celles du calcium (Prat et al. 2005).

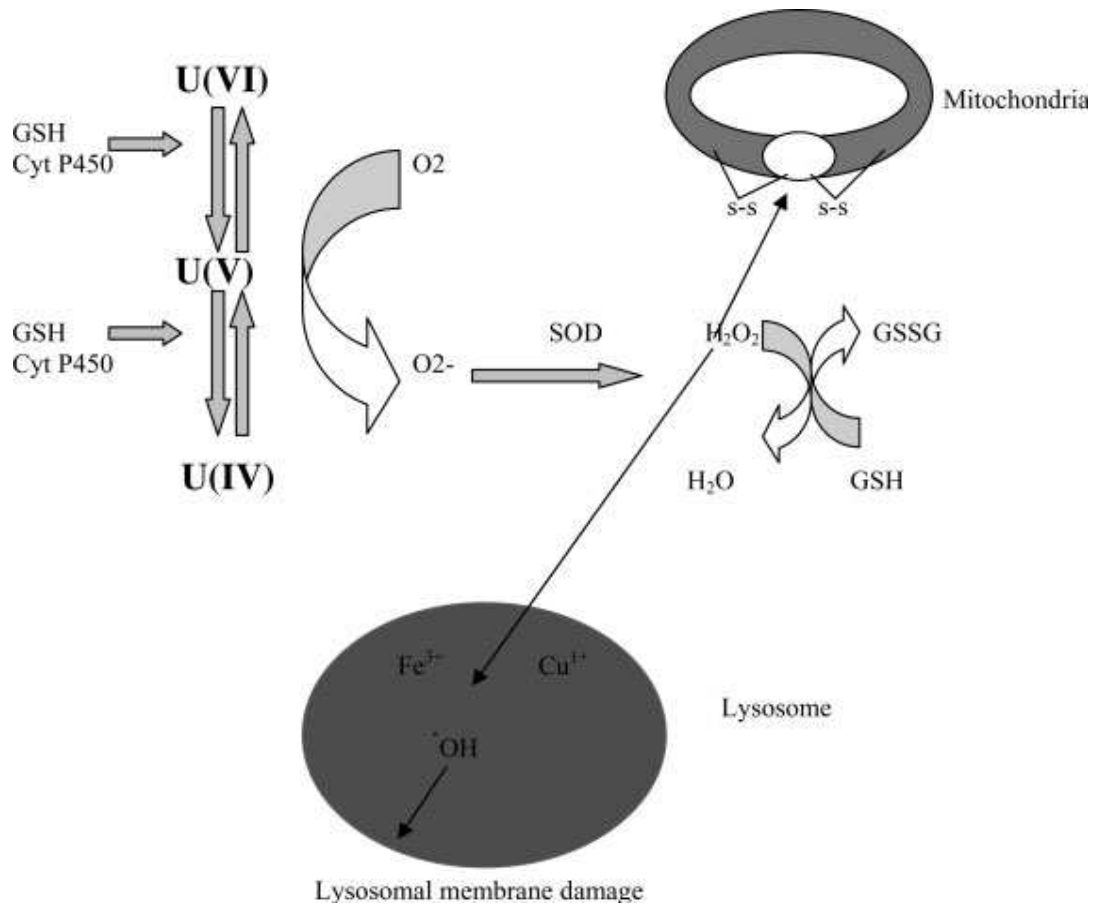


Figure 4 : Proposition de mécanisme de cytotoxicité de l'uranium médiée par des espèces réactives de l'oxygène

(D'après Pourahmad et al., 2006)

3. Uranium et stress oxydant

De nombreux effets biologiques ont été décrits consécutivement à l'exposition des cellules à l'uranium. Parmi eux, on note ceux relatifs au stress oxydant et aux conséquences qui en découlent.

Une exposition à l'acétate d'uranyle induit sur des cellules épithéliales pulmonaires de rat en culture une chute du glutathion et de la superoxyde dismutase corrélée à l'apparition d'un stress oxydant (Periyakaruppan et al. 2007). Par ailleurs, Pourahmad et al. montrent que l'uranium appauvri induit sur des hépatocytes de rat fraîchement isolés une toxicité mitochondriale et lysosomale *via* un mécanisme faisant intervenir des espèces réactives de l'oxygène tel que décrit sur la figure 4 (Pourahmad et al. 2006).

Enfin, une étude menée sur des cellules hépatiques humaines (HepG2) montre qu'une contamination par l'uranium induit l'expression génique d'un certain nombre d'acteurs du stress oxydant dont la metallothionéine IIA ou encore GADD (protéines régulant le cycle cellulaire suite à des dommages à l'ADN) (Miller et al. 2004). Cette étude montre également des variations de l'expression génique de GST et de CYP1A1 (enzymes du métabolisme impliquées dans le stress oxydant et dans la détoxification de xénobiotiques) à des doses subtoxiques d'uranium. Dans des études expérimentales menées chez le rat, la perturbation de l'équilibre pro/antioxydant suite à une exposition à l'uranium serait une des explications de sa toxicité et notamment de sa néphrotoxicité. Suite à une exposition aiguë, à raison de 5 mg/kg en injection IP unique, une variation des enzymes anti-oxydantes au niveau rénal et une augmentation de la peroxydation lipidique sont observées (Belles et al. 2007). De même, l'injection IP de 0,5 mg/kg de nitrate d'uranyle est responsable d'une augmentation de la peroxydation lipidique ainsi que des activités de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase corrélée à une diminution de l'activité de la catalase dans le rein (Banday et al. 2008; Priyamvada et al. 2010). De plus, au niveau rénal du rat exposé de manière chronique à l'acétate d'uranyle (3 mois, 40 mg/kg), des modifications de la peroxydation lipidique et du glutathion oxydé sont observées. L'activité de la superoxyde dismutase rénale est induite dans ces conditions d'exposition (Linares et al. 2006). Des modifications de l'équilibre pro/antioxydant ont également été notées dans d'autres tissus après exposition chronique tel que le cerveau (Lestaevel et al. 2009; Linares et al. 2007) ou encore les testicules (Linares et al. 2006).

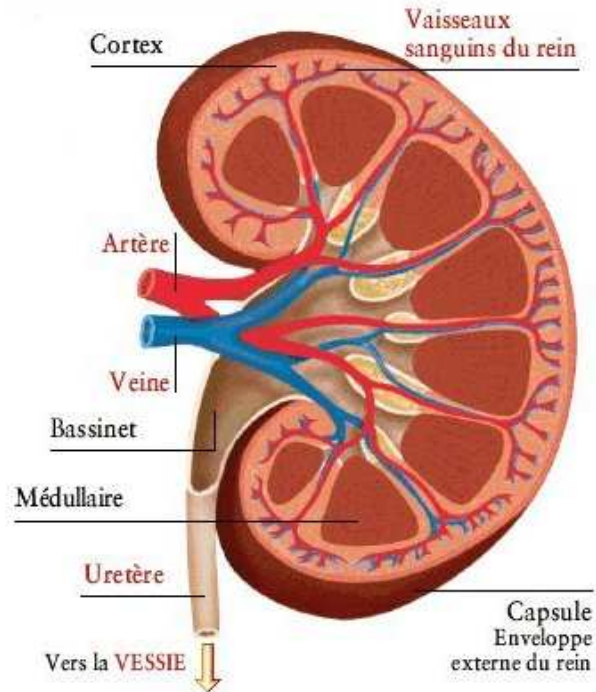


Figure 5 : Schéma d'une coupe longitudinale de rein

On distingue les différentes structures internes, les vaisseaux afférents et efférents ainsi que les voies urinaires dont le bassinnet débouche sur l'uretère

Les mécanismes de détoxification de l'organisme

L'organisme est continuellement exposé à divers xénobiotiques, dont les médicaments. Pour se protéger des éventuels effets toxiques de ces substances, il est muni de deux organes clés. Le premier est le foie qui dispose de nombreuses enzymes de métabolisation qui permettent la dégradation et l'épuration *via* la voie urinaire des composés hydrophiles et l'élimination biliaire des composés moins hydrosolubles. Le rein, du fait de la formation des urines, est le second organe clé du processus de détoxification. Le rein possède également un arsenal d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques qui contribuent à l'épuration et la détoxification par métabolisation de l'organisme.

A Le rein : organe d'épuration

1. Présentation du rein

a. Rappel anatomique et principales fonctions biologiques

Les deux reins siègent de part et d'autre du rachis juste en dessous du diaphragme et en arrière de la cavité abdominale dans l'espace rétro-péritonéal. Ils ne sont pas recouverts de péritoine. La structure interne du rein est composée de trois zones : le bassinet est placé le plus profondément et est relié à la zone médullaire. A l'extérieur se trouve le cortex rénal (Figures 5 et 6).

Les reins et plus généralement, le système urinaire, remplissent plusieurs fonctions de régulation nécessaires au maintien de l'homéostasie de l'organisme grâce à la production et à l'excrétion des urines. Les plus importantes missions des reins sont : l'élimination des produits de dégradation du métabolisme (exemple du métabolisme protéique), la détoxification par élimination des xénobiotiques (médicaments, etc.), la régulation des concentrations d'électrolytes (sodium, potassium, calcium et phosphore), le maintien du contenu hydrique et de la pression osmotique, le maintien de l'équilibre acido-basique et du pH, la formation de certaines hormones (rénine, érythropoïétine, etc.) et la transformation de la vitamine D en sa forme active.

Introduction

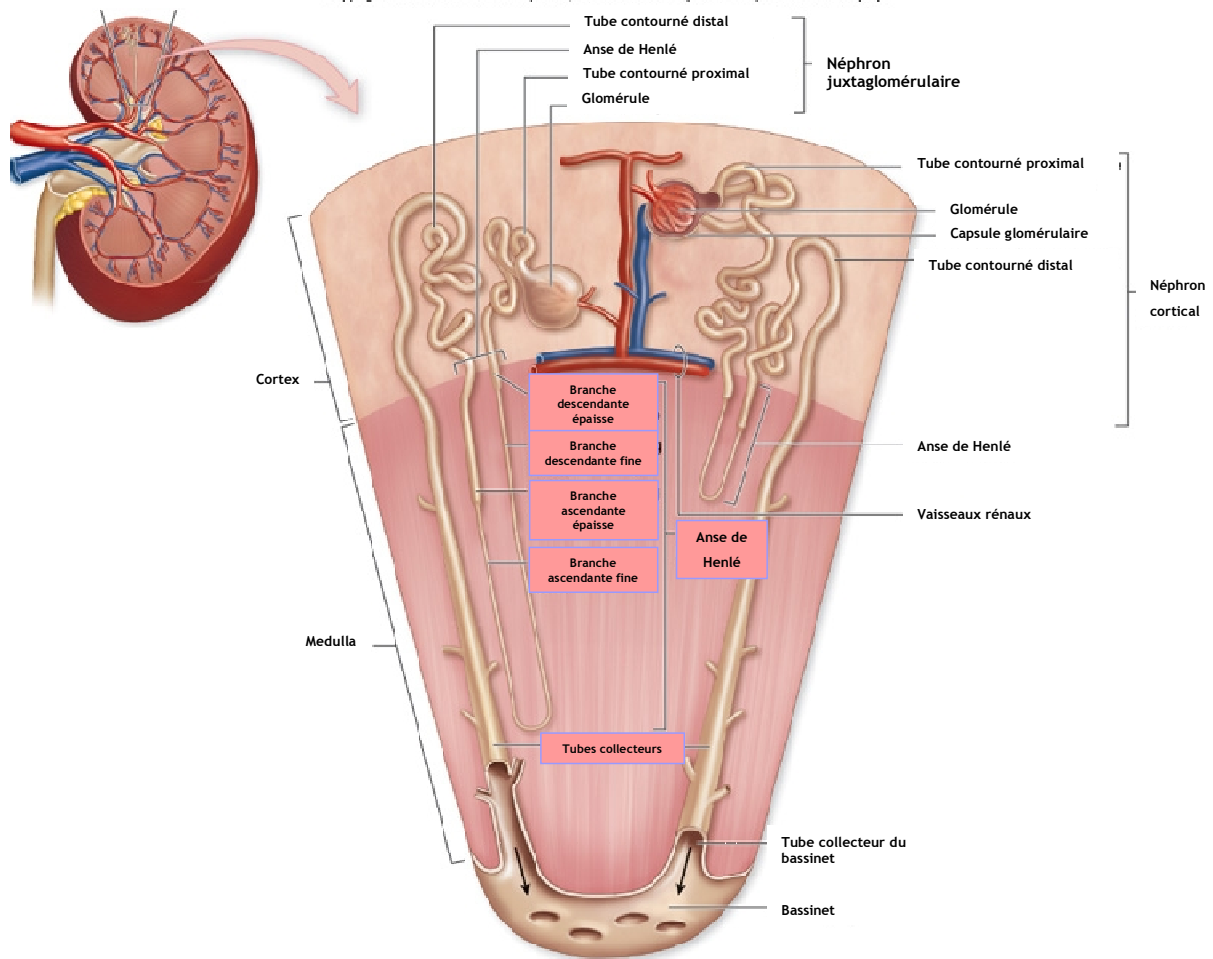


Figure 6 : Schéma de la coupe longitudinale d'un rein

La formation de l'urine est assurée au niveau du néphron. Chaque néphron est composé d'un glomérule et d'un appareil tubulaire. Au niveau du glomérule (zone corticale) commence la production d'urine primaire avec la « distillation » d'un filtrat aqueux à partir du sang qui coule dans la pelote capillaire. L'appareil tubulaire commence par le tube contourné proximal (zone corticale) où s'attache l'anse de Henlé, partie droite qui descend plus ou moins profondément dans la zone médullaire. La partie ascendante de l'anse se poursuit par le tube contourné distal (zone corticale) qui se termine par un tube collecteur où se réunissent les autres tubes en provenance d'autres néphrons. L'urine secondaire résultant de processus d'absorption et d'excrétion à travers les différentes structures tubulaires, atteint le bassinnet. De là, elle est dirigée par l'uretère vers la vessie.

Introduction

Concernant le maintien de l'équilibre hydrique et donc de la pression artérielle de l'organisme, le rein joue un rôle essentiel par sa fonction de synthèse de substances spécifiques régulatrices, notamment la rénine qui provoque en cas d'hypotension artérielle et *via* l'angiotensine II, une stimulation de la sécrétion d'aldostérone qui stimule la réabsorption de sodium et donc de l'eau et faisant ainsi augmenter la pression dans le sang. Ce n'est qu'un aspect schématisé et non exhaustif de la rénine car elle a également comme effet de stimuler la sécrétion de noradrénaline, toujours *via* l'angiotensine II et ainsi de provoquer une vasoconstriction. En cas d'hypertension artérielle, le rein va synthétiser la kallikréine à l'origine d'une kinine particulière, la bradykinine, qui induit des effets vasodilatateurs et permet ainsi de réduire la pression au niveau des vaisseaux.

Le rein est donc un acteur clé du maintien de l'homéostasie de l'organisme et son dysfonctionnement peut être à l'origine de nombreux dérèglements pouvant aboutir à une altération de l'état général de l'individu.

b. Fonctions de détoxification rénale

■ Filtration, réabsorption et sécrétion

Les déchets biologiques (endo- ou exogènes) sont en partie éliminés par l'intermédiaire des urines. Le sang artériel qui pénètre les reins par l'artère rénale, passe par l'artère interlobulaire, l'artériole afférente pour rejoindre l'unité élémentaire de la machinerie rénale : le glomérule, situé à l'intérieur du néphron.

Un rein contient environ un million de néphrons. Chaque jour, les reins filtrent environ 180 L de sang et produisent en moyenne 1500 mL d'urine définitive. Dans le glomérule rénal, le sang est filtré par un phénomène osmotique : il se décharge en eau et en substances minérales et biologiques. Cette urine primaire ou filtrat glomérulaire chemine dans un système de tubules (tubule contourné proximal, anse de Henlé, tubule contourné distal (TCD)) où elle est successivement enrichie en divers composés (dont des débris métaboliques) et débarrassée de certaines autres substances récupérées par l'organisme (eau, glucose, sels minéraux, xénobiotiques). Il en résulte la formation de l'urine secondaire ou urine définitive (Figures 6 et 7).

Introduction

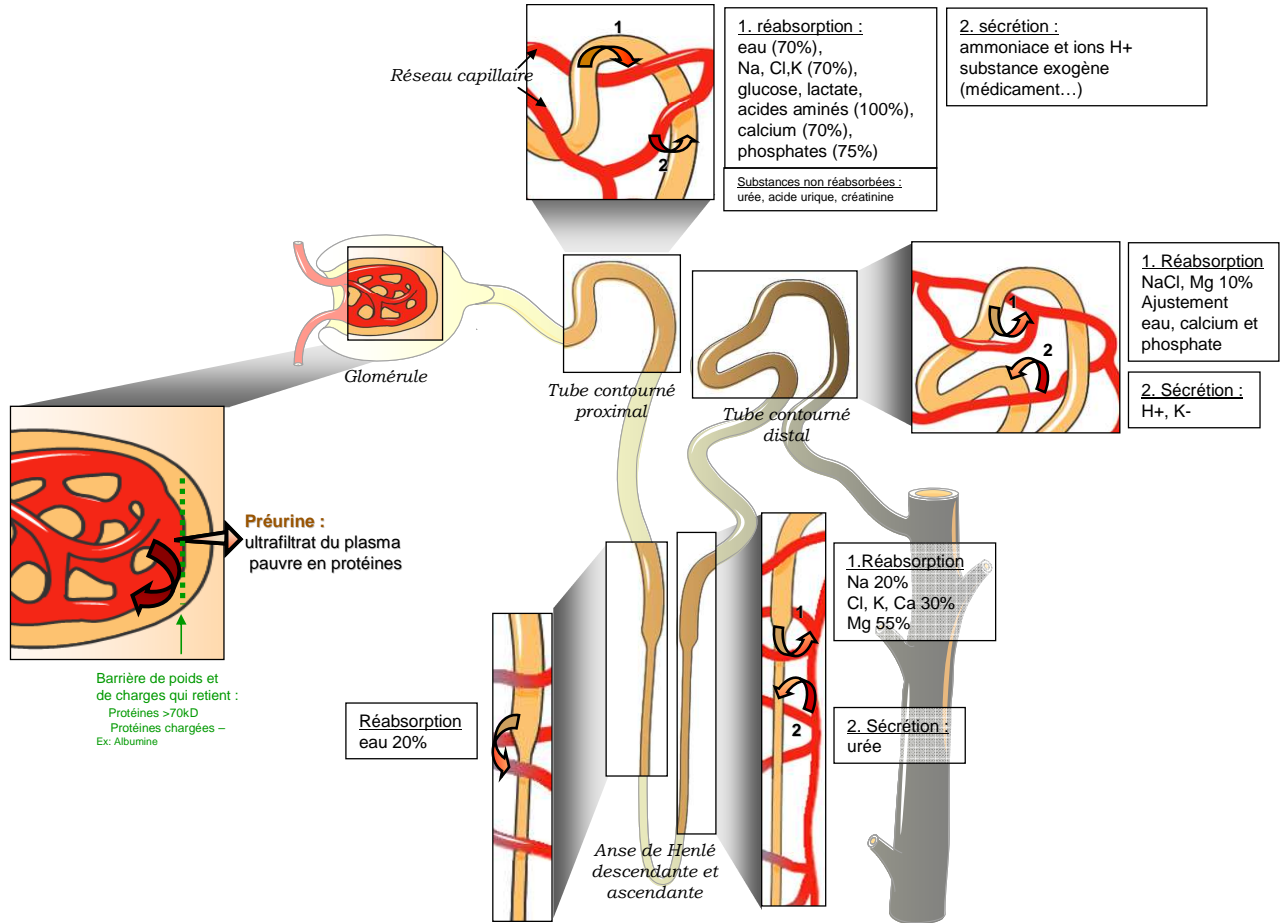


Figure 7 : Représentation schématique des fonctions glomérulaires et tubulaires dans la constitution des urines

Les phénomènes d'excrétion et de réabsorption sont régulés par plusieurs hormones, dont l'hormone anti-diurétique, le cortisol et la rénine-angiotensine. L'urine qui circule dans les tubes contournés distaux est collectée au niveau des tubes collecteurs avant de rejoindre les calices rénaux, les uretères puis la vessie.

■ Métabolisation des xénobiotiques

Les reins participent, dans une moindre mesure que le foie, à un processus de détoxification des xénobiotiques par métabolisation. De manière générale, les EMX présents dans la structure rénale sont les mêmes que celles du foie mais on les retrouve en plus petite quantité et/ou dans d'autres proportions. Parmi ces enzymes du métabolisme des xénobiotiques, on retrouve la famille des cytochromes P450 avec notamment les CYP3A, CYP1A et CYP1B (Korashy et al. 2004a; Lohr et al. 1998; Pavek and Dvorak 2008). Parmi les enzymes de phase I, on note également la présence de flavines monooxygénases, monoamines oxydases (Korashy et al. 2004a; Lohr et al. 1998). Concernant les enzymes de phase II, les familles d'enzymes les plus sollicitées sont les glucuronyltransférases, sulfotransférases et des glutathion-S-transférases (Korashy et al. 2004a; Lohr et al. 1998).

La figure 8 illustre que la majeure partie des EMX rénaux est localisée au niveau du cortex rénal et plus précisément au niveau des structures tubulaires dont le TCP. Bien que le rein soit muni d'EMX, la description détaillée de ces enzymes est située dans le chapitre relatif au foie (p 72) puisque c'est au niveau hépatique qu'elles y jouent leur rôle principal.

2. Les néphrotoxicités induites par des xénobiotiques : cas de la gentamicine

L'atteinte rénale consécutive à l'administration d'un médicament ou à l'exposition à un autre xénobiotique est une situation fréquente en clinique. Le rein est un organe particulièrement exposé à la toxicité des xénobiotiques puisqu'il est très irrigué (25% du débit cardiaque). La filtration glomérulaire du sang en vue de la formation d'une urine primitive, l'activité tubulaire associée en vue du processus de sécrétion et réabsorption de certains composés ainsi que l'existence d'un gradient osmotique corticomedullaire font que l'ensemble des structures rénales peuvent être concernées par une atteinte néphrotoxique. Cependant, la majorité des atteintes xéno-induites se situent au niveau du tubule contourné proximal, zone où l'activité de transport, de sécrétion et de métabolisation est maximale (Pour une revue, voir annexe I b).

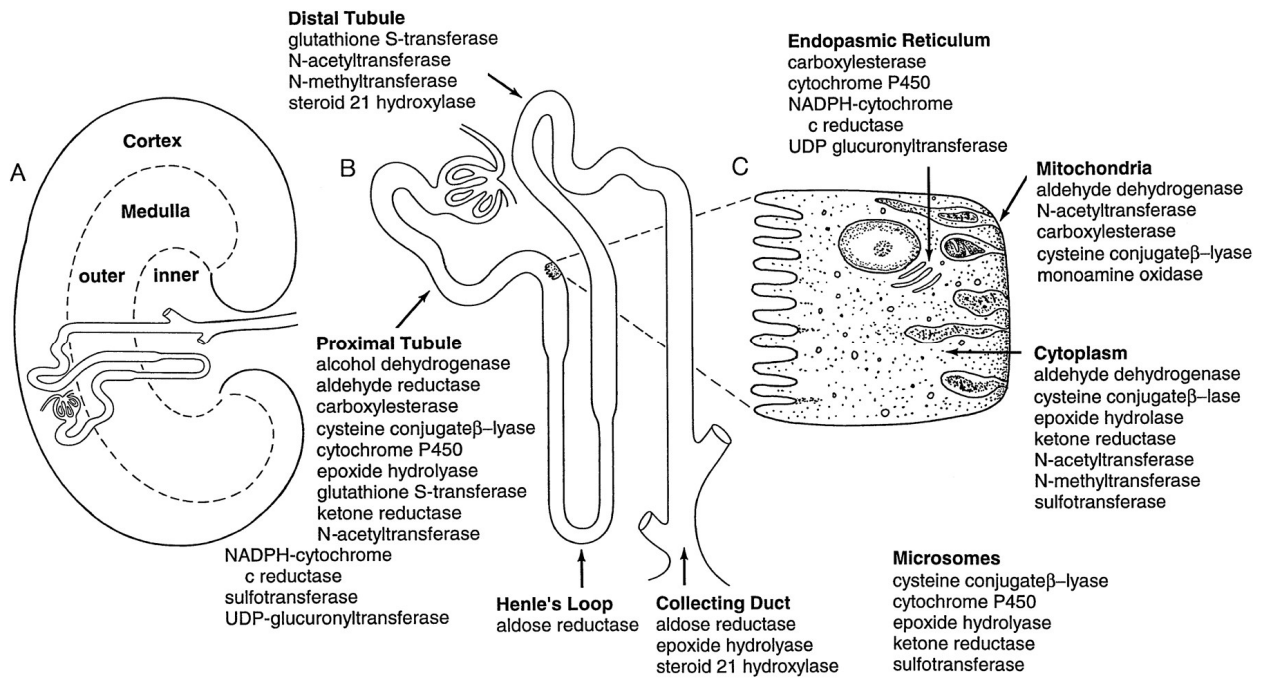


Figure 8 : Localisation rénale (A), tubulaire (B) et subcellulaire (C) des EMXs dans le rein

Figure issue de (J.W. LOHR, 1998).

Introduction

La gentamicine est un médicament dont les propriétés néphrotoxiques sont actuellement bien connues. De ce fait, elle est fréquemment utilisée dans les études expérimentales en tant que modèle de néphrotoxicité.

a. Historique de la gentamicine

La gentamicine appartient à la grande famille des antibiotiques et à la sous-famille des aminosides. Les aminosides sont les premiers médicaments qui se révélèrent efficaces dans le traitement de la tuberculose. La gentamicine est utilisée dans le traitement de cette pathologie depuis 1964 et est toujours utilisée de nos jours en clinique.

b. Structure

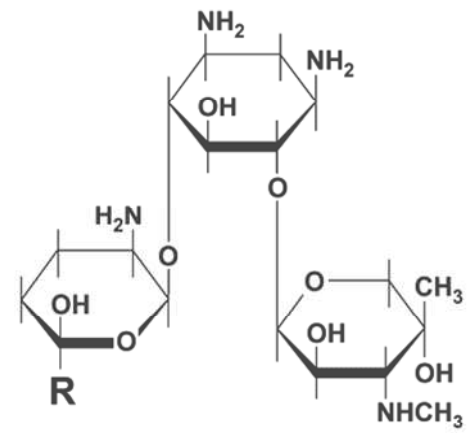
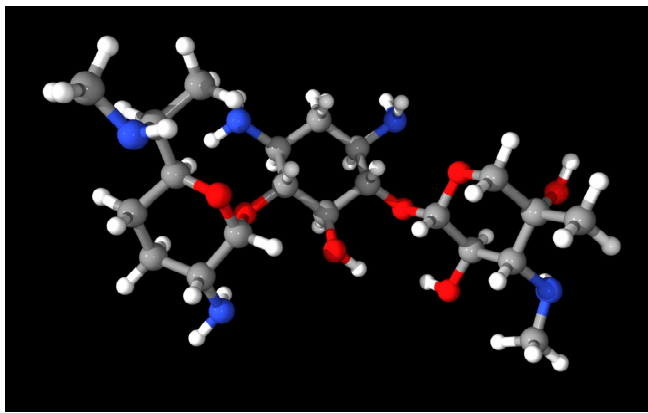
Les aminosides sont des hétérosides (ou glucosides) nés de l'association d'oses et de substances non glucidiques (appelées génines). Les antibiotiques se distinguent entre eux par la nature de la génine, des oses et des positions d'ancrage de ces deux entités chimiques. Dans le cas de la gentamicine, les oses sont fixés par des liaisons osidiques engageant les hydroxyles portés par les carbones 4 et 6 du désoxy-2D-streptamine. Etant donné leur origine naturelle, certains aminosides sont utilisés en thérapeutique sous forme de mélange comme c'est le cas pour la gentamicine. Cette dernière correspond en fait au mélange de trois gentamicines : C1, C1a et C2 (Figure 9) (Gaudy and Buxeraud 2005).

c. Mécanisme d'action

Les aminosides possèdent des effets multiples sur la cellule bactérienne. On sait néanmoins que le ribosome en est la cible principale. Après franchissement de la paroi bactérienne et de la membrane cytoplasmique, les aminosides se fixent sur le ribosome (sur la sous unité 30S) où ils perturbent la lecture de l'ARN messager (ARNm). Il en résulte des perturbations de la fonction ribosomale avec blocage de l'initiation de la synthèse protéique.

d. Propriétés pharmacologiques et indications

La commission d'AMM (autorisation de mise sur le marché) a déterminé comme habituellement sensibles à la gentamicine les espèces suivantes : *Staphylocoques méticilline-sensibles*, *Listeria monocytogenes*, *Hemophilus Influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, *Campylobacter*, *Pasteurella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter diversus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Yersinia*.



gentamicine :

C1A

C2

C1

R :

—CH₂NH₂

—CH(CH₃)NH₂

—CH(CH₃)NHCH₃

Figure 9 : Représentations 3D et plane du sulfate de gentamicine

La gentamicine est principalement indiquée dans certaines infections rénales, urinaires ou génitales à germes sensibles en monothérapie ou en association.

e. Pharmacocinétique

■ Absorption

La gentamicine n'est pas ou très peu absorbée au niveau intestinal. L'administration par voie parentérale (intramusculaire) est donc préférable. Par voie intramusculaire, le pic plasmatique atteint en 1 heure est voisin de 4 à 6 µg/mL après administration de 80 mg chez l'Homme. A la 6^{ème} heure, le taux sérique est inférieur à 1 µg/mL.

■ Distribution

La gentamicine est peu liée aux protéines sériques (liaison inférieure à 10%). Elle a une bonne diffusion dans les tissus, les séreuses, le placenta et le liquide amniotique. Les aminosides se concentrent dans les liquides extracellulaires et pénètrent mal dans les tissus adipeux, le cerveau et le liquide céphalorachidien. On retrouve des concentrations importantes dans le parenchyme rénal, particulièrement dans la zone corticale. La gentamicine est susceptible de passer dans le lait maternel.

■ Métabolisme

La gentamicine est éliminée sous forme inchangée sans être métabolisée.

■ Demi-vie et élimination

La demi-vie de la gentamicine dans l'organisme est comprise entre 2 et 3 heures. Il existe une variabilité interindividuelle assez importante. La gentamicine est éliminée principalement par filtration glomérulaire au niveau du rein.

f. Toxicité

Un traitement par aminoglycosides expose le patient à des risques d'ototoxicité et de néphrotoxicité.

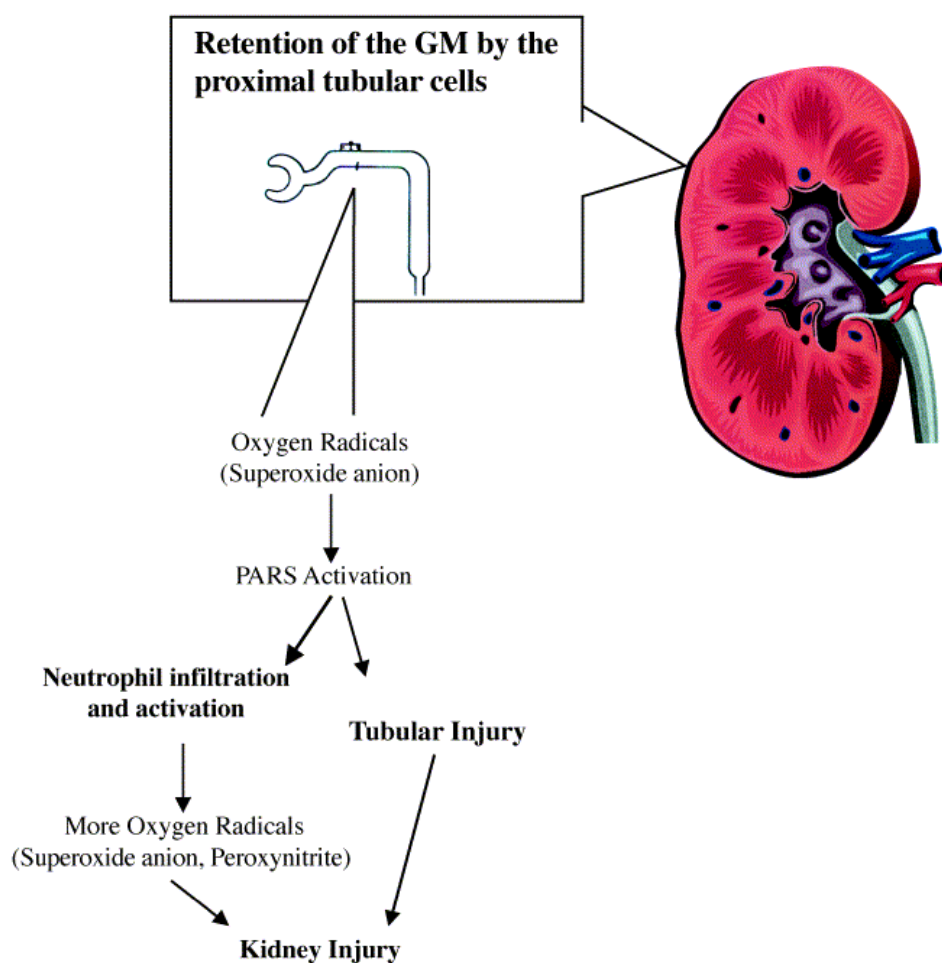


Figure 10 : Schéma de certains mécanismes de la néphropathie induite par la gentamicine

(d'après S. Cuzzocrea et al., 2002)

La rétention de la gentamicine dans les cellules du tubule contourné proximal et la formation des radicaux libres oxygénés (anions superoxydes, radicaux hydroxylés, peroxynitrite) qui y sont associés contribuent à l'induction de néphropathies. Une des conséquences peut être le développement de cassures simple brin de l'ADN qui induit les PARS (poly(ADP-ribose) synthase) conduisant à des dysfonctionnements cellulaires. Pour plus de détails voir l'article (Cuzzocrea et al. 2002).

■ Ototoxicité

Il est aujourd'hui bien connu qu'une des toxicités majeures des aminosides est l'ototoxicité. Pour ce qui concerne la gentamicine, on note une vestibulotoxicité prédominante sur une cochleotoxicité. L'ototoxicité serait provoquée par plusieurs mécanismes concomitants : perturbation de la synthèse protéique mitochondriale, hyperactivation des récepteurs et formation de radicaux libres. Cette toxicité serait à la fois dépendante de la dose d'exposition et liée à une prédisposition génétique (Selimoglu 2007).

■ Néphrotoxicité

Les complications rénales des aminosides sont fréquentes. La néphrotoxicité touche environ 20% des malades traités. Elle se manifeste cliniquement par une insuffisance rénale aiguë de degré variable, accompagnée d'une protéinurie minimale et d'une leucocyturie qui précèdent une diminution de la filtration glomérulaire. Sur le plan histologique, la lésion rénale est représentée par une nécrose tubulaire dont l'évolution après arrêt du toxique est généralement favorable. Les signes d'atteinte rénale ont également été rapportés à des faibles doses chez l'Homme et chez l'animal. Après la filtration glomérulaire, une faible quantité (2-5%) de gentamicine se lie aux cellules endothéliales du tubule contourné proximal (Bennett 1989). Cette liaison résulte aussi bien de l'interaction des aminosides polybasiques avec les acides phospholipidiques que de la liaison du composé à des transporteurs endocytosiques tels que la mégaline (Nagai and Takano 2004). Après entrée dans le cytoplasme par endocytose, la gentamicine s'accumule dans les vacuoles lysosomales. Différentes voies mécanistiques ont été explorées pour tenter de comprendre par quel(s) mécanisme(s) la gentamicine induit une néphrotoxicité : formation d'espèces radicalaires de l'oxygène, augmentation de la phospholipidose rénale, dérégulation de l'équilibre électrolytique par inhibition de la pompe Na/K-ATPase, perturbation des enzymes lysosomales, modification de l'hémodynamie par action sur le système rénine-angiotensine (Ali 1995; Sundin et al. 2001). A l'heure actuelle, de nombreux travaux étudient les effets d'agents anti-oxydants sur la prévention de la néphrotoxicité induite par la gentamicine (Dhanarajan et al. 2006; Khan et al. 2009). Ces études soulignent l'importance du stress oxydant dans les mécanismes d'atteinte rénale (Figure 10) bien qu'il paraît clair aujourd'hui que la néphrotoxicité induite par la gentamicine est une combinaison de différents mécanismes (Ali 2003).

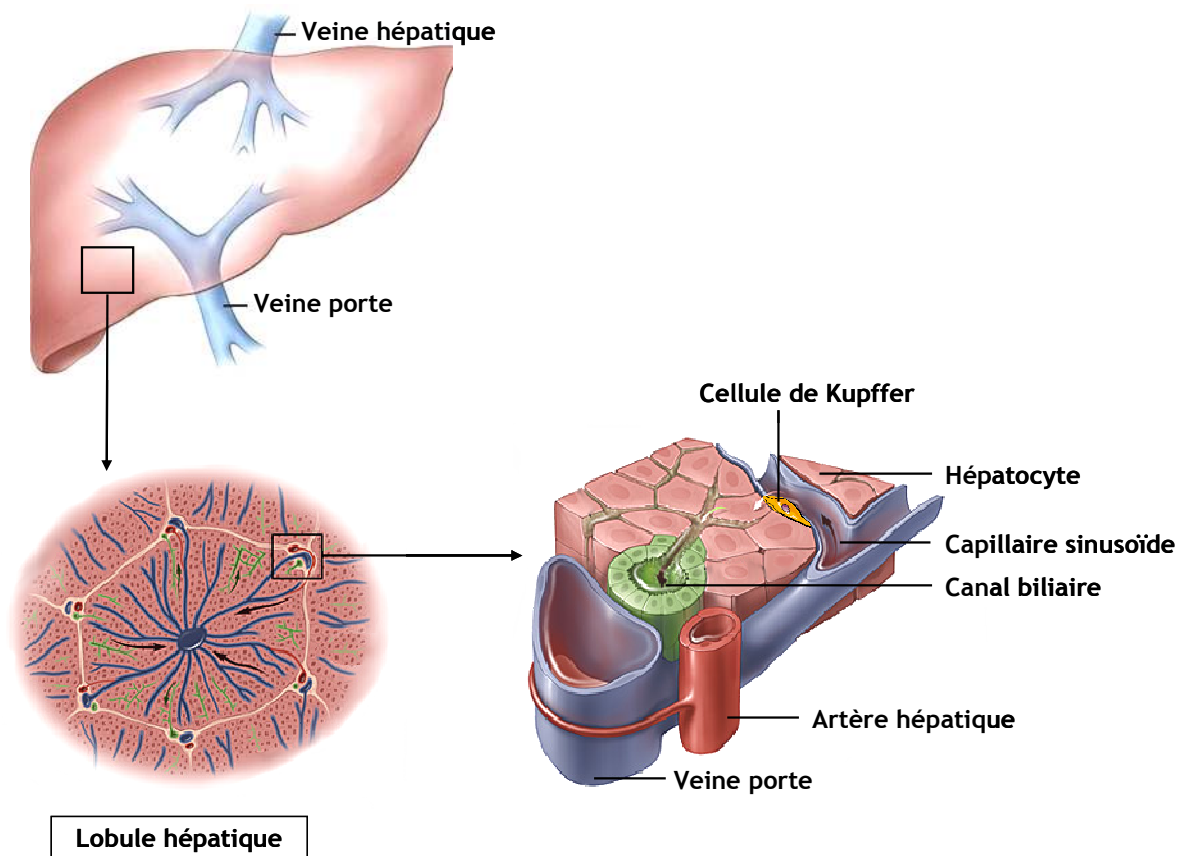


Figure 11 : Structure fine du foie et organisation d'un lobule hépatique

D'autres facteurs contribuent à la néphrotoxicité de la gentamicine : la dose administrée, la durée du traitement, l'âge, le co-traitement par des médicaments associés à des néphropathies, etc. Flandre *et al.* ont ainsi montrés qu'un traitement à la gentamicine (100 mg/kg) administré chez des rats de 12-16 mois induit des dommages rénaux plus sévères (dont les nécroses tubulaires) que chez des rats de 5-6 mois (Flandre and Damon 1967).

B Le foie : organe de métabolisation

1. Présentation du foie

a. Rappel anatomique et principales fonctions biologiques

Le foie a une structure complexe liée à la diversité de ses fonctions. En effet, il joue un rôle essentiel dans la détoxification de nombreux xénobiotiques (alcool, médicaments, etc.), dans la formation de la bile et dans le métabolisme des protéines, des hydrates de carbone et des lipides.

Le foie reçoit 25% de sang provenant de l'artère hépatique et 75% provenant de la veine porte. Cette dernière recueille le sang veineux des organes intra-abdominaux et se divise en de nombreuses branches immédiatement après son entrée dans le foie. Le sang de la veine porte contient, entre autre, les nutriments et les substances absorbés par la muqueuse intestinale (dont certains médicaments).

Le foie est un organe multilobé (5 lobes principaux chez le rat et 2 chez l'Homme). Il est constitué de très nombreux lobules hépatiques. Un réseau dense de capillaires sinusoides permet le passage du sang à l'intérieur du foie et l'absorption des diverses molécules par les hépatocytes. Le foie est également traversé par des canalicules biliaires, qui se rejoignent et forment des canaux biliaires. Ceux-ci se jettent dans le canal cholédoque qui rejoint la lumière intestinale. Les hépatocytes sont organisés en travées, elles-mêmes constituées de lobules (en forme de prismes polygonaux). Entre les travées se trouvent les capillaires sinusoides où se mélangent le sang artériel et le sang veineux. Ces capillaires sanguins se jettent dans la veine centrolobulaire, qui elle-même rejoint les veines sus-hépatiques, la veine hépatique puis la veine cave inférieure (Figure 11).

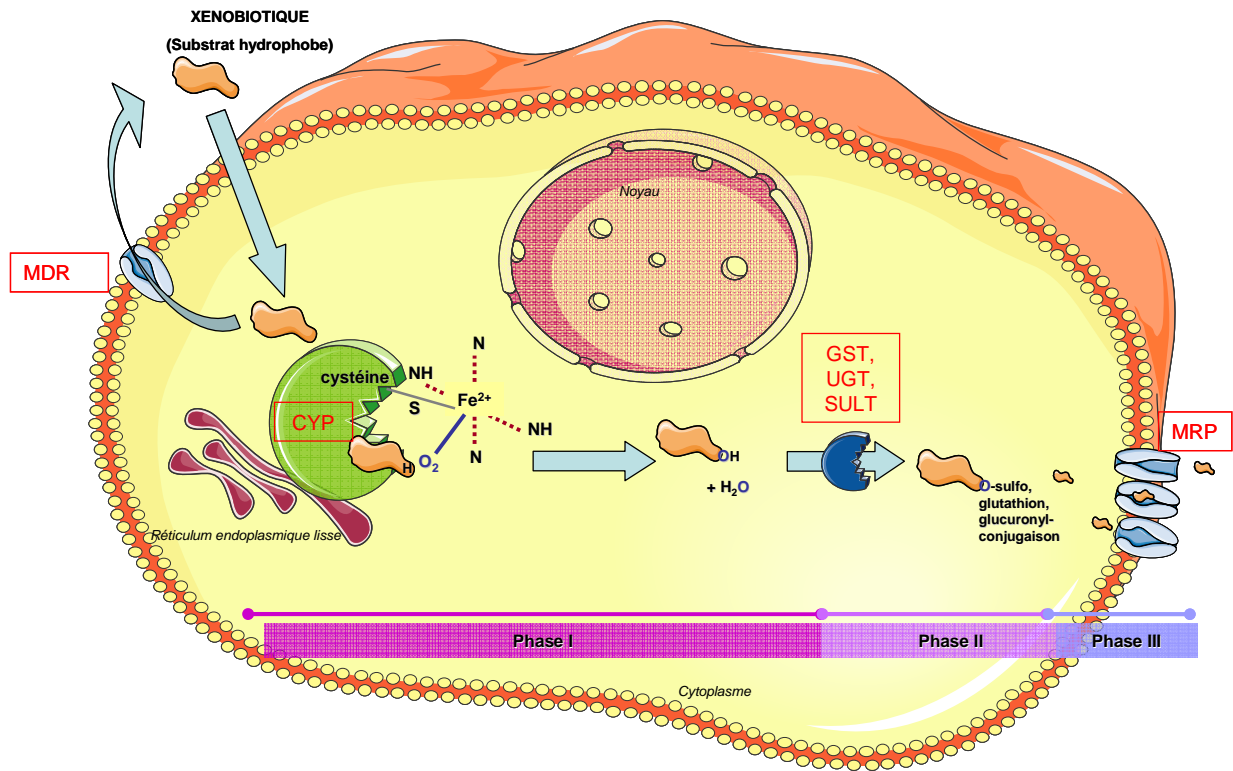


Figure 12 : Schéma de la métabolisation d'un xénobiotique au niveau cellulaire

b. Fonction de détoxification : métabolisme des xénobiotiques, notions sur les EMXs

Le foie joue un rôle particulier du fait de son intégration dans le système porte : il agit comme un filtre pour toutes les substances qui sont absorbées dans le tractus digestif et doivent passer par le foie avant de parvenir à la circulation générale. De nombreux médicaments sont souvent métabolisés au niveau hépatique ce qui induit une modification de leur activité pharmacologique (effet de premier passage hépatique).

Le foie est ainsi un organe majeur de l'épuration de l'organisme. Pour cela, il est muni d'un très important arsenal enzymatique.

Les enzymes de biotransformation sont habituellement classées en deux familles : les enzymes de phase I (dont les cytochromes P450 sont majoritaires) et les enzymes de phases II (ou transférases). Les transporteurs membranaires (phase III) jouent également un rôle crucial dans l'élimination des composés hors de la cellule (Figure 12).

■ Les enzymes de phase I

Les enzymes de phase I induisent une oxydation, une réduction, une hydrolyse ou une hydratation du composé. La majorité de ces enzymes sont des CYPs. Celles-ci sont des hémoprotéines qui appartiennent à la grande famille des oxygénases. Afin d'être fonctionnels, les CYPs ont besoin d'une source d'électrons ; le Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) en est la source majeure (Figure 13).

Ces enzymes se trouvent dans tous les tissus mais le foie est considéré comme l'organe le plus riche. Elles peuvent en effet représenter 1% des protéines totales du foie (Gueguen et al. 2006b). Ces CYPs se situent sur la membrane du réticulum endoplasmique ou dans les mitochondries. Actuellement, on connaît 57 CYPs humains dont 15 sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (familles 1, 2 et 3). Les isoenzymes du cytochrome P450 présentent des caractéristiques communes. Tout d'abord, il y a peu de spécificité des CYPs pour leur ligand. De plus, il existe une grande variabilité inter et intra-individuelle quant à l'expression et à l'activité des cytochromes dans les divers tissus de l'organisme (Gueguen et al. 2006b; Hasler et al. 1999; Lewis 2004; Nebert and Russell 2002).

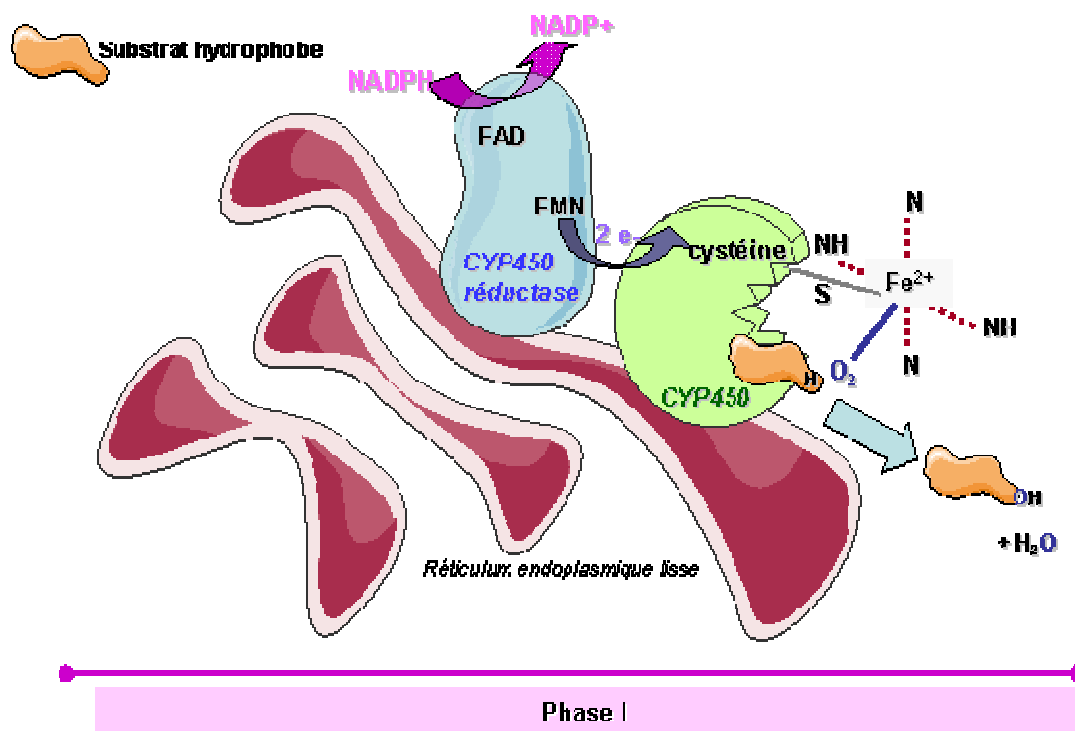


Figure 13 : schéma de la métabolisation d'un xénotique par les cytochromes P450

La transformation d'un composé chimique par les enzymes à cytochromes P450 a lieu sur la face externe du réticulum endoplasmique où est ancrée l'enzyme. Le site actif du cytochrome P450 contient un atome de fer (Fe). Deux électrons, provenant d'une molécule de NADPH, sont transférés à l'hémoprotéine par une flavoprotéine (FAD-FMN) en présence d'une molécule organique et d'un atome d'oxygène. Le composé organique est oxydé et un atome d'oxygène moléculaire est incorporé au produit chimique.

CYP1

Les principaux représentants de cette famille sont CYP1A1, 1A2 et 1B1. Les isoformes CYP1A1 et CYP1A2 jouent un rôle essentiel dans le métabolisme des hydrocarbures aromatiques polycycliques, tels que ceux retrouvés dans les produits d'incinération des composés industriels ou dans la fumée de cigarette. Ils sont ainsi utilisés dans certaines études de toxicologie environnementale ou d'écotoxicologie en tant que marqueur d'exposition (Quiros et al. 2007; Zhou et al. 2010). Leur voie de régulation transcriptionnelle dépend principalement du récepteur nucléaire AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) (Ma and Lu 2007).

CYP2

La famille CYP2 représente la plus grande diversité d'isoenzymes du cytochrome P450 chez les espèces étudiées. Les CYP2A métabolisent de nombreux xénobiotiques tels que la coumarine, l'aflatoxine B1, la nicotine mais également des endobiotiques (testostérone, progestérone). Les CYP2A sont inductibles dans le foie par diverses molécules (telles que le phénobarbital) et les récepteurs nucléaires PXR (pregnane X receptor) et CAR (constitutive androstane receptor) sont fortement impliqués dans leurs voies de régulation transcriptionnelle (Su and Ding 2004).

La régulation transcriptionnelle des CYP2B est principalement dépendante de CAR. Bien que son taux basal soit relativement bas, de nombreux xénobiotiques (millepertuis, paracétamol, etc.) sont susceptibles d'en induire l'expression (Wang and LeCluyse 2003).

La famille CYP2C est composée de 4 isoformes. L'isoforme la plus abondante est la CYP2C9. Elle est reconnue comme métabolisant environ 25% des médicaments utilisés en clinique (statines, rifampicine, phénobarbital, etc.). L'équivalent du CYP2C9 de l'Homme est la sous-famille 2C11 chez le rat (Gueguen et al. 2006b).

L'homologie de la CYP2E1 entre les espèces est parmi celle qui est la mieux conservée. Outre le paracétamol, on compte parmi ses substrats l'éthanol, la théophylline et la caféine. Les voies de régulation transcriptionnelle de CYP2E ne sont actuellement pas entièrement connues.

CYP3

La famille CYP3 comprend seulement une sous-famille, le CYP3A composé de 4 isoformes 3A4, 3A5, 3A7, 3A43 dont l'expression tissulaire diffère. Il est généralement accepté que la famille CYP3A est la plus abondante des CYP dans le foie et l'intestin grêle humain.

Introduction

Introduction

En effet, dans ces organes, les CYP3A représentent entre 30 et 60% des CYP totales (Burk and Wojnowski 2004). Leur fonction s'exerce sur la métabolisation de composés endogènes (hormones stéroïdiennes) et de composés exogènes. CYP3A4 est très fréquemment impliqué dans le métabolisme de médicaments (on estime que plus de 50% des médicaments sont métabolisés par cette enzyme).

Au niveau du foie, les hépatocytes centrolobulaires sont les structures les plus riches en CYPs. CYP3A4 est l'isoforme la plus abondante au niveau hépatique (Shimada et al. 1994; Wrighton et al. 1990). CYP3A5 est également présent dans le foie mais un polymorphisme inter-individuel existe (Wrighton et al. 1990). Quant à CYP3A7, la description de son existence a longtemps été réduite au stade fœtal du développement hépatique, néanmoins, il a été montré que CYP3A7 peut également être présent dans le foie adulte (Hakkola et al. 1994).

Un important système de régulation contrôle l'expression de cette enzyme, notamment par l'activation de facteurs de transcription et de récepteurs nucléaires (RXR (retinoid X receptor), CAR, PXR, VDR (vitamin D receptor) par des ligands spécifiques.

Selon qu'il se produit une induction ou une inhibition de l'expression et/ou de l'activité des enzymes, la pharmacocinétique voire la toxicité d'un xénobiotique peut être modulée. Par conséquent, l'exposition concomitante d'un inhibiteur ou d'un activateur de CYP3A et d'un xénobiotique peut entraîner des modifications de son métabolisme et donc de sa détoxification (Burk et al. 2004; Gueguen et al. 2006b).

Il est intéressant de noter que les isoenzymes du rat (CYP3A1 et CYP3A2) correspondent à CYP3A4 de l'homme.

A la suite du processus métabolique de phase I, les substrats peuvent être soit conjugués avec des composés endogènes et subir ainsi une réaction de phase II, soit excrétés directement dans les urines ou dans la bile.

■ Les enzymes de phase II

Les enzymes de phase II (ou transférases) interviennent afin de conjuguer le xénobiotique ou son métabolite à des molécules polaires. Tout comme pour les enzymes de phase I, il existe différentes familles et sous-familles. Ces transférases sont multifonctionnelles et impliquées dans le métabolisme de composés exogènes et endogènes. Pour le métabolisme des xénobiotiques, les glutathion-S-transférases (GST), les sulfotransférases (ST) ainsi que les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) sont les trois familles les plus sollicitées.

Introduction

Glutathion-S-transférases

Le niveau d'expression des GST est crucial dans la détermination de la sensibilité cellulaire aux effets de nombreux xénobiotiques (carcinogènes, médicaments antitumoraux, polluants environnementaux, produits du stress oxydant). Les GSTs représentent une importante famille d'isoenzymes polymorphes réparties en huit classes : mu, alpha, pi, thêta, zêta, sigma, kappa et omega. Les isoformes α sont exprimées de manière importante dans le foie et le rein (Habdous et al. 2004). Le mode de régulation est complexe mais dépend notamment de ARE (antioxydant-responsive element) et de XRE (xénobiotique-responsive element). L'implication de AhR dans la régulation transcriptionnelle est vraisemblable (Hayes and Pulford 1995).

Toutes les enzymes GST ont la capacité de conjuguer une molécule de glutathion (GSH) à un composé possédant un centre électrophile (tel que l'aflatoxine B1, le benzo(a)pyrène, la fosfomycine ou encore le paracétamol) (Hayes et al. 1995).

Sulfotransférases

La sulfonation est une réaction majeure dans le métabolisme de nombreux xénobiotiques (*p*-nitrophénol, paracétamol) et d'endobiotiques (dopamine, cholestérol, thyroxine). Le donneur universel de sulfonate est le PAPS (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate). A l'heure actuelle, cinq classes d'isoenzymes ont été mises en évidence chez les mammifères : ST1, 2, 3, 4 et 5.

Les xénobiotiques sont susceptibles de réguler la transcription des STs *via* le récepteur nucléaire AhR principalement mais également *via* PXR et CAR. L'isoforme ST1A1 est la plus présente dans le foie humain. Cette isoforme est conservée dans les différentes espèces. Elle serait la plus impliquée dans le métabolisme des médicaments (Gamage et al. 2006).

UDP-glucuronosyltransférases

La conjugaison avec l'acide glucuronique est une réaction majeure dans la détoxification et l'élimination des xénobiotiques lipophiles. Les UGTs sont situées sur la membrane luminale du réticulum endoplasmique.

Les récepteurs nucléaires PXR, CAR et AhR sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle des UGTs par les xénobiotiques (Zhou et al. 2005). A l'heure actuelle, les données les plus abondantes quant au métabolisme des xénobiotiques chez le rat portent sur UGT1A1 et UGT2B1 (Ritter 2000).

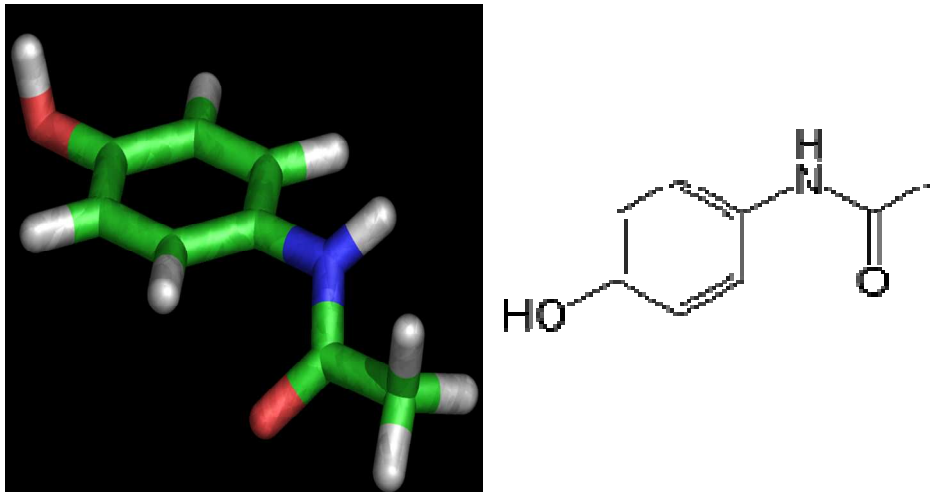


Figure 14 : Représentations 3D et plane du paracétamol

■ Les transporteurs impliqués dans la phase 3

De même que pour les enzymes des autres phases, ces protéines appartiennent à des superfamilles. MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) véhicule les anions organiques (glucuronate, sulphate et conjugat au glutathion) à travers la membrane apicale des hépatocytes. Ils permettent l'élimination de substances exogènes vers la bile ou les urines. La protéine MDR (multidrug resistance protein) est également un transporteur fréquemment sollicité dans la détoxification des médicaments. Ces deux transporteurs appartiennent à la grande famille des protéines ABC (ATP-binding cassette). Nous avons limité notre étude à deux transporteurs apicaux particulièrement impliqués dans le transport des médicaments (de l'hépatocyte vers les canaux biliaires) : MDR1 et MRP2 (Chan et al. 2004).

2. Hépatotoxicités induites par des xénobiotiques : cas du paracétamol

Les xénobiotiques les plus couramment décrits comme hépatotoxiques sont les médicaments. Plus de 1100 médicaments sont susceptibles d'être hépatotoxiques. L'incidence de l'hépatotoxicité médicamenteuse est estimée à plus de 8000 cas par an et de 500 décès en France. La majorité des hépatopathies médicamenteuses sont liées à la transformation du médicament en un métabolite réactif. Le paracétamol en est le parfait exemple.

a. Historique du paracétamol

Le paracétamol, dérivé hydroxylé et non néphrotoxique de l'acétanilide, est apparu en 1893, son utilisation s'est étendue de manière considérable depuis la fin de la deuxième guerre mondiale pour ses propriétés antipyrétiques (Gueneau 2006).

b. Structure et propriétés chimiques

Le paracétamol est une poudre blanche. Il est très soluble dans l'alcool et beaucoup moins dans l'eau (1,4 g dans 100 mL d'eau).

La molécule est constituée d'un cycle benzénique, substitué par un groupement hydroxyle et par un groupement amide en position *para* (Figure 14).

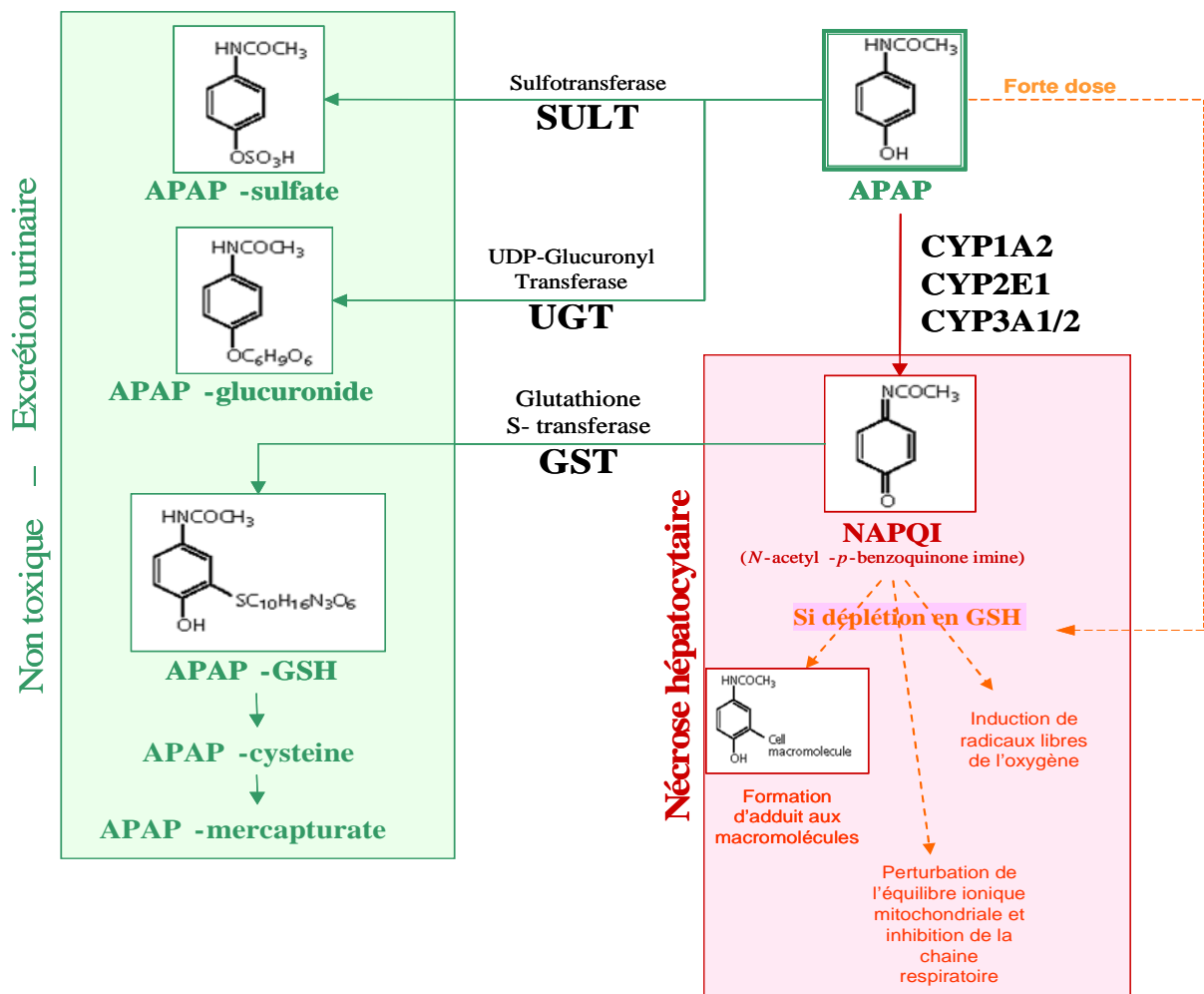


Figure 15 : Schéma du métabolisme hépatique du paracétamol chez le rat

Introduction

c. Mécanisme d'action

Comme les salicylés, le paracétamol dispose d'une activité antipyrétique et analgésique, mais il s'en distingue par l'absence d'activité anti-inflammatoire et anti-agrégante, ainsi que par l'absence de toxicité sur la muqueuse gastro-duodénale. A l'heure actuelle, soit environ un siècle après sa découverte, le mécanisme d'action complet du paracétamol reste mal connu.

d. Propriétés pharmacologiques et indications

Les propriétés pharmacologiques et les indications de l'utilisation du paracétamol sont définies de la façon suivante par le DOROSZ, guide pratique des médicaments :

(1) « Analgésique-antipyrétique d'efficacité comparable à celle de l'aspirine sans effet anti-inflammatoire, avec l'avantage d'une excellente tolérance en particulier digestive autorisant son emploi en première intention notamment chez l'enfant, la femme enceinte ou qui allaite, et en cas d'ulcère gastroduodéal ou d'autres lésions du tube digestif »,

(2) « Traitement symptomatique des affections douloureuses et/ou fébriles, en 1ère intention »

Le paracétamol est ainsi le médicament le plus prescrit en France. Il a l'avantage d'avoir peu de contre-indications, de pouvoir être prescrit à tout âge et d'être dénué d'effets indésirables sérieux.

e. Pharmacocinétique

■ Absorption :

Après administration par voie orale, le paracétamol est rapidement et presque totalement résorbé au niveau de l'intestin grêle. Le pic plasmatique est obtenu entre 15 minutes et 2 heures. Il existe un effet de premier passage hépatique peu marqué et sa biodisponibilité absolue par voie orale est voisine de 80 %.

■ Distribution

Le paracétamol est peu lié aux protéines plasmatiques (inférieur à 20 %). Il diffuse rapidement à travers la barrière hémato-encéphalique et sa concentration dans le liquide céphalo-rachidien est proche de la concentration plasmatique.

Introduction

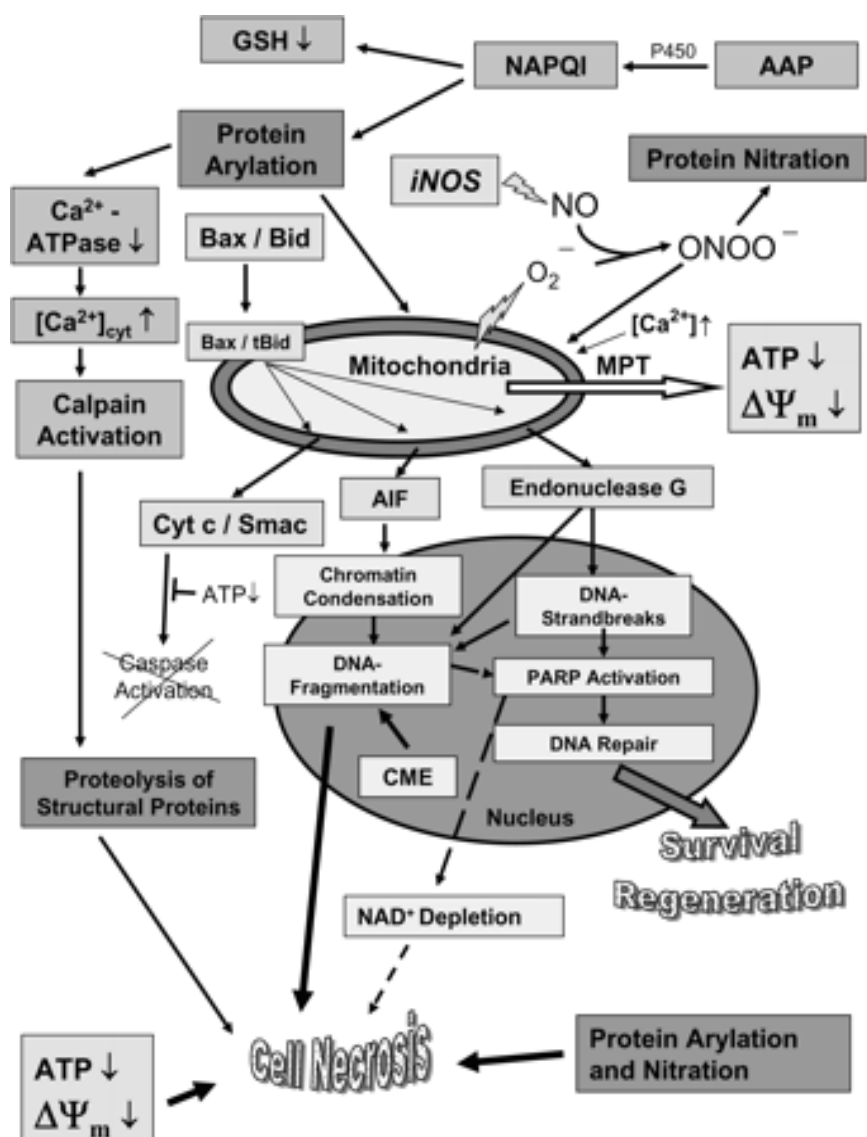


Figure 16 : Schéma des hypothèses des voies de toxicité du paracétamol

Abréviations : AIF, apoptosis-inducing factor; CME, nuclear Ca^{2+}/Mg^{2+} -dependent endonuclease (DNAS1L3); cyt, cytosolic; cyt c, cytochrome c; $\Delta\Psi_m$, mitochondrial membrane potential; GSH, reduced glutathione; iNOS, inducible NO synthase; MPT, mitochondrial membrane permeability transition; NAPQI, N-acetyl-p-benzoquinone imine; NO, nitric oxide; O_2^- , superoxide; ONOO⁻, peroxynitrite; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; Smac, second mitochondria-derived activator of caspases; tBid, truncated from of Bid.

(d'après Jaeschke et al., 2006)

Introduction

■ Métabolisme

Dans les conditions normales de son utilisation (posologie maximale de 1 g par prise et 4 g par jour chez l'adulte), le paracétamol est métabolisé, majoritairement au niveau hépatique, en dérivés glucuro- et sulfo-conjugués *via* des glucuronyltransférases et des sulfotransférases. Les métabolites du paracétamol sont alors excrétés dans la bile *via* les transporteurs (notamment MRP2) ou dans le sang *via* MRP3. Seule une faible fraction est transformée par les CYPs (tels que CYP2E1 ou CYP3A) en un métabolite très réactif : le N-acétyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI). Celui-ci est normalement complexé au glutathion qui le détoxifie et facilite son élimination. En cas de surdosage en paracétamol ou en cas de co-administration avec un inducteur enzymatique (éthanol par exemple), la proportion d'APAP métabolisé par les CYPs est plus importante. Ceci aboutit à une augmentation de la formation du NAPQI. Cette importante quantité de métabolite réactif épuise le stock de glutathion. Une cytolyse centro-lobulaire au niveau hépatique débute alors (Figure 15) (Jaeschke and Bajt 2006; James et al. 2003).

■ Demi-vie et élimination :

La demi-vie du paracétamol dans l'organisme est comprise entre 1,5 et 3 heures. Il existe peu de variabilité interindividuelle. Le paracétamol est éliminé principalement par voie rénale sous forme de métabolites glucuro- ou sulfo-conjugués. Moins de 10% de la quantité administrée est éliminé par les urines sous forme inchangée.

f. Toxicité

Les effets toxiques du paracétamol se manifestent principalement au niveau du foie. Il est un des exemples le plus couramment utilisé dans la littérature pour illustrer une hépatotoxicité médicamenteuse. Les mécanismes de l'hépatotoxicité du paracétamol ne sont pourtant pas entièrement connus (Figure 16). Le NAPQI se lie de manière covalente aux protéines avoisinantes y compris aux protéines mitochondriales. Ces adduits induisent une inhibition de la respiration mitochondriale et la formation intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène. Ce stress oxydant a pour conséquence une inactivation des transporteurs calciques et donc une augmentation de la teneur en calcium intracellulaire. L'augmentation du calcium intracellulaire a deux conséquences. La première est l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale, une perturbation du potentiel membranaire, des dysfonctionnements de la machinerie de synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP) et en dernier lieu, une nécrose de la cellule.

Introduction

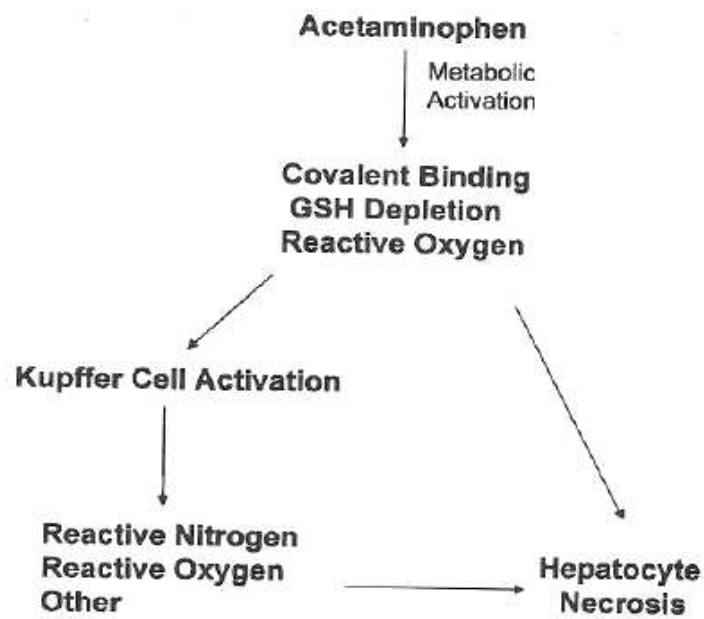


Figure 17 : Schéma de l'hypothèse de l'implication des cellules de Kupffer dans la toxicité du paracétamol.

(D'après Michael et al, 1999)

Introduction

La seconde conséquence de l'accumulation intracellulaire de calcium est l'activation des protéines calcium-dépendantes telles que les calpaïnes. Celles-ci participent à la nécrose de la cellule mère mais également, au moment de la rupture membranaire, à la nécrose des cellules avoisinantes.

En cas de lésions plus modérées, une voie alternative se met en place. Cette dernière passe par la libération du cytochrome c, qui lui-même est à l'origine de l'activation de caspases et donc d'un processus apoptotique (Jaeschke et al. 2006; James et al. 2003).

Il a été décrit plus récemment un rôle des cellules de Küpffer dans les mécanismes d'hépatotoxicité induit par le paracétamol (Figure 17). Ces cellules macrophagiques seraient, en effet, activées par la déplétion en glutathion et par le stress oxydant qui en découle. Une fois activées, les cellules de Küpffer libèrent des espèces réactives nitrogénées et oxygénées ainsi que des médiateurs de l'inflammation qui participent à l'induction de la mort cellulaire (James et al. 2003; Michael et al. 1999; Roberts et al. 2007).

Problématique

Problématique

Problématique

L'uranium est un métal lourd naturellement présent dans la croûte terrestre. L'utilisation d'uranium appauvri (UA) à des fins civiles et militaires conduit à la potentialisation de l'exposition de la population par ingestion. Ce travail s'inscrit dans le cadre du programme ENVIRHOM qui évalue les risques liés à l'exposition chronique des radionucléides sur la santé humaine. L'organe cible de l'uranium est le rein mais des effets biologiques notables du composé ont néanmoins été décrits dans d'autres organes, y compris le foie. Le but de cette thèse est d'explorer, *in vivo* et *in vitro*, l'action de l'UA sur les principaux protagonistes du système de détoxification de l'organisme : le rein et le foie avec notamment les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX).

Dans le but de mimer une contamination chronique de l'organisme à une dose environnementale, le modèle *in vivo* est basé sur une exposition de 9 mois de rats mâles adultes à l'UA (40 mg/L). La concentration de 40 mg/L correspondant à une concentration maximaliste environnementale.

Comme le montre l'abondante bibliographie, le rein est un des premiers organes cibles de l'uranium. Néanmoins, en cas de contamination chronique à une concentration environnementale, la sensibilité du rein reste à l'heure actuelle méconnue. Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à étudier dans le détail les effets de la contamination chronique par l'uranium sur différents marqueurs de néphrotoxicité (organiques ou fonctionnels). La finalité de cette étude était de répondre à la question suivante : « **L'uranium appauvri administré en chronique à une dose maximaliste environnementale, induit-t'il une prédisposition du rein à une néphrotoxicité induite par un autre xénobiotique ?** ». Pour cela, nous avons complété notre modèle expérimental de base par un traitement à un médicament néphrotoxique, la gentamicine. Ce dernier a été administré à différentes doses (de non néphrotoxique à très néphrotoxique) afin d'évaluer l'effet de l'uranium sur différents stades de gravité d'atteinte rénale.

Par ailleurs, les données bibliographiques plus récentes montrent que le foie et notamment les EMXs, sont des cibles potentielles de l'uranium. La seconde question que nous nous sommes posée est la suivante : « **L'uranium appauvri administré en chronique à une dose maximaliste environnementale induit-t'il des perturbations du métabolisme des xénobiotiques ?** ». Afin d'y répondre et d'estimer l'impact d'une modification des acteurs du métabolisme hépatiques des xénobiotiques, la contamination à l'UA a été suivie d'un traitement au paracétamol, médicament possédant un métabolite fortement hépatotoxique. Différents schémas de traitement ont été entrepris afin d'évaluer

Problématique

Problématique

l'impact de l'UA en cas de traitement faiblement/potentiellement/fortement hépatotoxique.

Compte tenu des résultats obtenus *in vivo* (notamment ceux concernant les EMXs), nous avons développé une approche plus mécanistique afin de répondre à la question suivante : « **Comment l'uranium agit-il à l'échelle de la cellule ?** ». Une approche *in vitro* a ainsi été développée sur des lignées cellulaires d'origine humaine (hépatiques et rénales), des hépatocytes humains et des microsomes hépatiques de rat.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

Matériels

A 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° 92-317) et en respect des recommandations du comité d'éthique de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire.

Les rats mâles adultes Sprague-Dawley de souche OFA, pesant entre 220 et 250 g et âgés de 3 mois au début des expérimentations, sont issus de l'élevage Charles River (L'Arbresle, France). Les animaux sont placés à deux par cage avec 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 12/12 heures est observé (jour de 8 h à 20 h, nuit de 20 h à 8 h).

Une phase d'une semaine d'acclimatation des animaux est respectée avant de commencer les études. Pour le suivi des animaux durant la contamination un relevé hebdomadaire du poids, de la consommation hydrique et de la prise alimentaire est réalisé.

B Modèle cellulaire

1. NRK-52e

Les cellules NRK-52e proviennent de l'ATCC (réf. CRL-1571 ; Illkirch/Strasbourg, France). Ce sont des cellules du tubule proximal de rats. Elles sont adhérentes à morphologie épithéliale. Les NRK-52e sont issues des cellules NRK, qui ont spontanément développées des propriétés d'immortalisation. A l'heure actuelle, elles sont principalement utilisées dans des modèles de toxicité et quelques études les ont utilisées dans le cadre de l'évaluation de la toxicité de l'uranium (Carriere et al. 2004; Thiebault et al. 2007).

2. HEK-293

Les cellules HEK-293 proviennent de l'ATCC (réf. CRL-1573). Ce sont des cellules adhérentes à morphologie épithéliale. Elles ont été générées et immortalisées par

Matériels et Méthodes

transformation de cellules de rein embryonnaire humain par un adénovirus. Bien qu'elles soient principalement utilisées pour leur facilité de transfection, elles sont néanmoins également impliquées dans des études de toxicité.

3. HepG2

Les cellules HepG2 proviennent de l'ATCC (réf. CRL-10741). Ces cellules sont issues d'un carcinome hépatique d'un jeune homme de 15 ans, caucasien. Ce sont des cellules adhérentes à morphologie épithéliale. Leur statut d'hépatoblaste leur confère la caractéristique d'exprimer le CYP3A7 et l' α -fétoprotéine qui sont des protéines principalement exprimées par les hépatocytes durant la vie fœtale. Les cellules HepG2 sont les plus utilisées parmi les lignées cellulaires hépatiques humaines. Elles ont l'avantage de présenter des fonctions spécifiques au foie dont notamment l'expression d'enzymes de conjugaison. Malgré le fait qu'elles soient relativement pauvres en enzymes de type cytochromes P450, elles restent à l'heure actuelle un modèle de référence dans les études impliquant les enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Elles sont aussi très largement employées dans les études d'hépatotoxicité.

4. Cellules hépatiques primaires d'origine humaine

Ces cellules proviennent de chez BD Biosciences (réf.454551, lot 208 ; Le pont de Claix, France). Elles sont issues du foie d'une femme de 15 ans, en bonne santé et non fumeuse de type caucasien, décédée accidentellement. Des tests préliminaires menés par le fournisseur ont démontré l'inductibilité des CYP3A4 par l'isoniazide dans cette lignée cellulaire.

C Préparation des solutions

1. Uranium appauvri

a. Contamination animale

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-COGENA, Pierrelatte, France). La composition isotopique de l'UA est : $^{238}\text{U}=99,74\%$, $^{235}\text{U}=0,26\%$, $^{234}\text{U}=0,001\%$.

Matériels et Méthodes

Lors des contaminations d'animaux, les cristaux sont dissouts dans une solution de bicarbonate puis dans de l'eau d'Evian® (Danone, Paris, France) afin d'obtenir une solution à 40 mg/L d'UA. La source se présente sous la forme d'une poudre jaune, il faut alors ajouter la quantité désirée de nitrate d'uranyle hexahydraté ($PM=502.13 \text{ g.mol}^{-1}$) (soit une teneur en uranium ($PM=238 \text{ g.mol}^{-1}$) de 47,4 mg d'uranium pour 100 mg de poudre) pour parvenir à la concentration de 40 mg.L^{-1} d'uranium soit 0.0844 g d'UA pour 1 L de boisson. La concentration de 40 mg/L correspond au double des concentrations maximales d'uranium naturel retrouvées dans l'eau sur Terre (Juntunen 1991; Salonen 1994).

b. Contamination cellulaire

Lors des contaminations cellulaires, les cristaux de nitrate d'uranyle sont dissouts dans une solution de bicarbonate de sodium ($pH=8,1$) (15 mg de poudre d'UA ($PM= 205 \text{ g/mol}$) à 3 mL de solution de bicarbonate à 100 mM). Par la suite, l'uranium est dissout 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. Il est important de préciser que l'uranium étant dissout dans du bicarbonate, nous nous sommes appliqués à ajuster des concentrations équivalentes de bicarbonate dans toutes les conditions.

2. Solutions médicamenteuses des expérimentations animales

Voir les fiches produits en [annexe II](#).

a. Solution de paracétamol

■ Solution de paracétamol à 50 mg/kg

Pour les traitements au paracétamol (réf A7085; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) à 50 mg/kg, la solution a été préparée à 20 mg/mL dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%) en vue d'une injection intra-péritonéale. Le pH de la solution a été ajusté à 7,4 par ajout d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique. Avant injection, la solution a été filtrée sur un filtre de 0,2 μm .

■ Suspension de paracétamol à 100 et 200 mg/kg

En vue d'une administration par gavage, le paracétamol (50 et 100 mg/ml) a été suspendu dans une solution de sérum physiologique avec 0,5% de Tragacanth (réf. G1128 ; Sigma-Aldrich). Le pH a ensuite été ajusté à 7 par ajout de NaOH ou de HCl.

Matériels et Méthodes

b. Solution de gentamicine

La gentamicine (réf. G3632, Sigma-Aldrich) a été mise en solution dans du sérum physiologique afin d'obtenir des concentrations de 5, 25, 100 et 150 mg/mL. Le pH des solutions est ajusté à 7. Les solutions sont alors filtrées sur filtre de 0,2 µm.

3. Solutions de culture cellulaire

a. Solution relative au milieu de culture

Les milieux de culture Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEM, réf. 11880-036), Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640, réf. 21875034) et Minimum Essential Medium (MEM, réf. 51200) ainsi que la solution de Pénicilline/streptomycine 10000U/mL (PS, réf. 15140), le sérum de veau fœtal (SVF, réf. 10270-106), la L-glutamine (réf. 25030-024) proviennent de chez Invitrogen (Cergy-Pontoise, France).

b. Inducteur ou inhibiteur enzymatique

■ **Dexaméthasone**

Une solution de dexaméthasone (20 mM) (réf. D1756 ; Sigma-Aldrich) est préparée par dissolution de la poudre dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, réf. D2650 ; Sigma-Aldrich). La solution mère est ensuite diluée afin d'obtenir les concentrations désirées tout en respectant une concentration de DMSO dans les milieux de culture inférieure à 0,1% et identique au sein d'une même expérience.

■ **Rifampicine**

Une solution de rifampicine (20 mM) (réf. R3501 ; Sigma-Aldrich) est préparée par dissolution de la poudre dans du DMSO. La solution mère est ensuite diluée afin d'obtenir les concentrations désirées tout en respectant une concentration de DMSO dans les milieux de culture inférieure à 0,1% et identique au sein d'une même expérience.

■ **Isoniazide**

Une solution d'isoniazide (10 mM) (réf. I3377 ; Sigma-Aldrich) est préparée par dissolution de la poudre dans de l'eau. La solution mère est ensuite diluée afin d'obtenir les concentrations désirées.

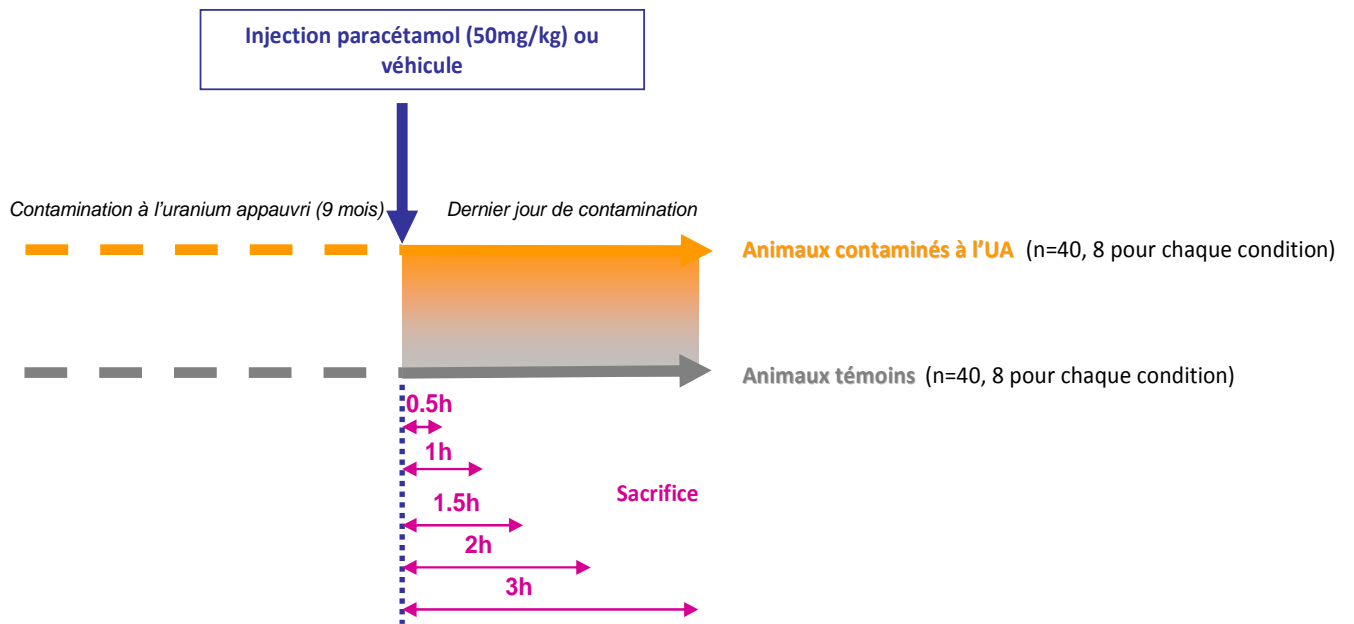


Figure 18 : Schéma du protocole expérimental « UA et traitement unique au paracétamol »

Méthodes

A Modèles d'expérimentation

1. Contamination animale

Les animaux sont répartis aléatoirement entre lots témoins et lots contaminés avec un nombre équivalent d'animaux pour chaque groupe.

Une semaine après l'arrivée des animaux à l'animalerie, la contamination débute *via* l'eau de boisson. Les rats adultes sont contaminés pendant 9 mois avec de l'UA à 40 mg/L.

Les mesures d'uranium dans les organes sont réalisées après le sacrifice de l'animal.

2. Traitement médicamenteux

Tous les traitements médicamenteux sont réalisés au court de la dernière semaine de la contamination par l'uranium appauvri.

a. Traitement unique au paracétamol

Le but de cette étude est d'établir une cinétique des évènements consécutifs au traitement au paracétamol. Pour se faire, chaque groupe d'animaux est composé de 8 rats. Les rats traités reçoivent une dose unique de paracétamol (50 mg/kg) par voie intrapéritonéale. Les rats témoins reçoivent un volume équivalent de sérum physiologique (NaCl 0,9%) par la même voie d'injection. Cette dose de paracétamol correspond à une dose décrite comme n'induisant pas d'effet toxique chez le rat. Elle peut être comparée à une dose « thérapeutique » chez l'Homme adulte. Les animaux traités au paracétamol sont sacrifiés 30 minutes (n=16), 60 minutes (n=16), 90 minutes (n=16), 120 minutes (n=16) et 180 minutes (n=16) après l'injection. Les 16 animaux témoins sont sacrifiés dans les 3 heures qui suivent leur injection de sérum physiologique (Figure 18).

b. Traitement au paracétamol selon un schéma thérapeutique

Le but de cette étude est d'analyser l'impact d'une contamination chronique à l'UA sur le métabolisme du paracétamol administré selon un schéma thérapeutique. Pour se faire, chaque groupe d'animaux est composé de 8 rats. Les rats traités sont gavés deux fois par jour avec une suspension de paracétamol (50 et 100 mg/mL) à raison de 2 mL par kg, en respectant un intervalle de 3 heures entre les deux traitements. Les rats témoins reçoivent

Matériels et Méthodes

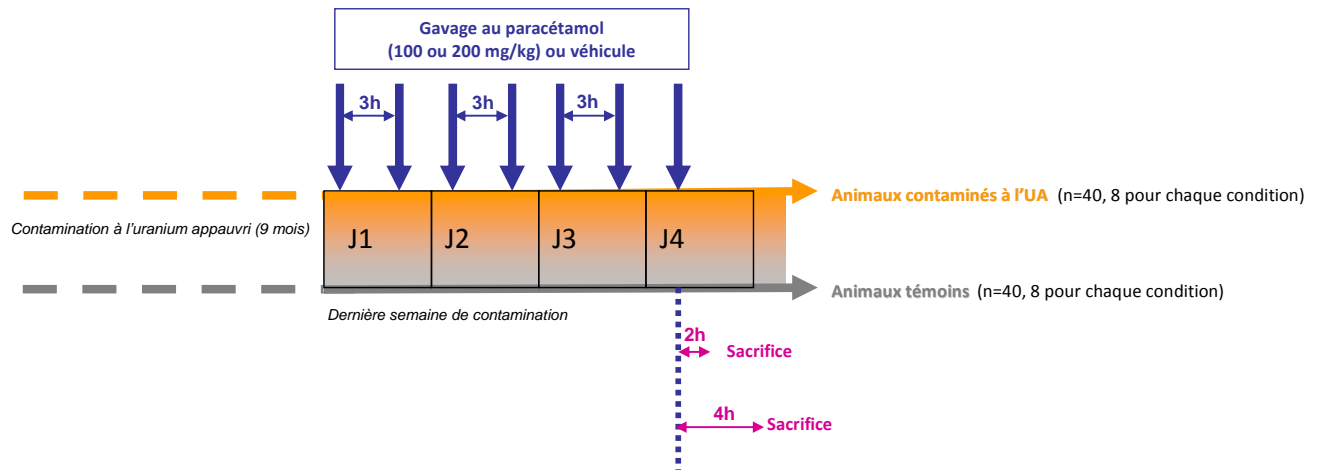


Figure 19 : Schéma du protocole expérimental « UA et traitement selon un schéma thérapeutique au paracétamol »

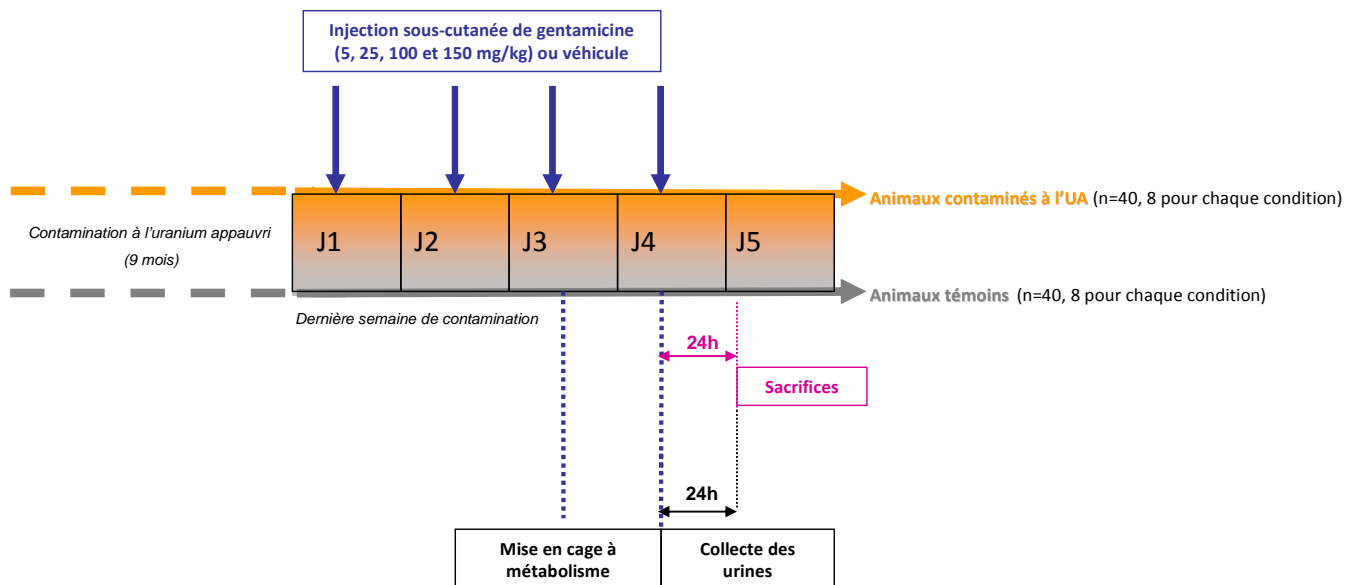


Figure 20 : Schéma du protocole expérimental « UA et traitement à la gentamicine »

un volume équivalent de véhicule (tragacanth 0,5%). La première dose (100 mg/kg) est reconnue comme non-hépatotoxique et la seconde (200 mg/kg) se situe au seuil de l'hépatotoxicité (données déterminées à partir de nos mises au point). Les animaux traités au paracétamol sont sacrifiés 2 ou 4 heures après le dernier gavage afin d'établir une chronologie des événements consécutifs au traitement au paracétamol. Les 16 animaux témoins sont sacrifiés 2 ou 4 heures après le gavage par le véhicule (Figure 19).

c. Traitement à la gentamicine

Le but de cette étude est d'analyser l'impact d'une contamination chronique à l'UA sur la toxicité et les enzymes du métabolisme des xénobiotiques de deux organes majeures de la détoxification de l'organisme ; le foie et le rein. Pour se faire, chaque groupe d'animaux est composé de 8 rats. Les rats sont traités quotidiennement et durant 4 jours par une injection sous-cutanée d'une solution de sulfate de gentamicine (5, 25, 100 et 150 mg/mL) à raison d'une injection de 1ml/kg. Les rats témoins reçoivent un volume équivalent de véhicule. La dose seuil de l'apparition des premiers signes de néphrotoxicité est décrite aux environs de 80-100 mg/kg (Flandre et al. 1967; Priyamvada et al. 2008; Zhou et al. 2008). Les animaux sont sacrifiés 24 heures après la dernière injection. Les rats sont placés individuellement dans des cages à métabolisme 48 heures avant le sacrifice et les urines sont collectées durant les 24 dernières heures. Les animaux sont pesés quotidiennement durant les 4 jours de traitement médicamenteux (Figure 20).

3. Contamination des modèles cellulaires

a. Test 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 μ M pendant 24, 48 ou 72 heures *via* le milieu de culture. Toutes les cellules sont exposées à la même concentration de bicarbonate 10 mM.

b. Observation SIMS

Lors des préparations cellulaires pour les observations au SIMS, les cellules ont été incubées dans un milieu de culture complet contenant 10, 50 ou 100 μ M de nitrate d'uranyle (UA) pendant 24 h. Toutes les cellules sont exposées à la même concentration de bicarbonate 10 mM.

Matériels et Méthodes

c. Test d'induction enzymatique

Les cellules HepG2 ont été mises en culture durant 24 heures avec différentes concentrations de solution d'UA seul (10, 100 et 500 μ M), de dexaméthasone seul (50 et 100 μ M) ou d'un mélange des deux composés. Toutes les cellules sont exposées à la même concentration de bicarbonate ou de DMSO.

Les hépatocytes humains ont été mis en culture durant 24 heures avec différentes concentrations d'UA seul (10, 100 et 500 μ M), de rifampicine seule (20 et 50 μ M) ou d'un mélange des deux composés. Toutes les cellules sont exposées à la même concentration de bicarbonate ou de DMSO.

d. Test d'inhibition enzymatique

Lors des tests d'inhibition enzymatique, les microsomes de foie de rat ont été mis en contact avec des inhibiteurs enzymatiques tels que l'isoniazide (de 1 à 1000 μ M) ainsi qu'avec du nitrate d'uranyle (UA) (1 à 1000 μ M). Toutes les cellules sont exposées à la même concentration de bicarbonate ou d'eau.

B Techniques d'analyses *post mortem*

1. Prélèvements du matériel biologique

Le sang est prélevé par ponction intracardiaque sous anesthésie gazeuse à l'Isoflurane 5% (Florène[®], Abbott France, Rungis, France). Le sang est prélevé à la fois sur tube hépariné (plasma) et sur tube sec (sérum). Après coagulation dans le tube collecteur du tube sec, tous les prélèvements sont centrifugés (10 min, 1000 rpm, 4°C). Le plasma et le sérum (surnageant) sont ensuite récupérés, aliquotés et conservés à -80°C.

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

Dans le cadre du traitement à la gentamicine, les reins sont soigneusement disséqués afin de séparer la partie corticale du reste du rein.

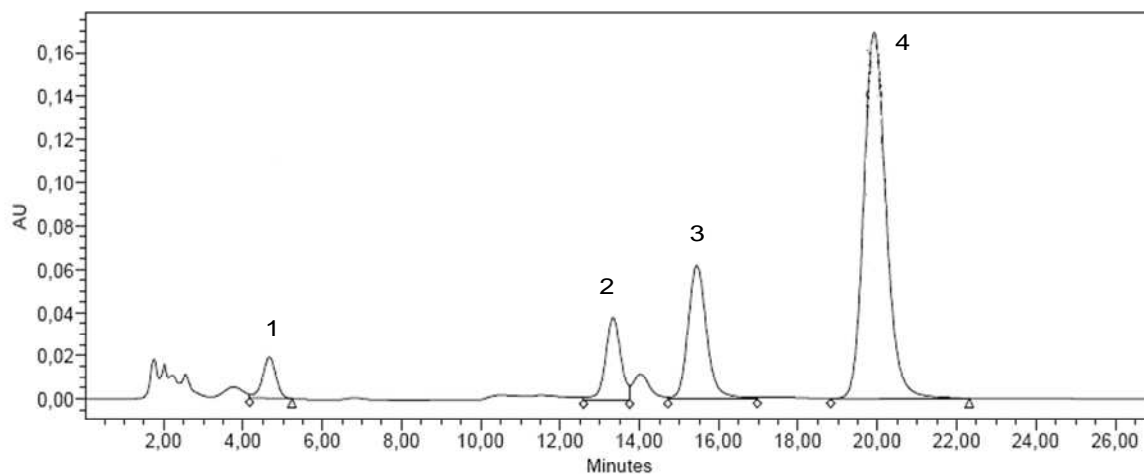


Figure 21: Profil chromatographique de l'éluion par HPLC du paracétamol et de ses métabolites majeurs

Pics 1 : APAP-gluc ; 2 : APAP-sulf ; 3 : APAP ; 4 : théophylline (standard interne)

2. Techniques biochimiques

a. Dosage de l'uranium tissulaire

Après adjonction aux échantillons de 8 mL d'acide nitrique à 70% et 2 mL de peroxyde d'hydrogène, la minéralisation est réalisée dans un four à micro-ondes de 1000W (Ethos Touch, Milestone Microwaves Laboratory Systems, Bergamo, Italie) 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'ICP-MS est de $1,07 \cdot 10^{-4}$ µg/L.

b. Dosage des médicaments

■ Analyse des concentrations plasmatiques du paracétamol et de ses métabolites par HPLC

Les concentrations plasmatiques de l'APAP et de ses métabolites majeurs (APAP-glucuronide et APAP-sulfate) sont mesurées en utilisant la méthode légèrement modifiée de l'équipe de Tran (Tran et al. 2001).

L'échantillon plasmatique (90 µL) est mélangé avec la théophylline (réf. 883008 ; Sigma-Aldrich)(10 µL, 15 mM) utilisée en tant que standard interne. Les protéines plasmatiques sont précipitées par l'ajout de 10 µL d'acide perchlorique 30% (v/v) (réf. 17,674-5 ; Sigma-Aldrich). Les échantillons sont soigneusement mélangés pendant 10 secondes puis centrifugés deux fois 15 minutes à 10000g. Le surnageant est filtré à travers un filtre de 0,2 µm. Un volume de 20 µL est injecté dans un système de chromatographie liquide haute pression (HPLC) (colonne SymmetryShield RP18, 4,6mmx150mm, 5µm, Waters) et les composés élués sont quantifiés à 254 nm. Le gradient d'élution suit la cinétique suivante : 100% de tampon phosphate 20 mM (1 mL/min) durant 6 minutes. Pendant la 7^{ème} minute, le pourcentage de tampon phosphate décroît jusqu'à 96%, les 4% restant sont de l'acétonitrile. La composition reste ainsi jusqu'à la fin du cycle. Les temps typiques de rétention des composés sont : 4 minutes pour l'APAP-glucuronide, 12 minutes pour l'APAP-sulfate, 15 min pour l'APAP et 20 minutes pour la théophylline (Figure 21).

Les composés utilisés en tant que standard référent APAP, APAP-sulfate (réf. UC-448), APAP-glucuronide (réf. A4438) proviennent de chez Sigma-Aldrich.

Tableau 3 : Etapes de déshydratation des échantillons biologiques par VIP

Solution	Temps (minutes)
Formol	10
Ethanol 80°	10
Ethanol 80°	25
Ethanol 95°	10
Ethanol 95°	25
Ethanol 100°	25
Butanol	15
Butanol	15
Toluène	40
Xylène	40
Paraffine	15
Paraffine	30
Paraffine	60
Paraffine	60

Tableau 4 : Etapes de déparaffinage des coupes avant coloration

Solution	Temps (minutes)
Xylène	3
Xylène	3
Alcool 100°	3
Alcool 100°	3
Alcool 100°	3
Eau courante	15
Triton X-100 0.1%	10
Eau courante	5
H ₂ O ₂ 3%	10
Eau courante	15

Tableau 5 : Programmation des bains de la coloration Hématoxyline Eosine Safran

Solution	Temps (minutes)
Eau courante	2
Hemalun	15
Eau courante	1.5
Eau courante	1.5
Alcool HCl 1%	0.5
Eau courante	0.5
Eau courante	1.5
Carbonate de lithium	2
Eau courante	0.5
Eau courante	1.5
Erythrosine 1%	0.1
Eau courante	0.5
Eau courante	1.5
Alcool 100°	1
Alcool 100°	1
Safran	4
Alcool 100°	0.5
Alcool 100°	1
Xylène	1
Xylène	2

■ **Analyse des concentrations plasmatiques du paracétamol par automate**

La concentration plasmatique de paracétamol a également été déterminée par adaptation du kit de dosage Roche Diagnostic (réf. 20767174 ; Meylan, France sur l'automate Konelab 20 (Biological chemistry reagents, Thermo Electron Corporation, Villebon sur Yvette, France).

■ **Analyse des concentrations plasmatiques de gentamicine par automate**

La concentration plasmatique en gentamicine est déterminée par adaptation du kit de dosage Roche Diagnostic (réf. 04490843) sur l'automate Konelab 20.

c. **Technique de dosage des paramètres biochimiques classiques**

L'analyse des paramètres biochimiques plasmatiques et urinaires (ASAT, ALAT, albumine, amylase, acide urique, glucose, bilirubine totale, créatinine, phosphate alcaline, urée, protéines totales, calcium, chlore, potassium, sodium, phosphore) a été réalisée sur l'automate Konelab 20.

3. Analyse histologique

a. **Préparation et déshydratation des échantillons**

Immédiatement après le sacrifice des animaux, une fraction de tissu (foie et rein) est conservée dans une solution de formaldéhyde (4%). Une fois toutes les biopsies mises en cassettes (moins de 1 cm³), elles sont disposées dans la cuve d'un automate de déshydratation (Tissue-Tek VIP). Celui-ci effectue les étapes de déshydratation et d'imprégnation en paraffine. Les différentes étapes réalisées par le VIP sont les suivantes : étape de déshydratation qui consiste à remplacer l'eau contenue dans les cellules par de l'alcool 100°, étape de substitution qui permet d'échanger l'alcool 100° par le toluène et étape de substitution du toluène par la paraffine. Les séquences de bains nécessaires sont indiquées dans le [tableau 3](#).

b. **Inclusion des tissus dans des blocs de paraffine et coupe histologique**

Suite à la déshydratation des tissus, les échantillons sont inclus en blocs de paraffine.

Tableau 6 : Critères d'évaluation des scores de lésions rénales

Renal lesions	Scores
Glomerular damages	Glomerular score /8
Mesangial proliferation/Glomerulosclerosis	
None	0
Slight mesangial thickening with or without hypercellularity, in few glomerules	1
Mesangial proliferation and/or sclerosis in <20% of glomerules	2
Mesangial proliferation and/or sclerosis in 20-50% of glomerules	3
Mesangial proliferation and/or sclerosis in >50% of glomerules	4
Glomerular cystic dilatation	
None	0
Slight distension of Bowman chamber	1
Mild glomerular cystic dilatation (≤5 cysts per section)	2
Moderate glomerular cystic dilatation (5-10 cysts per section)	3
Marked glomerular cystic dilatation (>10 cysts per section)	4
Tubulointerstitial damages	Tubulointerstitial score /16
Tubular necrosis	
None	0
Single, small focal tubular alteration (vacuolization, necrosis)	1
Tubular necrosis of <20% tubules	2
Tubular necrosis of 20-50% tubules	3
Tubular necrosis of >50% of tubules	4
Tubular atrophy and/or dilatation (hyaline casts)	
None	0
Few atrophic tubules and/or hyaline casts	1
Tubular atrophy/dilatation of <20% tubules	2
Tubular atrophy/dilatation of 20-50% tubules	3
Tubular atrophy/dilatation of >50% of tubules	4
Interstitial inflammation	
None	0
Minimal inflammation, multifocal	1
Mild inflammation, multifocal	2
Moderate inflammation, multifocal or diffuse	3
Marked inflammation, multifocal or diffuse	4
Interstitial fibrosis	
None	0
Few interstitial fibrosis foci (peri-tubular, peri-glomerular)	1
Interstitial fibrosis involving <20% of renal parenchyma	2
Interstitial fibrosis involving 20-50% of renal parenchyma	3
Interstitial fibrosis involving >50% of renal parenchyma	4

Des coupes de 5 μM sont réalisées par à l'aide d'un microtome (Accu-Cut SRM Sakura). Les coupes sont dépliées et déposées sur des lames de verre.

c. Déparaffinage des lames et coloration Hématoxyline Eosine Safran (HES)

Le déparaffinage des coupes est réalisé par un automate (DRS 601, Sakura) en suivant le programme décrit dans le [tableau 4](#).

Les lames subissent alors une coloration HES selon le programme décrit dans le [tableau 5](#). Cette coloration est réalisée par automate (DRS 601, Sakura).

d. Lecture histologique des lames

La lecture microscopique des lames a été réalisée en aveugle dans un laboratoire expert en histopathologie (Biodoxis, Romainville, France). Le détail des critères d'évaluation demandés est répertorié dans le [tableau 6](#).

4. Technique de quantification de l'expression génique

a. Extraction des ARN messagers tissulaires

L'ARN total est extrait à partir des tissus conservés à -80°C puis broyés grâce au kit Rneasy total RNA isolation (réf. 74106, Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant les recommandations du fournisseur.

Environ 30 mg de tissu sont lysés en présence de billes de précession et de 600 μL d'une solution de lyse contenant du tampon RLT (tampon contenant de la guanidine-thiocyanate à fort pouvoir dénaturant) complété par du β -mercaptoéthanol 1%. La lyse se fait à l'aide d'un broyeur-homogénéisateur (FastprepTM; BIO101; QBIOgene). Après centrifugation (16000 g pendant 3 minutes), le lysat récupéré est homogénéisé dans 350 μL d'éthanol 70% (afin d'augmenter la spécificité de liaison des ARNs avec la membrane de la colonne). Le mélange est alors appliqué sur une mini colonne Rneasy en résine de silice. Cette dernière est centrifugée 1 minute à 16000 g. Un premier tampon de rinçage est appliqué sur la colonne puis celle-ci est à nouveau centrifugée 1 minute à 16000 g. L'ADN résiduel est éliminé par addition de DNase (incubation de 15 minutes). Puis un deuxième tampon de rinçage est déposé sur la colonne. Celle-ci subit à nouveau une centrifugation (1 minute à 16000g). Quarante microlitres d'eau sans RNase sont ajoutés à la colonne. Une dernière centrifugation d'une minute à 16000 g permet de récupérer les ARNs. La concentration

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

d'ARN est déterminée par lecture de la densité optique à 260 nm (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000, ND-1000 spectrophotometer, logiciel : ND-1000 V3.5.1, Labtech, Palaiseau, France). La pureté des ARNs est vérifiée par la mesure du rapport de DO 260/280 nm (qui doit être compris entre 1,75 et 2,00). L'intégrité des ARNs est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% en condition dénaturante, avec révélation au bromure d'éthidium. Les ARNs sont conservés à -20°C.

b. Rétro-transcription (RT)

La transcription inverse est réalisée avec le kit « High capacity cDNA reverse transcription kit » (réf. 4368814, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Elle est effectuée avec une quantité d'ARN de 1 µg. La synthèse d'Acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) s'effectue avec 50 unités de transcriptase inverse (Multiscribe reverse transcriptase) dans 20 µL de tampon de réaction (RT buffer, Random Primer, dNTP, RNase-free H₂O). Le programme de rétro-transcription comprend une première étape de 10 minutes à 25°C, une seconde de 120 minutes à 37°C, une troisième de 5 minutes à 85°C. 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 inspirées de références bibliographiques ou déterminées à partir du logiciel « Primer Express » (Applied Biosystems), puis commandées chez Invitrogen-Life technologies.

L'expression des gènes est mesurée par PCR en temps réel. La PCR en plaque 96 puits est réalisée avec 8 µL d'ADNc dilués au 1/50^{ème} auxquels sont ajoutés 12 µL d'un mélange de réactifs SYBR (polymérase, dNTP, sels, intercalant fluorescent, fluorophore de contrôle interne, Power SYBR® Green (Applied Biosystems) (83% v/v), d'eau stérile (14,5% v/v) et d'amorces sens et antisens spécifiques du gène d'intérêt (2,5%, v/v). L'amplification et la détection des produits de PCR sont effectuées à l'aide de l'appareil AbiPrism 7500 (Applied Biosystems), 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.

Tableau 7 : Séquences des amorces de PCR utilisées chez le rat

	sens	anti-sens	n° accession	source
CYP2C11	ATG GGA TGC AAT GGA AGG AG	TCT TGC CCA TCC CAA AAG TC	X79081	Gueguen et al., 2007
CYP2E	GGA GGA GCT CAA AAA GAC CAA A	GGT GCG CAG CCA ATC AG	NM_031543	Gueguen et al., 2007
CYP3A1	AGG CAC CTC CCACCT ATG ATA C	TGG GCA TAA ACA CAC CAT TGA	M10161	Su et al, 2004
CYP3A2	AGT AGT GAC GAT TCC AAC ATA T	TCA GAG GTA TCT GTG TTT CCT	NM_153312.2	Rekka et al, 2002
GSTA2	TTG ACA TGT ATT CAG AGG GT	TTG TTT TGC ATC CAT GGC TG	K00136	Hoehn et al, 2002
ST1A1	AGGGTGGCAAGCTAGAGAAGTG	GAGGGAACCCCTGGACATTT	NM_031834	Rouas et al., 2009
UGT1A1	TGG CTA CCC CAA AAC GAT CT	GGA ACC GGA GTG TGT GAT GAA	NM_175846.2	Rouaset al., 2009
UGT2B1	TGG AGA ACA TGG TGT AGT GGT	TTG GCT TTT TCT TCA GTA GTC AGG	NM_173295.1	Primer Express
HPRT	GCT CGA GAT GTC ATG AAG GAG A	TCAGCG CTT TAA TGT AAT CCA GC	NM_012583	Ropenga et al. 2004
KIM-1	CGCAGAGAAACCCGACTAAG	CAAAGCTCAGAGAGCCCATC	AF35963	Amin et al. 2004
Kallikreine	GCACCGGCTTGTCAGTCAA	TCGGGTGTGGTTCCTCATG	M19647	Amin et al. 2004
Ostéopontine	CCAGCACACAAGCAGACGTTT	CAGTCCGTAAGCCAAGCTATCA	M99252	Amin et al. 2004

Dans le cas d'utilisation de plaque 384 puits, la programmation des cycles d'amplification est inchangée mais les volumes déposés dans les puits sont réduits de moitié.

La méthode comparative des $\Delta\Delta C_t$ est employée pour la quantification relative de l'expression des transcrits des gènes d'intérêts. Le taux d'expression de chaque échantillon est normalisé par le taux d'expression d'un gène endogène de référence, l'HPRT (Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyl Transférase) pour les échantillons issus des expérimentations animales ou la GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) pour les échantillons issus des expérimentations cellulaires. Leur taux d'expression est constant et proche de ceux des gènes étudiés.

Les séquences des amorces de chaque gène (sens et anti-sens) sont données dans le [tableau 7](#) et peuvent être issues de données bibliographiques (Amin et al. 2004; Gueguen et al. 2007; Rekka et al. 2002; Ropenga et al. 2004; Rouas et al. 2009; Su et al. 2004; t Hoen et al. 2002).

5. Technique de quantification de l'expression protéique

a. Extraction de protéines tissulaires totales

Les protéines totales sont extraites grâce au tampon de lyse fourni par le kit « Mammalian Cell Lysis Kit » de chez Sigma-Aldrich en respectant la proportion de 100 μ L de tampon pour 10 mg de tissu.

Composition du tampon de lyse : 10 mM HEPES pH 7,9 ; 10 mM KCl ; 1,5 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT ; 0,5 mM PMSF ; 1% de cocktail d'inhibiteurs de protéases.

Le matériel biologique est tout d'abord homogénéisé sur roue (40 min à 4°C). La lyse des tissus est ensuite affinée grâce à un passage de 10 secondes au broyeur-homogénéiseur (FastPrep™ ; BIO101 ; QBIogene). Après une centrifugation (20 min, 13200 rpm, 4°C), le surnageant est récupéré, aliquoté et stocké à -80°C.

b. Préparation de sous-fractions cellulaires

■ Préparation des microsomes hépatiques

Après le prélèvement de l'ensemble du foie, un morceau de 1 g est pesé et stocké (dans la glace) dans 3 mL de tampon aqueux contenant du KH_2PO_4 (50 mM), saccharose (300 mM), Dithiothréitol (DTT) (0,5 mM), acide éthylène diamine tetra acétique (EDTA) (10 mM), NaCl (50 mM) et dont le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH ou du NaOH.

Matériels et Méthodes

Tableau 8 : Composition des gels de polyacrylamide à 12 % pour Western-blots

	Gel de concentration	Gel de séparation	Fournisseur
Eau distillée	1,4 ml	3,3 ml	
Acrylamide	330 µl	4,0 ml	Biorad
Tris 1,5M pH 8,8		2,50 ml	
Tris 0,5M pH 6,6	250 µl		
SDS 10%	20 µl	100 µl	Invitrogen
APS 10%	20 µl	100µl	Biorad
Temed	2 µl	4 µl	Biorad

Tableau 9 : Références des anticorps utilisés pour les Western-blots chez le rat

Antigène	Poids moléculaire (kDa)	anticorps primaire		anticorps secondaire		
		Réf.	fournisseur		Réf.	fournisseur
CYP2C11	57	299186	Daiichi pure chemicals	anti IgG de chèvre	sc-2768	Santa Cruz
CYP2E1	56	299216	Daiichi pure chemicals	anti IgG de chèvre	sc-2768	Santa Cruz
CYP3A1	57	ab1253	Millipore	anti IgG de lapin	sc-2004	Santa Cruz
CYP3A2	57	ab1276	Millipore	anti IgG de lapin	sc-2004	Santa Cruz
UGT1A1	55	sc-25847	Santa Cruz	anti IgG de chèvre	sc-2768	Santa Cruz
UGT2B	52	sc-50386	Santa Cruz	anti IgG de lapin	sc-2004	Santa Cruz
GSTγa	25	GS 09	oxford biomedical	anti IgG de chèvre	sc-2768	Santa Cruz
SULT1	32	sc-32928	Santa Cruz	anti IgG de lapin	sc-2004	Santa Cruz
GAPDH	37	sc-25778	Santa Cruz	anti IgG de lapin	sc-2004	Santa Cruz
KIM	34	AF3689	R&D systems	anti IgG de chèvre	sc-2768	Santa Cruz

Matériels et Méthodes

La fraction de foie est alors découpée en de fines lamelles puis broyée par un piston en téflon en maintenant le tout sur glace. L'homogénat obtenu est centrifugé à 20000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est centrifugé à 100000 g pendant 1 heure à 4°C. Le culot, correspondant à la fraction microsomale, est remis en suspension dans environ 1 mL de tampon. Celui-ci est aliquoté et conservé à -80°C.

■ Préparation de la fraction cytosolique

Le surnageant obtenu après la dernière centrifugation de la préparation des microsomes, correspond à la fraction cytosolique des cellules. Il est aliquoté et conservé à -80°C.

c. Mesure de la concentration protéique

La concentration protéique des échantillons est déterminée selon la méthode de Bradford, 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, Marnes la Coquette, France) 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 tampon Laemmli (125 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 20% glycérol ; 4 % SDS ; 0,02 % bleu de bromophénol ; 10 % β -mercaptoéthanol). Elles sont alors déposées sur un gel d'acrylamide en conditions dénaturantes dont la composition est indiquée dans le [tableau 8](#). Après séparation, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (réf. LC-2001 ; Invitrogen) sous l'action d'un courant de 150 mA appliqué pendant 1,5 h. Les sites aspécifiques de la membrane sont bloqués par un bain de tampon tris salin (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-Tween à 0,025 % est réalisée (5 X 5 min, température ambiante). Un kit de détection par électrochimiluminescence (Immobilon Western ; réf. WBKLS0500 ; Millipore, Cergy Pontoise, France) permet de révéler le signal, par la suite détecté par une caméra CCD (Las-3000 ; Fujifilm) et quantifié *via* le logiciel MultiGauge.

Les anticorps utilisés sont listés dans le [tableau 9](#).

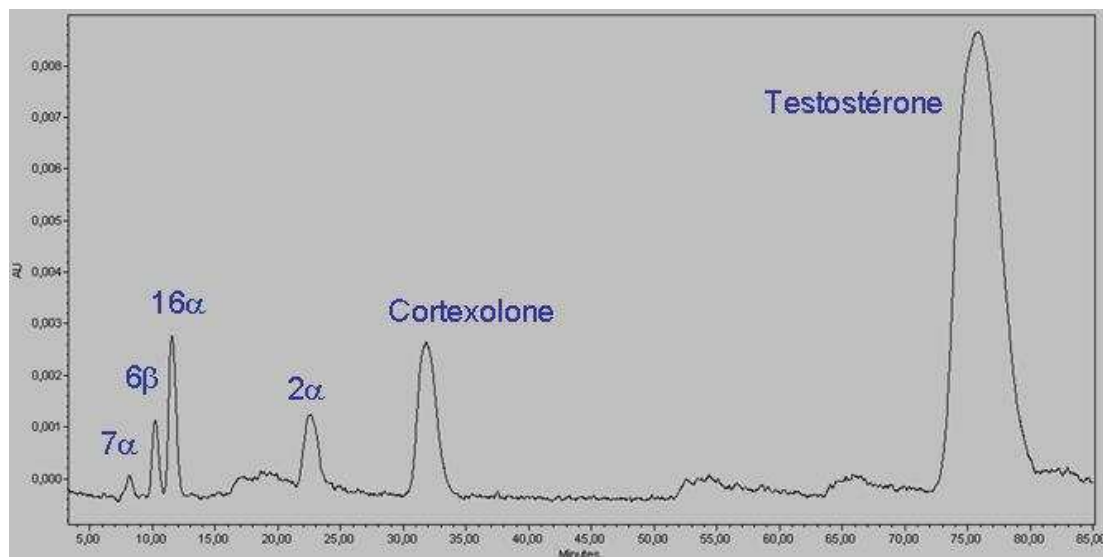


Figure 22 : Chromatogramme type du dosage de l'activité des CYP450 2A, 3A, 2B et 2C

Les métabolites formés sont spécifiques de l'activité d'un CYP. Ainsi les CYP 2A, 3A, 2B et 2C sont respectivement responsables de la formation du 7 α -hydroxytestostérone, 6 β -hydroxytestostérone, 16 α -hydroxytestostérone et du 2 α -hydroxytestostérone .

6. Technique de l'analyse des activités enzymatiques

■ Dosage des activités CYP450 par HPLC

Les activités enzymatiques sont mesurées selon la méthode décrite par Souidi et al. en 2005 (Souidi et al. 2005). Cette méthode permet de déterminer simultanément quatre activités enzymatiques (CYP2A, CYP3A, CYP2B et CYP2C) *via* le dosage des métabolites de la testostérone. L'activité est mesurée à partir d'une solution de microsomes fraîchement préparée. Les microsomes (50 µL) sont mis en contact avec 10 µL de testostérone solubilisée dans de l'hydroxypropyl-β-cyclodextrine (HPBCD) (3 mg de testostérone solubilisés dans 1 mL d'HPBCD à 45% (3,6 g dans 8 mL de tampon)), et 390 µL de tampon (KH₂PO₄ 15 mM, K₂HPO₄ 60 mM, EDTA 1 mM, DTT 0,5 mM, MgCl₂·6H₂O 5 mM). La réaction est déclenchée par du NADPH à 1 mM (50 µL). Les tubes sont alors incubés pendant 20 minutes à 37°C sous agitation. La réaction est stoppée par ajout de 2 mL d'une solution de Chloroforme/Méthanol (1:2). Du Chloroforme (2 mL) et de l'eau (1,5 mL) sont alors ajoutés afin d'extraire les métabolites hydrophobes. Le standard interne, la cortexolone, est incorporé dans tous les tubes (10 µL). Les tubes sont alors vortexés pendant 1 minute. Deux millilitres de la phase organique sont recueillis, filtrés (pour retenir les débris membranaires) et évaporés sous azote. Les résidus sont repris dans 250 µL d'acétonitrile (1 minute de vortex). La solution est alors séparée par HPLC (Alliance, Waters, Saint Quentin en Yvelines, France) sur une colonne RP18, Lichrospher 100, 250 mm x 4 mm, 5 µm. La phase mobile est constituée d'acétonitrile (26%) et d'eau (74%). Le débit est de 1,3 mL/min.

Les métabolites formés sont spécifiques de l'activité d'un CYP. Ainsi les CYP 2A, 3A, 2B et 2C sont respectivement responsables de la formation du 7α-hydroxytestostérone, 6β-hydroxytestostérone, 16α-hydroxytestostérone et du 2α-hydroxytestostérone (Figure 22).

Les activités sont exprimées en picomole par minute pour le foie total.

■ Dosage de l'activité GST

L'activité totale de la GST est mesurée dans un homogénat de foie en utilisant le « Glutathione S-transferase assay kit » (Réf. 702202, Spi-Bio, Montigny-le-Bretonneux, France). L'activité microsomale et cytosolique de la GST est mesurée *via* la conjugaison du 1-chloro-2,4-dinitrobenzene avec le glutathion. Cette conjugaison est accompagnée d'une augmentation de l'absorbance à 340 nm. L'activité enzymatique est exprimée en nmol/min/µg de protéines.

Matériels et Méthodes

7. Dosage ELISA

a. KIM-1

Le dosage de KIM-1 (Kidney injury molecule-1) dans les urines a été réalisé par l'intermédiaire du kit « ELISA rat KIM-1 » (réf. DY3689, R&D Systems Europe, Lille, France) en respectant les indications du fournisseur. Les urines sont diluées au 10 ou au 100^{ème} avant d'être dosées.

b. Bêta 2-microglobuline

Le dosage de la β 2-microglobuline dans les urines a été réalisé par l'intermédiaire du kit « ELISA kit for rat Beta 2 Microglobulin » (réf. E0260Ra, Gentaur, Paris, France) en respectant les indications du fournisseur. Les urines sont dosées pures ou diluées au 10ème.

C Techniques d'analyse *in vitro*

1. Culture cellulaire

Toutes les cellules sont cultivées dans une étuve à 37°C, 5% de CO₂.

a. Mises en culture

■ Lignées cellulaires

Les cellules, issues de l'ATCC (Illkirch/Strasbourg, France), sont conservées à -150°C. Au moment de leur mise en culture, les cellules sont décongelées le plus rapidement possible puis sont disposées dans du milieu de culture préalablement chauffé à 37°C. Les cellules sont alors centrifugées pendant 10 minutes à 450 g. Le culot est repris dans du milieu propre et les cellules sont dispersées dans des flasques de culture.

■ Cellules primaires

Les hépatocytes primaires, issus de BD Biosciences, sont conservés à -150°C jusqu'à leur utilisation. Au moment de leur mise en culture, les cellules sont décongelées le plus rapidement possible puis sont disposées dans 50 mL de milieu ISOM'S issu du kit de purification des cellules (réf. 454600) de BD Biosciences préalablement chauffé à 37°C. Les cellules sont culotées par 5 minutes de centrifugation (50 g) et le culot cellulaire est

Tableau 10 : Composition des milieux de culture

	HEPG2	NRK52E	HEK-293	Hépatocytes primaires
RPMI 1640 Invitrogen, 21875034	500 mL			
DMEM blanc Invitrogen, 11880-036		500 mL	500 mL	
Hepato-STIM media BD Biosciences, 355056				500mL
L-glutamine		11mL	11mL	
Pénicilline/ Streptomycine	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
SVF décomplémenté et filtré	50 mL	50 mL	50 mL	
Glucose (20%)		8,75 mL		
EGF				1 mL

Remarque : avant son utilisation, le SVF est décomplémenté par un bain de 30 minutes à 56 °C puis il est filtré (filtre de 0,2µm).

Matériels et Méthodes

resuspendu dans du milieu ISOM'S complété par 500 µL d'acide ascorbique 25 mM et par 5 mL de SVF. Après comptage cellulaire, 2,5 millions de cellules sont distribués par puits de plaque 6 puits collagénées de chez BD Biosciences (réf. 354400).

Après incubation des cellules mises en plaque durant 3 heures à 37°C, 5% de CO₂, le milieu de culture est remplacé par du milieu Hepato-STIM (réf. 355056, BD Biosciences). Les cellules sont maintenues dans ce milieu environ 24 heures avant leur utilisation.

b. Préparation des milieux de culture

Chaque lignée cellulaire possède son milieu de culture qui lui est propre (Tableau 10).

c. Entretien des lignées cellulaires

A 80% de confluence, soit tous les 3-4 jours, les cellules sont repiquées. Pour ce faire, le milieu de culture est retiré des flasques et remplacé par du tampon salin phosphaté (PBS) stérile afin d'éliminer les débris cellulaires et le milieu contenant du SVF qui pourrait inhiber la trypsine. Le PBS est alors remplacé par une solution de trypsine. Après décollement des cellules, ces dernières sont culotées par centrifugation (50 g, 5 minutes) puis remises en suspension dans du milieu de culture conditionné à 37°C. Elles sont alors redistribuées dans de nouvelles flasques (repiquage au 1 :3).

2. Test de cytotoxicité

Les cellules sont incubées durant 24, 48 ou 72 heures avec des concentrations croissantes de nitrate d'uranyle comprises entre 0 et 1000 µM.

a. Mesure de la LDH

La LDH (lactate déshydrogénase) est une enzyme relarguée par les cellules lorsque la membrane cellulaire est rompue. Sa quantification dans le surnageant cellulaire est réalisée avec le kit Cytotoxicity Detection Kit PLUS (Réf. 04744926001) selon les recommandations du fournisseur. Elle permet d'estimer la mortalité cellulaire.

b. Mesure de l'activité des protéases : test cytotox-Glo

Le kit cytotox-Glo™ Cytotoxicity Assay (Réf. G9291, Promega, Charbonnières, France), utilisé selon les recommandations du fournisseur, permet d'estimer la mortalité cellulaire dans une population donnée. Ce test nécessite que les cellules soient mises en culture sur des plaques spécifiques (Réf. 236108, Nunc®) pouvant être lues au luminomètre.

Matériels et Méthodes

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-phénylalanyl-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 et ainsi de normaliser le résultat.

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

3. Préparations et analyse SIMS et MET

a. Préparation des cellules

Les cellules sont incubées pendant 24 h à des concentrations de 10, 50 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% + 4 mL de PBS 0,2 M pH 7,4), renouvelée 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 résine afin d'effectuer des coupes de 800 nm pour les observations au SIMS et de 70 à 80 nm pour les observations au MET. Des coupes sériées de 30 nm sont également réalisées en vue de faire un suivi au microscope optique. Dans ce cas les coupes sont colorées par un bain d'une minute en bleu de toluidine.

b. Analyse SIMS

Le but de la microscopie SIMS est l'analyse élémentaire et isotopique d'une surface solide par un faisceau d'ion couplé avec un spectromètre de masse. Le principe de cette technique est basé sur le décollement de quelques couches atomiques de la surface d'un échantillon, induit par le bombardement d'ions primaires (O_2^+ , O^- , Cs^+ , Ar^+) de part une

Tableau 11 : Séquences des amorces de PCR utilisées chez le rat

	sens	anti-sens	n° accession	source
CYP3A5	TGGTGATTCCAACCTTATGCTCTTC	AACCTTTCAGGCGGAACTC	NM_000777,2	primer express
CYP3A7	ATGGAGATGTGTTGGTGAGAAATC	GTAGGCCCCAAAGACGTGTTT	NM_000765,2	primer express
CYP3A4	CTTCATCCAATGGACTGCATAAAT	TCCAAGTATAACACTCTACACAGACAA	X12387	Animat et al., 2005
GAPDH	TCAACGGATTGGTCGTATTG	TCTCGCTCCTGGAAGATGG		Muller et al., 2007

émission à suffisamment haute énergie (plusieurs keV). Ces ions primaires pénètrent dans la surface solide et transfèrent un peu de leur énergie cinétique aux particules cibles, créant les cascades de collision qui incitent l'émission de particules superficielles (des atomes ou molécules) dans un état chargé ou non. "Les ions secondaires" émis sont représentatifs de la composition élémentaire et isotopique du secteur analysé bombardé. Ils sont accélérés et analysés par le spectromètre de masse sur la base de la proportion de charge à la masse. Les ions décollés de chaque point de la surface bombardée sont concentrés dans une image par une lentille d'objectif d'immersion. Les analyses de SIMS ont été réalisées en utilisant u, appareillage CAMECA IMS 4F E7. Pour cette étude, la résolution massive peut atteindre $M/\Delta M = 10000$ et la résolution latérale de l'image est de $0,5 \mu M$. Pour chaque secteur analysé, des spectres massifs de la masse d'isotope 238 d'uranium et des images d'ion a été obtenu.

4. Techniques d'analyses moléculaires

Les techniques de dosage des ARNm, de retro-transcription et de PCR sont les mêmes que celles décrites dans la partie « techniques d'analyse post mortem ». Les séquences des amorces utilisées pour les cellules d'origine humaines sont données dans le [tableau 11](#) et peuvent être issues de données bibliographiques ([Amin et al. 2004](#); [Muller et al. 2007](#)).

a. Extraction d'ARNm à partir de cellules en culture

Le protocole d'extraction des ARN messagers cellulaires est sensiblement le même que celui décrit pour l'extraction tissulaire. Dans le but d'une extraction d'ARNm cellulaire, les cellules sont mises en culture dans des plaques 6 puits. Lorsque ces dernières sont aux environs de 80% de confluence, leur milieu de culture est supprimé et le tapis cellulaire rincé avec une solution de PBS froid. Les cellules sont alors grattées sur glace dans du PBS et les culots cellulaires sont obtenus après centrifugation (300 g, 5 minutes) et conservés à $-80^{\circ}C$. Après décongélation, les culots cellulaires sont repris dans 350 μL de tampon RLT complété avec du β -mercaptoéthanol (comme décrit précédemment). Une étape de sonication est ajoutée et remplace l'étape de ribolyse. La suspension cellulaire est reprise dans de l'éthanol comme décrit précédemment et le protocole est alors identique à celui de l'extraction tissulaire.

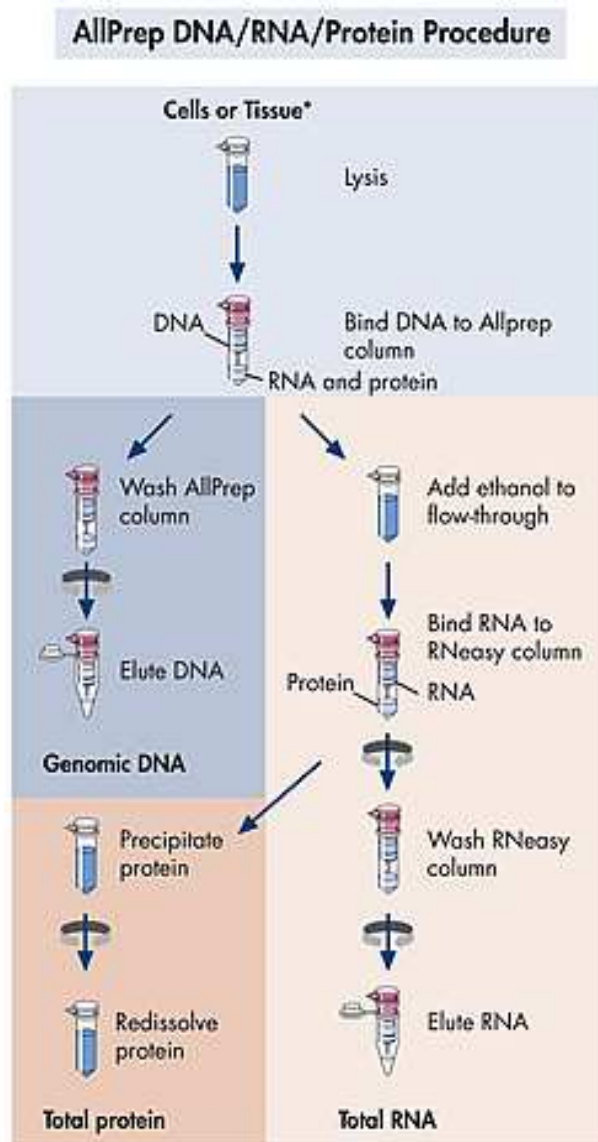


Figure 23 : Schéma d'extraction des ARNm et des protéines du kit Qiagen AllPrep DNA/RNA/Protein

Dans le cas des hépatocytes primaires, l'extraction des ARNm a été réalisée en même temps que celle des protéines par l'utilisation du kit (réf. 80204, AllPrep DNA/RNA/Protein Procedure, Qiagen) et en suivant les instructions du fabricant. Le protocole d'extraction des ARNm est pratiquement similaire de celui décrit précédemment mais un éluât peut être conservé en vue de l'extraction des protéines (Figure 23).

b. Dosage de l'activité CYP3A totale sur hépatocytes en culture

Dans ce dosage, un substrat luminogénique est ajouté au milieu de culture mis à incuber avec les cellules sur une période appropriée. Les enzymes CYP450 intracellulaires convertissent le substrat en D-luciferine qui diffuse hors de la cellule, dans le milieu de culture, où il peut être détecté. Le kit P450-Glo assay (Réf. V8901, Promega, Charbonnières, France), utilisé selon les recommandations du fournisseur, permet d'estimer l'activité CYP3A des cellules.

c. Dosage des activités CYP 450 sur microsomes de rat

Un pool de microsomes de rat âgés de 12 mois a été constitué. L'exposition à l'uranium est faite durant la période d'incubation des microsomes avec le substrat et le cofacteur selon la méthode décrite précédemment. Les activités CYP ont ensuite été déterminées par la méthode HPLC décrite précédemment p 122.

Analyses statistiques

L'ensemble des résultats sont représentés sous la forme « moyenne \pm écart standard à la moyenne (SEM) ».

Dans l'ensemble de ce travail deux types d'approches statistiques ont été utilisés. La première approche est menée *via* un Two Way Anova et concerne principalement les études *in vivo* nécessitant une analyse selon deux critères indépendants : la contamination à l'uranium et la durée ou la dose du médicament administré. La seconde approche est menée par un test t de Student et concerne principalement les études *in vitro* ou certains aspects particuliers des analyses *in vivo* (dont les comparaisons des expressions protéiques). Le type de test statistique réalisé sera toujours mentionné dans la légende des figures. Les analyses ont été réalisées par l'utilisation du logiciel 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.

Résultats

Résultats

Résultats

Effet d'une contamination chronique par l'UA sur le rein : intégrité et fonction de détoxification

***Effect of nephrotoxic treatment with gentamicin on rats
chronically exposed to uranium***

C. Rouas, J. Stefani, S. Grison, L. Grandcolas, C. Baudelin, I. Dublineau,
M. Pallardy et Y. Gueguen

Sous presse dans *Toxicology*

[Voir Annexe Ic](#)

Résultats

A Introduction

Du fait de son rôle de filtration, le rein est continuellement exposé à la toxicité des xénobiotiques. La structure la plus souvent touchée est le tubule contourné proximal (situé dans la partie corticale du rein). Elle est en effet le siège de nombreux échanges entre les compartiments sanguins et urinaires.

La néphrotoxicité est le premier symptôme d'une intoxication par l'uranium (Domingo et al. 1987) et les lésions rénales induites sont majoritairement localisées dans les deux tiers distaux du tube contourné proximal (Haley 1982). En cas d'exposition chronique à des doses relativement élevées, l'atteinte rénale reste essentiellement tubulaire (Diamond et al. 1989; Zamora et al. 1998). La majorité des études menées sur les populations les plus exposées s'accorde à dire qu'il existe une corrélation entre l'uranium contenu dans l'eau et celui mesuré dans les urines (Kurttio et al. 2002; Kurttio et al. 2006; Selden et al. 2009; Zamora et al. 2009). Certaines études montrent une augmentation de marqueurs biochimiques classiques de néphrotoxicité (Magdo et al. 2007; Mao et al. 1995; Zamora et al. 2009) avec notamment une prédominance de l'atteinte tubulaire (Kurttio et al. 2002; Zamora et al. 1998). Ces augmentations restent néanmoins ponctuelles et modérées.

Au sein du laboratoire, les études menées ont pour but de mimer une contamination chronique à une dose « environnementale » et d'estimer les effets sur différents systèmes et organes de l'organisme. La dose d'uranium choisie est en dessous d'un seuil de néphrotoxicité sévère (créatine et urée inchangées). Le but de nos travaux est d'évaluer si cette contamination par long terme par l'uranium est susceptible d'induire une sensibilité du rein qui se manifesterait par une toxicité plus importante en cas de co-exposition à un composé néphrotoxique. Pour ce faire, le modèle expérimental choisi consiste à traiter les animaux par de la gentamicine durant leur dernière semaine de contamination par l'uranium.

La gentamicine a été choisie pour différentes raisons. Tout d'abord, c'est une substance néphrotoxique dont les mécanismes de toxicité sont relativement bien connus. Sa cible principale est, tout comme l'uranium, le tubule contourné proximal. Du fait de cette similitude, les chances de cumul de néphrotoxicité peuvent être optimisées. Ensuite, la néphrotoxicité est induite relativement rapidement ce qui a permis d'établir notre protocole expérimental en respectant une exposition courte à la gentamicine. Enfin, bien

Résultats

que la gentamicine ne soit prescrite qu'en milieu hospitalier, elle reste, à l'heure actuelle, un médicament encore utilisé en clinique.

Par ailleurs, dans le cadre de cette étude, nous nous sommes appliqués à étudier de nouveaux marqueurs de néphrotoxicité. L'utilisation de ces marqueurs plus sensibles avait pour but de mieux estimer les effets de la contamination par l'uranium dans notre modèle expérimental afin de discriminer un éventuel effet cumulatif de l'uranium sur la néphrotoxicité induite.

L'objectif de cette partie est donc d'évaluer si la contamination chronique par l'uranium (40 mg/L) est susceptible d'induire une sensibilité rénale (tissulaire et/ou fonctionnelle) dans le cadre d'une néphrotoxicité induite par la gentamicine.

B Cas d'un traitement à dose croissante de gentamicine.

1. Préambule

a. Contexte

L'uranium est un métal lourd potentiellement néphrotoxique. Bien que le modèle expérimental classiquement étudié au laboratoire (exposition *via* l'eau de boisson (40 mg/L) durant 9 mois) ne montre pas d'atteinte rénale sévère, la question du développement d'une sensibilité du rein du fait de la contamination par l'uranium reste ouverte.

b. Objectif

Le but de l'étude est d'estimer l'intégrité tissulaire et fonctionnelle du rein exposé durant 9 mois à de l'uranium puis soumis à une néphrotoxicité aiguë *via* un traitement à la gentamicine.

c. Stratégie expérimentale

Des études expérimentales préliminaires ainsi que l'analyse des données bibliographiques nous ont permis de déterminer cinq conditions de traitement à la gentamicine couvrant les différents stades de la néphrotoxicité. La dose d'induction de néphrotoxicité dépend de la voie d'injection. Il est rapporté que chez le rat, la dose létale 50% (DL50) est croissante si le traitement est intravasculaire, intramusculaire, intra-péritonéale, sous-cutanée et *per os*. Dans notre étude, nous avons choisi le traitement par injection sous-cutanée, voie

Résultats

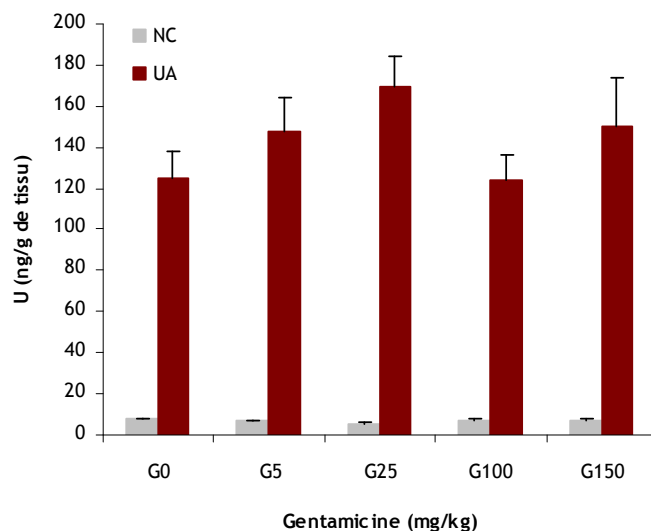


Figure 24 : Dosage de l'uranium dans le rein

Les animaux ont été contaminés (UA) ou non (NC) à l'uranium appauvri (40 mg/L) durant 9 mois. Ils ont alors été traités durant 4 jours par une injection sous-cutanée de gentamicine à différentes doses (0, 5, 25, 100, 150 mg/kg). Le groupe 0 correspond aux animaux ayant reçu du sérum physiologique. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

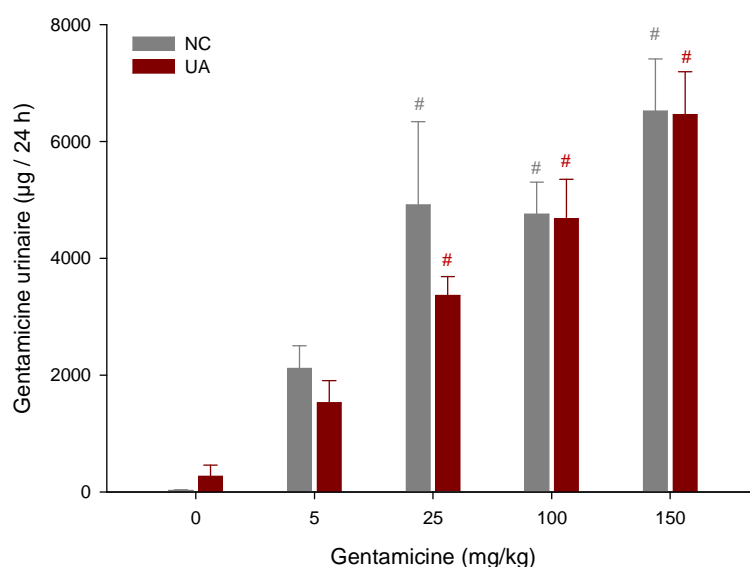


Figure 25 : Dosage de la gentamicine urinaire

Les animaux ont été contaminés (UA) ou non (NC) à l'uranium appauvri (40 mg/L) durant 9 mois. Ils ont alors été traités durant 4 jours par une injection sous-cutanée de gentamicine à différentes doses (0, 5, 25, 100, 150 mg/kg). Le groupe 0 correspond aux animaux ayant reçu du sérum physiologique. La dose de gentamicine mesurée dans les urines a été ajustée au volume total des urines récupérées sur 24 heures. La représentation d'une différence entre les animaux traités à la gentamicine par rapport aux animaux non traités (0) est # si $p < 0.01$ (pour les animaux contaminés) et # si $p < 0.01$ (pour les animaux non contaminés). L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova

Résultats

classique des études expérimentales. L'apparition de la néphrotoxicité est décrite, par cette voie, aux environs de 80 mg/kg après 10 (Bledsoe et al. 2008; Murakami et al. 1999) ou 12 jours de traitement (Ekor et al. 2006) ; 100 mg/kg après 4 (Dhanarajan et al. 2006) ou 5 jours de traitement (Cuzzocrea et al. 2002) et 150 mg/kg après 3 (Zhou et al. 2008) ou 5 jours de traitement (Xie et al. 2001). Grâce à nos études préliminaires, nous avons choisis de traiter les animaux durant 4 jours aux doses de 5, 25, 100 et 150 mg/kg.

Concernant la contamination par l'uranium, les analyses menées jusqu'à présent sur notre modèle expérimental (9 mois de contamination par l'eau de boisson (40 mg/L)) montrent l'absence de variation de la créatinine et de l'urée plasmatiques (Souidi et al. 2005). L'examen d'autres marqueurs classiques de l'atteinte rénale (créatinine et urée urinaire, électrolytes, protéines totales urinaires, diurèse, analyse histologique) ainsi que celui de marqueurs plus sensibles et plus récents (β 2-microglobuline, KIM-1, kallikréine, ostéopontine) permettra de mieux estimer l'impact sur l'intégrité et la fonction rénale de la contamination par l'uranium seul et en cas de co-exposition à la gentamicine. L'analyse des EMXs au niveau rénal a pour but d'estimer l'éventuel effet sur une des fonctions métaboliques du rein. Les animaux ont ainsi été traités durant 4 jours consécutifs par injection journalière de gentamicine. Les urines ont été collectées durant les 24 dernières heures de traitement par l'utilisation d'une cage à métabolisme (Figure 20, p105).

2. Résultats / Discussion

a. Validation des expositions

■ Dosage de l'uranium rénal

Tous les animaux contaminés par l'uranium accumulent statistiquement ($p < 0,001$) plus d'uranium dans leur rein que les animaux non contaminés. Les quantités d'uranium dans les reins sont similaires au sein du groupe des animaux contaminés, quelque soit les conditions de traitement à la gentamicine (Figure 24).

Nous notons la présence d'U chez les animaux témoins due au fait de la présence d'uranium naturel dans l'eau de boisson.

■ Dosage de la gentamicine urinaire

La figure 25 montre qu'il existe une corrélation entre la dose injectée de gentamicine et celle que l'on mesure dans les urines. On en déduit ainsi un lien avec la

Résultats

Tableau 12 : Etude du poids final et de la perte de poids liée au traitement par la gentamicine

Les animaux contaminés ou non par l'uranium ont été pesé quotidiennement durant les quatre jours de traitement à la gentamicine (5, 25, 100 et 150 mg/kg). Le tableau rapporte le poids final des animaux et la perte de poids relevé durant le traitement. La représentation d'une différence entre les animaux traités à la gentamicine par rapport aux animaux non traités (0) est # si $p < 0.01$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova

concentration gentamicine (mg/kg)	Rats non contaminés				
	0	5	25	100	150
Poids corporel final (g)	617 ± 18	681 ± 23	638 ± 15	592 ± 18	592 ± 21
Perte de poids durant le traitement gentamicine (%)	1,3 ± 0,9	1,4 ± 0,66	1,8 ± 0,8	3,5 ± 1,9	5,3 ± 0,5 #

concentration gentamicine (mg/kg)	Rats contaminés à l'UA				
	0	5	25	100	150
Poids corporel final (g)	604 ± 26	590 ± 17	601 ± 14	608 ± 28	594 ± 17
Perte de poids durant le traitement gentamicine (%)	0,6 ± 0,2	1,0 ± 0,8	2,9 ± 0,8	5,3 ± 0,6 #	5,4 ± 0,5 #

Résultats

concentration de gentamicine à laquelle le rein est exposé.

Nous notons la présence de gentamicine chez les animaux non traités (0). La concentration déterminée se situe néanmoins en dessous du seuil de détection et appartient au bruit de fond du dosage.

b. Paramètres généraux de santé

■ Prise alimentaire, hydrique, et prise de poids : effet de la contamination par l'uranium

La contamination par l'uranium n'a aucun impact sur la consommation hydrique (30 mL/j/rat) ainsi que sur le gain de poids des animaux contaminés par l'uranium par rapport aux animaux non contaminés. Tous les animaux ont donc été exposés, *via* leur eau de boisson, à la même quantité d'uranium (1 mg/rat/jour en moyenne) sur les 9 mois de contamination.

■ Suivi du poids des animaux : effet du traitement à la gentamicine

A partir de 100 mg/kg, la gentamicine induit une perte de poids des animaux durant les 4 jours de traitement (Tableau 12). La perte de poids est le signe d'une altération de l'état général de l'animal. Une diminution du gain de poids dépendante de la dose a été décrite chez des rats traités par injection intramusculaire de gentamicine (80 mg/kg) durant 6 jours. La courbe de poids était redevenue normal après arrêt du traitement (Ali et al. 1992)

c. Bilan de l'état général de l'animal

Le tableau 13 regroupe l'ensemble des analyses en vue d'un bilan rénal et hépatique.

■ Bilan rénal

Paramètres physiologiques rénaux, analyse de la créatinine et de l'urée

Concernant les paramètres physiologiques, le poids du rein ne varie pas en fonction de la concentration de gentamicine injectée. On note l'absence de différence significative de la diurèse bien que la clairance de la créatinine soit diminuée pour l'ensemble des animaux traités à la gentamicine dès 25 mg/kg. Cette diminution n'est cependant statistiquement significative que chez les animaux non contaminés par l'uranium. Il n'existe néanmoins pas de différence statistique entre les animaux contaminés et les non contaminés par l'uranium pour ce paramètre aux doses 100 et 150 mg/kg. Des variations de la

Résultats

Tableau 13 : Analyse des paramètres physiologiques, plasmatiques et urinaires

Les animaux ont été contaminés (UA) ou non (NC) à l'uranium appauvri (40 mg/L) durant 9 mois. Ils ont alors été traités durant 4 jours par une injection sous-cutanée de gentamicine à différentes doses (0, 5, 25, 100, 150 mg/kg). Le groupe 0 correspond aux animaux ayant reçu du sérum physiologique. Chaque groupe est composé de 8 animaux. Les paramètres urinaires sont mesurés dans les urines collectées sur 24 heures avant le sacrifice. Le plasma utilisé pour les dosages a été prélevé au moment du sacrifice de l'animal. La représentation d'une différence entre les animaux traités à la gentamicine par rapport aux animaux non traités (0) est # si $p < 0,01$ et ## si $p < 0,001$. La représentation d'une différence entre les animaux non contaminés et ceux contaminés par l'uranium est * si $p < 0,01$ et ** si $p < 0,001$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

concentration gentamicine (mg/kg)	Rats non contaminés				
	0	5	25	100	150
Paramètres physiologiques					
Rein (g/100g PC)	0,58 ± 0,02	0,58 ± 0,03	0,56 ± 0,01	0,63 ± 0,02	0,65 ± 0,02
Clairance de la créatinine (ml/min/kg)	4,39 ± 0,63	3,52 ± 0,26	2,70 ± 0,23 ##	2,48 ± 0,12 ##	1,73 ± 0,36 ##
Diurèse (µL/min)	6,60 ± 0,80	7,10 ± 0,60	6,30 ± 0,74	7,04 ± 0,57	7,76 ± 1,65
Foie (g/100g PC)	3,33 ± 0,14	3,34 ± 0,09	2,93 ± 0,06	2,47 ± 0,14 ##	2,79 ± 0,07 #
Paramètres plasmatiques					
Créatinine (µM)	42,0 ± 4,3	41,2 ± 2,9	52,9 ± 2,7	65,4 ± 4,0 ##	71,2 ± 4,3 ##
Urée (mM)	3,6 ± 0,3	3,7 ± 0,3	4,3 ± 0,3	6,6 ± 0,6 ##	5,9 ± 0,6 ##
Cl (mM)	79,90 ± 7,89	76,86 ± 5,41	89,82 ± 3,19	84,95 0177 3,35	85,83 ± 4,52
K (mM)	3,37 ± 0,31	3,35 ± 0,25	3,85 ± 0,21	3,12 ± 0,17	3,19 ± 0,19
Na (mM)	115,15 ± 9,58	112,53 ± 6,46	128,57 ± 3,63	121,47 ± 4,11	123,14 ± 5,56
Ca (mM)	1,96 ± 0,21	1,95 ± 0,13	2,29 ± 0,09	2,11 ± 0,10	2,22 ± 0,12
ALAT (U/l)	36,0 ± 8,5	72,3 ± 23,1	39,1 ± 9,1	26,8 ± 3,7	51,5 ± 13,2
ASAT (U/l)	71,66 ± 16,66	111,55 ± 19,16	82,28 ± 10,42	85,50 ± 9,45	140,95 ± 28,20
Albumine (g/l)	24,62 ± 2,03	23,73 ± 1,20	27,78 ± 0,70	26,07 ± 0,84	26,36 ± 1,08
Paramètres urinaires					
Urée (mol/mol Ucreat)	71,29 ± 3,16	77,51 ± 7,24	65,29 ± 5,37	48,09 ± 3,61##	50,65 ± 1,35 ##
Ca (mmol/mol Ucreat)	0,09 ± 0,01	0,21 ± 0,05	0,24 ± 0,04	0,51 ± 0,10 ##	0,80 ± 0,11 ##
K (mol/mol Ucreat)	9,48 ± 1,24	9,72 ± 0,97	8,85 ± 1,26	7,76 ± 0,64	10,65 ± 0,74
Na (mol/mol Ucreat)	7,78 ± 0,95	7,88 ± 0,30	7,01 ± 1,02	4,62 ± 0,35 #	5,37 ± 0,56
Phosph (mol/mol Ucreat)	2,19 ± 0,29	3,69 ± 0,65 #	2,98 ± 0,30	4,51 ± 0,25 ##	6,03 ± 0,49 ##
Protéine totale (g/mmol Ucreat)	0,46 ± 0,16	0,78 ± 0,21	0,22 ± 0,04	0,45 ± 0,06	0,72 ± 0,12
B2-microglobuline (g/mol Ucreat)	2,38 ± 1,49	2,09 ± 1,40	1,36 ± 1,07	6,30 ± 1,40	9,25 ± 2,38 #
Créatinine (mM)	17,46 ± 2,49	14,67 ± 1,31	16,18 ± 2,49	14,91 ± 2,06	10,95 ± 1,46
Rats contaminés à l'UA					
concentration gentamicine (mg/kg)	0	5	25	100	150
Paramètres physiologiques					
Rein (g/100g PC)	0,58 ± 0,02	0,56 ± 0,01	0,58 ± 0,02	0,61 ± 0,02	0,64 ± 0,01
Clairance de la créatinine (ml/min/kg)	3,37 ± 0,14	3,21 ± 0,31 *	3,05 ± 0,21	2,20 ± 0,34	2,66 ± 0,20
Diurèse (µL/min)	6,07 ± 0,80	6,19 ± 0,65	5,43 ± 0,63	5,79 ± 0,97	8,92 ± 1,08
Foie (g/100g PC)	3,21 ± 0,12	3,18 ± 0,13	2,84 ± 0,08	2,61 ± 0,07 #	2,51 ± 0,08 ##
Paramètres plasmatiques					
Créatinine (µM)	46,1 ± 1,9	48,6 ± 1,7	52,8 ± 2,1	64,0 ± 6,3	72,4 ± 10,6##
Urée (mM)	4,4 ± 0,1	4,2 ± 0,2	4,2 ± 0,4	5,6 ± 0,6	6,3 ± 0,9
Cl (mM)	91,75 ± 2,34	90,89 ± 4,43	93,77 ± 3,17	86,90 ± 2,53	83,97 ± 5,75
K (mM)	3,97 ± 0,09	3,76 ± 0,19	3,76 ± 0,20	3,35 ± 0,14	3,13 ± 0,23
Na (mM)	129,68 ± 2,50	128,37 ± 5,08	132,19 ± 3,55	124,91 ± 3,19	119,87 ± 6,79
Ca (mM)	2,32 ± 0,04	2,32 ± 0,12	2,35 ± 0,10	2,19 ± 0,09	2,03 ± 0,17
ALAT (U/l)	36,11 ± 1,26	40,9 ± 3,9	65,0 ± 19,9	21,7 ± 1,2	28,6 ± 3,9
ASAT (U/l)	83,67 ± 11,21	78,62 ± 8,37	117,93 ± 29,69	75,88 ± 5,97	93,89 ± 11,28
Albumine (g/l)	28,61 ± 0,77	28,38 ± 1,04 *	28,11 ± 0,61	27,14 ± 0,76	25,18 ± 1,76
Paramètres urinaires					
Urée (mol/mol Ucreat)	71,67 ± 3,35	69,02 ± 3,86	60,76 ± 6,62	48,85 ± 2,70 ##	46,83 ± 2,47 ##
Ca (mmol/mol Ucreat)	0,09 ± 0,01	0,22 ± 0,05	0,21 ± 0,03	0,60 ± 0,13 ##	0,39 ± 0,08# **
K (mol/mol Ucreat)	9,26 ± 1,53	9,98 ± 1,08	7,23 ± 1,00	8,42 ± 0,50	9,46 ± 0,72
Na (mol/mol Ucreat)	7,32 ± 1,11	8,51 ± 0,90	5,23 ± 0,94 #	5,14 ± 0,62 #	5,25 ± 0,84 #
Phosph (mol/mol Ucreat)	2,79 ± 0,23	2,39 ± 0,34 *	2,73 ± 0,48	4,43 ± 0,41 ##	4,95 ± 0,42 ##
Protéine totale (g/mmol Ucreat)	0,38 ± 0,11	0,50 ± 0,21	0,25 ± 0,06	0,42 ± 0,06	0,51 ± 0,13
B2-microglobuline (g/mol Ucreat)	1,47 ± 0,67	0,96 ± 0,66	0,78 ± 0,42	3,19 ± 0,90	8,13 ± 3,18
Créatinine (mM)	18,27 ± 2,66	15,20 ± 1,19	20,00 ± 3,07	15,04 ± 1,47	11,59 ± 1,70

Résultats

diurèse et de la clairance de la créatinine sont des signes fréquemment décrits en cas d'exposition à des doses élevées de gentamicine. C'est notamment le cas chez des rats traités durant 10 jours par injection intrapéritonéale de gentamicine (80 mg/kg) (Priyamvada et al. 2008) ou durant 5 jours après injection sous-cutanée (100 mg/kg) (Cuzzocrea et al. 2002). La clairance dépend à la fois de la filtration glomérulaire et de la réabsorption/excrétion tubulaire. Son analyse est très souvent couplée à celle de la créatinine et l'urée plasmatique et/ou urinaire.

Dans des conditions non pathologiques, la créatinine plasmatique est filtrée mais non réabsorbée. Sa concentration plasmatique est donc dépendante du débit de filtration glomérulaire. L'urée ne reflète que partiellement le fonctionnement rénal puisque l'équilibre de l'urée dans l'organisme est conditionné par sa production endogène et par son excrétion rénale. Au moment de son élimination urinaire, l'urée est filtrée et partiellement réabsorbée. L'excrétion rénale de l'urée est fonction de la diurèse et sa réabsorption tubulaire augmente quand le débit urinaire diminue. Dans nos conditions expérimentales, une augmentation de la créatinine et de l'urée plasmatiques est observée chez les animaux traités à la gentamicine (100 et 150 mg/kg) (Tableau 13). Comme pour la clairance de la créatinine, cette augmentation n'est statistiquement significative que chez les animaux non contaminés. Il n'y a pas de différence entre les animaux contaminés ou non par l'uranium. En parallèle, les fortes doses de gentamicine administrée (100 et 150 mg/kg) sont responsables d'une diminution du taux d'urée urinaire (rapportée aux taux de créatinine). Ce type de résultats est très souvent décrit dans les publications relatives aux effets néphrotoxiques de la gentamicine (Ali et al. 1992; Cuzzocrea et al. 2002; Karahan et al. 2005; Khan et al. 2009; Silan et al. 2007; Tugcu et al. 2006; Zhou et al. 2008). Ces deux marqueurs renseignent sur la présence d'une atteinte de la fonction rénale mais ne permettent pas de préciser la structure rénale touchée.

Marqueurs tubulaires

Dosage biochimique : les électrolytes

La mesure des taux d'électrolytes a été réalisée au niveau urinaire et plasmatique. Ce sont les structures tubulaires qui sont responsables de l'échange d'électrolytes entre les urines en formation et le compartiment sanguin en vue d'un contrôle de l'osmolarité et du pH urinaire. Dans notre étude, la gentamicine induit des modifications des taux d'électrolytes exclusivement au niveau des urines et pour des doses de gentamicine supérieures ou égales à 100 mg/kg (Tableau 13).

Résultats

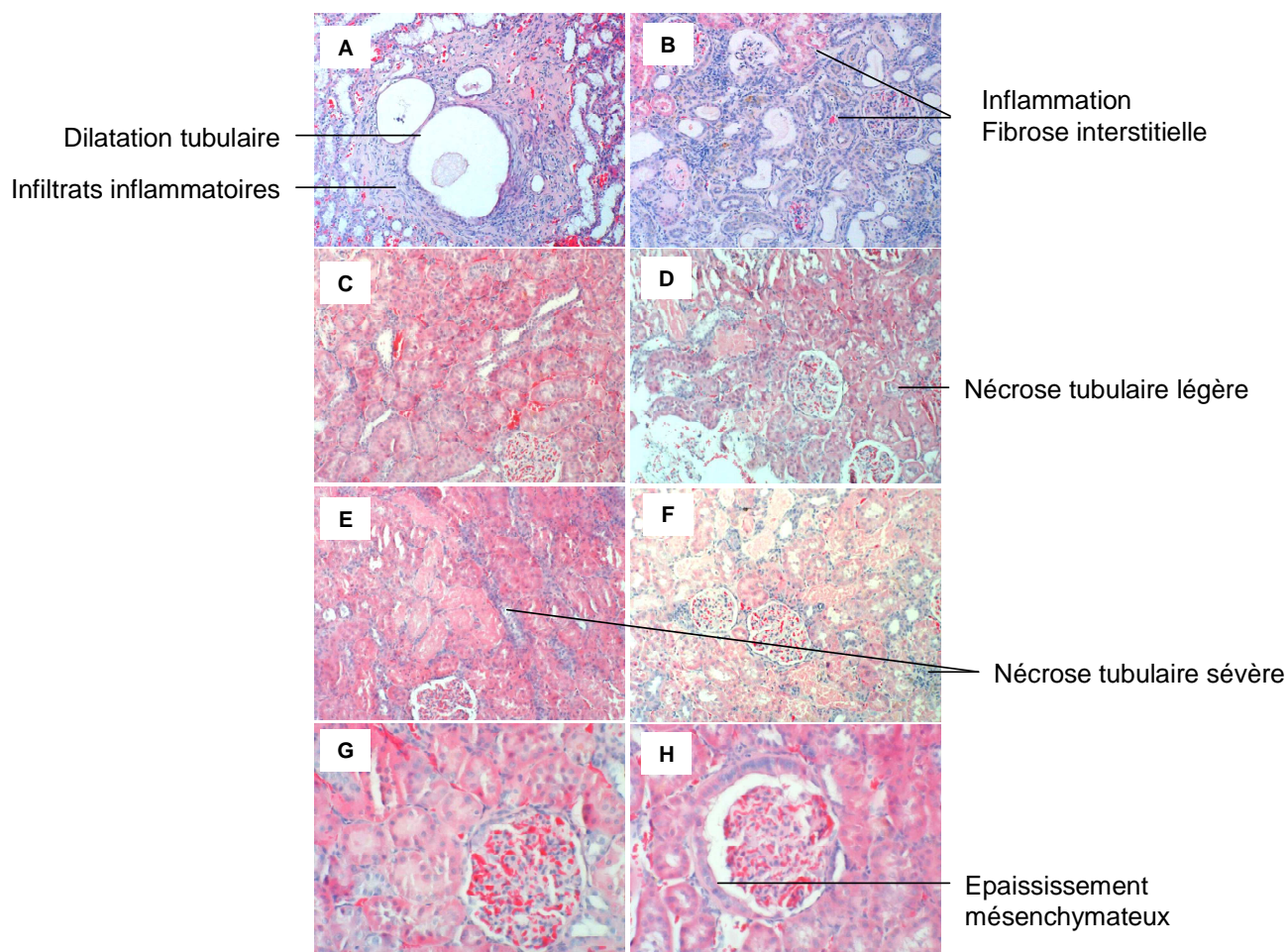


Figure 26 : Microphotographies représentatives des lésions rénales chez le rat, 24 heures après le dernier traitement à la gentamicine

Photographies A, G, H (x200), B, C, D et E (x100) ; coloration HES. Photographie A - gentamicine 5 mg/kg : Fibrose interstitielle légère et focale : dilatation tubulaire et inflammation interstitielle. Photographie B - gentamicine 150 mg/kg : Inflammation et fibrose interstitielles modérées. Photographie C - gentamicine 5 mg/kg : Tubules normaux, absence de nécrose. Photographie D : gentamicine 25 mg/kg : Nécrose tubulaire sur moins de 20% des tubules. Photographie E : gentamicine 100 mg/kg : Nécrose tubulaire sur 20 à 50% des tubules. Photographie F : gentamicine 150 mg/kg : Nécrose tubulaire sur 20 à 50% des tubules. Photographie G - gentamicine 150 mg/kg : Glomérules normaux. Photographie H - gentamicine 5 mg/kg : Epaississement mésenchymateux léger sans hyper-prolifération cellulaire dans quelques glomérules.

Résultats

A partir de 100 mg/kg, la gentamicine est responsable, au niveau des urines, d'une augmentation des taux de phosphore et de calcium ainsi que d'une diminution de celui du sodium. Le taux de potassium urinaire est inchangé quelque soit la dose de gentamicine. Globalement, la contamination par l'UA n'induit pas de modifications de ces paramètres, excepté ponctuellement pour la concentration en calcium urinaire (150 mg/kg). Les variations électrolytiques observées sont en accord avec ceux de la littérature : un traitement durant 10 jours par injection sous cutanée de gentamicine (80 mg/kg) induit chez le rat une diminution du sodium urinaire alors que le taux de potassium urinaire est inchangé (Murakami et al. 1999). L'absence de variation du potassium urinaire est également décrite chez le rat après 5 jours de traitement par injection sous-cutanée de gentamicine (100 mg/kg) (Cuzzocrea et al. 2002). Par ailleurs, un traitement de 15 jours chez le rat par des aminosides induit une augmentation de la réabsorption tubulaire du phosphate (Luft et al. 1978). Enfin, une augmentation de plus de 300% du phosphate urinaire est provoquée par un traitement de 10 jours d'injection intrapéritonéale de gentamicine à la dose de 80 mg/kg (Priyamvada et al. 2008).

Dosage biochimique : protéines urinaires

Dans nos conditions expérimentales, les protéines totales urinaires ne varient pas. En effet, le taux de protéines totales est susceptible de varier dans d'autres conditions expérimentales notamment dans le cas d'un traitement plus long et/ou d'une voie d'injection différente. Un traitement de 10 jours par injection ip de gentamicine à une dose supérieure à 80 mg/kg est ainsi responsable de l'augmentation du taux protéique urinaire (Priyamvada et al. 2008; Tugcu et al. 2006). Les protéines totales urinaires ne permettent néanmoins pas une discrimination fine de l'atteinte glomérulaire de celle tubulaire. L'utilisation de protéines de bas poids moléculaire permet ainsi de mieux décrire le type d'atteinte rénale. On note ainsi l'augmentation du taux urinaire d'une protéine de bas poids moléculaire, la β 2-microglobuline (Tableau 12). Cette protéine est normalement filtrée au niveau du glomérule puis réabsorbée par les structures tubulaires. L'augmentation de son taux urinaire témoigne généralement d'une atteinte des tubules. L'analyse des protéines urinaires et de la β 2-microglobuline est utilisée dans les études épidémiologiques qui visent à évaluer les atteintes rénales consécutives à l'exposition à l'uranium (Kurttio et al. 2002; Magdo et al. 2007; Zamora et al. 1998). Il est intéressant de noter qu'aucune différence n'est constatée entre les animaux contaminés ou non par l'uranium dans nos conditions expérimentales.

Résultats

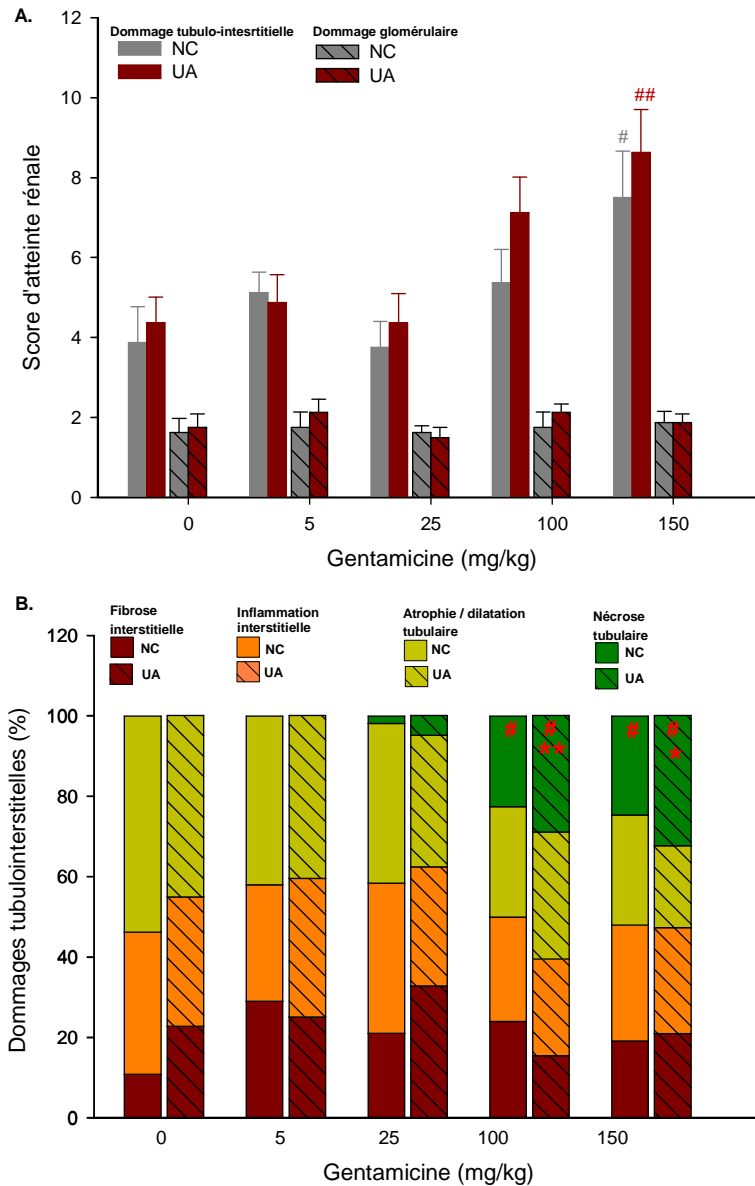


Figure 27 : Score des lésions rénales totales (A) et détail des types de dommages tubulo-interstitiels (B)

La première partie du graphique représente l'évolution des atteintes tubulaires (barre pleine) et glomérulaire (barre rayée) en fonction de la dose en gentamicine chez les animaux contaminés par l'uranium (bordeaux) ou non (gris). La représentation d'une différence entre les animaux traités à la gentamicine par rapport aux animaux non traités (0) est # si $p < 0,01$ et ## si $p < 0,001$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

La deuxième partie du graphique représente la décomposition en pourcentage de l'atteinte tubulo-interstitielle (fibrose interstitielle, inflammation interstitielle, dilatation/atrophie tubulaire, nécrose tubulaire). Les animaux contaminés ou non par l'UA ont été traités par des doses croissantes de gentamicine (5 à 150 mg/kg). L'analyse histologique des reins a été réalisée ($n=8$ pour chaque groupe). La représentation d'une différence entre les animaux traités à la gentamicine par rapport aux animaux non traités (0) est # si $p < 0,001$. La représentation d'une différence entre les animaux non contaminés et ceux contaminés par l'uranium est * si $p < 0,05$ et ** si $p < 0,01$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

Analyse histologique

Des microphotographies représentatives des lésions rénales des rats, 24 heures après leur dernière injection de gentamicine sont présentées en [figure 26](#).

Les lésions tubulo-interstitielles sont dominantes. Elles sont caractérisées par la présence d'infiltrats inflammatoires de cellules mononuclées, d'une atrophie ou d'une dilatation des tubules ([Figure 26 A](#)), de fibroses interstitielles ([Figure 26 B](#)) et enfin des nécroses tubulaires (légères à sévères) ([Figures 26 C-F](#)). L'apparition de nécrose tubulaire n'est statistiquement significative qu'à partir de 100 mg/kg (+25%, $p < 0,001$) ([Figure 27 B](#)).

Le score des lésions tubulo-interstitielles observées varie entre le stade léger et modéré et est dépendant de la dose de gentamicine injectée (+100% à 150 mg/kg, $p < 0,001$) ([Figure 27 A](#)). Par ailleurs, une augmentation significative de la nécrose tubulaire est attribuable à la contamination par l'uranium chez les animaux traités par 100 et 150 mg/kg de gentamicine (+30%, $p < 0,05$) ([Figure 27 B](#)).

Nos travaux sont en accord avec les analyses histologiques menées dans des études relatives à la néphrotoxicité de la gentamicine. Une augmentation significative du score d'atteinte rénale est notamment constatée à partir de 150 mg/kg de gentamicine dans des conditions expérimentales proches des nôtres (3 jours de traitement par injection sous-cutanées de gentamicine) ([Zhou et al. 2008](#)).

Concernant les glomérules, les lésions constatées sont minimales et indépendantes de la dose de gentamicine injectée ([Figure 26 G-H](#)) et ainsi en accord avec les analyses biochimiques plasmatiques et urinaires.

Les marqueurs utilisés par la suite sont des marqueurs relativement récents et en cours de développement expérimental ou clinique. Alors que leur propriété de marqueurs de néphrotoxicité a déjà été prouvée pour d'autres néphrotoxiques, ils n'ont jamais été utilisés dans nos conditions expérimentales de contamination chronique à l'uranium. Pour plus d'informations, se référer à la revue présentée en [annexe Ib](#).

Résultats

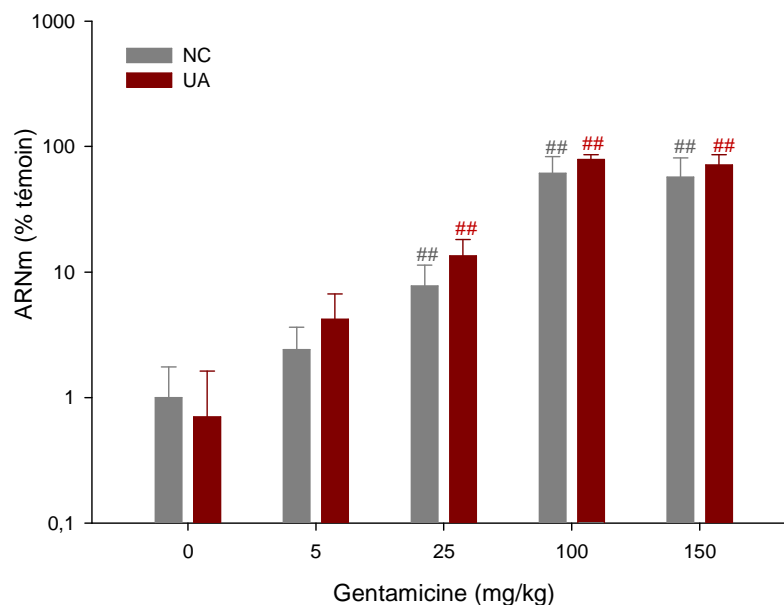


Figure 28 : Expression génique de KIM-1 dans le cortex rénal

Les animaux contaminés ou non par l'UA ont été traités par des doses croissantes de gentamicine (5 à 150 mg/kg). La partie corticale du rein a été excisée au moment du sacrifice des animaux (n=8 dans chaque groupe). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression de l'HPRT. La représentation d'une différence entre les animaux traités à la gentamicine par rapport aux animaux non traités (0) est ## si $p < 0,001$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

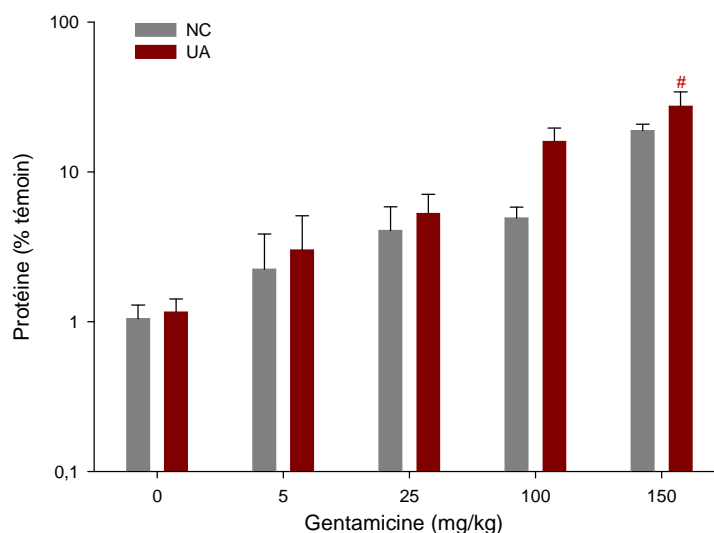


Figure 29 : Expression protéique de KIM-1 dans le cortex rénal

Les animaux contaminés ou non par l'UA ont été traités par des doses croissantes de gentamicine (5 à 150 mg/kg). La partie corticale du rein a été excisée au moment du sacrifice des animaux (n=8 dans chaque groupe). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression de la GAPDH. La représentation d'une différence entre les animaux traités à la gentamicine par rapport aux animaux non traités (0) est # si $p < 0,01$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

Analyse moléculaire : KIM-1

La protéine KIM-1 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée uniquement par les cellules du tubule proximal en cas de dommage ischémique ou néphrotoxique. Dans nos conditions expérimentales, l'expression génique de KIM-1 est très fortement induite par la gentamicine et ce dès une exposition des animaux à 25 mg/kg (+500%, $p < 0,01$) (Figure 28). A 150 mg/kg, l'augmentation de l'expression génique est supérieure à 6000%. L'augmentation de KIM-1 a été validée en tant qu'excellent marqueur de néphrotoxicité notamment dans le cas d'un traitement à la gentamicine à une dose supérieure à 200 mg/kg (Wang et al. 2008a). Dans une étude menée chez le rat traités à la gentamicine par injection sous cutanée, l'augmentation de l'expression génique de KIM-1 s'est révélée significative à partir de la dose 150 mg/kg (Zhou et al. 2008). Cette différence de sensibilité peut être attribuée à la différence de durée de traitement ; nos conditions expérimentales incluent un jour de traitement en plus. L'âge des animaux peut également être à l'origine de cette différence. Nos animaux ont un an au moment du sacrifice et sont donc plus sensibles à la toxicité de la gentamicine (Flandre et al. 1967).

Par ailleurs, chez les rats traités à la gentamicine ainsi que chez les rats non traités, la contamination par l'uranium n'induit aucune différence significative dans l'expression génique de KIM-1.

Le taux protéique de KIM-1 augmente également en fonction de la dose de gentamicine administrée (Figure 29). Cette augmentation n'est cependant significative qu'après un traitement à 150 mg/kg chez les rats contaminés par l'uranium. L'absence de significativité dans les autres groupes d'animaux peut s'expliquer par l'hétérogénéité du taux protéique de KIM-1 au sein d'un même groupe.

Le taux de KIM-1 urinaire augmente de manière significative ($\times 20$, $p < 0,001$) à la dose de 150 mg/kg de gentamicine, aussi bien chez les animaux contaminés que les non contaminés par l'uranium (Figure 30). Cette augmentation est en accord avec celle décrite par Zhou et son équipe dans le cadre d'un traitement sur 3 jours par injection sous-cutanée de doses croissantes de gentamicine (Zhou et al. 2008).

Résultats

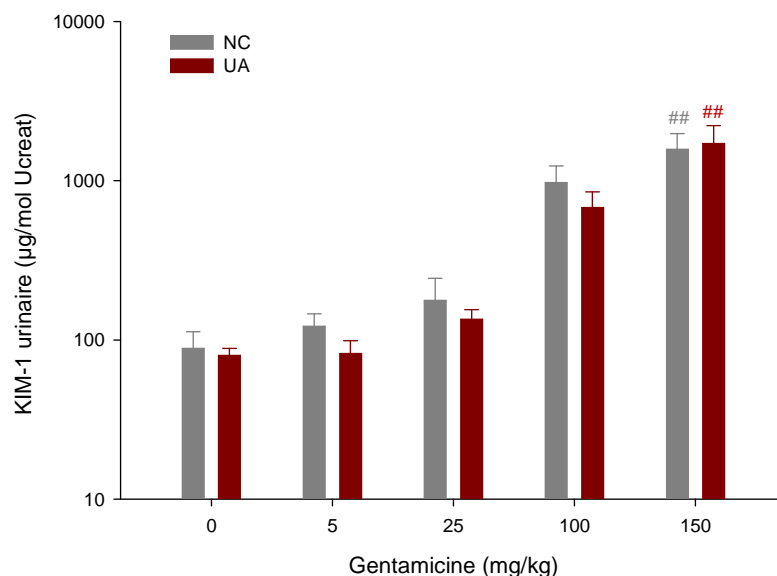


Figure 30 : Expression urinaire de KIM-1

Les animaux contaminés ou non par l'UA ont été traités par des doses croissantes de gentamicine (5 à 150 mg/kg). Le groupe 0 correspond aux animaux ayant reçu du sérum physiologique. Chaque groupe est composé de 8 animaux. Les urines ont été collectées durant les 24 dernières heures avant le sacrifice. La représentation d'une différence entre les animaux traités à la gentamicine par rapport aux animaux non traités (0) est # si $p < 0,001$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

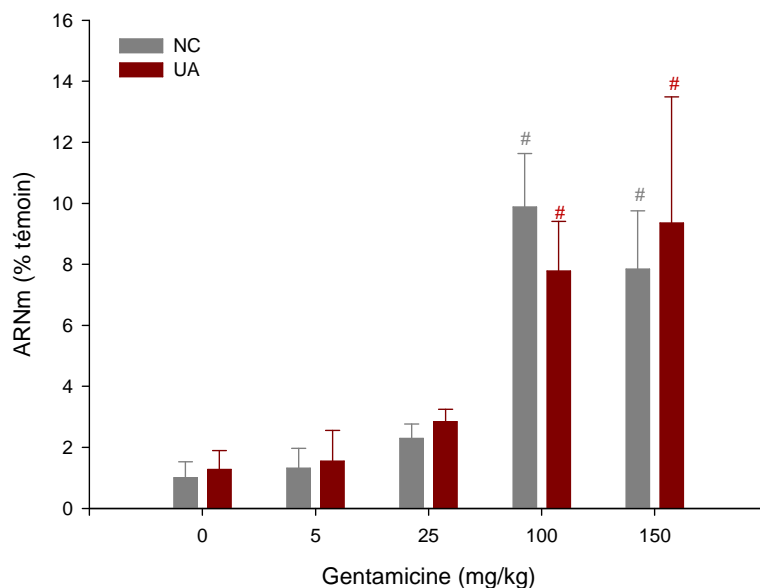


Figure 31 : Expression génique de l'ostéopontine dans le cortex rénal

Les animaux contaminés ou non par l'UA ont été traités par des doses croissantes de gentamicine (5 à 150 mg/kg). La partie corticale du rein a été excisée au moment du sacrifice des animaux ($n=8$ dans chaque groupe). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression de l'HPRT. La représentation d'une différence entre les animaux traités à la gentamicine par rapport aux animaux non traités (0) est # si $p < 0,001$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

Analyse moléculaire : Ostéopontine

L'ostéopontine est une glycoprotéine phosphorylée originellement identifiée dans les tissus osseux. Elle est exprimée dans les cellules épithéliales du tubule proximal et normalement sécrétée dans l'urine. Son excrétion urinaire est nettement augmentée en cas d'insuffisance rénale aigüe (Verstrepen et al. 2001). Au niveau tissulaire, nous observons une augmentation de l'expression génique de l'ostéopontine liée au traitement à la gentamicine (Figure 31). Le taux d'ARNm dans le cortex rénal augmente de manière significative (+65%, $p < 0.001$) dans le cas d'un traitement par la gentamicine aux doses supérieures à 100 mg/kg, chez les animaux contaminés ou non par l'uranium. De récents travaux rapportent l'augmentation de l'expression génique et protéique de l'ostéopontine au niveau du rein (TCP et TCD) en cas de traitement néphrotoxique à la gentamicine (Amin et al. 2004; Ozaki 2009; Xie et al. 2001).

Analyse moléculaire : Kallikréine

La kallikréine est une protéase à sérine qui a pour rôle de cliver le kininogène en kinine, un peptide vasoactif et natriurétique. Des études récentes montrent la diminution de l'expression génique de la kallikréine en cas d'atteinte rénale liée à un traitement par la gentamicine (Amin et al. 2004; Ozaki 2009). Dans nos conditions expérimentales, nous confirmons cette diminution d'expression pour des doses de gentamicine supérieures à 100 mg/kg (-80%, $p < 0,01$) (Figure 32). L'uranium n'induit pas de modification d'expression génique de la kallikréine chez les animaux traités ou non par la gentamicine.

Analyse moléculaire : les EMXs

De part leur localisation dans le TCP, les EMXs sont des marqueurs de la fonctionnalité métabolique du rein. Dans une étude très récente, Ozaki et son équipe mettent en évidence que l'injection intra musculaire de gentamicine durant 7 jours consécutifs, à la dose de 80 mg/kg induit, dans le rein, une diminution de l'expression génique d'un certain nombre d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques dont SUL1A1, UGT8, CYP1A1 ou encore CYP2C9 (Ozaki 2009).

Par ailleurs, des variations d'expression génique de certaines EMXs rénales (CYP3A1, CYP2B1 et CYP2C11) ont été décrites dans la cadre d'une contamination par l'uranium suivant le même protocole que celui de notre étude (9 mois de contamination *via* l'eau de boisson 40 mg/L) (Gueguen et al. 2005; Souidi et al. 2005)

Résultats

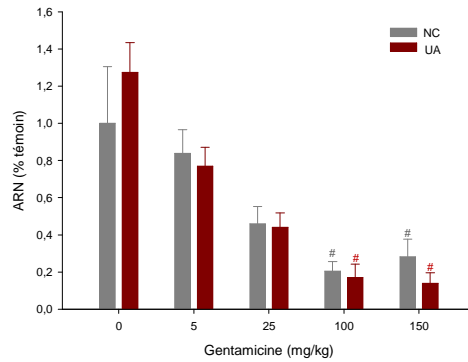


Figure 32 : Expression génique de la kallikréine dans le cortex rénal

Les animaux contaminés ou non par l'UA ont été traités par des doses croissantes de gentamicine (5 à 150 mg/kg). La partie corticale du rein a été excisée au moment du sacrifice des animaux (n=8 dans chaque groupe). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression de l'HPRT. La représentation d'une différence entre les animaux traités à la gentamicine par rapport aux animaux non traités (0) est # si $p < 0,001$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

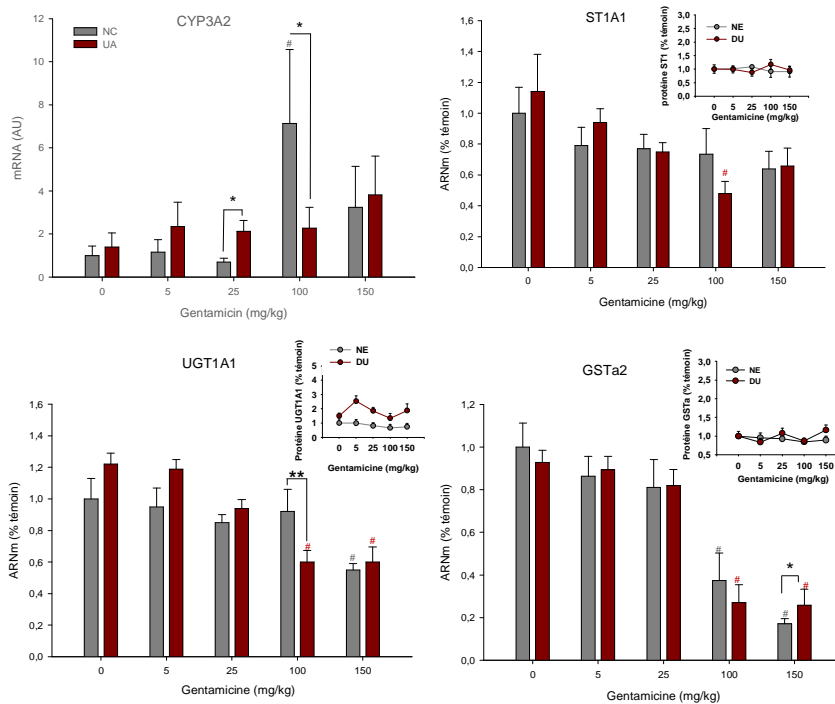


Figure 33 : Expression génique et protéique d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques dans le cortex rénal

Les animaux contaminés ou non par l'UA ont été traités par des doses croissantes de gentamicine (5 à 150 mg/kg). La partie corticale du rein a été excisée au moment du sacrifice des animaux (n=8 dans chaque groupe). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression génique de l'HPRT et protéique de la GAPDH. La représentation d'une différence entre les animaux traités à la gentamicine par rapport aux animaux non traités (0) est # si $p < 0,001$. La représentation d'une différence entre les animaux non contaminés et ceux contaminés par l'uranium est * si $p < 0,05$ et ** si $p < 0,01$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

Résultats

Concernant la gentamicine, nos résultats montrent une diminution de l'expression génique de ST1A1, UGT1A1 et GSTa2 pour un traitement à une dose supérieure ou égale à 100 mg/kg (Figure 33).

Seule, la contamination par l'uranium n'induit pas de modification de l'expression génique des EMXs étudiées. Néanmoins, chez les animaux traités à la gentamicine, l'uranium induit de légères modifications de l'expression génique de GSTa2, UGT1A1 et CYP3A2 à 100 ou 150 mg/kg. Ni la contamination par l'uranium, ni le traitement à la gentamicine n'induit de modification sur la teneur en protéines de ces EMXs (Figure 33).

Par ailleurs, les analyses menées sur l'expression génique d'autres EMXs (CYP3A1, CYP1A1, UGT2B) n'ont mis en évidence aucun effet ni de l'uranium ni du traitement à la gentamicine (données non montrées).

■ Bilan hépatique

Tel que montré au début de cette partie dans le tableau 13, p145), le traitement à la gentamicine est responsable d'une diminution du poids du foie chez les rats contaminés ou non par l'uranium. Les marqueurs de l'intégrité structurale du foie ne sont cependant pas altérés (ALAT, ASAT) (Tableau 13). Au vue de ces résultats, une analyse succincte de marqueurs d'intégrité fonctionnelle a été réalisée. Globalement, le taux d'albumine plasmatique ne varie ni du fait de la contamination par l'uranium ni de celui du traitement à la gentamicine (Tableau 12). Concernant les EMXs, la majorité des gènes analysés (CYP3A2, CYP3A1, CYP2C11, ST1A1 et UGT1A1), montre l'absence d'effet de la contamination par l'uranium ou du traitement à la gentamicine dans notre modèle (données non montrées). Quelques différences ponctuelles d'expression génique existent néanmoins en fonction de la dose de gentamicine administrée ou de la contamination par l'uranium pour GSTA2 et UGT2B1 (Figure 34). Aucune modification du taux protéique n'y est associée. Il ne semble donc pas que le traitement à la gentamicine ou l'exposition à l'uranium induise des perturbations fonctionnelles dans notre modèle.

Résultats

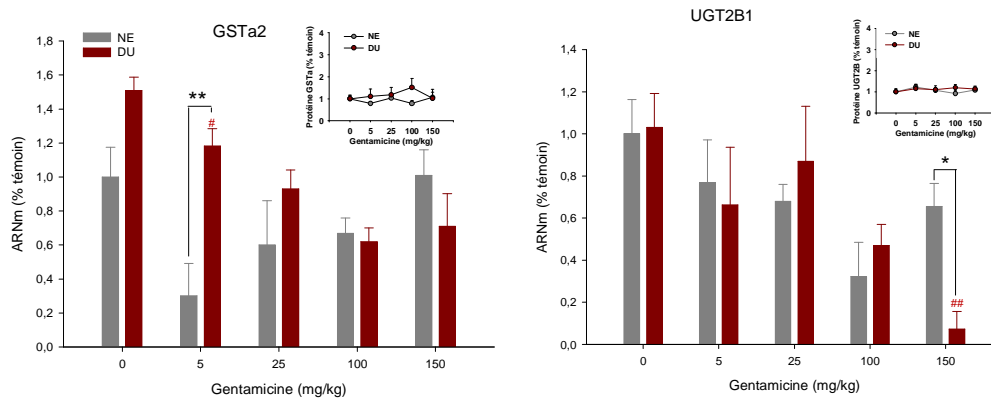


Figure 34 : Expression génique et protéique d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques au niveau hépatique

Les animaux contaminés ou non par l'UA ont été traités par des doses croissantes de gentamicine (5 à 150 mg/kg). La partie corticale du rein a été excisée au moment du sacrifice des animaux (n=8 dans chaque groupe). La représentation d'une différence entre les animaux traités à la gentamicine par rapport aux animaux non traités (0) est # si $p < 0,01$ et ## si $p < 0,001$. La représentation d'une différence entre les animaux non contaminés et ceux contaminés par l'uranium est * si $p < 0,01$ et ** si $p < 0,001$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

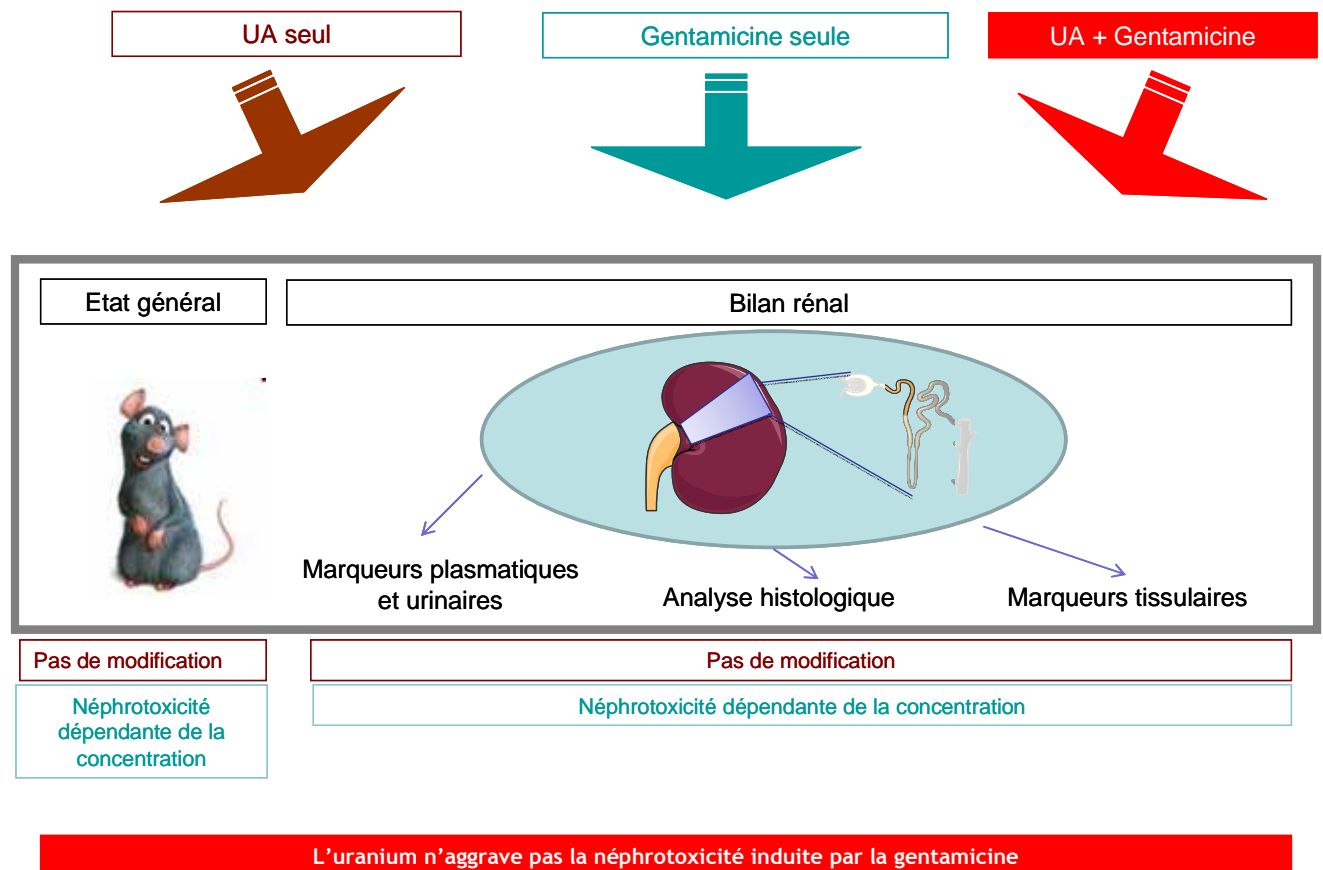


Figure 35 : Résumé des résultats obtenus lors du protocole « UA et traitement néphrotoxique à la gentamicine »

3. Résumé - Conclusion

La **figure 35** résume l'ensemble des résultats obtenus pour ce protocole expérimental.

Le but de cette étude était d'évaluer la synergie des effets de l'uranium et de la gentamicine, deux néphrotoxiques reconnus, sur le rein.

Concernant l'hypothèse d'une sensibilité rénale provoquée par l'exposition à l'uranium, l'étude des paramètres plasmatiques et urinaires classiques (créatinine, urée, électrolytes) ainsi que l'analyse histologique montrent que cette exposition n'induit pas d'aggravation sévère de la néphrotoxicité induite par la gentamicine. Par ailleurs, l'utilisation de nouveaux marqueurs plus sensibles et plus spécifiques de l'atteinte rénale (KIM-1, kallikréine, ostéopontine) a permis d'affiner le seuil de néphrotoxicité de la gentamicine et de conforter l'absence d'aggravation de la toxicité rénale liée à la contamination par l'uranium.

L'expression génique de quelques EMXs rénales (principalement UGT1A1 et GSTA2) est susceptible de diminuer suite au traitement à la gentamicine. Quelques modifications géniques sont également observées, du fait de la contamination à l'UA, sur l'expression de certains EMXs rénales (CYP3A2, UGT1A1 et GSTA2) sans conséquence notable sur le taux protéique.

En conclusion et au vue des analyses menées sur les marqueurs d'atteinte rénale (classiques ou plus sensibles), cette étude montre que notre modèle de contamination chronique à l'uranium (9 mois, 40 mg/L) n'induit pas de néphrotoxicité et n'induit pas de sensibilité du rein face à un autre néphrotoxique (d'après les marqueurs organiques que fonctionnels).

Résultats

Effet d'une contamination chronique à l'UA sur le foie : fonction de métabolisation des xénobiotiques

***Acetaminophen induces xenobiotic-metabolizing enzymes in rat:
impact of a uranium chronic exposure***

C. Rouas, M. Soudi, L. Grandcolas, S. Grison, C. Baudelin, P. Gourmelon, M. Pallardy et Y. Gueguen

Environmental Toxicology and Pharmacology 28 (2009) 363-369

Voir annexe Id

Résultats

A Introduction

Quelques rares études ont analysé les effets de l'uranium sur les cytochromes P450. Dans les conditions d'une administration unique d'une dose toxique du radionucléide, l'activité des CYP et la pharmacocinétique de certains médicaments sont modifiées (Moon et al. 2003; Pasanen et al. 1995).

Notre laboratoire a alors entrepris d'examiner les effets d'une contamination chronique (9 mois) à une dose non néphrotoxique d'UA (40mg/L) sur les enzymes du métabolisme des médicaments. Il a ainsi été montré que, dans ces conditions, l'expression de certaines enzymes de phase I est augmentée dans différents tissus (foie, rein, cerveau, poumon) alors que les expressions des enzymes de phase II et des transporteurs étudiés ne varient pas (Gueguen et al. 2005; Souidi et al. 2005).

Le but des travaux mis en œuvre est donc d'estimer si les modifications du métabolisme des xénobiotiques constatées lors d'une exposition à une dose toxique d'UA sont retrouvées dans des conditions d'exposition à l'UA non néprotoxique. Afin de répondre à cette question, un modèle expérimental a été mis en place. Il consiste à exposer les animaux de manière chronique à une faible dose d'uranium puis à les traiter par du paracétamol.

Le paracétamol a été choisi pour de nombreuses raisons. Tout d'abord, c'est un xénobiotique fréquemment utilisé par un large spectre de la population compte tenu de ses propriétés pharmacologiques. Ensuite, sa pharmacocinétique et sa toxicité sont relativement bien décrites. En effet, en cas d'exposition à une dose trop élevée, le système de métabolisation des enzymes de phase II est saturé. La balance de détoxification est alors perturbée et tend vers l'apparition d'un métabolite réactif et toxique, le NAPQI. Ce sont les enzymes de phase I et précisément les CYPs (2E, 3A) qui en sont responsables. Une augmentation de la teneur en CYP du fait d'une exposition à l'uranium pourrait ainsi être responsable d'une augmentation de l'hépatotoxicité induite par le paracétamol.

Cette hypothèse d'une modification de la pharmacocinétique et de la toxicité d'un médicament a été étudiée chez des rats contaminés de manière chronique à l'uranium et recevant une injection unique de paracétamol à une dose hépatotoxique (400 mg/kg). Une élimination plus lente du paracétamol plasmatique a été observée chez les animaux contaminés par l'uranium. De plus, des altérations histologiques rénales et une

Résultats

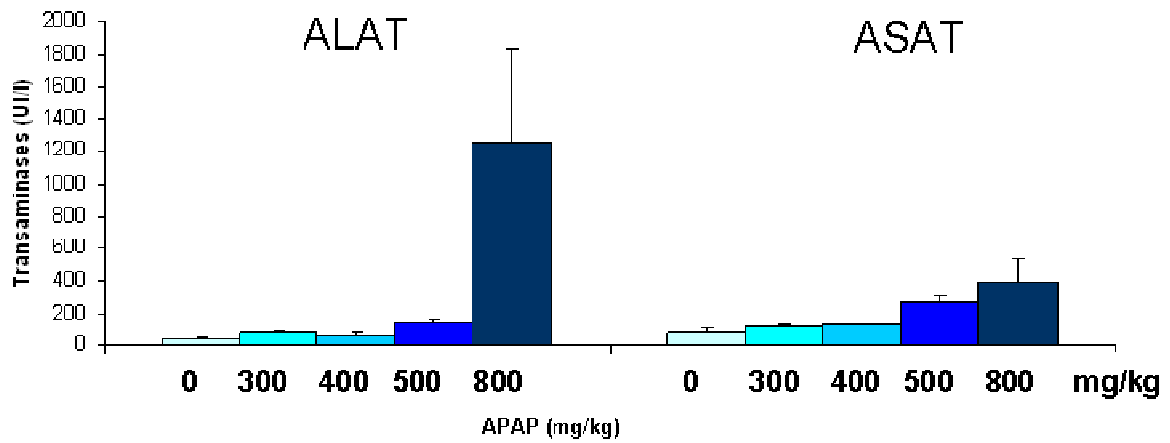


Figure 36 : Evolution des transaminases en fonction de la dose de paracétamol administré

Les animaux ont été traités par injection intrapéritonéale de paracétamol à différentes doses (300 à 800 mg/kg). L'analyse des transaminases a été réalisée 24 heures après le traitement.

augmentation des marqueurs biochimiques d'une atteinte hépatique ont été également constatées plus fréquemment chez les animaux contaminés. Ceci confirme qu'un traitement chronique à de faibles doses d'uranium tend à perturber le métabolisme d'un médicament (Gueguen et al. 2007).

L'objectif de cette première partie de thèse est donc d'évaluer les effets d'une contamination chronique (9 mois) par l'UA (40 mg/L soit 1 mg/rat/jour) sur le métabolisme de l'APAP administré dans des conditions thérapeutiques et plus proche des schémas thérapeutiques utilisés en médecine humaine.

B Cas d'un traitement unique et à dose thérapeutique en paracétamol.

1. Préambule

a. Contexte

L'uranium agit sur les enzymes du métabolisme des médicaments que l'exposition soit aiguë et à forte dose ou chronique et à faible dose. De plus, dans le cadre d'une contamination chronique de 9 mois à l'uranium appauvri (40 mg/L) suivi d'un traitement au paracétamol à une dose hépatotoxique (400 mg/kg), une modification de l'élimination et de la toxicité du médicament a été observée chez les rats.

b. Objectif

Le but de l'étude à venir est d'analyser les effets d'une contamination chronique à l'UA (40 mg/L) sur les acteurs du métabolisme du paracétamol et sur sa pharmacocinétique lorsque le médicament est administré à une dose dite « thérapeutique » (50 mg/kg).

c. Stratégie expérimentale

Des études préliminaires ont démontré que la dose de 50 mg/kg de paracétamol n'induit aucun dommage tissulaire hépatique. Elle se situe bien en dessous de la dose minimale induisant une hépatotoxicité après injection intrapéritonéale unique de paracétamol (Figure 36) (données internes au laboratoire). Par ailleurs, la dose de 100 mg/kg a été choisie en vue des propriétés analgésiques du paracétamol chez le rat (Nagakura et al. 2003). La dose de 50 mg/kg est utilisée dans d'autres études expérimentales

Résultats

Tableau 14 : Résultats de l'analyse des paramètres physiologiques et biochimiques des rats contaminés ou non par l'UA

Les animaux ont été contaminés durant 9 mois avec de l'UA. Ils ont ensuite été traités avec une injection unique de paracétamol. N=8 dans tous les groupes. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- S.E.M. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

Temps après traitement APAP (h)	Témoins non contaminés					
	0	0,5	1	1,5	2	3
Paramètres physiologiques						
Poids des animaux (g)	626 ± 15	615 ± 8	655 ± 18	652 ± 40	673 ± 20	684 ± 21
Foie (g/100 g de poids corporel)	3,17 ± 0,07	3,35 ± 0,13	3,33 ± 0,08	3,29 ± 0,10	3,17 ± 0,09	3,31 ± 0,15
Reins (g/100g de poids corporel)	0,57 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,57 ± 0,00	0,55 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,58 ± 0,01
Paramètres plasmatiques						
ALAT (U/L)	69,86 ± 13,30	79,07 ± 18,37	59,51 ± 6,46	101,06 ± 15,40	56,66 ± 8,04	51,05 ± 8,32
ASAT (U/L)	139,05 ± 25,36	144,46 ± 26,20	120,07 ± 18,07	205,25 ± 36,19	111,53 ± 13,76	107,61 ± 5,44
PAL (U/L)	124,46 ± 9,61	155,15 ± 20,94	128,06 ± 8,21	197,05 ± 28,19	128,01 ± 16,54	172,30 ± 12,98
LDH (U/L)	950 ± 246	693 ± 261	797 ± 256	921 ± 255	315 ± 77	460 ± 77
Albumine (g/L)	34,15 ± 1,02	31,74 ± 0,45	30,94 ± 0,53	31,04 ± 0,46	31,45 ± 0,80	33,24 ± 1,49
Bilirubine totale (µmol/L)	3,51 ± 0,50	3,91 ± 0,41	3,60 ± 0,42	4,45 ± 0,82	3,92 ± 0,35	5,09 ± 0,68
Triglycérides (mmol/L)	1,57 ± 0,26	1,47 ± 0,17	1,80 ± 0,29	1,30 ± 0,13	2,34 ± 0,60	2,34 ± 0,31
Cholestérol (mmol/L)	3,43 ± 0,34	3,62 ± 0,31	3,55 ± 0,13	4,47 ± 0,69	2,78 ± 0,29	4,87 ± 0,46
Créatinine (µM)	64,07 ± 4,16	52,34 ± 1,10	50,80 ± 1,77	48,85 ± 0,86	50,38 ± 2,45	58,41 ± 2,52
Urée (mM)	6,99 ± 0,35	5,63 ± 0,27	5,28 ± 0,13	5,08 ± 0,21	5,22 ± 0,24	6,92 ± 0,50

Temps après traitement APAP (h)	Contaminés UA					
	0	0,5	1	1,5	2	3
Paramètres physiologiques						
Poids des animaux (g)	660 ± 23	683 ± 11	679 ± 19	688 ± 18	680 ± 26	645 ± 16
Foie (g/100 g de poids corporel)	3,25 ± 0,12	3,30 ± 0,07	3,38 ± 0,12	3,16 ± 0,13	3,16 ± 0,07	3,00 ± 0,08
Reins (g/100g de poids corporel)	0,56 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,57 ± 0,01
Paramètres plasmatiques						
ALAT (U/L)	58,43 ± 5,51	70,91 ± 9,89	64,04 ± 8,76	89,28 ± 18,87	83,32 ± 14,46	71,10 ± 8,50
ASAT (U/L)	177,94 ± 13,36	174,51 ± 28,77	149,88 ± 24,00	168,28 ± 22,02	142,15 ± 21,35	136,36 ± 15,33
PAL (U/L)	126,40 ± 7,27	142,02 ± 15,21	135,71 ± 5,36	142,94 ± 14,22	126,65 ± 14,72	153,60 ± 18,56
LDH (U/L)	780 ± 96	468 ± 96	359 ± 113	565 ± 228	415 ± 47	426 ± 88
Albumine (g/L)	33,80 ± 0,44	30,07 ± 0,46	29,97 ± 0,88	31,28 ± 0,79	31,56 ± 0,78	33,54 ± 0,93
Bilirubine totale (µmol/L)	4,98 ± 0,54	4,01 ± 0,44	3,56 ± 0,27	3,59 ± 0,44	3,29 ± 0,36	4,16 ± 0,45
Triglycérides (mmol/L)	2,05 ± 0,36	1,38 ± 0,14	1,78 ± 0,22	1,39 ± 0,15	1,28 ± 0,14	1,58 ± 0,21
Cholestérol (mmol/L)	4,41 ± 0,68	3,77 ± 0,34	3,91 ± 0,48	3,39 ± 0,26	3,66 ± 0,26	3,22 ± 0,23
Créatinine (µM)	64,87 ± 7,24	53,22 ± 1,28	50,31 ± 0,90	48,46 ± 1,29	49,07 ± 2,74	55,74 ± 3,36
Urée (mM)	7,21 ± 0,31	5,80 ± 0,18	5,89 ± 0,28	4,86 ± 0,26	6,02 ± 0,59	7,24 ± 0,83

dont l'un des objectifs est, comme le nôtre, d'analyser la pharmacocinétique du médicament (Tran et al. 2001).

Afin d'optimiser l'étude du métabolisme et de l'élimination du paracétamol, différents temps de sacrifice ont été choisis. Ils s'échelonnent tous entre 30 minutes et 3 heures après le traitement afin de couvrir la totalité de l'élimination du paracétamol dans nos conditions expérimentales. Le T0 correspond aux animaux témoins traités par le véhicule d'administration du paracétamol (sérum physiologique). Ils ont été sacrifiés dans l'intervalle 30 minutes-3 heures après le traitement (Figure 18, p103). Une série d'analyses a alors été entreprise afin d'étudier l'état général de l'animal ainsi que les atteintes moléculaires liées au métabolisme du composé.

2. Résultats / Discussion

a. Paramètres généraux de santé

■ Prise alimentaire, hydrique et prise de poids

La contamination par l'uranium n'a aucun impact sur la consommation hydrique (30 mL/j/rat) ainsi que sur le gain de poids des animaux contaminés par l'uranium par rapport aux animaux non contaminés. De plus, tous les animaux du groupe UA ont été exposés, *via* leur eau de boisson, à la même quantité d'uranium (1 mg/rat/jour).

■ Bilan des paramètres biochimiques.

Le dosage de certains paramètres plasmatiques nous a permis d'évaluer l'état général de l'animal et notamment les marqueurs physiologiques et fonctionnels du foie et du rein. Le **tableau 14** présente le poids des animaux, les poids du foie et du rein au moment du sacrifice ainsi que les valeurs de différents paramètres plasmatiques.

Au moment du prélèvement des organes, aucune anomalie macroscopique du foie et des reins n'a été constatée dans les deux lots d'animaux. De plus, l'étude des marqueurs biochimiques d'atteinte organique (ALAT, ASAT, PAL, LDH) ou d'atteinte fonctionnelle du foie (albumine, bilirubine totale, triglycérides, cholestérol) ainsi que ceux de néphrotoxicité (créatinine, urée) n'ont montré aucune différence entre les animaux contaminés ou non par l'uranium.

Résultats

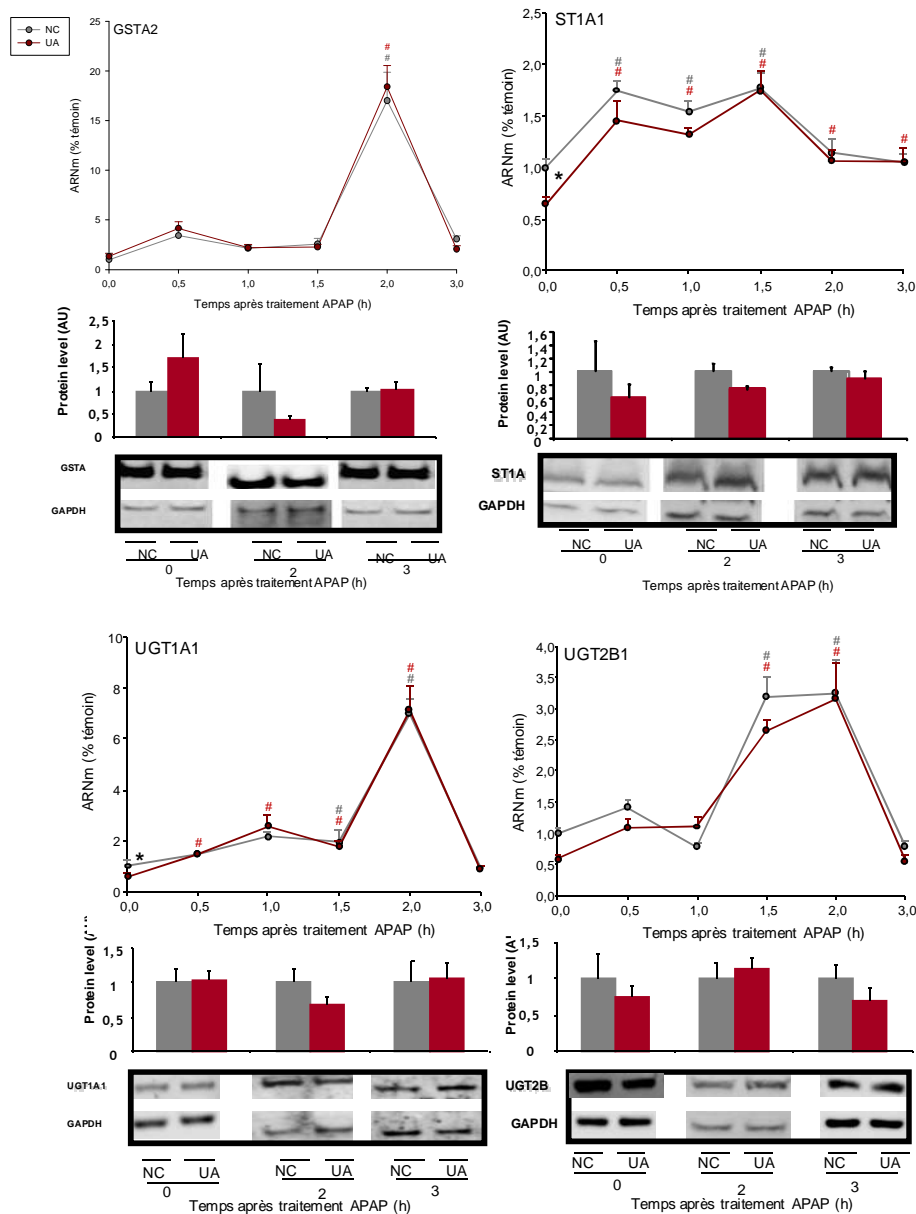


Figure 37 : Expression génétique et protéique des principales enzymes de phase II

Les animaux ont été contaminés (UA) ou non (NC) à l'uranium appauvri durant 9 mois. Ils ont ensuite été traités au paracétamol (APAP) puis ils ont été sacrifiés entre 30 min et 3 heures après le traitement médicamenteux. Le taux d'ARNm des EMX a été quantifié par RT-PCR (n=6 pour tous les groupes d'animaux). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression du gène codant pour l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT). Le taux de protéines a été quantifié par Western-blot (n=6 pour les groupes 0, 2 et 3 heures). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression protéique de la glycéraldéhyde 3-phosphate deshydrogénase (GAPDH). Chaque point correspond à la moyenne des valeurs +/- S.E.M. La représentation d'une différence significative entre les animaux contaminés et non contaminés est * si $p < 0,05$. La représentation d'une différence dans la cinétique d'expression par rapport aux animaux du temps 0 est # si $p < 0,05$ (pour les animaux contaminés) et # si $p < 0,05$ (pour les animaux non contaminés). L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova pour les cinétiques d'expression génétique et via un test t de Student pour la comparaison des taux protéiques.

b. Effets sur les enzymes du métabolisme des xénobiotiques hépatiques

■ Analyse des enzymes de phase II

Dans des conditions de traitement non hépatotoxique, le paracétamol est principalement métabolisé par des enzymes de phase II. Afin d'évaluer l'impact potentiel de la co-exposition uranium/paracétamol sur ce système, l'analyse des expressions génique et protéique a été réalisée.

Expression génique

La cinétique d'expression des gènes codant pour les principales enzymes de phase II du métabolisme des xénobiotiques est étudiée dans le foie des animaux contaminés par l'uranium et des animaux témoins, traités ou non par le paracétamol (Figure 37).

Globalement, la contamination par l'uranium n'induit pas de changement majeur dans l'expression génique des enzymes de phase II. Néanmoins, en considérant les valeurs dans leur globalité et en tenant compte des facteurs « traitement au paracétamol » et « contamination par l'UA » attribués à chaque valeur, une différence significative entre les animaux contaminés et non contaminés par l'UA est observée dans la cinétique d'expression du gène codant pour ST1A ($p < 0,05$). L'analyse des résultats nécessite d'émettre quelques réserves quant à la significativité biologique de la différence observée. Les cinétiques d'expression génique ne diffèrent pas entre les animaux contaminés et non contaminés par l'UA pour GSTA2, UGT1A1 et UGT2B1. Par ailleurs, en analysant les données temps par temps, la contamination par l'UA n'induit aucune différence d'expression génique des enzymes analysées chez les animaux traités au paracétamol.

Le traitement au paracétamol est responsable d'une induction de l'expression génique. L'induction la plus importante concerne l'expression du gène codant pour GSTA2, 2 heures après le traitement au paracétamol (18 fois, $p < 0,001$). L'expression du gène codant pour UGT1A1 est également triplée ($p < 0,001$), 2 heures après le traitement. Concernant UGT2B1, le pic d'expression génique débute à 1,5 heures et reste constant jusqu'à 2 heures. L'induction de l'expression génique de ST1A débute dès la première demi-heure après le traitement mais reste beaucoup plus modérée dans le temps.

Très peu de données existent sur l'expression génique ou protéique des enzymes de phase II à la suite d'un traitement au paracétamol. Il est décrit que les taux hépatique et rénal d'ARNm d'enzymes de phase II (GSTA2, UGT2B1 et ST1B1) sont augmentés 2 heures après

Résultats

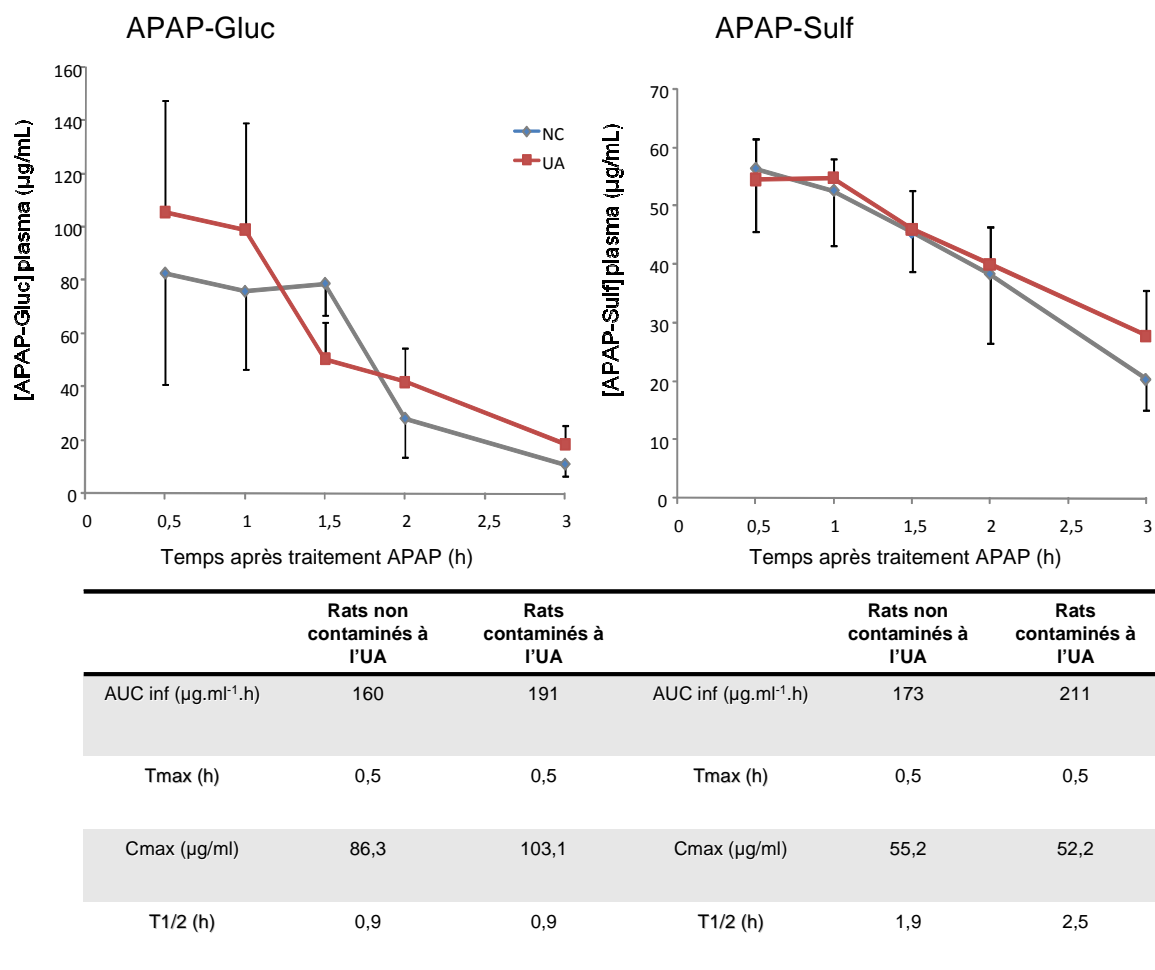


Figure 38 : Détermination des concentrations plasmatiques des métabolites majeurs du paracétamol

Les concentrations des métabolites majeurs du paracétamol (APAP-Gluc et APAP-Sulf) ont été déterminées chez les rats contaminés par l'uranium (UA) et les rats non contaminés (NC). Les rats ont été sacrifiés 0,5, 1, 1,5, 2 et 3h après l'administration de paracétamol (n=8). Le dosage a été réalisé par HPLC. Chaque point correspond à la moyenne des valeurs obtenues ± S.E.M. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

Résultats

un traitement par injection intrapéritonéale de paracétamol (400 mg/kg) et retrouve un niveau basal 24 heures après le traitement (Gueguen et al. 2007).

Expression protéique

Dans le but d'estimer les conséquences de l'induction de l'expression des gènes codant pour les enzymes de phase II sur leur taux protéique respectif, une semi quantification des protéines a été réalisée par Western-blot (Figure 37). Aucune différence n'a été mise en évidence entre les animaux contaminés et les non contaminés par l'UA, 2 et 3 heures après le traitement au paracétamol. L'induction de l'expression génique se situant environ 2 heures après le traitement, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse d'une élévation du taux protéique à un temps plus tardif que 3 heures.

Activité des enzymes de phase II

Les enzymes de phase II sont les enzymes principalement impliquées dans l'élimination du paracétamol administré à une dose non hépatotoxique. De nombreuses études analysent les cinétiques de formation et d'élimination des métabolites (Kim et al. 2009; Lin et al. 1996; Mirochnitchenko et al. 1999; Tran et al. 2001). Les métabolites principaux du paracétamol sont des formes conjugués au glucuronide (APAP-glucuronide) et au sulfate (APAP-sulfate). D'autres métabolites existent également sous forme minoritaires : APAP-cystéine, APAP-glutathion, APAP-mercapturate. Ces derniers ne sont présents qu'en très faibles quantités et leur dosage est beaucoup plus délicat. De ce fait, peu de données bibliographiques existent sur ces métabolites.

Dosage des métabolites majeurs

La figure 38 représente la cinétique plasmatique des métabolites majeurs du paracétamol.

Aucune différence significative n'est notée entre les animaux contaminés ou non par l'UA. La formation des métabolites majeurs s'effectue durant la première demi-heure après le traitement. Leur élimination est rapide et l'on constate qu'au temps 3 heures, la majorité des métabolites formés a disparu. Chez l'Homme, une étude menée sur 6 volontaires sains ayant reçu par voie orale 1 g de paracétamol (dose appartenant à un intervalle thérapeutique) montre l'apparition d'APAP-gluc et APAP-sulf plasmatiques dès la première heure après le traitement avec un Tmax (temps où la concentration est maximale) de 4 et 2 heures respectivement. L'élimination des métabolites est quasi-totale 12 heures après le traitement (Jensen et al. 2004). Nous constatons dans notre étude une apparition et une

Résultats

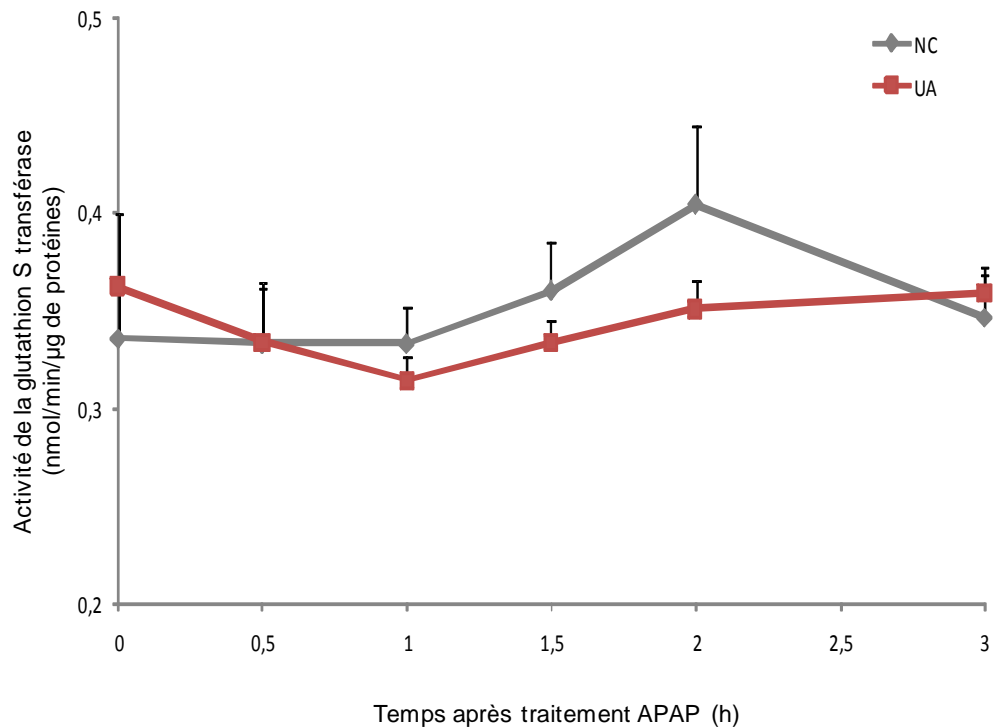


Figure 39 : Dosage de l'activité de la glutathion-S-transférase hépatique

Les animaux ont été contaminés (UA) ou non (NC) par l'uranium appauvri durant 9 mois. Ils ont ensuite été traités au paracétamol (APAP) puis ils ont été sacrifiés 0,5h, 1h, 1,5h, 2h et 3h après le traitement médicamenteux (n=8 pour chaque groupe). Le point à 0h correspond aux animaux qui n'ont pas reçu de paracétamol. Chaque point correspond à une moyenne \pm S.E.M. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

Résultats

élimination des métabolites qui s'effectuent à des temps plus précoces. Ceci est certainement attribuable à l'utilisation d'une dose plus faible de paracétamol et à une variabilité inter-espèce.

Nos résultats sont en accord avec ceux décrits dans une étude utilisant la même dose de paracétamol (50 mg/kg) administré par injection intrapéritonéale chez le rat. Cette étude montre l'apparition des métabolites majeurs plasmatiques dès la première demi-heure avec une disparition quasi-totale dans les 3 heures qui suivent le traitement (Tran et al. 2001). Par ailleurs, il a été décrit chez des rats traités au paracétamol (1 g/kg ; IP) que l'apparition du métabolite APAP-gluc dans les urines débute également dès la première heure et atteint un maximum à 150 minutes. Au temps 3 heures, les concentrations d'APAP-gluc urinaires tendent vers 0 (Ghanem et al. 2005).

Activité GST totale

Du fait de la forte induction de l'expression génique de la GSTA2, nous avons réalisé un dosage de l'activité totale de la GST.

La dose de paracétamol administré n'induit pas de modification de l'activité totale de la GST (Figure 39). Paradoxalement, une étude menée sur des souris traitées oralement par 300 mg/kg de paracétamol rapporte une diminution de l'activité de la GST hépatique chez les animaux traités. Cette diminution est corrélée avec une baisse de la teneur en glutathion (Bhattacharjee and Sil 2006). La diminution de glutathion successive à un traitement hépatotoxique de paracétamol est couramment décrite dans la littérature (Jaeschke et al. 2006; Mirochnitchenko et al. 1999; Mitchell et al. 1973; Potter et al. 1974). Elle est en effet due à la liaison du glutathion au métabolite réactif NAPQI *via* la GST. Dans nos conditions expérimentales, la dose de paracétamol administré se situe bien dessous le seuil d'hépatotoxicité et le métabolite NAPQI n'est vraisemblablement pas ou peu formé. Ceci peut expliquer l'absence de diminution de l'activité de la GST.

■ Analyse des transporteurs de la phase III

Lors d'un traitement à une dose thérapeutique de paracétamol, ce dernier est majoritairement métabolisé par les enzymes de phase II (ST et UGT) puis éliminé *via* les transporteurs (MDR1 et MRP2). L'étude de l'expression des gènes codant pour les transporteurs de la phase III hépatiques est représentée dans la figure 40.

Résultats

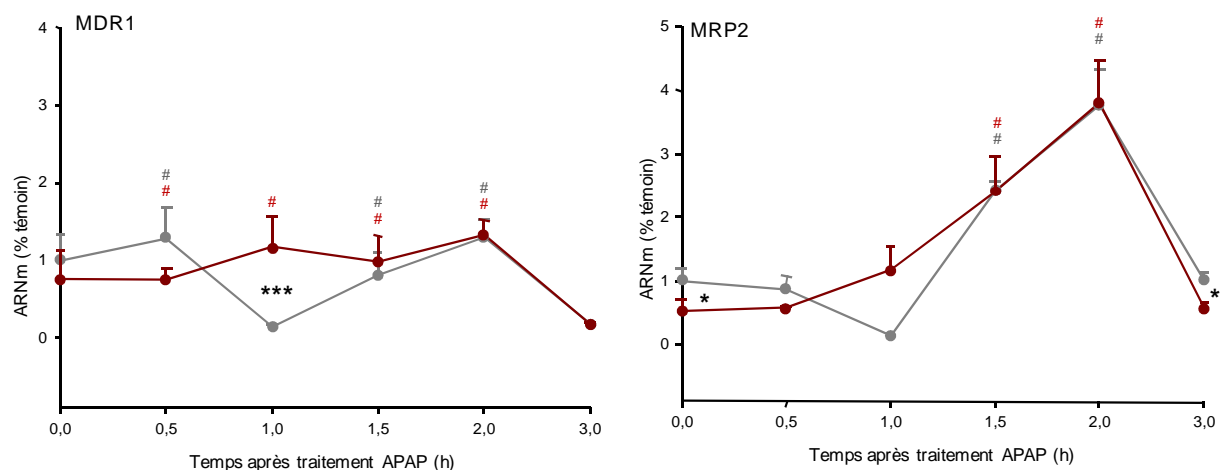


Figure 40 : Expression génique des principaux transporteurs de la phase III

Les animaux ont été contaminés (UA) ou non (NC) par l'uranium appauvri durant 9 mois. Ils ont ensuite été traités au paracétamol (APAP) puis ils ont été sacrifiés entre 30 min et 3 heures après le traitement médicamenteux. Le taux d'ARNm des transporteurs a été quantifié par RT-PCR (n=6 pour tous les groupes d'animaux). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression du gène codant pour l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT). Chaque point correspond à la moyenne des valeurs +/- S.E.M. La représentation d'une différence significative entre les animaux contaminés et non contaminés est * si $p < 0,05$ et *** si $p < 0,001$. La représentation d'une différence dans la cinétique d'expression par rapport aux animaux du temps 0 est # si $p < 0,05$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

Résultats

Durant ces dix dernières années, deux autres équipes se sont intéressées aux effets du paracétamol sur les transporteurs de la famille des MRPs. L'équipe de Ghanem montre qu'un traitement au paracétamol induit chez le rat une augmentation du taux protéique de MRP2 et MRP3, 24 heures après le traitement à une dose hépatotoxique (1 g/kg ; IP) (Ghanem et al. 2004; Ghanem et al. 2009; Ghanem et al. 2005). Chez la souris, l'équipe d'Aleskunes confirme l'effet inducteur du paracétamol (400 mg/kg ; IP) sur l'expression génique et/ou protéique des transporteurs MRP1, MRP2, MRP3 et MRP4 (Aleksunes et al. 2007; Aleksunes et al. 2008a).

Concernant l'expression génique de MRP2 dans nos conditions expérimentales, en considérant les valeurs dans leur globalité et en tenant compte des facteurs « traitement au paracétamol » et « contamination par l'UA » attribués à chaque valeur, une différence significative entre les animaux contaminés et non contaminés par l'UA est observée dans la cinétique d'expression du gène codant pour MRP2 ($p < 0,05$). Par ailleurs, on note une induction de cette dernière liée au traitement au paracétamol et dont le maximum se situe environ 2 heures après le traitement ($\times 4$, $p < 0,01$) (Figure 40).

L'équipe d'Aleskunes a également montré une induction, bien que plus modérée, des transporteurs MDR1a et MDR1b chez les souris traitées par injection intrapéritonéale de paracétamol (400 mg/kg) (Aleksunes et al. 2008b). Une variation d'expression génique supérieure à 3 fois des gènes codant pour ABCB1a (MDR1a) a également été montrée chez le rat traité par voie orale au paracétamol (Morishita et al. 2006).

En considérant MDR1, on note que malgré la présence de quelques différences significatives pour les animaux traités par rapport aux animaux non traités au paracétamol, l'expression génique fluctue autour d'un facteur 1 ; ceci témoigne de la non-inductibilité de l'expression génique de MDR1 par le paracétamol dans nos conditions expérimentales (50 mg/kg). Une heure après le traitement, une différence est néanmoins notée entre les animaux contaminés et les non contaminés par l'UA.

Au regard de la globalité de la cinétique, quelques réserves peuvent être émises quant à la significativité biologique de la différence observée entre les animaux contaminés ou non par l'UA aussi bien pour l'expression génique de MDR1 que pour celle de MRP2.

Résultats

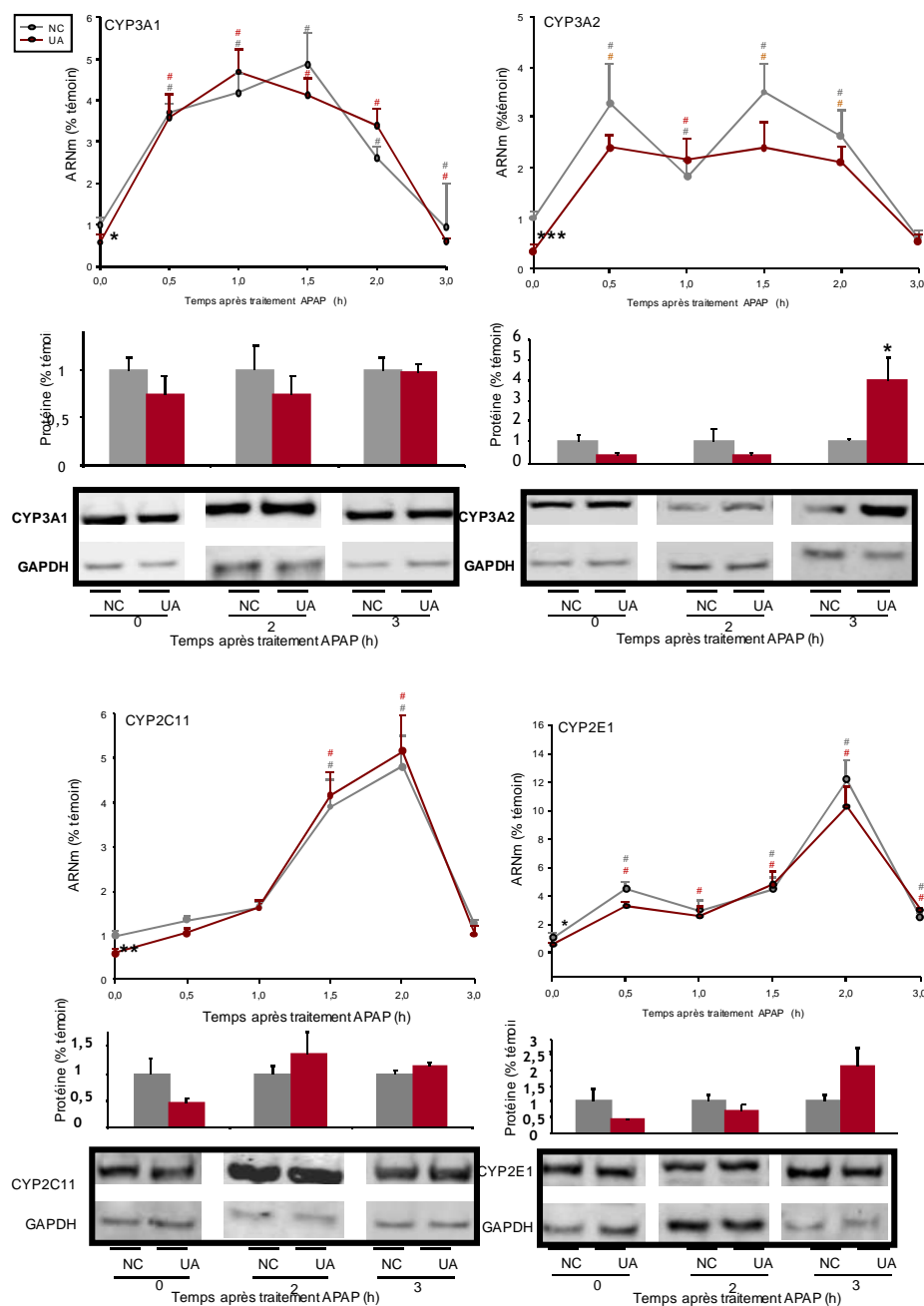


Figure 41 : Expression génique et protéique des principales enzymes de phase I

Les animaux ont été contaminés (UA) ou non (NC) par l'uranium appauvri durant 9 mois. Ils ont ensuite été traités au paracétamol (APAP) puis ils ont été sacrifiés entre 30 min et 3 heures après le traitement médicamenteux. Le taux d'ARNm des EMX a été quantifié par RT-PCR (n=6 pour tous les groupes d'animaux). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression du gène codant pour l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT). Le taux de protéines a été quantifié par Western-blot (n=6 pour les groupes 0, 2 et 3 heures). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression protéique de la glycéraldéhyde 3-phosphate deshydrogénase (GAPDH). Chaque point correspond à la moyenne des valeurs +/- S.E.M. La représentation d'une différence significative entre les animaux contaminés et non contaminés est * si $p < 0,05$, ** si $p < 0,01$ et *** si $p < 0,001$. La représentation d'une différence dans la cinétique d'expression par rapport aux animaux du temps 0 est # si $p < 0,05$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

■ Analyse des enzymes de phase I

Expression génique

La cinétique d'expression des gènes codant pour les principales enzymes de phase I du métabolisme des xénobiotiques est étudiée dans le foie des animaux contaminés par l'uranium et des animaux témoins, traités ou non par le paracétamol (Figure 41). Globalement, ces résultats ne montrent pas d'effet significativement différent entre les animaux contaminés ou non par l'uranium.

Une différence significative entre les animaux contaminés et non contaminés par l'UA est néanmoins observée dans les cinétiques d'expression des gènes codant pour CYP3A2 ($p < 0,05$) et CYP2E1 ($p < 0,05$). Aux regards de ces résultats, nous pouvons cependant émettre quelques réserves quant à la significativité biologique des différences observées. Les cinétiques d'expression génique ne diffèrent pas entre les animaux contaminés et non contaminés par l'UA pour CYP3A1 et CYP2C11. Par ailleurs, en analysant les données temps par temps, la contamination par l'UA n'induit aucune différence d'expression génique des enzymes analysées chez les animaux traités au paracétamol.

Indépendamment de la contamination par l'uranium, et en comparaison avec les animaux non traités (T0), une augmentation de l'expression génique est observée pour l'ensemble des enzymes de phase I comme nous l'avons mentionné pour les enzymes de phase II. L'induction maximale est observée pour le CYP2E1, 2 heures après le traitement (environ $\times 11$; $p < 0,001$ pour les animaux contaminés ou non par l'UA). Le pic d'induction de CYP2C11 est également observée 2 heures après le traitement (environ $\times 5$; $p < 0,001$ pour les animaux contaminés ou non par l'UA). Dans le cas des CYP3A, l'induction maximale est obtenue dès 30 minutes (environ $\times 4$; $p < 0,001$ pour les animaux contaminés ou non par l'UA).

Les enzymes de phase I ne sont que minoritairement impliquées dans le métabolisme du paracétamol lorsqu'il est administré à une dose non hépatotoxique. Par ailleurs, le CYP2E1 a pendant longtemps été considéré comme l'enzyme responsable de l'hépatotoxicité du paracétamol (Lee et al. 1996). Quelques études ont en effet montré l'importance de CYP2E1 dans l'hépatotoxicité du paracétamol induite par l'éthanol (Zimmerman and Maddrey 1995) ou dans d'autres conditions d'induction (Burk et al. 1990) ou d'inhibition enzymatique (Hu et al. 1996; Lin et al. 1996).

Résultats

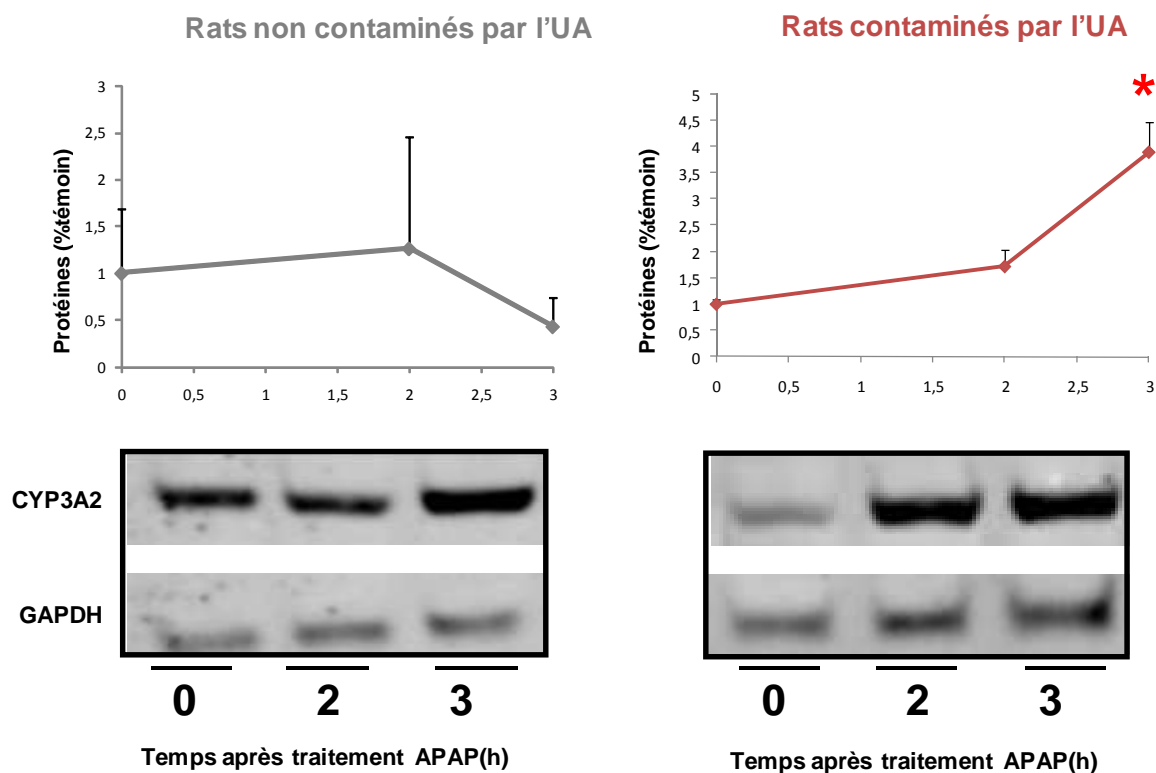


Figure 42: Profil de l'expression protéique de CYP3A2 dans le foie

Les animaux ont été contaminés ou non par l'uranium appauvri durant 9 mois. Ils ont ensuite été traités au paracétamol (APAP) puis ils ont été sacrifiés 2 et 3 heures après le traitement médicamenteux. Le point T0 correspond aux animaux ayant été traités par le véhicule. Le taux de protéine a été quantifié par Western-blot ($n=6$ pour tous les groupes d'animaux). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression protéique de la GAPDH. Chaque point correspond à la moyenne des valeurs \pm S.E.M. La représentation d'une différence significative entre rats contaminés et rats non contaminés par l'UA pour chaque temps est * si $p < 0,05$. L'analyse statistique a été menée via le test t de Student.

Résultats

Cependant, depuis peu, il a été montré que les CYP3A jouent également un rôle dans l'apparition de l'hépatotoxicité (Cheng et al. 2009; Kostrubsky et al. 1997; Laine et al. 2009; Sinclair et al. 1998; Wolf et al. 2007). Une relation entre l'induction génique des CYPs et l'apparition de la toxicité pourrait ainsi être suggérée. Bien que dans notre étude expérimentale, la dose administrée ne soit pas hépatotoxique, une augmentation de l'expression génique de CYP3A et CYP2E1 est néanmoins observée tout comme cela a été observé en condition de traitement hépatotoxique. Ainsi, 2 heures après un traitement au paracétamol (400 mg/kg ; IP), une augmentation du taux d'ARNm de CYP3A2, CYP2C11, CYP2E1 est également notée (Gueguen et al. 2007).

Expression protéique

L'induction génique précoce de CYP3A1 et CYP3A2 est associée, dans nos conditions expérimentales de contamination par l'uranium, à une augmentation du taux protéique de CYP3A2 chez les animaux contaminés par rapport aux animaux non contaminés par l'UA (x_4 ; $p < 0,05$) (Figure 41). Afin de compléter ce résultat, une analyse de la cinétique du taux protéique a été réalisée (Figure 42). Cette analyse nous permet de conclure qu'en plus de la différence entre les animaux contaminés ou non par l'UA, le taux protéique augmente au cours du temps après le traitement. On note en effet une augmentation de 4 fois ($p < 0,05$) entre les animaux contaminés par l'UA et sacrifiés 3 heures après le traitement et ceux non traités (T0).

Alors qu'une augmentation du taux protéique de CYP3A et de CYP2E1 a été décrite dans le cadre d'un traitement hépatotoxique de paracétamol (500 mg/kg ; IP) (Kim et al. 2007), nos résultats sont les premiers à souligner une augmentation du taux protéique de CYP3A2 dans le cadre d'un traitement à une dose aussi faible de paracétamol (50 mg/kg). Cette augmentation est néanmoins dépendante de l'exposition à l'UA. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans des études précédentes qui montraient que l'expression de CYP3A était modifiée suite à une contamination par l'UA. En effet, une administration néphrotoxique d'UA induit des différences de l'expression génique de CYP3A1 ainsi que de l'activité totale des CYP3A au niveau hépatique, entre les animaux contaminés ou non, 24 heures après l'administration sous-cutanée d'uranium appauvri à dose néphrotoxique (11,5 mg/kg) (Gueguen et al. 2006a).

Résultats

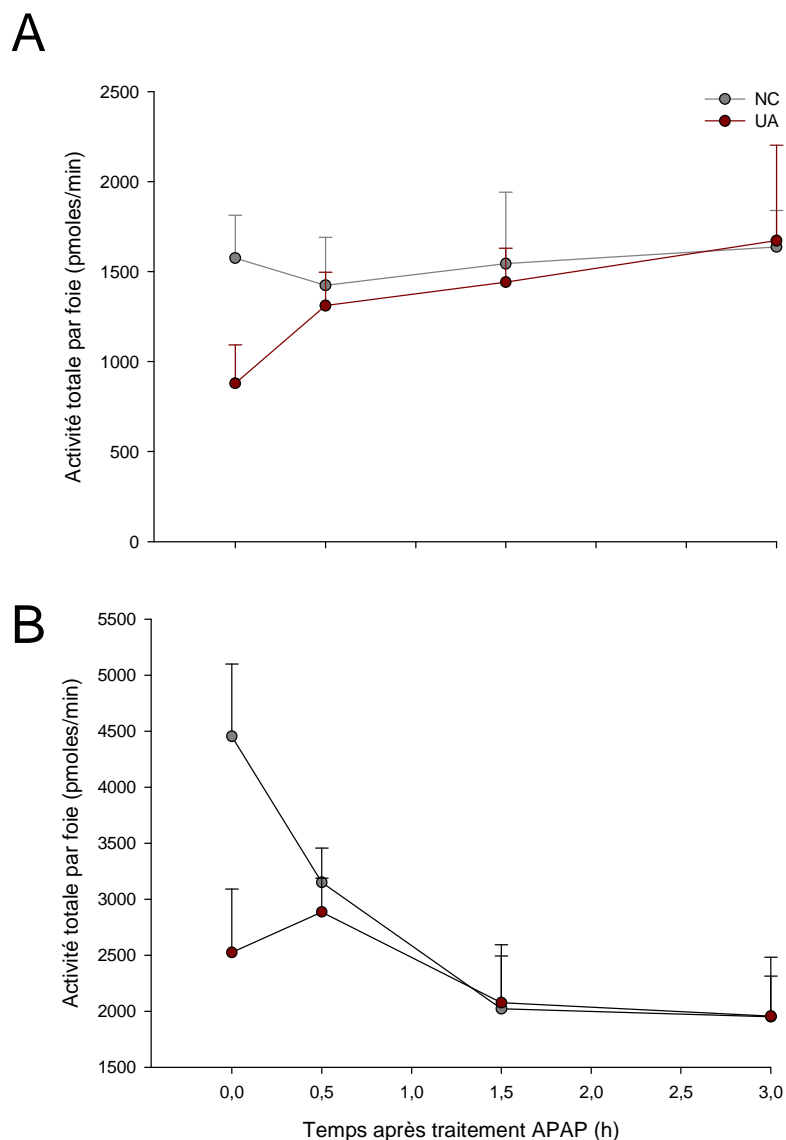


Figure 43 : Dosage de l'activité de la testostérone hydroxylase dans les microsomes hépatiques

Les animaux ont été contaminés (UA) ou non (NC) à l'uranium appauvri durant 9 mois. Ils ont ensuite été traités au paracétamol (APAP) puis ils ont été sacrifiés 0,5, 1, 1,5, 2 et 3h après le traitement médicamenteux (n=8 pour chaque groupe). Le point à 0h correspond aux animaux qui n'ont pas reçu de paracétamol. Ce graphe représente au dosage des métabolites de la testostérone dans le lot de rats contaminés par l'uranium (UA) et le lot de rats non contaminés (NC). L'un des métabolites formés par l'hydroxylation de la testostérone est le 6 β -hydroxytestostérone ; il est représentatif de l'activité des CYP3A (A). Un second métabolite est le 6 α -hydroxytestostérone ; il est représentatif de l'activité des CYP2C (B). Chaque point correspond à une moyenne \pm S.E.M. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

Résultats

Une exposition chronique et non néphrotoxique d'UA induit également des différences d'expression génique de CYP3A1 et CYP3A2 (1 mg/rat/jour) et ce dans différents tissus (cortex, foie, reins et poumons) (Souidi et al. 2005). Pour la première fois, dans cette étude, nous montrons qu'une contamination chronique non néphrotoxique suivi d'un traitement non hépatotoxique d'APAP induit une augmentation du taux protéique chez les animaux contaminés par l'uranium, 3 heures après un traitement au paracétamol, par rapport aux animaux non contaminés et traités à l'APAP mais également par rapport aux animaux contaminés par l'UA mais non traités à l'APAP.

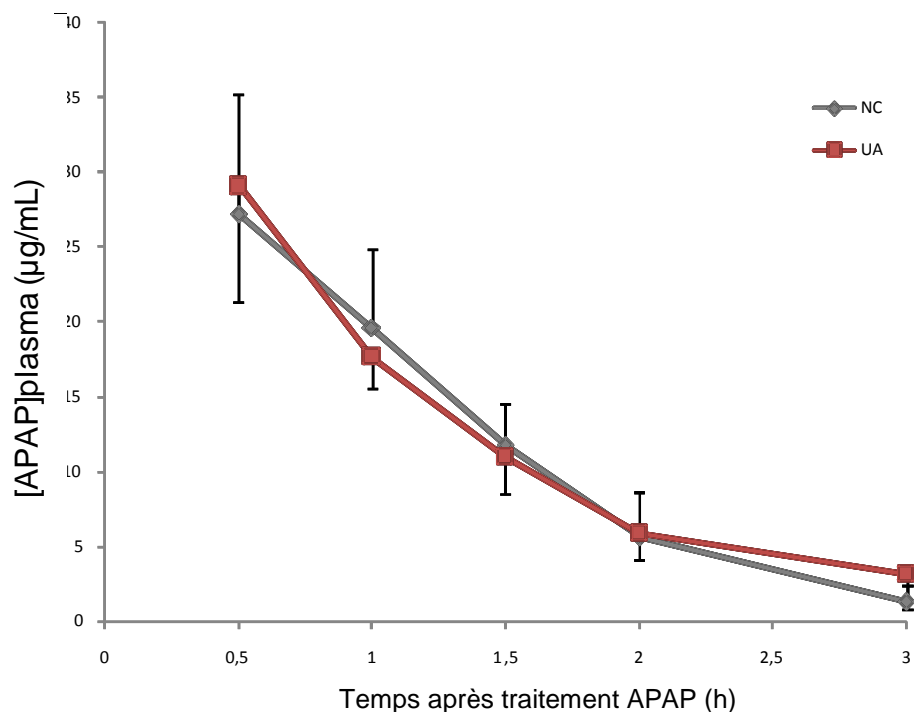
Concernant CYP2E1, le taux protéique n'augmente pas de manière significative chez les animaux traités au paracétamol. Néanmoins, compte tenu des résultats décrits par l'équipe de Kim relatifs à l'induction du taux protéique de CYP2E1 suite à une exposition au paracétamol (Kim et al. 2007) et en considérant le pic d'expression génique de CYP2E1 qui est plus tardif que celui de CYP3A2, nous pouvons penser que l'expression protéique de CYP2E1 débute sur un temps plus tardif que ceux étudiés dans notre schéma expérimental.

Activité CYP3A totale

Une étude de l'activité des principaux CYPs, utilisant la testostérone en tant que substrat a été entreprise. Aucune différence n'est observée entre les animaux contaminés ou non par l'uranium et entre les animaux traités ou non au paracétamol ni pour l'activité des CYP3A ni pour celle de CYP2C (Figure 43).

Dans une étude récente, Gueguen *et al.* montrent des différences dans l'activité des CYPs du fait de la contamination par l'uranium. Dans le cadre de cette précédente étude, les rats étaient traités avec une dose toxique de paracétamol (400 mg/kg, IP), ce qui induit une implication plus intense des CYPs dans le métabolisme du médicament (Gueguen et al. 2007). Par ailleurs et indépendamment de l'uranium, une seconde étude montre qu'une injection intrapéritonéale de paracétamol (500 mg/kg) induit une augmentation de l'activité de CYP3A et CYP2E1 (Kim et al. 2009). L'induction de l'activité du CYP3A4 par du paracétamol est également observée sur une lignée cellulaire hépatique (HepG2) (Feierman et al. 2002). Du fait de ces travaux, on peut se demander si l'impact de l'uranium sur les enzymes est plus marqué quand les enzymes sont pleinement activées par une dose hépatotoxique de paracétamol ou encore quand ce dernier est administré de manière répétée.

Résultats



	Rats non contaminés à l'UA	Rats contaminés à l'UA
AUC inf ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}$)	33,4	37,5
Tmax (h)	0,5	0,5
Cmax ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	26,2	28,2
T1/2 (h)	0,6	0,7

Figure 44 : Détermination de la concentration plasmatique du paracétamol

Les concentrations en paracétamol (APAP) ont été déterminées chez les rats contaminés par l'uranium (UA) et les rats non contaminés (NC). Les rats ont été sacrifiés 0,5, 1, 1,5, 2 et 3h après l'administration de paracétamol (n=8). Le dosage a été réalisé par HPLC. Chaque point correspond à la moyenne des valeurs obtenues \pm S.E.M. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

c. Dosage du paracétamol

Afin de conclure sur les conséquences des perturbations (géniques et protéiques) induites par l'exposition à l'uranium sur la pharmacocinétique globale du paracétamol, un dosage du paracétamol plasmatique a été réalisé par HPLC (Figure 44).

La cinétique plasmatique de l'APAP ne diffère pas, dans notre modèle expérimental, chez les rats contaminés et les rats non contaminés par l'UA. Ceci confirme que les quelques variations géniques et/ou protéiques observées ne suffisent pas à induire une modification de la pharmacocinétique du médicament administré. Précédemment, Gueguen *et al.* observaient un ralentissement de l'élimination du paracétamol chez les animaux contaminés par rapport aux animaux non contaminés (Gueguen *et al.* 2007). La dose utilisée en APAP était cependant plus élevée et hépatotoxique (400 mg/kg). une atteinte des tubules contournés proximaux était observée plus fréquemment chez les animaux contaminés. Il serait ainsi logique que l'atteinte rénale induise un ralentissement de l'élimination du médicament. *A contrario*, dans notre modèle, le rein et donc l'élimination rénale ne sont pas affectés. Ceci expliquerait l'absence de différence d'élimination de l'APAP dans nos conditions expérimentales de non-toxicité médicamenteuse.

Résultats

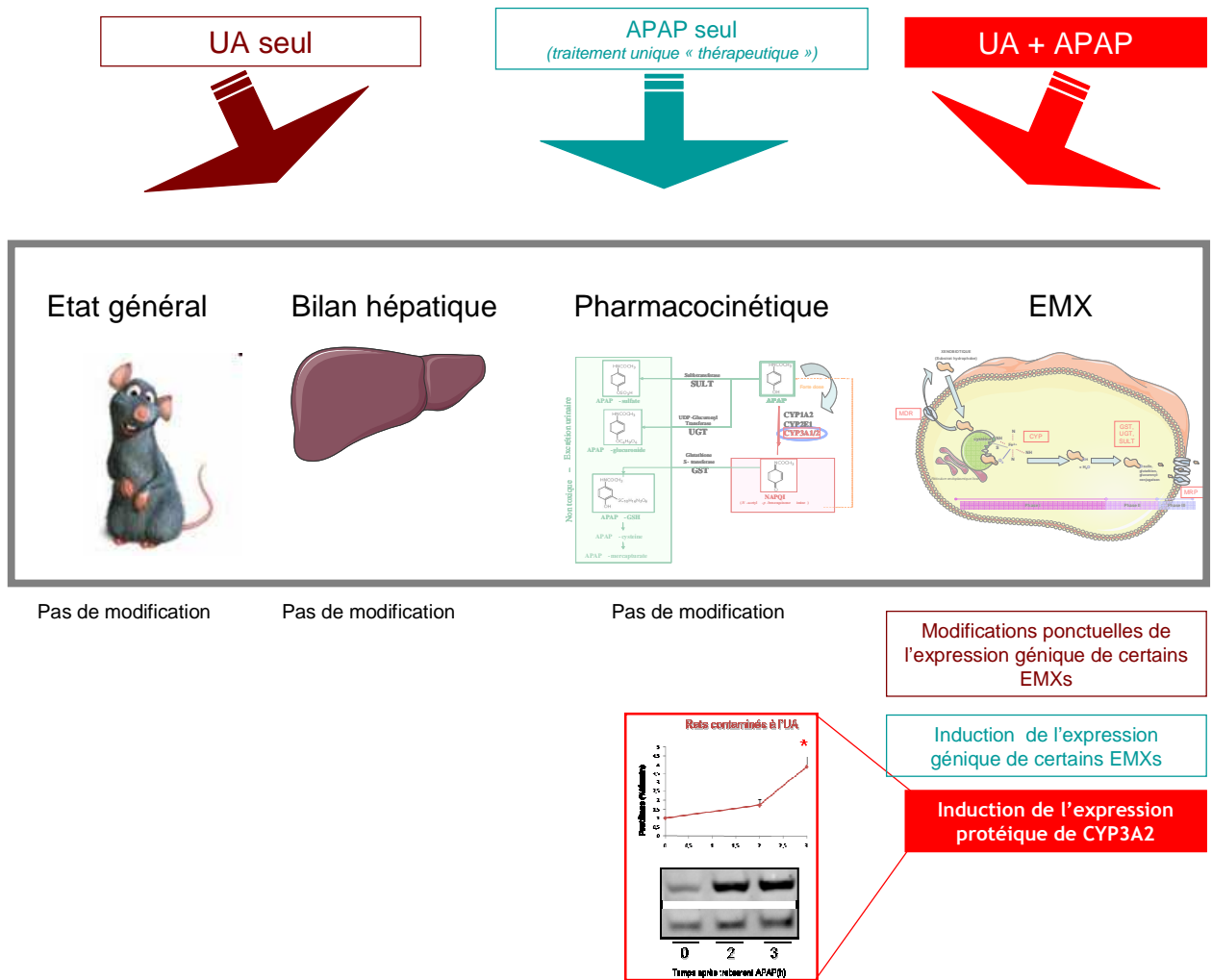


Figure 45 : Résumé des résultats obtenus lors du protocole « UA et traitement unique au paracétamol »

3. Résumé-Conclusion

La **figure 45** résume l'ensemble des résultats obtenus pour ce protocole expérimental.

En conclusion, cette étude montre qu'une contamination chronique à l'uranium induit de légères modifications d'expression génique et protéique au niveau du foie sans pour autant perturber les activités enzymatiques des EMXs ou la cinétique d'élimination de l'APAP plasmatique.

Les conditions expérimentales (contamination par l'UA non néphrotoxique, traitement au paracétamol non hépatotoxique) choisies ont très probablement eu une incidence sur les faibles modifications observées. Cependant, en considérant les résultats de cette étude et les résultats des études précédentes, nous confirmons que les EMXs (et particulièrement CYP3A2) sont des cibles potentielles de l'uranium.

Par ailleurs, cette étude nous a permis de mettre en évidence l'effet du paracétamol sur l'induction de l'expression génique de l'ensemble des acteurs impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques. Pour la première fois, la cinétique de cette induction a pu être déterminée.

Résultats

C Cas d'un traitement au paracétamol selon un schéma thérapeutique

1. Préambule

a. Contexte

Une exposition chronique (9 mois) à l'uranium appauvri (40 mg/L) induit des modifications de la pharmacocinétique et de la toxicité du paracétamol lorsque celui-ci est administré à une dose hépatotoxique (400 mg/kg). Dans le cas d'un traitement unique par une dose thérapeutique (50 mg/kg), la pharmacocinétique du paracétamol n'est pas modifiée mais des effets sur certains EMXs sont observés, notamment sur le taux protéique de CYP3A2.

b. Objectif

Le but de cette étude est d'estimer les effets d'une contamination par l'uranium sur la pharmacocinétique du paracétamol et les EMXs dans le cadre d'un traitement répété à des doses sub-toxiques de paracétamol.

c. Stratégie expérimentale

Dans le cadre de ce protocole, nous avons choisi deux doses de paracétamol proche du seuil d'hépatotoxicité chez le rat (100 et 200 mg/kg) avec un schéma d'administration bi-quotidienne par gavage. Entre les 2 gavages, un intervalle de 3 heures a été respecté dans le but de répéter l'administration au moment où le paracétamol est quasiment totalement éliminé. Ces doses ont été choisies suite à des mises au point que nous avons réalisées au laboratoire afin de déterminer les pharmacocinétiques précises dans le cas de traitement répété (résultats non montrés).

Après le dernier traitement, deux temps de sacrifice (2 et 4 heures) ont été choisis afin de pouvoir étudier la cinétique de métabolisation et d'élimination du paracétamol (Figure 19, p 105). Le T0 correspond aux animaux témoins traités par le véhicule d'administration du paracétamol (tragacanth suspendu dans du sérum physiologique). Une série d'analyse a alors été entreprise afin d'étudier l'état général de l'animal, le pharmacocinétique du paracétamol ainsi que les effets moléculaires liées à la co-exposition du paracétamol et de l'uranium.

Résultats

Tableau 15 : Analyse des paramètres physiologiques et plasmatiques des rats après contamination par l'uranium et traitement répété au paracétamol

Les animaux ont été contaminés (UA) ou non (NC) à l'uranium appauvri (40 mg/L) durant 9 mois. Ils ont alors été traités durant 4,5 jours par gavage bi-quotidien de paracétamol (APAP) (100 et 200 mg/kg). Le groupe T correspond aux animaux ayant reçu du tragacanth suspendu dans du sérum physiologique. Chaque groupe est composé de 8 animaux. Le plasma utilisé pour les dosages a été prélevé au moment du sacrifice de l'animal. La représentation d'une différence entre les animaux traités au paracétamol par rapport aux animaux non traités (T) est # si $p < 0,05$. La représentation d'une différence entre les animaux non contaminés et ceux contaminés par l'uranium est * si $p < 0,05$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

	Tragacanth (T)		APAP 100 mg/kg			
	NC	UA	NC		UA	
temps de sacrifice (h)			2	4	2	4
Poids corporel final (g)	639 ± 12	646 ± 31	597 ± 25	658 ± 24	613 ± 23	623 ± 16
Foie (g/ 100g PC)	3,04 ± 0,12	3,18 ± 0,10	3,65 ± 0,29	3,12 ± 0,10	3,17 ± 0,11	3,42 ± 0,08
Rein (g/ 100g PC)	0,56 ± 0,02	0,57 ± 0,014	0,64 ± 0,04	0,57 ± 0,02	0,59 ± 0,01	0,61 ± 0,01
Paramètres plasmatiques						
ALAT (U/L)	51,8 ± 5,7	57,1 ± 8,9	56,6 ± 4,3	59,5 ± 5,6	44,7 ± 3,1	54,9 ± 9,6
ASAT (U/L)	142,2 ± 16,5	108,1 ± 12,6	93,1 ± 4,5	108,1 ± 8,4	122,3 ± 18,2	155,8 ± 36,6
Alb (g/L)	30,2 ± 0,8	29,0 ± 0,6	29,75 ± 0,3	30,5 ± 0,5	26,6 ± 2,8	31,7 ± 0,9
Bilirubine totale (µM)	4,3 ± 0,6	4,2 ± 0,3	3,6 ± 0,4	3,9 ± 0,2	3,1 ± 0,3	4,8 ± 0,4
LDH (U/L)	1325 ± 253	1194 ± 248	775 ± 112	852 ± 108	1055 ± 291	2222 ± 551
PAL (U/L)	118,9 ± 12,7	110,3 ± 14,2	93,0 ± 8,0	96,8 ± 9,2	95,3 ± 9,4	112,9 ± 17,4
Trigly (mM)	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,3	2,5 ± 0,4	1,9 ± 0,2	1,5 ± 0,3	2,3 ± 0,5
Chol (mM)	3,5 ± 0,3	3,8 ± 0,4	3,1 ± 0,4	3,3 ± 0,3	2,8 ± 0,3	3,9 ± 0,7
Urée (mM)	5,6 ± 0,4	5,6 ± 0,3	5,1 ± 0,2	5,3 ± 0,3	5,6 ± 0,3	6,1 ± 0,4
Créat (µM)	54,1 ± 3,0	52,2 ± 1,3	53,2 ± 5,6	58,2 ± 5,5	58,8 ± 3,1	55,5 ± 3,0
Ca (mM)	2,48 ± 0,04	2,58 ± 0,06	2,50 ± 0,03	2,50 ± 0,06	2,29 ± 0,03 *#	2,43 ± 0,05
Cl (mM)	99,4 ± 0,8	98,3 ± 0,5	99,3 ± 1,0	99,3 ± 0,8	100,4 ± 0,8	99,2 ± 0,7
K (mM)	3,96 ± 0,08	3,95 ± 0,06	3,90 ± 0,08	3,95 ± 0,06	4,10 ± 0,18	4,23 ± 0,13
Na (mM)	138,9 ± 0,8	137,5 ± 0,4	137,8 ± 1,0	138,3 ± 0,6	139,0 ± 0,8	138,0 ± 0,8
Phosph (mM)	1,44 ± 0,03	1,27 ± 0,06	1,30 ± 0,04	1,46 ± 0,05	1,23 ± 0,08	1,48 ± 0,07
Protéine totale (g/L)	67,9 ± 2,0	63,8 ± 1,7	63,7 ± 1,0	65,3 ± 2,2	61,5 ± 0,9	67,2 ± 2,2

	APAP 200 mg/kg			
	NC		UA	
temps de sacrifice (h)	2	4	2	4
Poids corporel final (g)	641 ± 22	621 ± 19	555 ± 14	560 ± 20 #
Foie (g/ 100g PC)	3,34 ± 0,15	3,27 ± 0,10	3,46 ± 0,13	3,42 ± 0,13
Rein (g/ 100g PC)	0,59 ± 0,02	0,59 ± 0,02	0,63 ± 0,02	0,60 ± 0,1
Paramètres plasmatiques				
ALAT (U/L)	87,6 ± 24,5	68,7 ± 8,4	84,4 ± 13,6	65,6 ± 8,3
ASAT (U/L)	172,7 ± 47,2	141,5 ± 16,5	145,9 ± 24,7	131,0 ± 19,0
Alb (g/L)	29,5 ± 0,6	30,5 ± 0,7	30,9 ± 0,8	28,8 ± 0,7
Bilirubine totale (µM)	4,4 ± 0,5	3,7 ± 0,3	3,8 ± 0,2	4,8 ± 1,0
LDH (U/L)	1425 ± 461	1277 ± 416	1231 ± 147	1322 ± 184
PAL (U/L)	108,9 ± 11,1	105,6 ± 4,6	111,6 ± 11,5	109,0 ± 9,8
Trigly (mM)	1,7 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,3
Chol (mM)	4,1 ± 0,6	3,2 ± 0,4	2,8 ± 0,3	3,0 ± 0,3
Urée (mM)	5,5 ± 0,3	5,0 ± 0,4	5,5 ± 0,5	5,4 ± 0,4
Créat (µM)	53,8 ± 1,9	52,1 ± 1,9	55,6 ± 3,0	55,1 ± 2,2
Ca (mM)	2,50 ± 0,07	2,35 ± 0,04	2,43 ± 0,06	2,44 ± 0,04
Cl (mM)	99,1 ± 1,0	99,5 ± 1,1	100,4 ± 0,7	99,9 ± 1,0
K (mM)	3,92 ± 0,09	3,98 ± 0,09	3,94 ± 0,14	3,92 ± 0,13
Na (mM)	138,4 ± 0,9	137,7 ± 1,0	138,9 ± 0,8	138,6 ± 0,8
Phosph (mM)	1,41 ± 0,07	1,49 ± 0,07	1,41 ± 0,04	1,38 ± 0,08
Protéine totale (g/L)	64,5 ± 0,7	62,2 ± 1,5	66,0 ± 2,2	62,5 ± 2,1

2. Résultats / Discussion

a. Paramètres généraux de santé

■ Prise alimentaire, hydrique et prise de poids

La contamination par l'uranium n'a pas d'effet sur la consommation hydrique (30 mL/j/rat) ainsi que sur le gain de poids des animaux durant les 9 mois de contamination (résultats non montrés). Comme pour les autres protocoles expérimentaux, les animaux ont donc été exposés, *via* l'eau de boisson pour une exposition équivalente à environ 1 mg/rat/jour.

Concernant le traitement au paracétamol, une légère diminution du poids de l'animal est observée pour les animaux exposés à l'uranium et traités à la plus forte dose de paracétamol (-13%, $p < 0,05$) (Tableau 15). Néanmoins, aucune différence n'est constatée entre les animaux contaminés ou non par l'UA.

■ Bilan des paramètres plasmatiques

Globalement, les paramètres plasmatiques analysés ne sont modifiés ni par l'exposition à l'uranium ni par le traitement au paracétamol (Tableau 15). L'exposition à l'uranium n'induit donc pas de toxicité majeure au niveau du foie ou du rein chez des rats traités par des doses sub-toxiques de paracétamol.

b. Effets sur les enzymes du métabolisme des xénobiotiques hépatiques

■ Analyse des enzymes de phase II

Expression génique

La figure 46 représente l'analyse de l'expression génique des principales enzymes de la phase II du métabolisme des xénobiotiques.

Comme montré dans les résultats précédents (Figure 37, p167), ces analyses confirment que le paracétamol est à l'origine d'une induction enzymatique des EMX au niveau hépatique.

Résultats

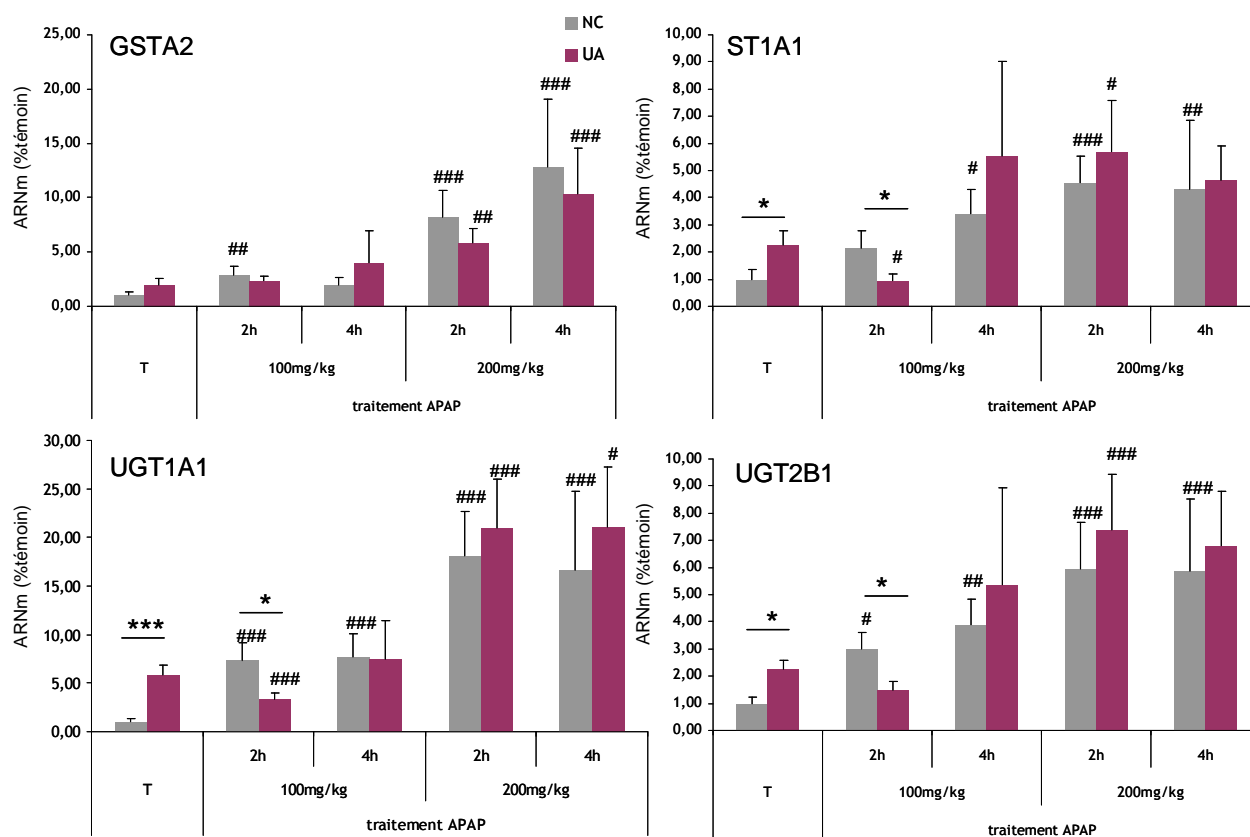


Figure 46 : Expression génique et protéique des principales enzymes de phase II

Les animaux ont été contaminés (UA) ou non (NC) à l'uranium appauvri (40 mg/L) durant 9 mois. Ils ont alors été traités durant 4,5 jours par gavage bi-quotidien de paracétamol (100 et 200 mg/kg). Le groupe T correspond aux animaux ayant reçu du tragacanth suspendu dans du sérum physiologique. Chaque groupe est composé de 8 animaux. Le taux d'ARNm des EMX a été quantifié par RT-PCR (n=8 pour tous les groupes d'animaux). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression du gène codant pour l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). La représentation d'une différence entre les animaux traités au paracétamol par rapport aux animaux non traités (T) est # si $p < 0,05$, ## si $p < 0,01$ et ### si $p < 0,001$. La représentation d'une différence entre les animaux non contaminés et ceux contaminés par l'uranium est * si $p < 0,05$ et *** si $p < 0,001$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

Résultats

La contamination par l'UA n'induit globalement pas de différence majeure dans l'induction génique des EMXs par le paracétamol dans nos conditions expérimentales, excepté au temps 2 heures après le traitement (100mg/kg). On note néanmoins, que pour certains gènes, l'uranium induit des modifications ponctuelles d'expression pour les animaux non traités au paracétamol mais traités par le véhicule d'administration, le tragacanth. Ainsi, l'expression génique de ST1A1, UGT1A1 et UGT2B1 est augmentée d'en moyenne 250% chez les animaux contaminés par rapport aux non contaminés par l'UA. Ce résultat n'est pas en accord avec une étude précédente qui ne montrait aucune modification de l'expression génique des enzymes de phase II en cas d'exposition chronique à l'UA (9 mois, 40 mg/L) (Gueguen et al. 2005). Cependant, dans la [figure 41](#), des variations d'expression génique de ST1A1 et UGT1A1 existent également pour les animaux non traités au paracétamol. Une partie de la discussion générale sera consacrée à cet aspect.

Expression protéique

Compte tenu des résultats de l'expression génique des enzymes de phase II, une analyse du taux protéique de GST a été menée pour les animaux contaminés ou non par l'UA et traités ou non par du paracétamol (200 mg/kg). Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la protéine GST car son expression génique est l'une des plus fortement induite par le paracétamol mais également car outre son rôle dans le métabolisme des xénobiotiques, elle est également un indicateur de la toxicité organique. Comme le montre la [figure 47](#), le taux protéique de GSTA ne varie ni du fait de la contamination par l'uranium, ni de celui du traitement au paracétamol.

Activité des enzymes de phase II

Afin d'évaluer l'activité de certaines enzymes de phase II, le dosage des métabolites majeurs glucuronide et sulfate ont été réalisés ([Figure 48](#)). Le métabolite glucuronide du paracétamol est présent dans le plasma proportionnellement au paracétamol administré. Son élimination est quasiment totale 4 heures après le traitement pour les rats ayant reçu 100 mg/kg et partielle pour ceux ayant reçu 200 mg/kg. Aucune différence n'est observée du fait de la contamination par l'uranium.

Résultats

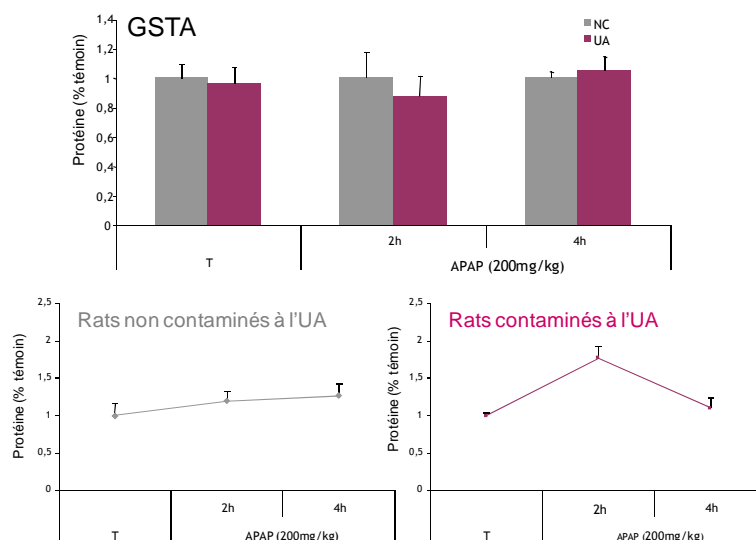


Figure 47 : Expression protéique de GSTA dans le foie

Les animaux ont été contaminés ou non par l'uranium appauvri durant 9 mois. Ils ont alors été traités durant 4,5 jours par gavage bi-quotidien de paracétamol (200 mg/kg). Le groupe T correspond aux animaux ayant reçu du tragacanth suspendu dans du sérum physiologique. Le taux de protéine a été quantifié par Western-blot ($n=6$ pour tous les groupes d'animaux). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression protéique de la GAPDH. Chaque point correspond à la moyenne des valeurs \pm S.E.M. La figure du haut représente les analyses temps par temps pour les animaux contaminés et non contaminés. La figure du bas représente les cinétiques d'expression de GSTA2 soit pour les animaux contaminés soit pour les non contaminés par l'UA. L'analyse statistique a été menée via un test t de Student.

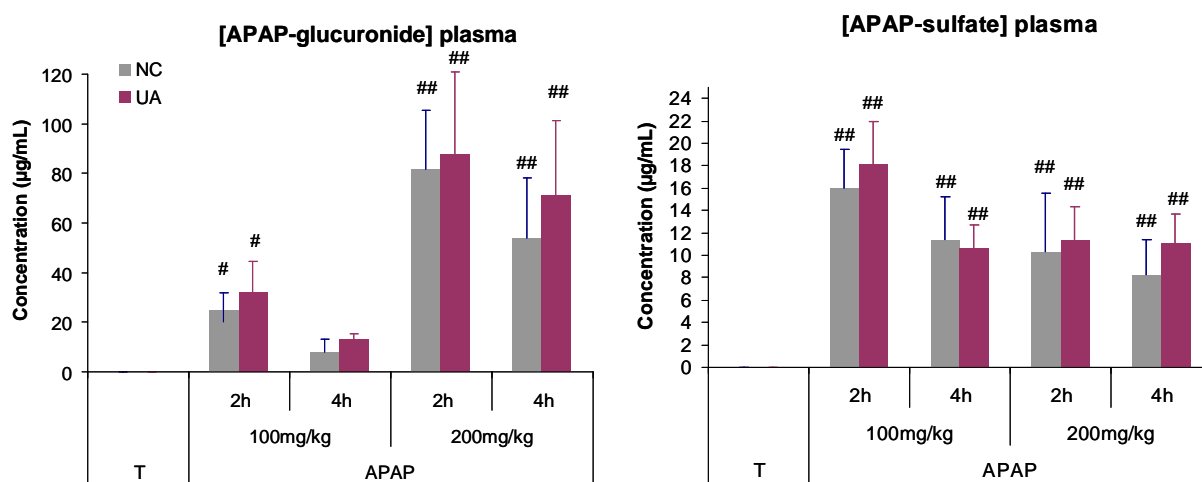


Figure 48 : Dosage des concentrations plasmatiques des métabolites majeurs du paracétamol

Les concentrations des métabolites majeurs du paracétamol (APAP-Gluc et APAP-Sulf) ont été déterminées chez les rats contaminés par l'uranium (UA) et les rats non contaminés (NC). Les rats ($n=8$) ont été sacrifiés 2 et 4h après l'administration de paracétamol (100 et 200 mg/kg). Le dosage a été réalisé par HPLC. Chaque point correspond à la moyenne des valeurs obtenues \pm S.E.M. La représentation d'une différence entre les animaux traités au paracétamol par rapport aux animaux non traités (T) est # si $p<0,05$, ## si $p<0,01$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

Résultats

Concernant le métabolite sulfate, sa synthèse et son élimination ne sont pas dépendantes du temps et de la dose de paracétamol administré contrairement à ce que nous avons observées dans le cadre d'un traitement unique (Figure 38). Par ailleurs, sa concentration plasmatique est bien inférieure à celle décrite dans la figure citée ci-dessus alors que les doses administrées sont supérieures. Ceci suggère une différence de métabolisation et d'élimination du métabolite sulfate du paracétamol en fonction de la durée du traitement et du nombre d'administration. En effet, une diminution du métabolite sulfate a précédemment été décrite dans le cas de deux traitement consécutifs de paracétamol (500 mg/kg) avec un intervalle d'administration de 18 heures (Kim et al. 2009). Comme le rappellent auteurs, la sulfation est une réaction catalysée par les sulfotransférases qui transfèrent les groupements sulfates du donneur PAPS à un métabolite récepteur. La sulfation, est une réaction de haute affinité mais facilement saturable. En effet, PAPS est décrit comme diminuant rapidement en cas de traitement des rats par une doses modérée de paracétamol (Kim et al. 1992; Liu and Klaassen 1996). De ce fait, la diminution du métabolite sulfate dans le plasma est vraisemblablement liée à une diminution du PAPS disponible à la réaction de sulfation.

■ Analyse des enzymes de phase I

Expression génique

La figure 49 représente l'analyse de l'expression génique des principales enzymes de la phase I du métabolisme des xénobiotiques.

Comme mentionné pour l'interprétation des enzymes de phase II et comme montré dans les résultats précédents (Figure 41, p175), ces analyses confirment que le paracétamol est à l'origine d'une induction enzymatique des EMXs. Cette induction génique est dépendante du temps et de la dose.

Concernant la contamination par l'UA, elle est responsable d'une augmentation de l'expression génique de certaines EMXs dont CYP3A1 (x2, $p < 0,05$) et CYP3A2 (x3, $p < 0,01$) pour les animaux non traités au paracétamol (T). *A contrario*, elle est responsable d'une diminution de l'expression génique de CYP3A1 chez les animaux traités par 100 mg/kg de paracétamol et sacrifiés 2 heures après (-66%, $p < 0,05$). Pour l'expression de CYP3A2, la contamination par l'uranium induit une diminution de son expression 2 heures après traitement à 100 mg/kg de paracétamol et une augmentation (+250%, $p < 0,05$) 4 heures après le traitement.

Résultats

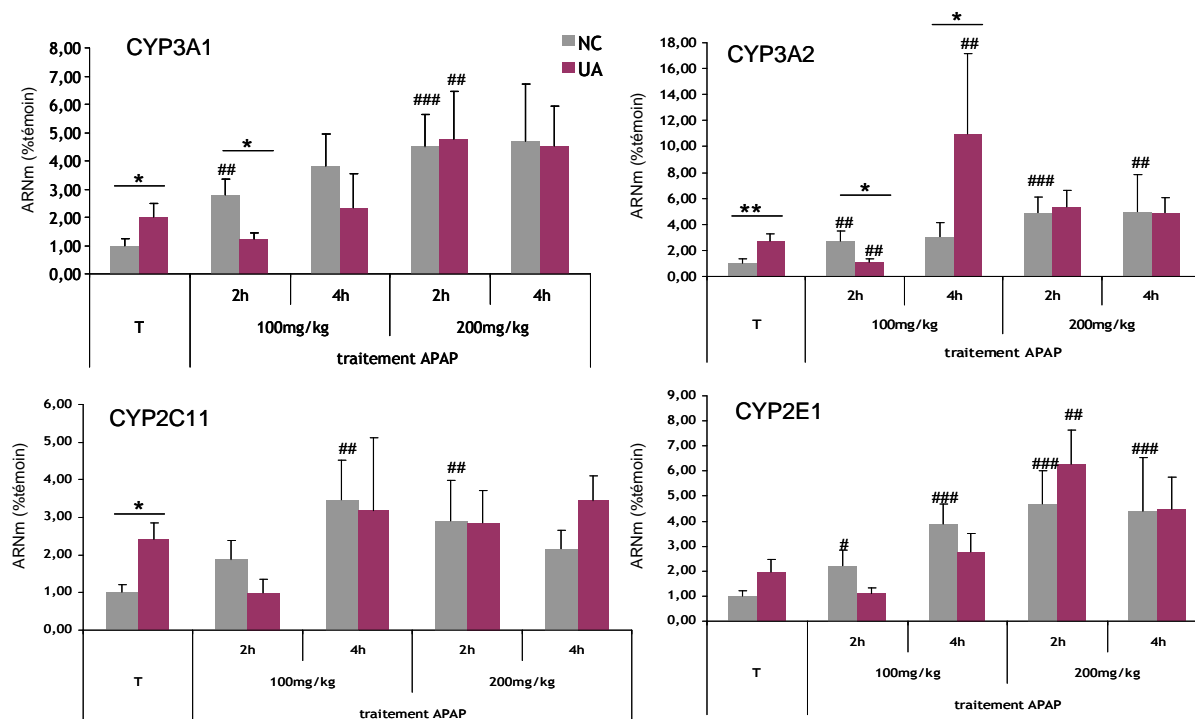


Figure 49 : Expression génique des principales enzymes de phase I

Les animaux ont été contaminés (UA) ou non (NC) à l'uranium appauvri (40 mg/L) durant 9 mois. Ils ont alors été traités durant 4,5 jours par gavage bi-quotidien de paracétamol (100 et 200 mg/kg). Le groupe T correspond aux animaux ayant reçu du tragacanth suspendu dans du sérum physiologique. Chaque groupe est composé de 8 animaux. Le taux d'ARNm des EMX a été quantifié par RT-PCR (n=8 pour tous les groupes d'animaux). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression du gène codant pour l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). La représentation d'une différence entre les animaux traités au paracétamol par rapport aux animaux non traités (T) est # si $p < 0,05$, ## si $p < 0,01$ et ### si $p < 0,001$. La représentation d'une différence entre les animaux non contaminés et ceux contaminés par l'uranium est * si $p < 0,05$ et ** si $p < 0,01$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

Expression protéique

Compte tenu des résultats décrits ci-dessus et de ceux décrits dans les figures 41 et 42, l'analyse du taux protéique de CYP3A2 pour les animaux traités par 200 mg/kg de paracétamol (Figure 50) a été entreprise.

Une diminution du taux protéique de CYP3A2 est observée chez les animaux non contaminés par l'uranium, 2 heures et 4 heures après leur traitement au paracétamol (200 mg/kg). Aucune différence n'est néanmoins constatée entre les animaux contaminés ou non par l'uranium. En considérant les résultats décrits dans le cadre d'un traitement unique à une dose non hépatotoxique de paracétamol, ce résultat montre que l'effet de l'uranium observé après traitement par 50 mg/kg n'est pas retrouvé en cas de traitement par 200 mg/kg. Il serait donc intéressant de mener l'analyse du taux protéique sur les rats traités à 100 mg/kg. Ceci nous permettrait en effet de savoir si l'UA induit des modifications du taux protéique de CYP3A2 uniquement lorsque le paracétamol est administré à une faible dose.

■ Analyse des transporteurs de la phase III

L'étude de MDR1 et MRP2 met en évidence une augmentation de leur expression génique dépendante de la dose de paracétamol administré et du temps de sacrifice. Une augmentation de l'expression génique de MDR1 est observée chez les animaux non traités au paracétamol mais aucune perturbation de l'expression génique liée à la contamination par l'uranium n'est observée pour les animaux traités au paracétamol (données non montrées).

c. Dosage du paracétamol

Afin de conclure sur la pharmacocinétique globale du paracétamol et sur les conséquences d'une exposition à l'uranium sur son élimination, son dosage a été réalisé dans le plasma.

La cinétique d'élimination de l'APAP dans notre modèle ne diffère pas entre les animaux contaminés ou non par l'uranium et ce quelque soit la dose de paracétamol administré (Figure 51). Il n'y a donc pas de modification de la pharmacocinétique du paracétamol lorsque le médicament est administré à une dose non hépatotoxique.

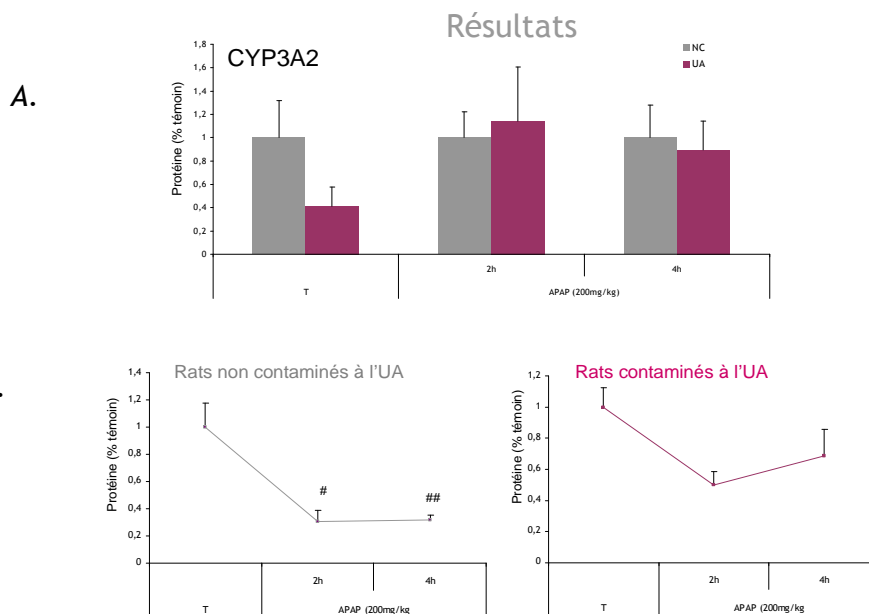


Figure 50 : Analyse de l'expression protéique de CYP3A2 dans le foie

Les animaux ont été contaminés ou non par l'uranium appauvri durant 9 mois. Ils ont alors été traités durant 4.5 jours par gavage bi-quotidien de paracétamol (200 mg/kg). Le groupe T correspond aux animaux ayant reçu du tragacanth suspendu dans du sérum physiologique. Le taux de protéine a été quantifié par Western-blot (n=6 pour tous les groupes d'animaux). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression protéique de la GAPDH. Chaque point correspond à la moyenne des valeurs +/- S.E.M. La figure A représente les analyses temps par temps pour les animaux contaminés et non contaminés. La figure B représente les cinétiques d'expression de CYP3A2 soit pour les animaux contaminés soit pour les non contaminés par l'UA. La représentation d'une différence entre les animaux traités au paracétamol par rapport aux animaux non traités (T) est # si $p < 0,05$, ## si $p < 0,01$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

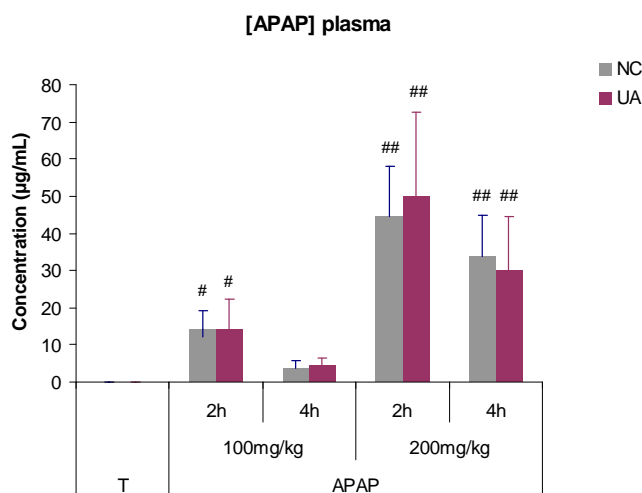


Figure 51 : Dosage de la concentration plasmatique du paracétamol

Les concentrations en paracétamol (APAP) ont été déterminées chez les rats contaminés par l'uranium (UA) et les rats non contaminés (NC). Les rats (n=8) ont été sacrifiés 2 et 4h après l'administration de paracétamol (100 et 200 mg/kg). Le dosage a été réalisé par HPLC. Chaque point correspond à la moyenne des valeurs obtenues ± S.E.M. La représentation d'une différence entre les animaux traités au paracétamol par rapport aux animaux non traités (T) est # si $p < 0,05$, ## si $p < 0,01$. L'analyse statistique a été menée via le test Two Way Anova.

Résultats

Résultats

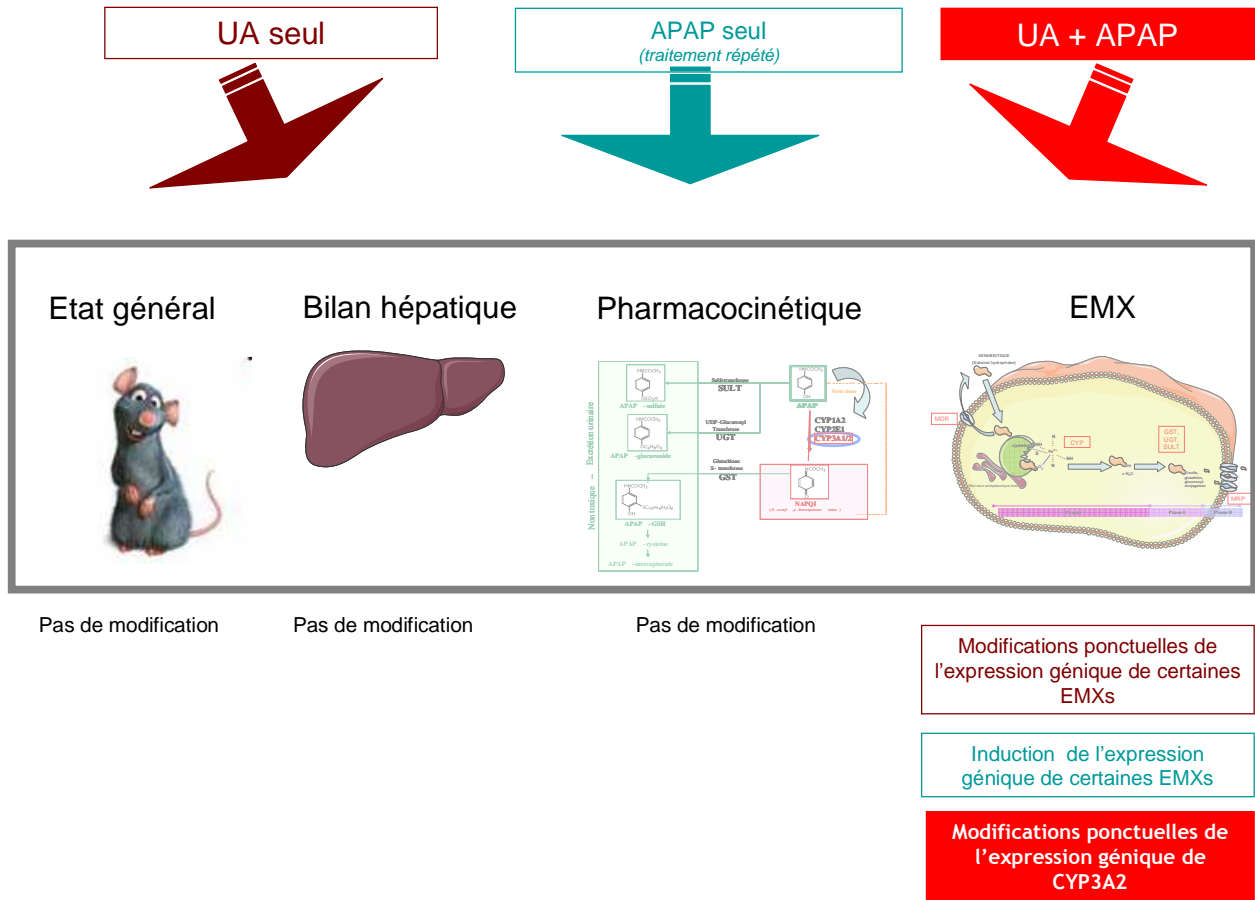


Figure 52 : Résumé des résultats obtenus lors du protocole « UA et traitement répété de paracétamol »

3. Résumé-Conclusion

La [figure 52](#) résume l'ensemble des résultats obtenus pour ce protocole expérimental.

Le but de cette étude était d'étudier l'effet de l'uranium sur les EMXs et sur la pharmacocinétique du paracétamol administré à deux concentrations subtoxiques, proches du seuil d'hépatotoxicité.

En conclusion, l'ensemble des résultats montre qu'une contamination chronique à l'uranium induit des modifications de l'expression génique de certaines EMXs pour les animaux non traités au paracétamol. Pour les rats traités par 100 ou 200 mg/kg de paracétamol, les effets de l'uranium sont rares. Néanmoins une modification de l'expression du gène de CYP3A2 est observée.

Quelque soit la concentration de paracétamol à laquelle les rats sont traités, la contamination par l'uranium n'affecte pas sa pharmacocinétique et n'induit aucun signe de toxicité hépatique.

Cette étude nous a par ailleurs permis, de confirmer que le paracétamol induit l'expression génique des principales EMXs étudiées impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques.

Résultats

Effet de l'uranium *in vitro* : sur hépatocytes et cellules rénales en culture

***Distribution of soluble uranium in the nuclear cell compartment
at subtoxic concentration***

C. Rouas, H. Bensoussan, D. Suhard, C. Tessier, L. Grandcolas, F. Rebière, I. Dublineau, M. Taouis, M. Pallardy et Y. Gueguen

En révision Chemical Research in Toxicology

[Voir annexe I e](#)

Résultats

A Introduction

Comme cela a été préalablement démontré, l'expression génique des enzymes du métabolisme des xénobiotiques est susceptible de varier dans le foie et le rein des animaux contaminés selon notre protocole expérimental (9 mois de contamination *via* l'eau de boisson à 40 mg/L). Bien que ces variations soient mesurées, elles sont corrélées à une potentialisation de la toxicité du paracétamol lorsque celui-ci est administré à une dose toxique (Gueguen et al. 2007). Par ailleurs, dans l'ensemble de nos modèles expérimentaux, une de ces EMXs s'est révélée particulièrement sensible à la contamination par l'uranium. Bien que les variations de son expression génique et/ou protéique aient pu rester sans conséquence pathologique à l'échelle de l'organisme, la CYP3A et particulièrement l'isoforme 3A2 semble être une cible privilégiée de l'uranium (Rouas et al. 2009; Souidi et al. 2005).

Le premier objectif de ces études *in vitro* est d'estimer l'impact direct de l'uranium sur des cellules hépatiques, notamment sur l'induction de l'expression de la CYP3A2.

A l'heure actuelle, la plupart des études menées *in vitro* se sont intéressées à l'effet cytotoxique de l'uranium (Carriere et al. 2004; Milgram et al. 2008; Mirto et al. 1999; Thiebault et al. 2007). A notre connaissance, seule une étude a évalué les effets de l'uranium sur l'induction génique de certaines EMXs à l'échelle cellulaire et cette étude ne recense que peu d'acteurs du métabolisme des xénobiotiques (Miller et al. 2004).

Afin de répondre à cette problématique, différents modèles cellulaires hépatiques ont été choisis. Il nous a paru incontournable de mener nos études sur la lignée cellulaire HepG2 (lignée d'hépatomes humains) qui reste le modèle de référence des études sur les lignées cellulaires hépatiques humaines. Ce modèle possède néanmoins des limites d'utilisation puisque l'inductibilité des EMXs y est modérée. Ainsi, nous avons également opté pour un modèle d'hépatocytes humains primaires. Enfin, des études ont également été réalisées sur des microsomes de foie de rat dans le but de préciser notre réponse et d'avoir un modèle *in vitro* en corrélation avec nos résultats *in vivo*.

Résultats

Par ailleurs, une des problématiques de notre approche *in vivo* consistait à évaluer les effets d'une co-exposition à l'UA et à un agent néphrotoxique. Cette étude n'a pas mis en évidence de potentialisation de la néphrotoxicité induite par la gentamicine du fait de la pré-exposition à l'uranium. Néanmoins, le rein est défini comme une cible majeure de la toxicité de l'uranium notamment du fait de son accumulation dans le TCP.

Dans ce contexte, une seconde approche *in vitro* a été entreprise dans le but de mieux comprendre les mécanismes de cytotoxicité de l'uranium à l'échelle des cellules rénales en parallèle des études menées sur les hépatocytes. Cette approche a eu pour but d'étudier la localisation de l'uranium à l'échelle de la cellule dans un contexte d'exposition à des concentrations non cytotoxiques. Deux modèles cellulaires ont été choisis. Le premier est la lignée NRK-52e. Ces cellules ont été choisies parce qu'elles proviennent de rat mais également car elles ont déjà fait l'objet d'études de cytotoxicité pour l'uranium (Carriere et al. 2004; Thiebault et al. 2007). Elles sont également un outil de mise en relation de nos résultats obtenus *in vivo* avec ceux *in vitro*. Le second modèle choisi est la lignée cellulaire de rein humaine : HEK-293. Ces cellules ont également fait l'objet d'études d'exposition à l'uranium et plus particulièrement dans le cadre des régulations géniques qui en découlent (Prat et al. 2005).

Ainsi, les effets de l'uranium *in vitro* ont été abordés selon deux axes différents : le premier visant à estimer l'impact de l'exposition sur l'induction des EMXs (principalement au niveau des cellules hépatique) et le second visant à estimer la localisation de l'uranium à l'échelle cellulaire en vue de mieux comprendre les mécanismes de cytotoxicité.

B Effet de l'uranium sur la viabilité cellulaire : détermination d'une concentration subtoxique

1. Préambule

a. Objectif

Notre approche *in vitro* a pour finalité (i) l'étude de l'impact de l'uranium sur l'expression et l'activité des EMXs à l'échelle de la cellule et (ii) l'analyse de la localisation de l'uranium à l'échelle cellulaire. Cette approche a pour but de travailler à des concentrations non cytotoxiques afin de mimer le protocole *in vivo*. La première étude a donc pour objectif de déterminer le seuil de cytotoxicité de l'uranium sur nos modèles cellulaires.

Résultats

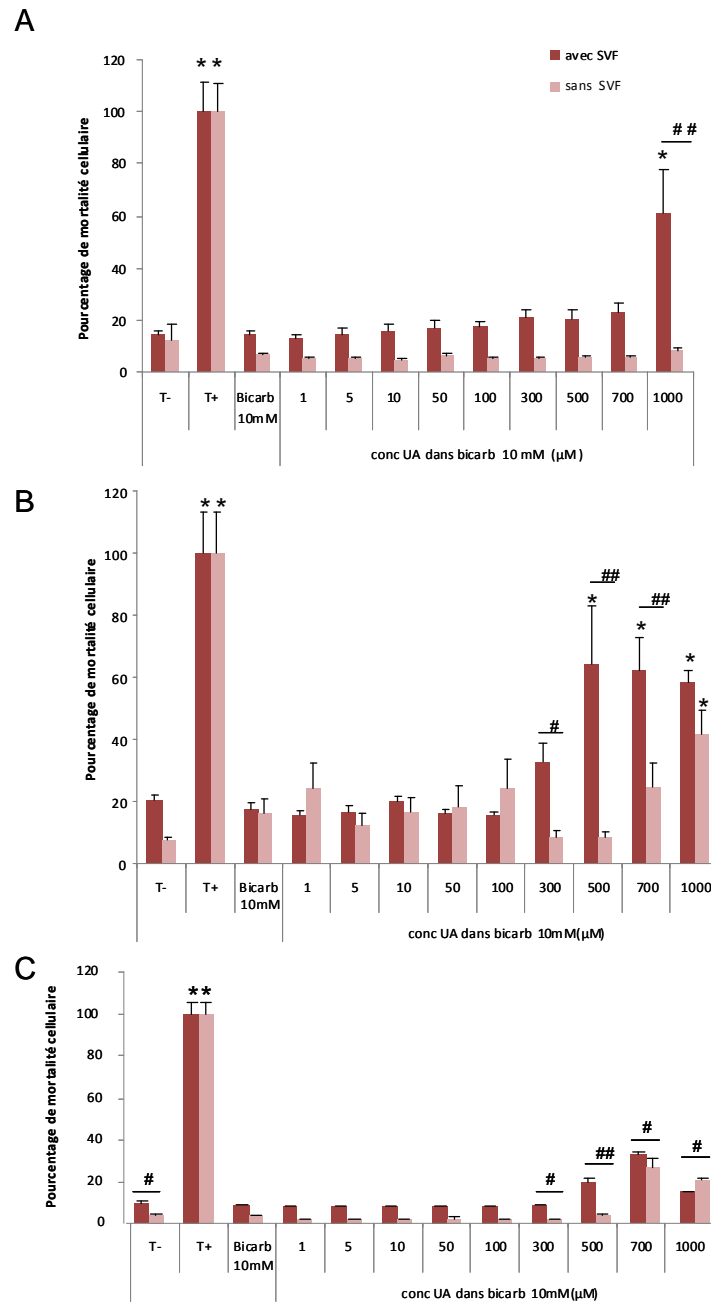


Figure 53 : Analyse de la mortalité cellulaire des cellules NRK-52e après incubation de 24, 48 et 72 h en présence de différentes concentrations de nitrate d'uranyle

Représentation de la mortalité cellulaire après 24 (A), 48 (B) et 72 (C) heures d'incubation avec différentes concentrations d'UA (n=4). La cytotoxicité a été évaluée via la mesure des protéases (test CytoTox-Glo). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM avec T-, les cellules en présence de leur milieu de culture ; T+, les cellules en présence d'un tampon de lyse ; Bicarb 10 mM, les cellules en présence de bicarbonate à 10 mM ; UA 1 μ M, les cellules en présence de 1 μ M d'UA etc. La représentation d'une différence significative avec le T- est * si $p < 0,001$. Celle représentative d'une différence entre les cellules cultivées avec ou sans SVF est # si $p < 0,05$ et ## si $p < 0,001$. Les analyses statistiques ont été menées par deux tests Two Way Anova successifs, le premier ayant comme paramètres de comparaison les conditions d'exposition à l'UA et le temps d'exposition et le second ayant les conditions d'exposition à l'UA et la présence ou non de SVF.

b. Stratégie expérimentale

Nous avons choisi trois lignées cellulaires différentes : les cellules rénales HEK-293 et NRK-52e afin d'estimer l'effet cytotoxique de l'UA sur des cellules d'origine rénale et de pouvoir comparer nos résultats avec ceux décrits dans la littérature ; les cellules HepG2 ont été choisies car elles sont un modèle incontournable de cellules hépatiques utilisées notamment dans les études de régulation des EMXs.

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés en présence et en absence de sérum de veau foetal. Le SVF apporte des nutriments et des facteurs de croissance nécessaires à la culture des cellules, mais sa composition précise est méconnue. Ainsi, lors d'expérimentations, notamment en cas d'étude de mécanisme d'induction, il est généralement ôté du milieu de culture afin de contrôler l'ensemble des paramètres de culture. En fonction des lignées cellulaires, deux types de test ont été utilisés : le test de dosage des protéases (test CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay) et le test de mesure du relargage de la LDH. Le test de dosage des protéases nécessite une mise en culture des cellules sur des plaques adaptées à la lecture au luminomètre. La croissance des cellules HepG2 étant très perturbée lors de la mise en culture sur ces plaques, nous avons opté pour un test LDH pour cette lignée cellulaire.

Lors de ces tests, 9 concentrations d'UA ont été choisies (de 1 à 1000 μM). Le témoin négatif (T-) correspond aux cellules dans leur condition de culture normale, le « Bicarb 10 mM » correspond aux cellules mises en contact avec la solution de solubilisation de l'UA (bicarbonate à 10 mM), le témoin positif (T+) correspond aux cellules exposées à un tampon de lyse. Les tests ont été réalisés après 24, 48 ou 72 heures d'incubation.

2. Résultats - discussion

a. Les cellules rénales

■ NRK-52e

La **figure 53** représente l'évolution du pourcentage de cytotoxicité des cellules NRK-52e en fonction de la concentration en UA, du temps d'exposition et de la déprivation ou non en SVF. Après 24 heures d'exposition, la mortalité cellulaire est faible (inférieure à 20%) dans la quasi-totalité des conditions d'exposition.

Résultats

Résultats

Elle augmente significativement (80%, $p < 0,001$) uniquement pour les cellules exposées à 1000 μM d'UA et cultivées avec SVF. Une différence significative est notée entre les conditions avec ou sans SVF pour les cellules exposées à 1000 μM d'UA ($p < 0,001$).

Après 48 heures d'exposition, la mortalité cellulaire augmente progressivement chez les cellules NRK-52E cultivées avec SVF dès 500 μM d'UA (65%, $p < 0,001$). Dans des conditions de culture sans SVF, la mortalité n'est statistiquement augmentée que pour les cellules traitées par 1000 μM d'UA. Des différences significatives entre les conditions de déprivation ou non en SVF sont observées dès 300 μM d'UA mais également à 500 et 700 μM .

Après 72 heures d'exposition, on note une absence de mortalité chez les cellules exposées à l'UA malgré des différences significatives entre les cellules déprivées ou non en SVF. Une hypothèse relative à l'absence de cytotoxicité chez les cellules exposées aux fortes concentrations d'UA est que le temps 72 heures se situe au delà du seuil temporel de l'induction de la mort des cellules. Le test utilisé pour quantifier la mortalité induite utilisant le dosage de l'activité des protéases, il est probable qu'à 72 heures, les protéases relarguées ne soient plus actives ou qu'il y ait eu une dégradation des protéases.

Dans des études menées sur NRK-52E, l'équipe de Carrière et al. met en évidence un index de cytotoxicité (IC50) après 24 heures d'exposition aux environs de 500 (Carriere et al. 2004) ou 600 μM (Carriere et al. 2005) en fonction du milieu de culture choisi. Cette équipe montre en effet qu'il existe de réelles variations de cytotoxicité en fonction de la composition du milieu de culture et que cela serait dépendant de la forme physico-chimique que prend l'uranium au sein de ce milieu. Dans des conditions de culture avec du DMEM, identiques à nos propres conditions de culture, Carrière montre une forte diminution de la cytotoxicité en comparaison avec celle induite dans un milieu de culture MEM (Carriere et al. 2004).

Par ailleurs, l'analyse statistique présentée dans ces résultats est une analyse globale prenant en compte les différents facteurs de variation d'exposition tels que la concentration d'UA, le temps d'exposition et la présence de SVF. Du fait de ces paramètres, il nous a paru plus adapté d'utiliser ce type d'analyse plutôt qu'un test de Student. Cette analyse menée *via* un Two Way Anova est une analyse robuste et fiable et dont le seuil de significativité est en dessous de celui d'un test de Student. Nous avons également réalisé une analyse temps par temps grâce à un test de Student et cette dernière met en évidence quelques différences supplémentaires.

Résultats

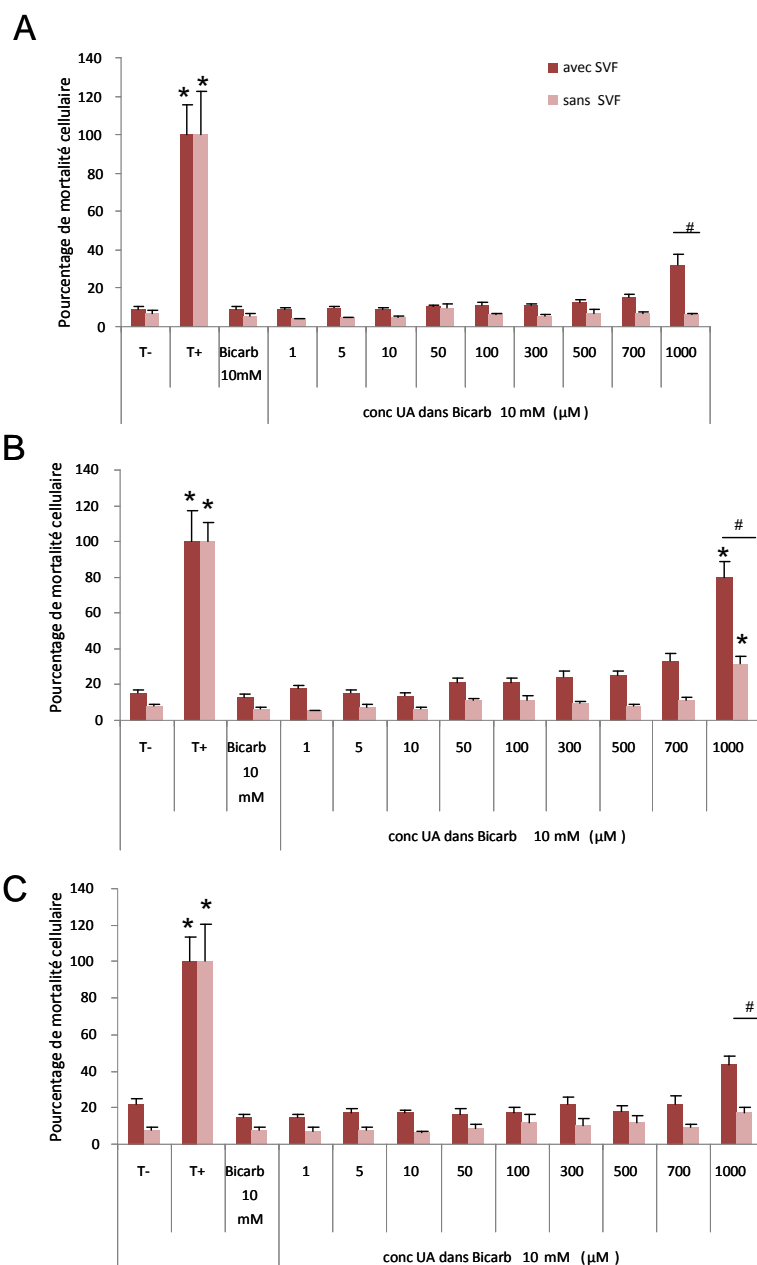


Figure 54 : Analyse de la mortalité cellulaire des cellules HEK-293 après incubation de 24, 48 et 72 h en présence de différentes concentrations de nitrate d'uranyle

Représentation de la mortalité cellulaire après 24 (A), 48 (B) et 72 (C) heures d'incubation avec différentes concentrations d'UA (n=4). La cytotoxicité a été évaluée via la mesure des protéases (test CytoTox-Glo). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM avec T-, les cellules en présence de leur milieu de culture ; T+, les cellules en présence d'un tampon de lyse ; Bicarb 10 mM, les cellules en présence de bicarbonate à 10 mM ; UA 1 μ M, les cellules en présence de 1 μ M d'UA etc. La représentation d'une différence significative avec le T- est * si $p < 0,001$. Celle représentative d'une différence entre les cellules cultivées avec ou sans SVF est # si $p < 0,05$. Les analyses statistiques ont été menées par deux tests Two Way Anova successifs, le premier ayant comme paramètres de comparaison les conditions d'exposition à l'UA et le temps d'exposition et le second ayant les conditions d'exposition à l'UA et la présence ou non de SVF.

Résultats

Nous notons par exemple, une augmentation de la cytotoxicité des cellules NRK-52E dès 300 μM dans des conditions de traitement avec SVF et après 24 heures d'exposition (résultats non montrés). La comparaison de ces deux types d'analyse n'induit pas de différence sur la détermination de l'IC50 mais fait varier l'interprétation du seuil de cytotoxicité.

■ HEK-293

La **figure 54** représente l'évolution du pourcentage de cytotoxicité des cellules HEK-293 en fonction de la concentration en UA, du temps d'exposition et de la déprivation ou non en SVF.

Après 24 heures d'exposition, la mortalité cellulaire est faible (inférieure à 20%) dans la quasi-totalité des conditions d'exposition. Elle augmente légèrement pour les cellules exposées à 1000 μM d'UA. Bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre la cytotoxicité des cellules à 1000 μM et celle des cellules T-, on note une différence significative entre la mortalité des cellules exposées à 1000 μM d'UA et cultivées en présence de SVF par rapport à celles déprivées de SVF (+450%, $p < 0,05$).

Après 48 heures d'exposition, la mortalité cellulaire augmente progressivement chez les cellules HEK-293 cultivées avec ou sans SVF. Dans les conditions d'exposition à 1000 μM d'UA, elle atteint 80% ($p < 0,001$) pour les cellules cultivées en présence de SVF et 50% ($p < 0,001$) pour celles qui en sont privées. La présence du SVF dans ces conditions induit donc une différence significative de mortalité ($p < 0,05$).

Après 72 heures d'exposition, on note une absence de mortalité significative chez les cellules exposées à l'UA malgré une différence significative entre les cellules déprivées ou non en SVF dans des conditions d'exposition à 1000 μM d'UA.

Peu d'études évaluent l'effet cytotoxique de l'UA sur cette lignée cellulaire. L'une d'entre elles estime que l'IC50 de cellules HEK-293 cultivées dans du milieu DMEM se situe aux environs de 500 μM (Prat et al. 2005).

Tout comme pour l'analyse de la mortalité cellulaire des cellules NRK-52E, le test statistique employé pour les cellules HEK-293 est un Two Way Anova. L'analyse par un test de Student a également été réalisée (résultats non montrés) et met en évidence quelques variations du seuil de cytotoxicité notamment pour les cellules exposées durant 48 heures en présence de SVF. La mortalité est en effet statistiquement augmentée dès une concentration de 300 μM d'UA. Ceci corrobore les données de la littérature suscitées.

Résultats

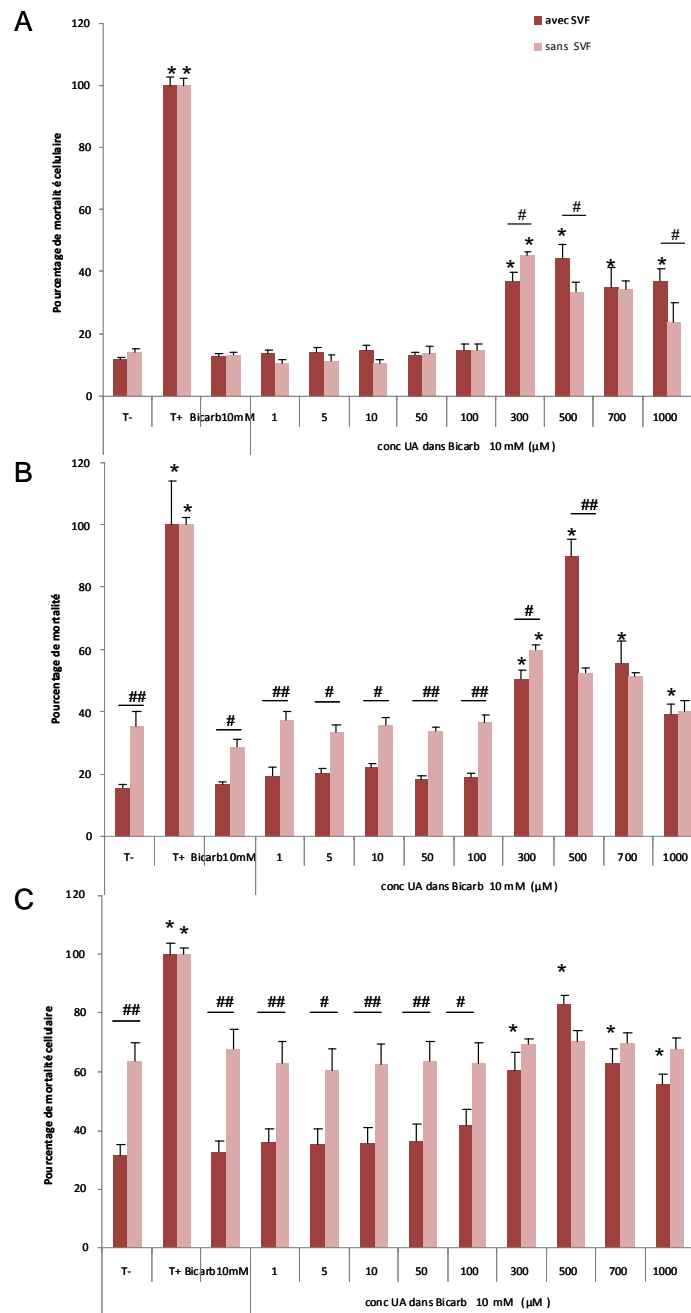


Figure 55 : Analyse de la mortalité cellulaire des cellules HepG2 après incubation de 24, 48 et 72 h en présence de différentes concentrations de nitrate d'uranyle.

Représentation de la mortalité cellulaire après 24 (A), 48 (B) et 72 (C) heures d'incubation avec différentes concentrations d'UA (n=4). La cytotoxicité a été évaluée via la mesure de la LDH relarguée. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM avec T -, les cellules en présence de leur milieu de culture ; T+ , les cellules en présence d'un tampon de lyse ; Bicarb 10 mM, les cellules en présence de bicarbonate à 10 mM ; UA 1 μ M, les cellules en présence de 1 μ M d'UA etc. La représentation d'une différence significative avec le T- est * si $p < 0,001$. Celle représentative d'une différence entre les cellules cultivées avec ou sans SVF est # si $p < 0,05$ et ## si $p < 0,001$. Les analyses statistiques ont été menées par deux tests Two Way Anova successifs, le premier ayant comme paramètres de comparaison les conditions d'exposition à l'UA et le temps d'exposition et le second ayant les conditions d'exposition à l'UA et la présence ou non de SVF.

b. Les cellules hépatiques : la lignée HepG2

La **figure 55** représente l'évolution du pourcentage de cytotoxicité des cellules HepG2 en fonction de la concentration en UA, du temps d'exposition et de la déprivation ou non en SVF.

Après 24 heures d'exposition, la mortalité cellulaire est faible (inférieure à 20%) pour les cellules exposées aux faibles concentrations d'UA. Dès 300 μM , une augmentation de la cytotoxicité est observée pour les cellules HepG2, qu'elles soient cultivées avec ou sans SVF. La mortalité est néanmoins supérieure pour les cellules déprivées en SVF à 300 μM d'UA alors que pour celles exposées aux concentrations supérieures, la cytotoxicité est potentialisée par la présence de SVF.

Après 48 heures d'exposition, la mortalité cellulaire basale est plus élevée qu'à 24 heures. Toutefois, une action cytotoxique de l'UA à partir de la concentration de 300 μM est observée pour les cellules privées ou non de SVF. Tout comme après 24 heures d'exposition, en présence de SVF, la mortalité pour les cellules exposées à 500 μM d'UA est supérieure à celle des cellules sans SVF. A 700 et 1000 μM d'UA, on note l'absence de différence de mortalité cellulaire entre les cellules cultivées en présence ou non de SVF, alors qu'une différence existe chez les T-. Ceci peut suggérer qu'à ces fortes concentrations, le SVF intensifie la mortalité induite par l'UA.

Après 72 heures d'exposition, le profil de réponse à l'UA est sensiblement le même que celui obtenu à 48 heures malgré le fait que la mortalité cellulaire basale soit plus élevée.

Peu d'études s'intéressent à l'induction de la cytotoxicité de l'uranium sur des cellules hépatiques. L'équipe de Miller a réalisé une étude de viabilité cellulaire sur les cellules HepG2 exposées à des métaux lourds dont l'UA mais ces résultats sont difficilement comparables aux nôtres du fait du manque d'informations sur l'uranium utilisé (forme physico-chimique et isotopie) (Miller et al. 2004). Une autre étude très récente montre également l'effet de l'UA sur des hépatocytes isolés de rat en démontrant l'implication du stress oxydant dans le processus de cytotoxicité (Pourahmad et al. 2006; Pourahmad et al. 2010).

Parallèlement à l'évaluation de la mortalité, une étude morphologique des cellules en présence d'UA a été réalisée par microscopie optique (**figure 56**).

Résultats

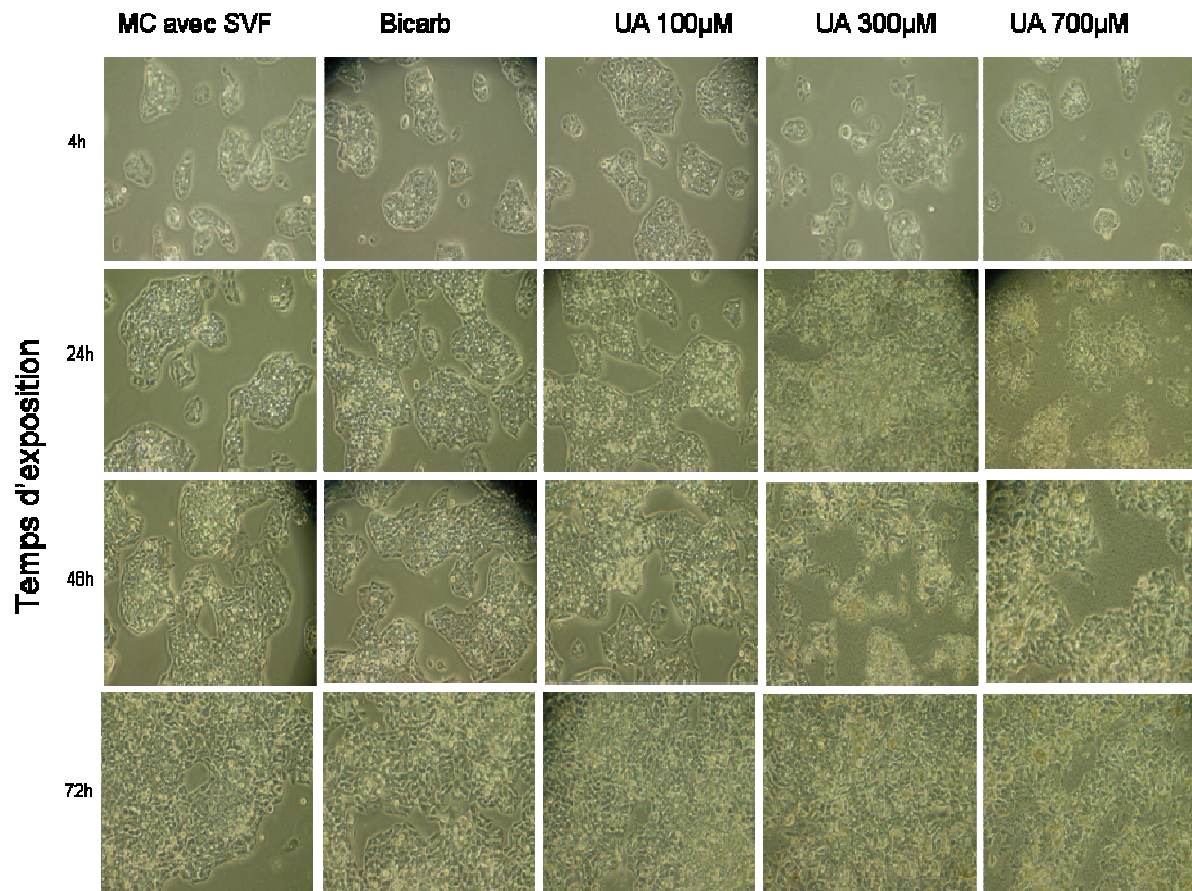


Figure 56 : Microphotographies des cellules HepG2 incubées en présence de SVF durant les tests de cytotoxicité

Observation par microscopie optique (x100) de cellules HepG2 incubées en présence de milieu de culture contenant du SVF, du bicarbonate à 10 mM, ou de l'UA à différentes concentrations d'UA (100, 300 et 500 µM) dissout dans du bicarb 10 mM.

Résultats

Ces images montrent qu'en fonction de la concentration en uranium et du temps d'exposition, la morphologie des cellules change, passant de cellules aux contours bien définis et nets à des cellules plus petites et aux contours moins nets. Par ailleurs, à 700 μM principalement mais également dès 300 μM , on note la présence de granulosités dans les espaces intercellulaires. Cette analyse ne permet pas de conclure sur la composition de ces granules mais laisse supposer qu'il pourrait s'agir de précipités d'uranium tel que décrit dans d'autres études (Carriere et al. 2005; Ghadially et al. 1982a).

c. Discussion transverse

De manière générale, le seuil de cytotoxicité obtenu pour nos lignées cellulaires est sensiblement plus élevé que ceux décrits dans la littérature. Ceci peut être expliqué, par différentes hypothèses que nous avons décrites dans les paragraphes précédents ; à savoir la composition physico-chimique de l'UA dans le milieu ou la nature du test statistique utilisé pour l'interprétation des résultats. Par ailleurs, il est intéressant de noter que pour l'ensemble des études suscitées, les études de cytotoxicité se sont faites dans des conditions de milieu de culture contenant 10% de SVF.

Par ailleurs, nous notons que pour l'ensemble des cellules, la mortalité induite par l'UA est supérieure en présence de SVF par rapport aux cellules qui en sont privées. Deux hypothèses découlent de ce constat : soit le SVF potentialise l'action toxique de l'UA sur la cellule, soit sa déprivation protège les cellules. La première hypothèse repose sur le fait que le SVF, en apportant de nombreux nutriments à la cellule mais également en activant certaines voies de signalisation favoriserait l'entrée de l'UA ou interférerait avec des voies de signalisation impliquées dans la mort de la cellule. La seconde hypothèse serait que la déprivation en SVF induirait un ralentissement du métabolisme cellulaire et protégerait ainsi la cellule de l'action cytotoxique de ce dernier. Aucun élément ne nous permet à l'heure actuelle de discriminer l'effet réel du SVF sur la cytotoxicité de l'UA. Les analyses de la localisation cellulaire de l'uranium en présence de SVF présentées dans le chapitre ci-dessous (p 230), apporteront néanmoins des éléments de réponse complémentaire.

Résultats

3. Résumé - conclusion

En conclusion, l'ensemble de nos lignées cellulaires étudiées (rénales : HEK-293 et NRK-52e et hépatiques HepG2) possède une sensibilité à l'uranium appauvri. Il n'y a pas de différence majeure entre les lignées d'origine humaine (HepG2 et HEK-293) et celles issues de cellules de rat (NRK52E).

Globalement, la cytotoxicité débute dès 300 μM bien qu'elle ne soit significative dans certaines conditions qu'à 1000 μM . Elle commence dès 24 heures et est plus importante après 48 heures d'exposition à l'UA. Enfin, elle est plus précoce et/ou plus intense dans les milieux de culture comprenant du SVF alors qu'aux concentrations inférieures à 300 μM , la mortalité cellulaire basale est moins importante en présence de SVF. La cytotoxicité est donc dépendante de la concentration en UA mais également du temps d'exposition et de la présence de SVF.

Le but global de cette étude était de déterminer les conditions expérimentales de traitement des cellules en vue de l'analyse de l'expression des EMXs et de celle de la localisation cellulaire de l'UA dans un cadre non-cytotoxique. De ce fait, suite aux résultats des tests de cytotoxicité réalisés, les conditions retenues pour les expériences ultérieures sont un temps de traitement de 24 heures à des concentrations en UA inférieures ou égales à 500 μM .

Résultats

C Effets de l'uranium sur l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques

1. Préambule

a. Contexte

La contamination chronique *in vivo* à l'uranium appauvri administré à une concentration non néphrotoxique induit des perturbations de l'expression génique et/ou protéique de certaines EMX. Une des plus sensibles est la CYP3A et notamment son isoforme 3A2. Les mécanismes d'action de l'UA sur le métabolisme des xénobiotiques restent cependant inconnus.

b. Objectif

Le but de cette approche *in vitro* est d'estimer l'impact de l'uranium sur les EMX à l'échelle cellulaire. Cette approche nous permettra de conclure si l'effet est direct ou s'il passe par des mécanismes indirects afin d'ébaucher une ou des voie(s) mécanistique(s) probable(s).

c. Stratégie expérimentale

Nous avons choisi trois modèles *in vitro* différents. Des analyses ont tout d'abord été réalisées sur des cellules hépatiques : lignée HepG2 et cellules primaires d'hépatocytes humains. Le troisième modèle est les microsomes de rat de 12 mois dans le but d'estimer les effets sur des enzymes purifiées et isolées des autres organites cellulaires.

Les cellules HepG2 ont été incubées durant 24 heures dans du milieu de culture déprivé en SVF et contenant du nitrate d'uranyle à différentes concentrations (10 à 500 μM) et/ou de la dexaméthasone, un inducteur spécifique reconnu des isoformes de CYP3A. L'uranium et la dexaméthasone étant solubilisé dans, respectivement, une solution contenant du bicarbonate ou du DMSO, des contrôles ont été réalisés en conséquence.

Les hépatocytes humains ont été incubés dans un milieu de culture adapté et recommandé par le fournisseur pour ce type d'expérience. Les cellules ont été mises en contact avec différentes concentrations d'UA seul (10 à 500 μM), de rifampicine seule (20 ou 50 μM) et d'un mélange des deux composés. L'uranium et la rifampicine étant respectivement solubilisés dans une solution contenant du bicarbonate ou du DMSO, des témoins ont été réalisés en conséquence.

Résultats

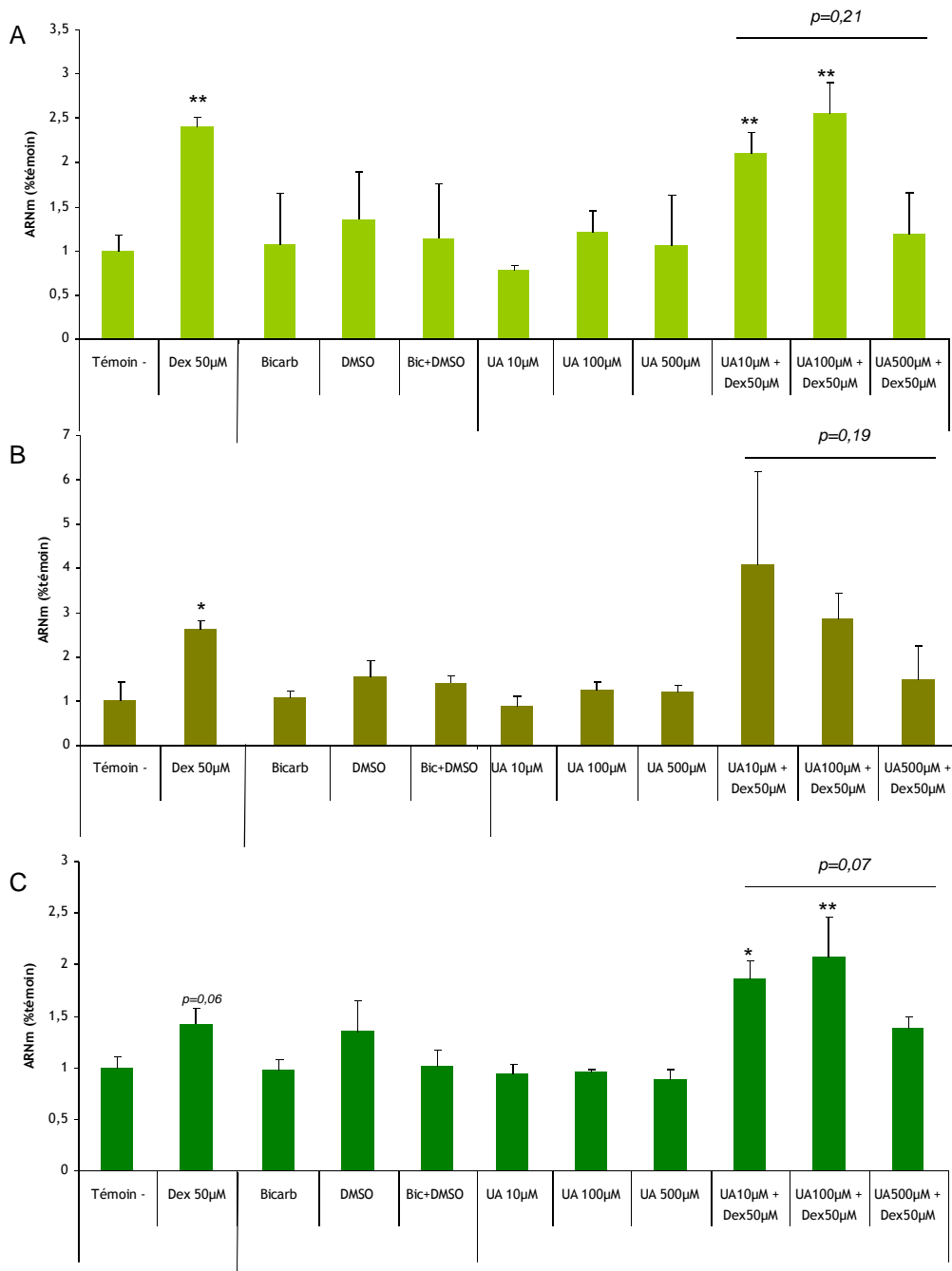


Figure 57 : Expression génique des isoformes de CYP3A chez HepG2 traités durant 24 heures à l'UA

Représentation de l'expression génique des isoformes CYP3A7 (A), CYP3A4 (B) et CYP3A5 (C) chez des cellules HepG2 exposées durant 24 heures à de l'UA (n=4). Les cellules ont été privées de SVF au moins 12 h avant le traitement. L'expression génique a été analysée par PCR semi quantitative en temps réel. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM avec T- pour les cellules cultivées dans leur milieu de culture, Dex 50 μ M pour les cellules cultivées avec 50 μ M de dexaméthasone solubilisées dans du DMSO, UA x μ M pour les cellules cultivées dans de l'UA solubilisé dans une solution de bicarbonate (Bic), etc. Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression de la GAPDH. La représentation d'une différence significative entre les cellules Témoin - et les autres conditions de culture est * si $p < 0,05$ et ** si $p < 0,01$. L'analyse statistique a été menée via un test t de Student

Résultats

Les microsomes de rat ont été préparés à partir de foie de rats âgés de 12 mois, hébergés dans les mêmes conditions que celles des animaux témoins destinés à une contamination chronique d'UA dans le cadre de nos expérimentations *in vivo*. Les microsomes ont été incubés avec de l'UA seul (1 à 1000 μM) ou avec de l'isoniazide, un inhibiteur enzymatique (1 à 1000 μM).

2. Résultats - discussion

■ HepG2

Il est couramment admis que l'isoforme prédominant de CYP3A dans le foie humain est le CYP3A4. Néanmoins, pour les cellules HepG2, l'expression basale de CYP3A4 est faible alors que l'isoforme fœtale CYP3A7 est anormalement élevée. De ce fait, dans cette lignée cellulaire, les formes prédominantes de CYP3A sont par ordre décroissant CYP3A7, CYP3A5 puis CYP3A4.

Par ailleurs, les cellules HepG2 sont des cellules dont l'expression basale des CYP3A est relativement faible. Bien qu'aujourd'hui, d'autres modèles cellulaires soient utilisés pour l'évaluation de l'induction de l'expression génique de certaines EMXs, les cellules HepG2 restent un modèle de référence (Krusekopf et al. 2003; Maruyama et al. 2007; Miranda and Meyer 2007). La dexaméthasone est un inducteur enzymatique fréquemment utilisé dans le cadre d'étude d'induction d'expression/d'activité de CYP3A (voir références suscitées). Des études préliminaires de mise au point nous ont permis de déterminer qu'un traitement par 50 μM de dexaméthasone est susceptible d'induire les différentes isoformes de CYP3A sans pour autant atteindre une concentration où l'induction est maximale (résultats non montrés).

La **figure 57** représente l'impact de l'exposition à l'UA sur l'expression génique des isoformes de CYP3A dans les cellules HepG2.

Comme attendu, la dexaméthasone est responsable d'une induction de l'expression génique de CYP3A7 (+150%, $p < 0,01$), CYP3A4 (+200%, $p < 0,05$) et CYP3A5. Concernant le traitement par l'uranium, que les cellules soient exposées à des concentrations cytotoxiques ou non, l'expression génique d'aucune des isoformes étudiées ne varie. Par ailleurs, en cas de co-exposition dexaméthasone/uranium, nous notons l'induction de l'expression génique des CYP3A du fait de la présence de la dexaméthasone mais également l'absence d'effet potentialisateur ou inhibiteur de l'UA sauf en condition de cytotoxicité.

Résultats

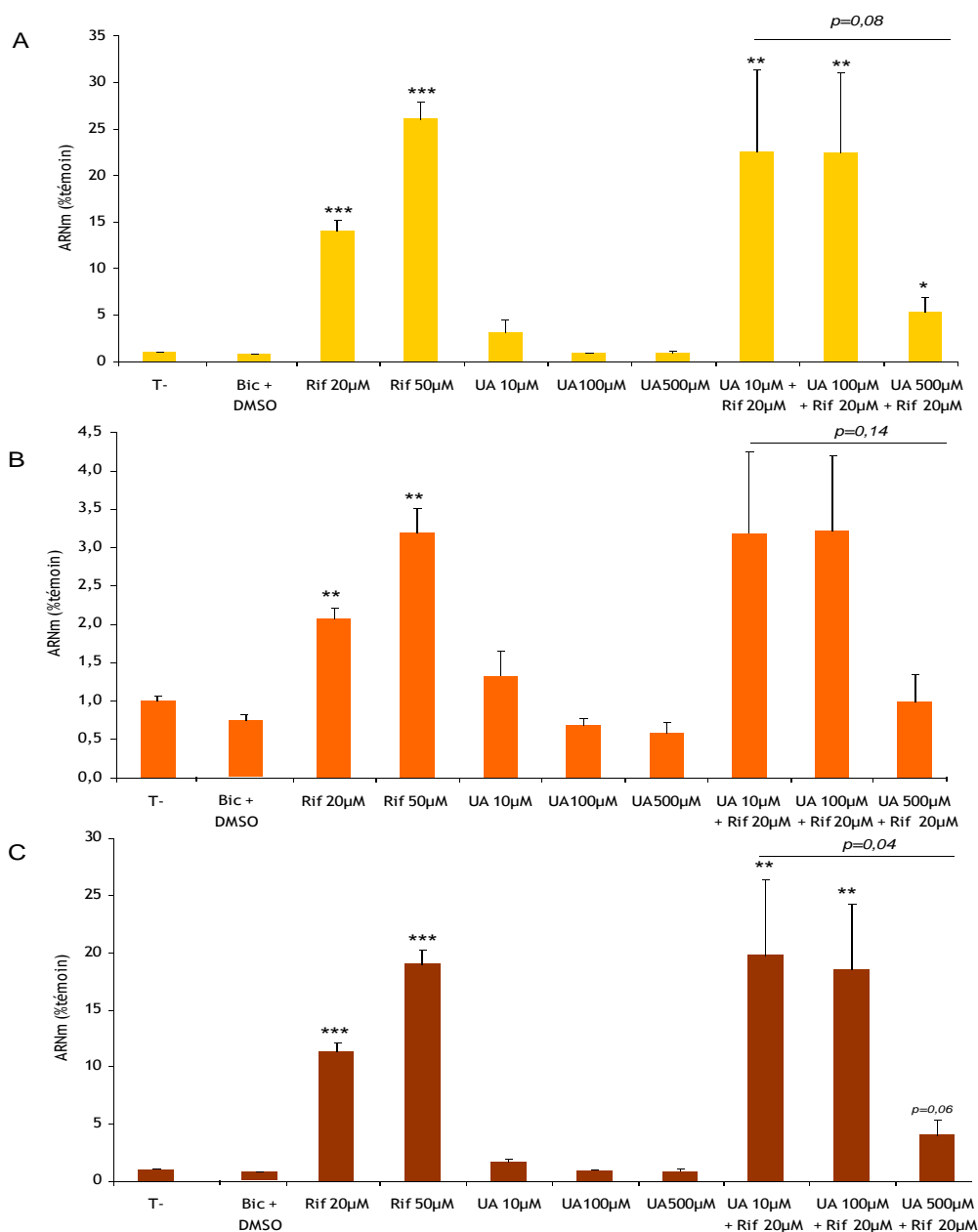


Figure 58 : Expression génique des isoformes de CYP3A chez des hépatocytes humains traités durant 24 heures à l'UA

Représentation de l'expression génique des isoformes CYP3A4 (A), CYP3A5 (B) et CYP3A7 (C) chez des hépatocytes humains exposés durant 24 heures à de l'UA (n=4). L'expression génique a été analysée par PCR semi quantitative en temps réel. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM avec T- pour les cellules cultivées dans leur milieu de culture, Rif x μ M pour les cellules cultivées avec x μ M de rifampicine solubilisées dans du DMSO, UA x μ M pour les cellules cultivées dans de l'UA solubilisé dans une solution de bicarbonate (Bic), etc. Hormis pour les cellules T-, toutes les cellules sont exposées à la fois au bicarb et au DMSO dans les mêmes concentrations. Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression de la GAPDH. La représentation d'une différence significative entre les cellules Témoin - et les autres conditions de culture est * si $p < 0,05$, ** si $p < 0,01$ et *** si $p < 0,001$. L'analyse statistique a été menée via un test t de Student

Résultats

A notre connaissance, une seule autre étude montre les effets de l'uranium sur l'expression de CYPs sur des cellules HepG2. Cette dernière met en évidence une très légère induction de l'expression génique de CYP1A1 chez des cellules HepG2 exposées à des concentrations cytotoxiques d'uranium (Miller et al. 2004). Dans ces conditions, le mécanisme de régulation de l'expression mis en jeu serait lié au stress oxydant provoqué par l'exposition à l'uranium comme cela a été montré par ailleurs (Pourahmad et al. 2006).

Cependant, comme nous l'évoquons dans le chapeau introductif de ce paragraphe, du fait des limites de ce modèle, nous ne pouvons pas conclure complètement quant à l'effet de l'UA sur les CYPs et CYP3A en particulier.

■ Hépatocytes humains

Afin de confirmer les résultats obtenus avec les cellules HepG2, nous avons menés une étude sur des hépatocytes primaires humains. Ces cellules, issues d'un jeune adulte sain et non fumeur, ont été choisies pour leur capacité à induire l'expression de certaines EMXs dont CYP3A sous l'action d'un inducteur : la rifampicine.

La figure 58 représente l'impact de l'exposition à l'UA sur l'expression génique des isoformes de CYP3A dans les hépatocytes humains.

En premier point, nous constatons que le potentiel d'induction de ces hépatocytes est supérieur à celui des cellules HepG2. Dans ce modèle cellulaire, l'induction maximale concerne l'expression génique de CYP3A4 après exposition à 50 μM de rifampicine.

Concernant l'uranium, que les cellules y soient exposées seules ou en co-exposition avec la rifampicine, l'uranium n'induit pas l'expression génique des isoformes de CYP3A. Une diminution de son expression est néanmoins observée en cas de co-exposition à la rifampicine et à une concentration d'UA de 500 μM . Parallèlement l'analyse de l'expression génique d'autres CYP (CYP1A2, CYP2E1, CYP2C9) de certaines enzymes de phase II (GSTA1, A4, M1, ST1B1) et de transporteurs (MDR1, MRP2) ne met pas en évidence d'induction du fait de la contamination par l'UA (résultats non montrés).

Résultats

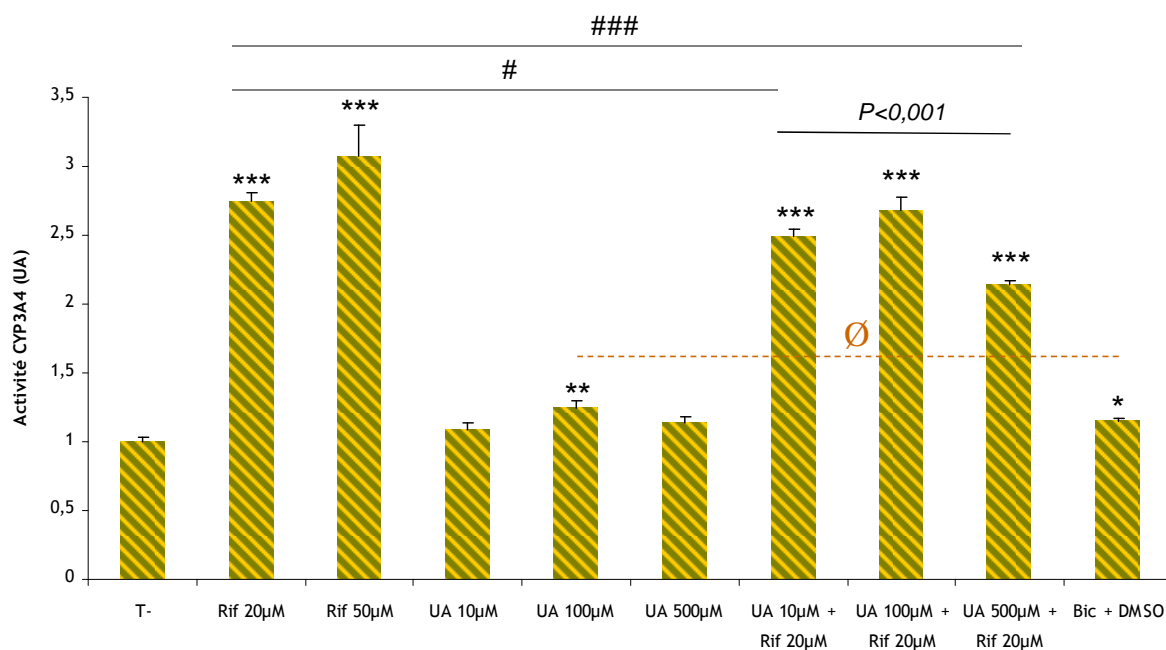


Figure 59 : Activité enzymatique de CYP3A4 chez des hépatocytes humains traités durant 24 heures à l'UA

Représentation de l'activité CYP3A4 chez des hépatocytes humains exposés durant 24 heures à de l'UA (n=3). Les cellules ont été privées de SVF dès la veille au soir de l'expérience. L'activité CYP3A4 a été mesurée par quantification de la luminosité émise par la D-Luciférine obtenu après métabolisation d'un substrat mis en contact avec les cellules au moment du dosage. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM avec T- pour les cellules cultivées dans leur milieu de culture, Rif x μ M pour les cellules cultivées avec x μ M de rifampicine solubilisées dans du DMSO, UA x μ M pour les cellules cultivées dans de l'UA solubilisé dans une solution de bicarbonate (Bic), etc. Hormis pour les cellules T-, toutes les cellules sont exposées à la fois au bicarb et au DMSO dans les mêmes concentrations. La représentation d'une différence significative entre les cellules Témoin - et les autres conditions de culture est * si $p < 0,05$, ** si $p < 0,01$ et *** si $p < 0,001$. La représentation d'une différence significative chez les cellules cultivées avec la rifampicine est # si $p < 0,05$ et ### si $p < 0,001$. L'analyse statistique a été menée via un test t de Student

Résultats

Afin de confirmer ces résultats, l'analyse de l'activité totale des CYP3A a également été réalisée (Figure 59).

Une très légère augmentation de cette activité est notée chez les cellules co-exposées au bicarbonate et au DMSO, les deux véhicules de solubilisation de l'UA et de la rifampicine (+14%, $p < 0,05$). Cet effet n'étant pas lié à une augmentation de l'expression génique, il semble qu'il soit lié à une régulation post-transductionnelle comme décrit précédemment dans des hépatocytes de rat (Zangar and Novak 1998). Dans cette étude, Zangar et son équipe montrent que le DMSO induit une augmentation du taux protéique de CYP3A corrélée à une augmentation de son activité en réponse à une diminution de sa dégradation et ce dès une exposition par 0,1% (v/v) de DMSO dans le milieu de culture.

Concernant l'exposition à l'UA, une augmentation de l'activité de CYP3A4 est notée chez les hépatocytes cultivées en présence de 100 μM d'UA (+24%, $p < 0,01$). Cependant, il est intéressant de noter qu'en comparaison avec le témoin Bic+DMSO, il n'y a pas d'effet de l'UA seul sur l'activité CYP3A4.

Par ailleurs, en cas de co-exposition UA et rifampicine, de légères variations sont observées du fait de la présence d'UA. En effet, une diminution de 9% de l'activité CYP3A4 est observée pour les hépatocytes exposées à 10 μM d'UA. L'interprétation de cette diminution se doit d'être pondérée. En effet, elle n'est pas corrélée à une modification de l'expression génique, aucune diminution n'est constatée chez les cellules traitées uniquement à l'UA et l'effet constaté à 10 μM n'est pas amplifiée à 100 μM . Par ailleurs, à 500 μM d'UA, la diminution (20% ; $p < 0,001$) de l'activité de CYP3A4 chez les cellules coexposées à la rifampicine et à l'UA est corrélée à la diminution de l'expression génique observée. Ceci suggère que l'uranium est susceptible de modifier les EMXs, lorsqu'il est à utilisé à concentration cytotoxique.

■ Microsomes de rat

La figure 61 représente les activités de CYP3A et CYP2C d'un pool de microsomes de rat exposés à différentes concentrations d'UA. Les activités CYP3A et CYP2C ont été mesurées par HPLC. Afin de s'assurer du potentiel d'induction/d'inhibition des CYPs, ils ont été exposés à différentes concentrations d'isoniazide. Une diminution des activités de CYP3A (35%, $p < 0,05$) et CYP2C (87%, $p < 0,01$) est constatée pour les microsomes exposés à 1 mM d'isoniazide. Cette diminution est plus marquée pour CYP2C et est également corrélée à un effet-concentration de l'isoniazide entre 10 μM et 1 mM.

Résultats

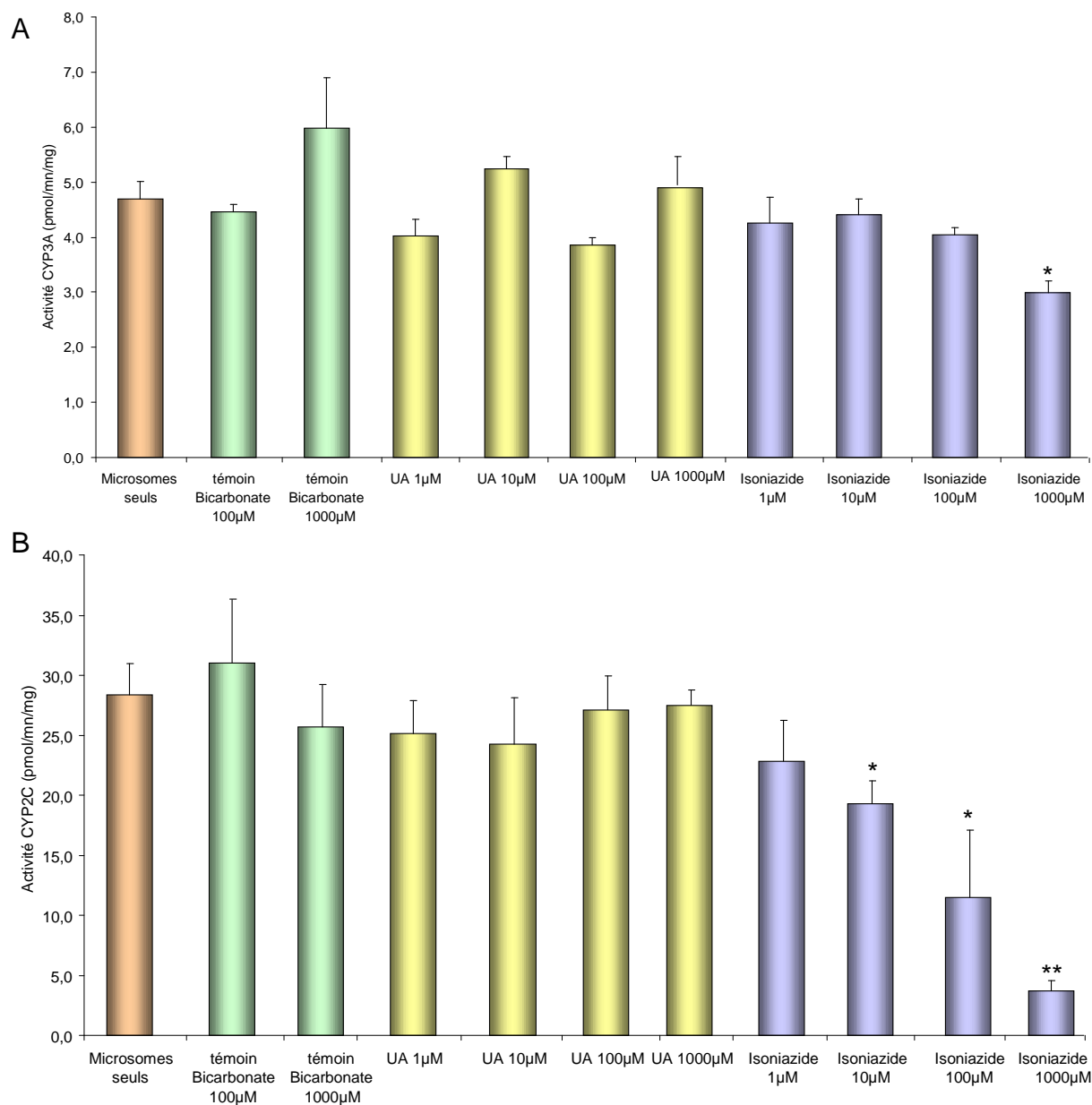


Figure 60 : Activité enzymatique de CYP de microsomes de rat exposés à l'UA

Représentation de l'activité CYP3A (A) et CYP2C (B) d'un pool de microsomes de rats traité à l'uranium appauvri (UA). Les microsomes ont été incubés avec l'uranium et l'isoniazide durant la période d'incubation de la testostérone (20 min). Les activités CYPs ont été mesurées par quantification par HPLC de certains métabolites de la testostérone. Deux des métabolites formés sont le 6B-hydroxytestostérone, représentatif de l'activité des CYP3A et le 2a-hydroxytestostérone, représentatif de l'activité des CYP2C. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Le témoin bicarbonate 1 mM correspond au contrôle de la solution de l'UA 1 mM, le témoin bicarbonate 100 μ M correspond au contrôle des solutions UA 1 mM, 100 μ M, 10 μ M et 1 μ M. La représentation d'une différence significative entre les microsomes seuls- et les autres conditions d'incubation est * si $p < 0,01$ et ** si $p < 0,01$. L'analyse statistique a été menée via un test t de Student

Résultats

Concernant l'UA, aucune différence n'est constatée dans les activités CYP3A et CYP2C entre les microsomes exposés et les témoins, quelque soit la concentration utilisée.

D'autres protocoles d'exposition des microsomes pourraient être envisagés afin de vérifier l'absence d'effet de l'uranium sur les activités enzymatiques des CYPs dans des microsomes isolés : test avec inducteur, pré-incubation des microsomes avec l'uranium, co-exposition uranium et inducteur/inhibiteur.

Résultats

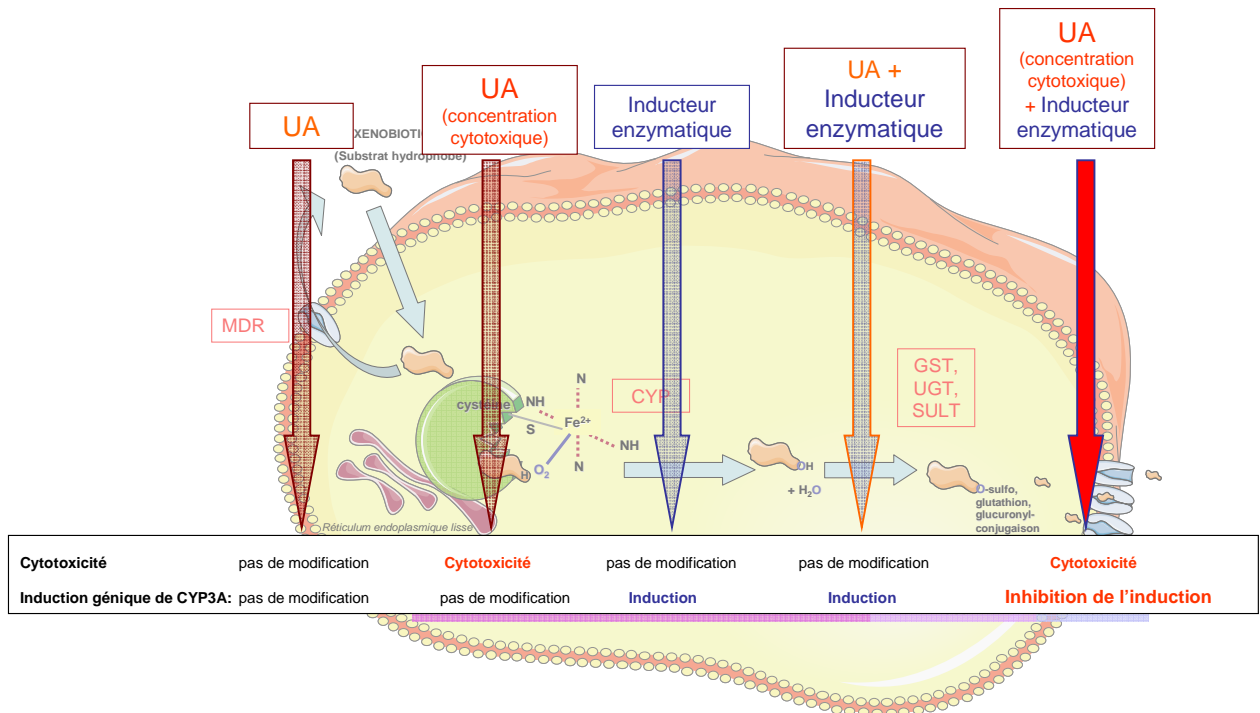


Figure 61 : Résumé des résultats obtenus sur l'induction génique de CYP3A lors de l'exposition des hépatocytes à l'uranium et/ou à un inducteur enzymatique

3. Résumé- conclusion

La **figure 61** résume l'ensemble des résultats obtenus pour les expériences d'induction de CYP3A sur les cellules hépatiques.

En conclusion, l'ensemble des modèles cellulaires sur lequel nous avons travaillé possède un potentiel d'induction ou d'inhibition de l'expression et/ou de l'activité de certains CYP.

L'exposition à l'uranium (concentration cytotoxique ou non) n'induit ou n'inhibe pas l'expression et/ou l'activité des CYP étudiés, dont CYP3A issus des rats ou des cellules (lignées ou cellule primaire) humaines. En cas de co-exposition avec un inducteur enzymatique spécifique de CYP3A2, l'uranium peut, à concentration élevée (500 μM), réprimer l'induction médicamenteuse et ce au niveau de l'expression génique et de l'activité.

L'UA n'induit donc pas directement ni l'expression génique ni l'activité de CYP3A à l'échelle de la cellule mais peut être responsable d'une inhibition de l'induction. Les effets décrits *in vivo* sont donc vraisemblablement liés à des perturbations indirectes dues à la contamination par l'UA.

Résultats

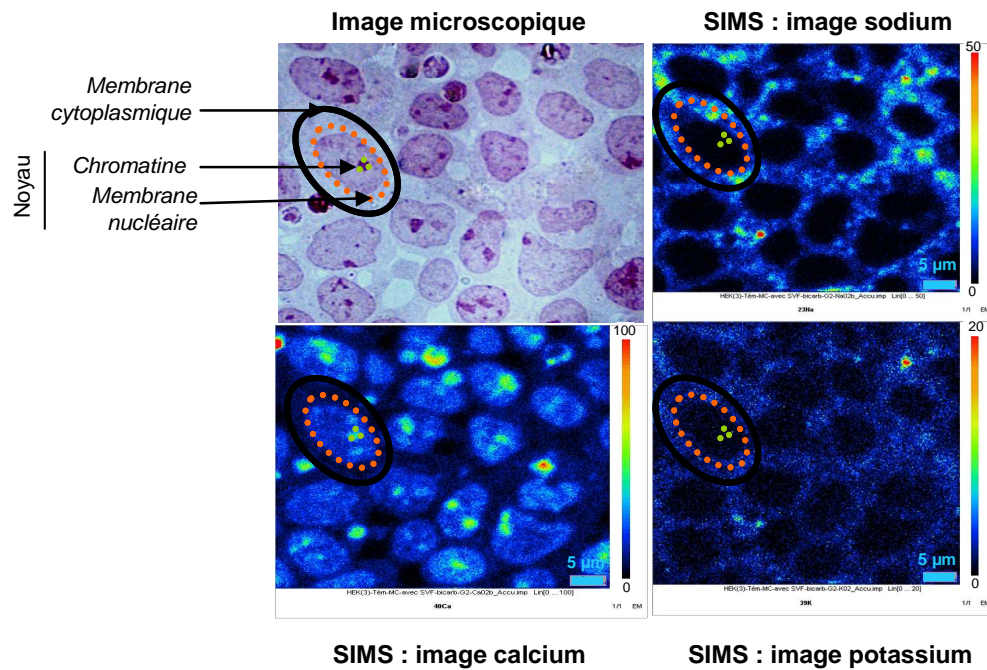


Figure 62 : Observation microscopique et SIMS de cellules HEK-293

La microphotographie a été obtenue après coloration des cellules au bleu de Toluidine. Les images SIMS montrent la répartition des ions sodium, calcium et potassium sur des coupes sériées cellulaires de celle obtenue pour la microscopie optique classique. Ces différentes images permettent de visualiser et de distinguer les grands compartiments cellulaires entre eux (cytoplasme et noyau) ainsi que la chromatine.

D Localisation de l'uranium à l'échelle cellulaire

1. Préambule

a. Contexte

L'uranium possède des propriétés cytotoxiques. *In vivo*, les cellules du TCP sont une cible privilégiée de l'U. *In vitro*, nos résultats précédents ainsi que ceux décrits dans la littérature s'accordent à dire que l'uranium, à partir d'une certaine concentration (300-700 μM en fonction des modèles), induit une mortalité cellulaire (Carriere et al. 2004; Carriere et al. 2008; Milgram et al. 2008; Mirto et al. 1999; Thiebault et al. 2007). Quelques études ont été entreprises pour essayer de comprendre le mécanisme d'induction de la cytotoxicité et se sont notamment intéressées à la présence dans les cellules de précipités d'uranium. On sait à l'heure actuelle, qu'à concentration élevée (supérieure au seuil de cytotoxicité), des précipités d'uranium sont retrouvés dans et hors des cellules. La question des mécanismes d'entrée et de la présence intracellulaire de ces derniers reste cependant ouverte. Certaines études suggèrent également la présence d'uranium sous forme soluble dans la cellule mais, actuellement, aucun outil n'a encore permis de visualiser l'uranium sous cette forme dans les cellules (Carriere et al. 2005; Carriere et al. 2008; Milgram et al. 2008b).

b. Objectif

Le but du travail développé ci-après est d'étudier la localisation de l'uranium dans des conditions non cytotoxiques, conditions pour lesquelles l'uranium est susceptible d'être sous une forme non précipitée. Cette approche menée à faible concentration d'UA nous permettra d'établir les prémices des mécanismes des effets biologiques induits par l'uranium à concentration sub-toxique.

c. Stratégie expérimentale

Les études menées jusqu'à présent relatives à la localisation de l'uranium dans la cellule ont été réalisées avec des concentrations cytotoxiques d'uranium et menées par des outils d'imagerie de type microscopie à transmission électronique ou rayon X. Ces techniques ont permis de mettre en évidence la présence de précipités d'uranium dans les milieux intra- et extra-cellulaires.

Résultats

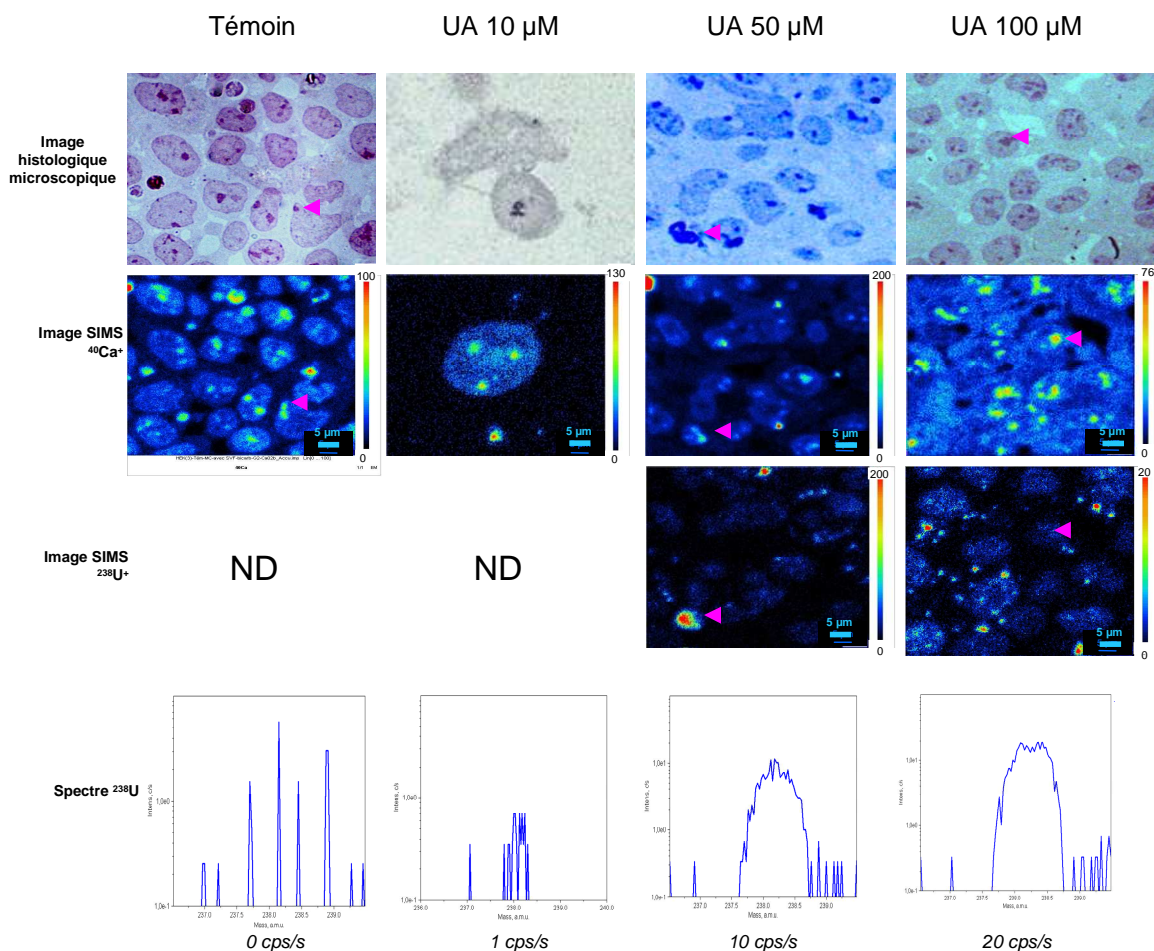


Figure 63 : Observations microscopiques et SIMS de cellules HEK-293 exposées à différentes concentrations d'UA

Les cellules HEK-293 ont été exposées durant 24 heures à différentes concentrations d'UA (10, 50 et 100 μM) dans du milieu de culture comprenant du SVF. Les images optiques microscopiques ont été obtenues après coloration des cellules au bleu de toluidine. Les images calcium et uranium ont été obtenues après analyse SIMS. Le spectre de masse de l'uranium est présenté pour toutes les conditions d'exposition à l'UA. Les flèches roses représentent des repères visuels permettant une localisation des cellules entre les différentes images. ND signifie que l'uranium n'a pas été détecté dans ces conditions.

Résultats

L'étude à venir est la première à utiliser le SIMS (spectrométrie de masse à ionisation secondaire). Cette technique très sensible a été introduite dans les années 1960 afin de réaliser la caractérisation chimique de surface solide. Son introduction dans le domaine de la biologie s'est faite de manière progressive et depuis peu, le SIMS est utilisé afin de détecter la présence d'uranium dans des échantillons biologiques.

L'analyse SIMS a été réalisée sur des cellules HEK-293 et HepG2 mises en culture avec de l'uranium appauvri à des concentrations subtoxiques (10, 50 et 100 μM). Les cellules ont été cultivées dans un milieu contenant du SVF. Après 24 heures d'exposition, les cellules ont été fixées sur leur support de culture par un tampon contenant du glutaraldéhyde. Cette méthode de fixation permet de visualiser les cellules dans leur état « physiologique » de culture avec notamment la conservation de la forme cellulaire. Elles ont ensuite été déshydratées par différents bains d'éthanol puis incluses en résine afin de permettre la réalisation des coupes analysables au SIMS. L'analyse SIMS a systématiquement été couplée à une analyse histologique classique des cellules, réalisée par une coloration au bleu de toluidine. Ce travail a été réalisé en collaboration interne avec le laboratoire de Radiochimie du service de dosimétrie interne de l'IRSN.

2. Résultats - discussion

■ Notions pour l'interprétation des images SIMS

En parallèle des observations SIMS, les cellules ont été observées au microscope après coloration au bleu de toluidine. L'image de microscopie optique informe sur la structure de la cellule. Les images sodium, calcium et potassium du SIMS comparées à l'image de microscopie optique classique permettent de visualiser le cytoplasme et la chromatine dans le noyau des cellules. Ainsi, il est possible de distinguer différentes structures cellulaires (cytoplasme, noyau, membrane nucléaire) de part la superposition/comparaison de différentes images SIMS entre elles (Figure 62). L'intégration de l'image SIMS de l'uranium dans la superposition permet d'établir une localisation du composé dans la cellule.

L'image calcium est l'image SIMS la plus complète et la mieux contrastée qui permet ainsi une identification des compartiments cellulaires. Dans la suite de ces résultats, nous nous servirons donc majoritairement des images SIMS calcium en vue de l'exploitation et de l'interprétation des images SIMS uranium.

Résultats

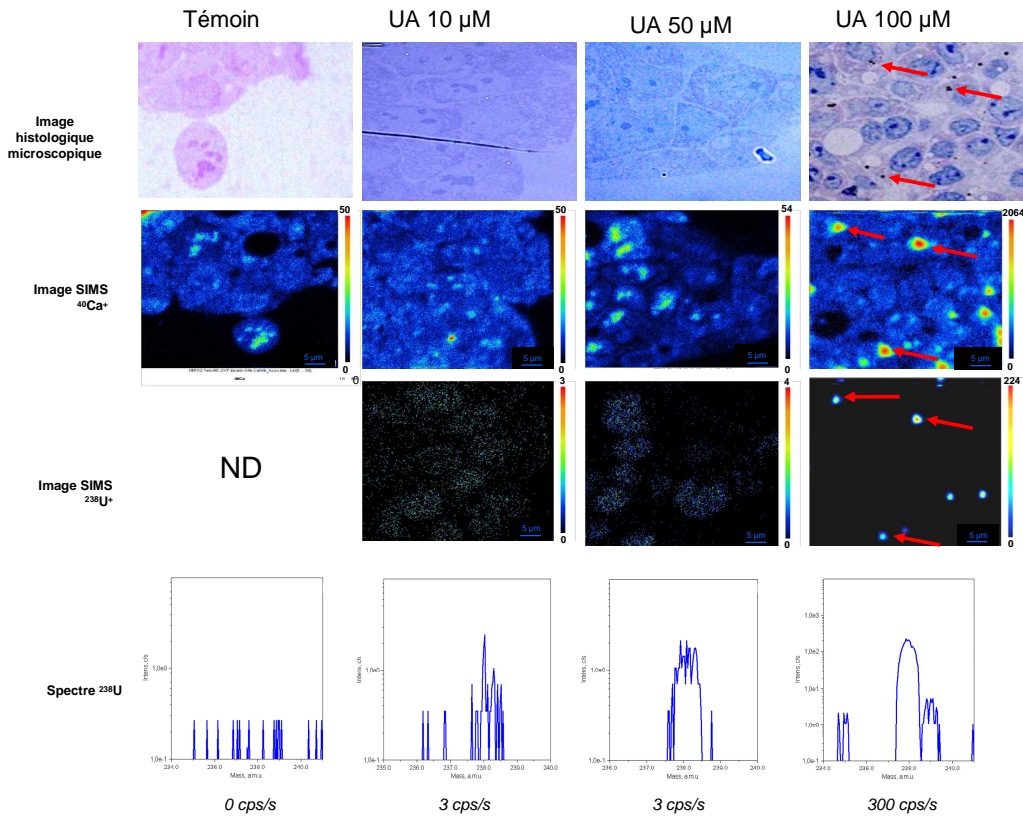


Figure 64 : Observations microscopiques et SIMS de cellules HepG2 exposées à différentes concentrations d'UA

Les cellules HepG2 ont été exposées durant 24 heures à différentes concentrations d'UA (10, 50 et 100 μM) dans du milieu de culture comprenant du SVF. Les images de microscopie optique ont été obtenues après coloration des cellules au bleu de toluidine. Les images calcium et uranium ont été obtenues après analyse SIMS. Le spectre de masse de l'uranium est présenté pour toutes les conditions d'exposition à l'UA. Les flèches rouges représentent des repères visuels permettant une localisation des précipités.

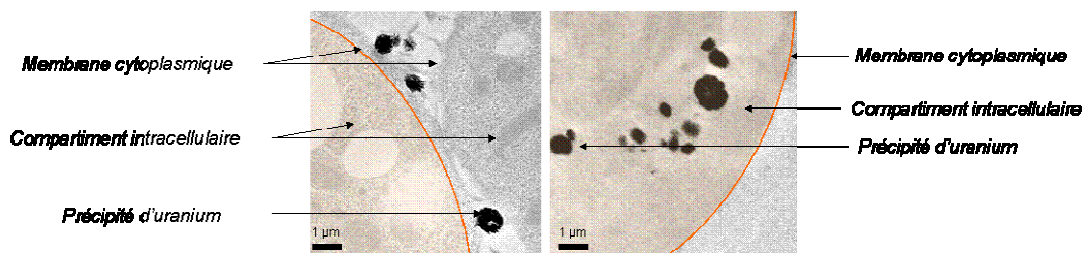


Figure 65 : observation par microscopie électronique de précipités d'UA chez les cellules HepG2 exposées à 100 μM d'UA

Les cellules HepG2 ont été exposées durant 24 heures à 100 μM d'UA dans du milieu de culture comprenant du SVF. Les images ont été obtenues par microscopie à transmission électronique.

Résultats

Par ailleurs, un spectre de masse est systématiquement réalisé afin d'identifier la présence de l'ion analysé. Nous ne présenterons que ceux des analyses de l'uranium afin de garantir la présence ou l'absence du composé sur les coupes cellulaires.

■ Cellules rénales : HEK-293

La [figure 63](#) permet d'analyser la localisation de l'uranium dans les cellules HEK-293.

Après 24 heures d'exposition, la présence de l'uranium n'est pas détectée pour les cellules HEK-293 exposées à 10 μM d'UA. Néanmoins, nous constatons une présence croissante du composé pour les cellules exposées à 50 (x10) et 100 μM (x20) d'UA (voir spectre de masse de la [figure 63](#)). Après une exposition à 50 μM , nous notons la présence d'uranium en intracellulaire et préférentiellement au niveau du noyau, voir de la chromatine. A 100 μM , l'uranium a une distribution cellulaire identique à celle décrite pour 50 μM .

■ Cellules hépatiques : HepG2

La [figure 64](#) permet d'analyser la localisation de l'uranium dans les cellules HepG2.

Après 24 heures d'exposition, la présence de l'uranium est détectée dans les cellules dès 10 μM d'UA. A 50 μM , l'UA dans la cellule est principalement localisé dans le compartiment nucléaire. A cette concentration, on note également la présence de quelques précipités selon le plan de cellules analysé (résultats non montrés). A 100 μM , de nombreux précipités d'uranium sont observés dans les compartiments intra et extracellulaires.

La présence des précipités a été confirmée par une étude sur microscopie à transmission électronique en collaboration avec le service de microscopie électronique de l'institut de biologie intégrative IF83 (Université Pierre et Marie Curie (Paris V)) ([Figure 65](#)).

Cette approche apporte un complément de détails quant à la localisation de l'uranium dans les compartiments cellulaires. En effet, pour ce qui concerne les précipités intracellulaires, leur présence semble être corrélée avec celle de lysosomes comme cela a préalablement été décrit dans d'autres types cellulaires ([Carriere et al. 2008](#)). L'analyse MET ne permet cependant pas de visualiser l'uranium sous forme « soluble » du fait de la faible dimension des éléments et donc de leur faible contraste.

Résultats

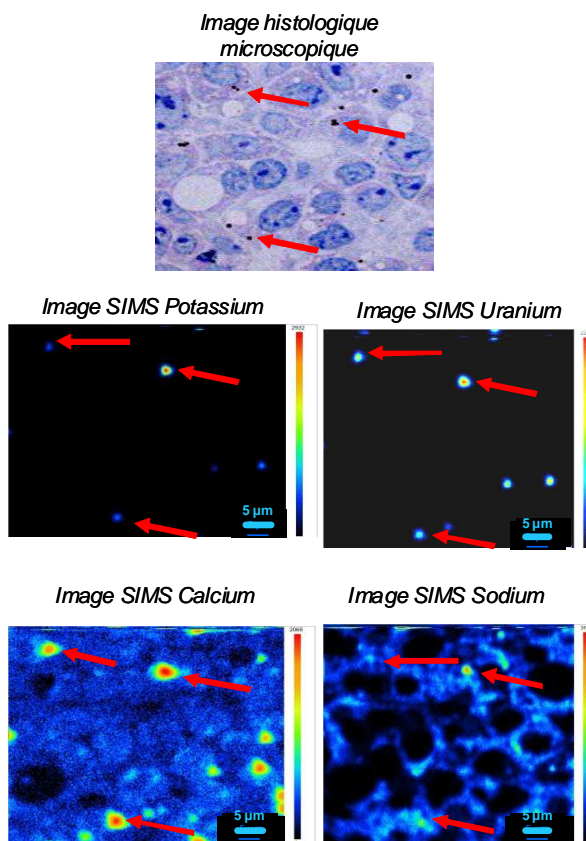


Figure 66 : Observations microscopiques et SIMS des ions calcium, sodium, potassium et uranium des cellules HepG2 exposées à 100 μM d'UA d'UA

Les cellules HepG2 ont été exposées durant 24 heures à 100 μM d'UA dans du milieu de culture comprenant du SVF. Les images optiques microscopiques ont été obtenues après coloration des cellules au bleu de toluidine. Les images calcium, sodium, potassium et uranium ont été obtenues après analyse SIMS. Les flèches rouges représentent des repères visuels permettant une localisation des précipités.

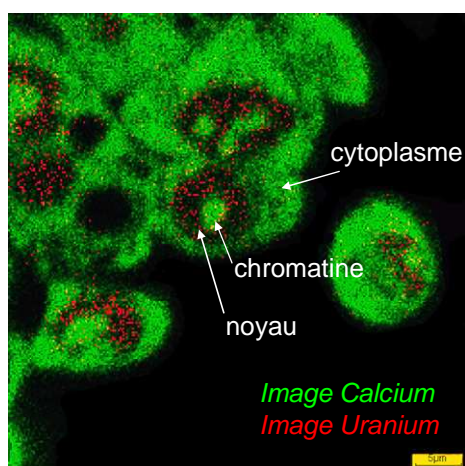


Figure 67 : Superposition des images calcium et Uranium obtenue par l'utilisation du SIMS pour des cellules HepG2

Résultats

L'analyse de la localisation des ions sodium, potassium, calcium et uranium à l'échelle des cellules HepG2 exposées durant 24 heures à 100 μM d'UA est présentée dans la [figure 66](#). Une co-localisation des différents ions étudiés témoignent de la co-précipitation de l'uranium avec, au moins, du sodium, du potassium et du calcium. Nos résultats sont ainsi en accord avec ceux décrits par l'équipe de Ghadially qui observe des précipités nommés « uranosome » dans les cellules rénales et des membranes synoviales de lapin ou encore dans des cellules lymphoblastiques humaines ([Ghadially et al. 1982a](#); [Ghadially et al. 1982b](#); [Ghadially et al. 1982c](#)).

■ Discussion transverse

Notre étude est la première à montrer une visualisation cellulaire de l'uranium sous sa forme soluble. Jusqu'à présent, les études suggéraient la présence d'une forme d'uranium soluble dans la cellule mais aucune technique ne permettait de le localiser ([Carriere et al. 2005](#); [Carriere et al. 2008](#); [Milgram et al. 2008b](#)). L'utilisation du SIMS nous a permis de distinguer la présence de l'uranium dans les différents compartiments cellulaires et d'en conclure que sa localisation semble être préférentiellement dans le compartiment nucléaire pour les concentrations d'exposition inférieures à 100 μM ([Figures 63, 64 et 67](#)).

Il est à l'heure actuelle très délicat de quantifier de manière précise l'uranium cytoplasmique et l'uranium nucléaire afin d'en déterminer un rapport de concentration. Néanmoins, une approche préliminaire de quantification de la densité de « points » d'uranium sur l'image obtenue nous a permis d'avoir une notion de ce rapport ([Figure 68](#)). La courbe obtenue par quantification des pixels représentant la présence d'uranium dans la cellule nous permet d'avoir une première approche de quantification.

■ Résultats préliminaires sur la cinétique d'entrée de l'uranium dans les cellules

Compte tenu des résultats décrits ci-dessus et de l'aspect novateur de la localisation de l'uranium soluble dans les noyaux, nous nous sommes intéressés à la cinétique d'entrée du composé dans les cellules.

Les premiers résultats obtenus concernent des cellules HepG2 exposées à l'UA durant 0,5 , 1, 2 et 24 heures. La présence d'uranium au niveau des noyaux cellulaires est détectée dès 30 minutes d'exposition. A ce même temps, quelques précipités sont présents. Comme précédemment, ces précipités sont composés d'uranium, de calcium, de sodium et de potassium.

Résultats

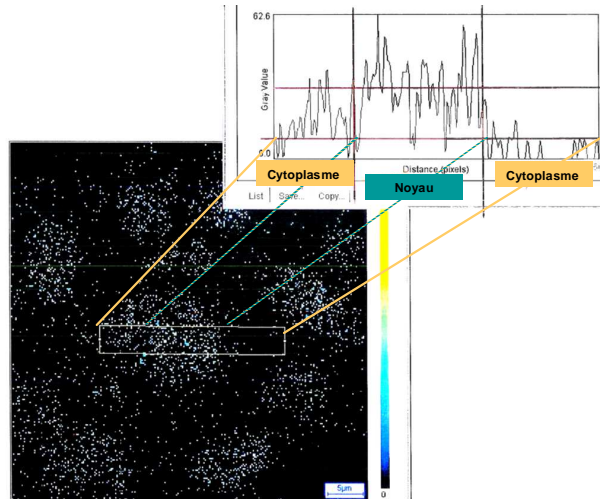


Figure 68 : Détermination d'un rapport de quantification de l'U dans le noyau ou dans le cytoplasme

L'image uranium obtenue par le SIMS a été traitée par un logiciel d'analyse d'image.

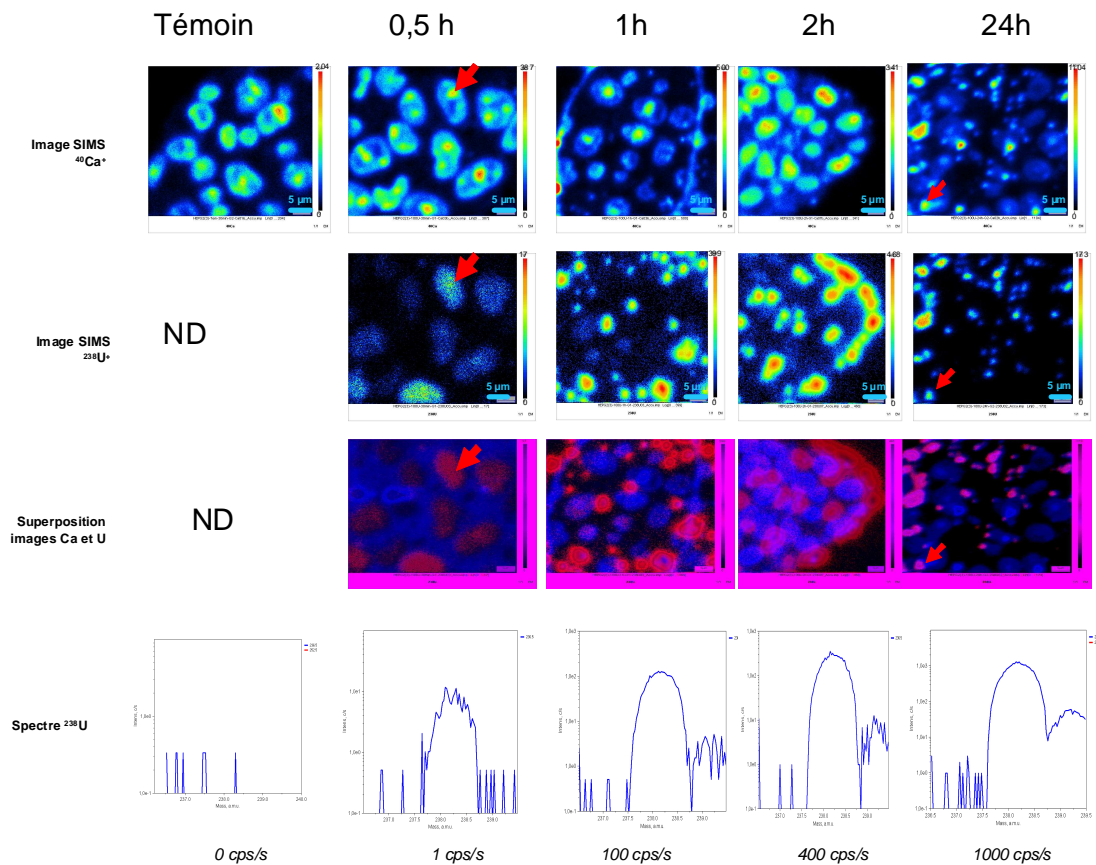


Figure 69 : Cinétique d'entrée de l'uranium dans les cellules HepG2

Les cellules HepG2 ont été exposées durant 0.5, 1, 2 et 24 heures à 100 μM d'UA dans du milieu de culture comprenant du SVF. Les images calcium et uranium ont été obtenues après analyse SIMS. Le spectre de masse de l'uranium est présenté pour toutes les conditions d'exposition à l'UA. Les flèches rouges représentent des repères visuels.

Résultats

Après 1 heure d'exposition, le nombre de précipités a largement augmenté. Au niveau des noyaux, on décèle toujours la présence d'uranium. Après 2 heures comme après 24 heures d'exposition, la grande majorité de l'uranium observé est sous forme précipitée. On ne le localise que très faiblement dans les noyaux (Figure 69). Ces résultats suggèrent que l'uranium soluble pénètre dans les cellules dans les premières minutes qui suivent l'exposition puis qu'au cours du temps, il précipite et sort du compartiment nucléaire.

3. Résumé- conclusion

En conclusion, notre approche nous a permis de confirmer la présence de précipités d'uranium dans et hors des cellules aux concentrations proches ou supérieures à 100 μM . Ces précipités sont la résultante d'une agrégation de différents ions en plus de l'uranium dont *a minima* le calcium, le potassium et le sodium font parti.

Outre la présence des précipités, nous avons visualisé la forme soluble de l'uranium dans la cellule. Bien qu'il nous soit pour l'instant impossible de quantifier cette présence, l'analyse des images suggère très fortement une localisation préférentielle du radionucléide au niveau du compartiment nucléaire. De plus, les derniers résultats que nous avons obtenus laissent à penser que l'entrée de l'uranium dans le noyau se fait dans la première demi-heure suivant l'exposition des cellules.

Ces résultats ouvrent la porte à de nombreuses discussions autour des mécanismes d'entrée de l'uranium dans la cellule ainsi que des conséquences de cette présence d'uranium sous forme soluble. Une partie de la discussion générale du manuscrit y sera consacrée.

Résultats

Discussion et Perspectives

Discussion et Perspectives

L'Homme est continuellement exposé à des composés présents dans l'environnement du fait de leur présence naturelle ou du fait de l'activité humaine. Les métaux lourds (dont l'uranium) font partie de ces composés. Le mode principal d'exposition de la population est l'ingestion notamment par la contamination de la chaîne alimentaire. La toxicité des métaux lourds et celle de l'uranium font aujourd'hui l'objet de nombreuses études. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à évaluer et décrire les conséquences biologiques d'une ingestion chronique d'uranium appauvri à une dose équivalente à celle d'une contamination environnementale sur deux des principaux organes et systèmes de défense de l'organisme. A cette dose, l'état général de l'animal n'est pas affecté. Au cours de cette discussion nous apporterons ainsi des éléments de réponse aux questions suivantes :

- Quels sont les effets de l'uranium appauvri sur les néphrotoxicités médicamenteuses ?
- Quels sont les effets de l'uranium appauvri sur le métabolisme hépatique des médicaments ?

Une approche *in vitro* transverse a également été utilisée dans le but de répondre, en partie, à la question suivante :

- Par quel(s) mécanisme(s) l'uranium appauvri agit-t'il au niveau cellulaire ?

Tableau 16 : Distribution de l'uranium dans les différents organes en fonction de la durée de contamination

Tableau issu de (Paquet et al. 2006)

Uranium distribution in rat after protracted exposure via contaminated drinking water.

Tissues	Uranium in ng g ⁻¹ tissue (mean ± SEM ^a)					
	32	95	Duration of exposure (d)		368	570
			186	312		
Teeth ^b	659 ± 56	656 ± 139	625 ± 94	455 ± 105	439 ± 92	756 ± 171
Whole brain	3.1 ± 1.2	1.0 ± 0.7	0.07 ± 0.05	0.37 ± 0.12	0.93 ± 0.60	1.1 ± 0.4
Cerebellum	21.5 ± 9.1	2.2 ± 1.1 ^b	0.80 ± 0.61	1.81 ± 0.20	0.53 ± 0.12	1.93 ± 1.49 ^b
Striatum	1.63 ± 0.62	0.92 ± 0.57	ND ⁱ	ND	0.49 ± 0.21	7.81 ± 3.12 ^b
Thalamus	54.4 ± 15.4	0.79 ± 0.45 ^b	2.54 ± 1.24	34.3 ± 18.2	24.2 ± 14.5	2.6 ± 1.3
Hippocampus	0.92 ± 0.75	4.5 ± 2.5	5.4 ± 3.1	30.3 ± 12.8 ^b	14.6 ± 3.1	21.9 ± 18.0
Cortex	ND	1.3 ± 0.98	ND	ND	0.32 ± 0.14 ^b	ND
Total gut	1295 ± 82	1178 ± 221	990 ± 207	1265 ± 250	0.05 ± 0.01 ^b	2103 ± 431 ^b
Esophagus	190 ± 21	178 ± 47	22.8 ± 6.8	115 ± 54	0.57 ± 0.36 ^b	1339 ± 336 ^b
Stomach ^c	1167 ± 326	623 ± 315	157 ± 55	524 ± 123 ^b	1.7 ± 1.7 ^b	1749 ± 874 ^b
Small intestine ^c	920 ± 114	499 ± 119 ^b	279 ± 67	231 ± 51	9.1 ± 5 ^b	474 ± 149 ^b
Large intestine ^c	2222 ± 102	2777 ± 719	2957 ± 814	3877 ± 911	ND	5524 ± 1005 ^b
Pancreas	5.1 ± 3.7	10.7 ± 6.5	5.7 ± 4.4	0.3 ± 0.2 ^b	ND	2.0 ± 1.1 ^b
Spleen	3.6 ± 1.5	11.5 ± 5.7	5.4 ± 2.2	4.7 ± 0.6	2.4 ± 0.6 ^b	10.0 ± 4.8
Liver	0.12 ± 0.08	2.1 ± 1.9	0.5 ± 0.2	26.7 ± 15.0 ^b	16.8 ± 6.7	13.4 ± 3.3
Lungs + trachea	29.6 ± 20.8	42.9 ± 31.3	ND	2.4 ± 2.4	ND	21.0 ± 15.9
Heart	1.2 ± 0.6	0.34 ± 0.23	0.40 ± 0.11	0.56 ± 0.27	0.06 ± 0.06	0.84 ± 0.39
Muscle ^d	ND	2.0 ± 1.3	1.4 ± 1.1	2.2 ± 1.9	0.3 ± 0.1	0.03 ± 0.03
Lumbar vertebrae	33.3 ± 4.8	35.6 ± 8.1	29.2 ± 8.3	19.9 ± 4.4	23.2 ± 6.6	70.3 ± 17.8 ^b
Total femurs	24.9 ± 2.9	65.1 ± 4.3	34.2 ± 10.6	59.9 ± 2.7	60.5 ± 7.7	93.5 ± 15.6
Femurs/diaphysis	21.3 ± 4.6	73.5 ± 6.4 ^b	48.2 ± 13.1	69.9 ± 2.0	74.0 ± 7.9	132.8 ± 17.1 ^b
Femurs/epiphysis	28.4 ± 2.3	55.4 ± 4.0 ^b	22.1 ± 10.0	52.2 ± 4.0	49.5 ± 7.5	58.9 ± 17.6
Kidneys	220 ± 54	97.3 ± 13.2 ^b	82.0 ± 13.0	60.5 ± 16.8	72.4 ± 15.5	311 ± 97 ^b
Testes	2.2 ± 1.9	30.2 ± 21.8	0.48 ± 0.16	0.79 ± 0.06	0.34 ± 0.09 ^b	3.4 ± 1.1
Head ^e	9.1 ± 4.3	9.3 ± 4.4	11.3 ± 2.1	20.3 ± 14.4	7.3 ± 5.5	66.4 ± 14.2 ^b
Carcass ^f	1.5 ± 0.5	111 ± 51 ^b	2.1 ± 0.6	51.5 ± 20.5	2.1 ± 0.9 ^b	7.6 ± 3.1
Whole body ^g	51.0 ± 3.0	182 ± 66	41.2 ± 8.9	134 ± 28 ^b	3.8 ± 0.6 ^b	200 ± 30 ^b

^a SEM: Standard error of the mean (s/√n).

^b Incisors + molars.

^c Organs were washed with water before analysis, so the values represent the retention in the organ wall.

^d From rear right leg.

^e Head = whole head minus brain, skin, incisors and molars.

^f Carcass = remainder.

^g Whole body = sum of all tissues listed.

^h Statistically different from mean calculated for previous time of measurement (Mann-Whitney test; *p* < 0.05).

ⁱ ND: inferior to the detection limit.

Quels sont les effets de l'uranium appauvri sur les néphrotoxicités médicamenteuses ?

Le rein est l'organe principal d'accumulation de nombreux métaux lourds. Une abondante littérature montre qu'après ingestion ou injection, le mercure, l'arsenic, le cadmium, le plomb, le sélénium sont présents de manière prépondérante au niveau du rein par rapport aux autres organes. Ceci est décrit chez le rat, dans des protocoles expérimentaux ainsi que chez d'autres espèces exposées de manière naturelle à un territoire contaminé (cochon, tortue) (Chen et al. 2006; Jakobsen et al. 2007; Jerez et al. 2010). Chez l'Homme, la quantité totale de cadmium dans le corps d'une personne d'âge moyen (50 ans) est environ le double de la somme des concentrations dans le foie et le rein (5-7 mg chez les non fumeurs et 8-13 mg chez un fumeur) dans une région non exposée (WHO 1992).

Concernant l'uranium, il est aujourd'hui bien décrit qu'en cas d'exposition aiguë, le rein est l'organe de stockage à court terme (Craft et al. 2004; La Touche et al. 1987; Leggett 1989). En cas d'exposition chronique à faible concentration par l'eau de boisson (40 mg/L), l'uranium ne s'accumule pas de manière linéaire en fonction du temps d'exposition (Paquet et al. 2006) (Tableau 16). Dans cette même étude, l'uranium urinaire ne suit pas non plus une cinétique linéaire et fluctue globalement de manière coordonnée avec les fluctuations observées dans les reins. Pourtant, il est couramment décrit que les métaux lourds s'accumulent de manière linéaire et croissante dans les organes au cours d'une contamination chronique (Haouem et al. 2007; Swiergosz et al. 1998). Cette variation d'accumulation serait donc liée à une spécificité propre à une exposition à faible dose d'uranium. Il est important de noter que ces variations ont lieu sur l'ensemble des organes et ne sont pas spécifiques du rein.

Par ailleurs, des résultats internes au laboratoire montrent une augmentation de la concentration d'uranium dans le rein en fonction de sa concentration dans l'eau de boisson après 9 mois d'exposition (Figure 70). Cette figure montre qu'après 9 mois de contamination par 40 mg/L d'uranium, la concentration d'uranium atteint environ 100 ng/g de rein. Ceci est en accord avec les concentrations rénales détaillées dans le tableau 16 (données internes au laboratoire et non publiées).

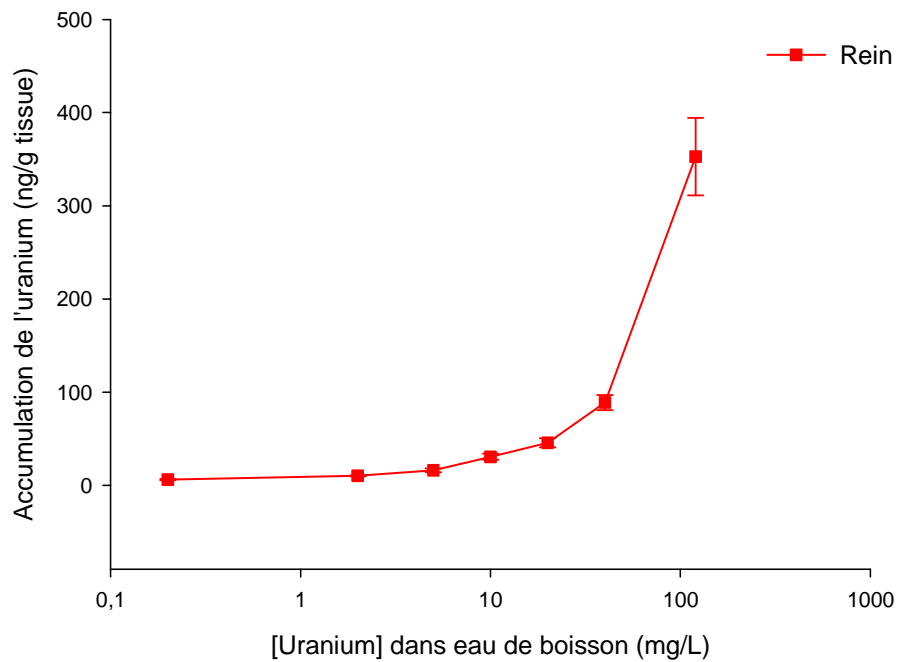


Figure 70 : Concentration d'uranium dans le rein en fonction de la concentration d'exposition.

Les animaux (n=8) ont été exposés à de l'uranium appauvri durant 9 mois à différentes concentrations (0,2, 2, 5, 10, 20, 40, 120 mg/L). A la fin de la contamination les animaux ont été sacrifiés par exsanguination sous isoflurane et les organes ont été pesés puis préparés pour un dosage de l'uranium par ICP-MS.

Discussion et Perspectives

Au cours de nos expériences expérimentation, la concentration rénale d'uranium se situe à environ 140 ng/g de rein. Elle est légèrement supérieure à celle décrite jusqu'à présent mais reste dans le même ordre de grandeur. Peu d'études s'intéressent à l'évolution de la concentration rénale d'uranium en fonction de la durée de contamination. Alors que l'étude de Paquet *et al.* est la seule à l'étudier après une exposition par voie orale, une autre approche a été menée en fixant en sous cutanée des implants d'uranium. Dans ces conditions, la concentration rénale atteint un maximum environ 3 mois après le début de l'exposition puis diminue lentement en restant décelable plus d'un an après l'implantation. Cette cinétique suit certainement la cinétique de désagrégation de l'implant dans l'organisme (Pellmar *et al.* 1999; Zhu *et al.* 2009b).

Dans nos conditions expérimentales, le rein est exposé à de l'uranium à une concentration voisine de 140 ng/g de tissus.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, **le rein est la première cible de la toxicité de l'uranium**. Chez les populations humaines exposées *via* une eau de boisson riche en uranium (concentration variant entre quelques dizaines de microgrammes et un milligramme par litre), l'augmentation de certains marqueurs tels que la β 2-microglobuline, la phosphatase alcaline et le calcium urinaires témoignent d'une atteinte potentielle des structures tubulaires rénales (Kurttio *et al.* 2002; Magdo *et al.* 2007; Zamora *et al.* 1998; Zamora *et al.* 2009).

Expérimentalement, après une exposition aiguë chez le rat, la partie rénale la plus altérée est le tubule contourné proximal avec une perte focale de la bordure en brosse associée à l'apparition de foyers nécrotiques après exposition à 100 mg/kg à du nitrate d'uranyle par injection sous-cutanée (Haley 1982). Ce type d'atteinte est corrélé à l'apparition d'une augmentation d'indicateurs plasmatiques ou urinaires de néphrotoxicité (Diamond *et al.* 1989; Fukuda *et al.* 2006; Gueguen *et al.* 2006a). Après contamination chronique, les atteintes sont également décrites sur le TCP et sont associées à certains indicateurs dont la créatinine, l'urée et la β 2-microglobuline (Gilman *et al.* 1998; Zhu *et al.* 2009b).

Tableau 17 : Evolution des paramètres d'intégrité hépatique et rénale en fonction de la concentration d'uranium administrée

Les animaux (n=8) ont été exposés à de l'uranium appauvri durant 9 mois à différentes concentrations (0,2, 2, 5, 10, 20, 40, 120 mg/L). A la fin de la contamination les animaux ont été sacrifiés par exanguination sous isoflurane, les organes ont été pesés, le plasma a été préparé puis conservé à -80°C. Les paramètres plasmatiques ont été mesurés par automate d'analyses cliniques biochimiques Konelab.

		0	0,2	2	5	10	20	40	120	
Poids corporel (g)	Total	648 ± 23	660 ± 26	655 ± 10	657 ± 13	672 ± 28	694 ± 28	673 ± 24	642 ± 17	
Poids tissulaire (g/100g poids corporel)	Foie	2,61 ± 0,06	2,76 ± 0,09	2,72 ± 0,07	2,63 ± 0,09	2,84 ± 0,09	2,82 ± 0,1	2,86 ± 0,06*	3,0 ± 0,13*	
	Rein D	0,29 ± 0,007	0,28 ± 0,005	0,29±0,006	0,28±0,007	0,29±0,007	0,28±0,006	0,28±0,006	0,29±0,013	
	Rein G	0,28±0,007	0,28±0,005	0,29±0,005	0,28±0,007	0,28±0,009	0,28±0,006	0,28±0,010	0,29±0,014	
Paramètres plasmatiques	Hépatiques	ALT (U/L)	43,4 ± 4,06	43,0 ± 4,9	ND	ND	37,6±3,31	37,9±3,31	37,7±6,6	130,4±52,6
		AST (U/L)	118,1±12,3	108,6±10,6	ND	ND	93,1±7,9	98,4±8,5	96,1±14,2	223,8±64,3
		gGT (U/L)	0,8±0,33	1,78±0,49	ND	ND	1,12±0,26	1,36±0,36	1,67±0,4	2,05±0,5*
		Alb (g/L)	30,0±0,43	30,8±0,25	ND	ND	30,7±0,53	31,7±1,3	30,0±0,63	31,3±0,67
		PAI (U/L)	78,6±21,1	74,3±6,36	ND	ND	84,5±7,5	72,0±16,3	75,1±6,6	90,5±21,3
		Bili T (µM)	4,04±0,28	4,3±0,42	ND	ND	4,32±0,24	4,60±0,56	4,06±0,42	5,11±0,80
	Rénaux	creat (µM)	49,3±1,05	47,9 ± 2,38	ND	ND	50,4±1,36	52,0±1,54	47,0±1,46	48,9±1,58
		urée (mM)	5,88±1,45	5,22±0,24	ND	ND	5,47±0,25	5,81±1,03	4,81±0,27	5,3±0,96

ND : non déterminé

* p<0,05

Discussion et Perspectives

A titre de comparaison, pour ce qui concerne la contamination *per os via* l'eau de boisson, les doses maximales estimées comme n'induisant pas de toxicité sont de 1,9 µg/g de rein pour le rat exposé durant 3 mois à de l'acétate d'uranyle dihydraté (Linares et al. 2006), 1,4 µg/g pour le rat exposé durant 1 mois à de l'acétate d'uranyle dihydraté (Ortega et al. 1989) et 0,4 µg/g pour les rats exposés durant 3 mois à du nitrate d'uranyle (Gilman et al. 1998). A notre connaissance aucune autre étude n'a montré d'effet sur les reins des animaux à des concentrations rénales inférieures à 0,4 µg/g après exposition orale.

Par ailleurs, si l'on considère les résultats obtenus au sein du laboratoire pour des rats contaminés *via* l'eau de boisson et durant 9 mois par du nitrate d'uranyle hexahydraté, nous notons l'absence de différence significative de la créatinine et de l'urée plasmatique chez les animaux contaminés à la concentration de 120 mg/L (Tableau 17). Dans ces conditions d'exposition, la concentration au rein est estimée aux environs de 0,35 µg/g (Figure 70). Ce résultat est en accord avec ceux de la littérature et confirme que le seuil de néphrotoxicité se situe au dessus de 0,4 µg/g de rein.

Dans notre protocole expérimental « uranium et gentamicine », si l'on considère uniquement les animaux contaminés à l'uranium et n'ayant pas reçu de gentamicine, la concentration d'uranium dans le rein est estimée en moyenne à 0,14 µg/g, soit bien en dessous du seuil de toxicité jusqu'à présent décrit. Les analyses que nous avons menées sur des indicateurs classiques dont la diurèse, la clairance de la créatinine, l'urée, les électrolytes et la β2-microglobuline ne montrent pas de signe de néphrotoxicité. De plus, l'analyse histologique ainsi que la mesure d'autres paramètres plus sensibles et plus spécifiques d'une atteinte rénale et particulièrement d'une atteinte tubulaire (KIM-1, ostéopontine, kallikréine, EMXs tubulaires) confirment que dans nos conditions expérimentales, l'uranium n'induit pas de néphrotoxicité tubulaire. Bien qu'aucun des marqueurs d'atteinte rénale ne soit modifié par la contamination à l'uranium (40 mg/L, 9 mois), aucune étude n'a actuellement estimé les effets d'une exposition à l'uranium sur la sensibilité du rein face à une atteinte rénale induite.

Dans nos conditions expérimentales, l'uranium n'induit pas de néphrotoxicité.

Discussion et Perspectives

L'Homme est en effet continuellement exposé à de nombreux composés dont un grand nombre résultent de l'activité anthropogénique. Dans nos conditions expérimentales, nous avons montré que l'uranium n'induit pas de néphrotoxicité. Néanmoins l'Homme est généralement exposé à un contexte de multi-pollution/exposition. Dans le but d'estimer **la synergie possible d'une co-exposition de l'uranium avec un autre xenobiotique**, nous avons choisi un protocole utilisant un xénobiotique dont les propriétés néphrotoxiques sont aujourd'hui bien connues et proches de celles de l'uranium : la gentamicine. Cette étude est la première à analyser les effets d'une exposition à l'uranium avec un autre xénobiotique potentiellement néphrotoxique. Au cours de ce travail, nous nous sommes appliqués à évaluer la synergie possible des deux composés au travers différents indicateurs de la fonction et de l'intégrité rénale en général mais aussi de ceux des structures tubulaires du cortex rénal en particulier.

L'ensemble des analyses que nous avons réalisées nous a permis d'étudier de manière précise la toxicité induite par la gentamicine au niveau de la fonction globale du rein mais aussi au niveau de l'atteinte fine des structures tubulaires. Une évolution franche de la néphrotoxicité a pu être étudiée en fonction des doses croissantes de gentamicine. Les résultats obtenus par la majorité des marqueurs utilisés sont en accord avec ceux de la littérature et montrent une néphrotoxicité induite par la gentamicine aux environs de 80-100 mg/kg. La quantification de l'expression génique de KIM-1 nous permet de conclure que les signes les plus précoces de la néphrotoxicité apparaissant dès 25 mg/kg. Cette dose est faible par rapport à ce qui est décrit dans la littérature (Zhou et al. 2008). Une des hypothèses possibles qui expliquerait que les premiers signes de néphrotoxicité débutent pour une dose de 25 mg/kg serait liée à l'âge avancé des animaux (12 mois) à la fin de l'expérience (Flandre et al. 1967).

Aucune des analyses menées, c'est-à-dire, plasmatique et urinaire (créatinine, urée, protéines, etc.), histologique (glomérulaire, tubulaire, etc.) et tissulaire sur le cortex rénal (KIM-1, ostéopontine, EMXs, etc.) n'a mis en évidence une aggravation de la néphrotoxicité de la gentamicine provoquée par l'exposition à l'uranium.

Nos résultats n'ont pas mis en évidence une potentialisation de la néphrotoxicité de la gentamicine chez les animaux préalablement exposés à l'uranium et ce quelque soit le stade de gravité de la néphrotoxicité induite.

Globalement, le rein est donc un organe d'accumulation de l'uranium. Cette dernière est dépendante de la dose et de la durée d'exposition en cas de contamination *per os*. Le seuil de néphrotoxicité semble être au dessus de 0,4 µg/g de rein. L'ensemble de ce travail de thèse tend à montrer que dans nos conditions expérimentales de contamination chronique à dose environnementale (9 mois, 40 mg/L soit environ 0,14 µg/g de rein), l'uranium n'induit ni de néphrotoxicité en cas d'exposition seule ni de sensibilité particulière du rein en cas de co-exposition avec un xénobiotique néphrotoxique. Le protocole de co-exposition choisi reste néanmoins un modèle d'étude de néphrotoxicité aiguë et particulièrement des toxicités tubulaires. Il nous permet donc donner une réponse partielle à la question de la sensibilité du rein induite par l'uranium face à un néphrotoxique.

Dans le but d'apporter des éléments de réponse supplémentaires, des protocoles expérimentaux complémentaires sont envisageables.

Le modèle expérimental de la gentamicine a pour avantage d'utiliser un médicament dont les propriétés néphrotoxiques sont bien connues et dont les mécanismes de toxicité rénale sont proches de ceux de l'uranium. Certaines faiblesses ou inconvénients ont néanmoins été mis à jour au sein de ce protocole et ont ouverts de nouvelles perspectives de recherche. La première d'entre elles est qu'il n'utilise qu'une seule dose d'uranium. Il ne permet donc pas de conclure si l'absence d'effet est due au fait que les animaux sont exposés à une dose trop faible d'uranium ou si, quelque soit la dose en uranium utilisée, ce dernier n'est pas susceptible d'aggraver la toxicité induite par la gentamicine. Il serait donc intéressant d'exposer les rats à différentes doses d'uranium afin de déterminer précisément à partir de quelle dose une exposition de 9 mois à l'uranium est susceptible d'induire des signes de néphrotoxicité. En second temps, et après détermination de plusieurs doses d'uranium (de néphrotoxique à environnementale), une co-exposition à un néphrotoxique tel que la gentamicine, nous permettra de répondre de manière plus précise sur un éventuel effet de sensibilité rénale induit par l'uranium.

La seconde perspective est liée au fait que la néphrotoxicité est induite de manière aiguë. Les mécanismes et les indicateurs de néphrotoxicité ne sont pas toujours les mêmes que dans le cas d'une atteinte chronique. Une étude utilisant un xénobiotique néphrotoxique sur une période plus longue pourrait donc nous permettre de compléter notre réponse. L'utilisation d'un autre métal comme inducteur de néphrotoxicité pourrait s'avérer intéressante. D'autres métaux possèdent en effet des propriétés néphrotoxiques (Barbier et al. 2005; Soderland et al. 2010). De plus, la co-exposition du plomb, cadmium et de l'arsenic est décrite comme induisant une toxicité additive ou synergique notamment

Discussion et Perspectives

après exposition à de faibles doses. L'exposition à un métal peut modifier la pharmacocinétique d'un second lors d'une exposition concomitante. Ainsi, l'exposition au cadmium est par exemple responsable d'une diminution de l'accumulation du plomb dans le rein (Wang and Fowler 2008) et peut influencer les taux de zinc, de cuivre et de fer dans le plasma ou dans divers tissus dont le muscle et l'intestin (Swiergosz-Kowalewska 2001).

Par ailleurs, le cumul d'exposition du plomb, de l'arsenic et du cadmium induit des modifications de molécules impliquées dans les mécanismes de toxicité de chaque métal telles que les métallothionéines, les protéines de liaison au plomb, ou encore le glutathion (Madden and Fowler 2000; Wang et al. 2008). Aucune étude ne s'est intéressée à l'interaction possible de l'uranium avec un autre métal lourd (cadmium, arsenic, plomb ou autre) dans un contexte de contamination chronique à faible dose. Cette approche nous permettrait de compléter la réponse obtenue par la gentamicine par des arguments considérant l'aspect chronique de la contamination.

Par ailleurs, d'autres protocoles de co-exposition peuvent être envisagés. En effet, dans ce travail de thèse, les animaux ont systématiquement été exposés aux médicaments lors de leur dernière semaine de contamination à l'uranium. Néanmoins, un traitement plus précoce serait susceptible d'induire d'autres effets. Il a en effet été montré une potentialisation de la néphrotoxicité du cadmium après 10 mois d'exposition chez des rats prétraités durant les deux premiers mois à du paracétamol (900 mg/kg, per os) (Bernard et al. 1988).

Enfin, ces données ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'étude de l'atteinte rénale en générale de part les nouveaux biomarqueurs de diagnostic ou pronostique qui sont actuellement développés (Annexe Ib). En effet, nous avons, pour la première fois, utilisé certains de ces biomarqueurs pour étudier l'effet néphrotoxique de l'uranium.

Cependant, de nombreux autres peuvent être étudiés (marqueurs plus sensibles, plus spécifiques, plus précoces) lors des différents protocoles proposés ci-dessus afin d'identifier le ou les marqueurs les mieux adaptés à la mise en évidence d'une altération chronique du rein. Par exemple, le dosage de la GST α dans les urines est étroitement corrélé avec une exposition chronique au plomb, un néphrotoxique tubulaire (Garcon et al. 2007). L'utilisation de la métabolomique s'avère notamment intéressante chez le rat dont la néphrotoxicité est induite après exposition chronique à des plantes médicinales chinoises (*Turbina corymbosa*) (Ma et al. 2010).

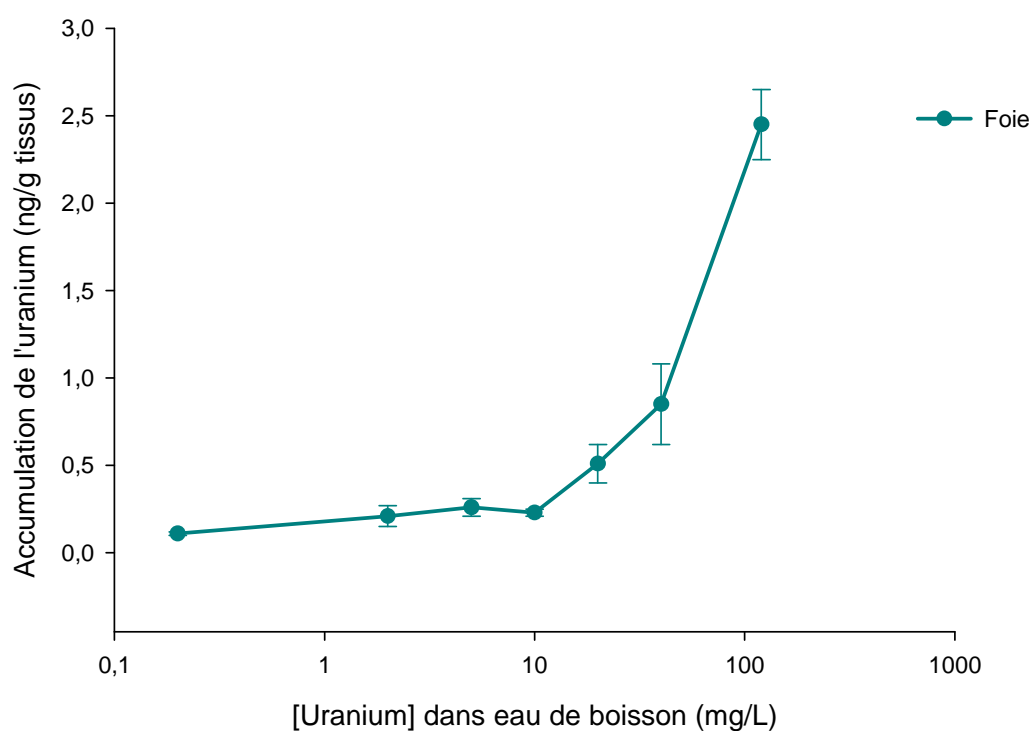


Figure 71 : Concentration d'uranium dans le foie en fonction de la concentration d'exposition.

Les animaux (n=8) ont été exposés à de l'uranium appauvri durant 9 mois à différentes concentrations (0,2, 2, 5, 10, 20, 40, 120 mg/L). A la fin de la contamination les animaux ont été sacrifiés par exsanguination sous isoflurane et les organes ont été pesés puis préparés pour un dosage de l'uranium par ICP-MS.

Quels sont les effets de l'uranium appauvri sur le métabolisme des médicaments ?

Le foie, *via* la veine porte, est le premier organe exposé aux composés (nutriments et xénobiotiques) absorbés par les voies digestives. Il est donc soumis à l'action de très nombreux composés potentiellement toxiques. Les EMX ont pour principales fonctions de le protéger en métabolisant et détoxifiant les xénobiotiques. Néanmoins, les systèmes de métabolisation peuvent être inefficaces et/ou saturés ce qui conduit à des dommages hépatiques par des mécanismes apoptotiques ou nécrotiques. Parmi les substances hépatotoxiques, on note de nombreux médicaments (paracétamol, halothane, *etc.*) mais également des toxines environnementales telles que l'aflatoxine ou encore certains métaux lourds.

De très nombreuses études rapportent la présence de plomb, de cadmium, de mercure ou encore d'arsenic au niveau du foie aussi bien pour le rongeur après contamination par voie orale (Ademuyiwa et al. 2010; Haouem et al. 2007) ou parentérale (Jakobsen et al. 2007) que pour d'autres espèces animales (cochon ou tortue) (Chen et al. 2006; Jerez et al. 2010).

La présence d'uranium dans le foie a déjà été décrite préalablement dans des conditions d'exposition différentes par voie parentérale (Bulman 1980; Pellmar et al. 1999; Zhu et al. 2009a) ou *per os* (Gilman et al. 1998; Ortega et al. 1989; Paquet et al. 2006).

Il a également été montré que la concentration d'uranium à l'organe varie sensiblement au cours des 9 mois de contamination après exposition par eau de boisson (40 mg/L) (Paquet et al. 2006) (Tableau 16). Ce tableau montre que l'accumulation dans le foie, comme celle dans d'autres organes, n'est pas croissante au cours du temps mais qu'il existe un maximum d'accumulation aux environs de 10 mois (312 jours). Ce phénomène de variation d'accumulation n'est habituellement pas décrit dans les études d'accumulation des métaux lourds en fonction du temps. Le cadmium s'accumule de manière linéaire dans le foie durant les six premiers mois d'exposition chez le rongeur (Haouem et al. 2007; Swiergosz-Kowalewska 2001; Swiergosz et al. 1998). Par ailleurs, une étude récente menée au niveau du laboratoire sur des rats contaminés durant 9 mois à l'uranium, montre que l'accumulation hépatique est dépendante de la concentration d'exposition (Figure 71).

L'accumulation hépatique augmentation dès 20 mg/L et est maximale à 120 mg/L. On note ainsi qu'à 40 mg/L, le foie est exposé à environ 1 ng/g.

Dans nos conditions expérimentales, le foie est exposé à l'uranium à une concentration voisine de 1 ng/g de tissu.

Si l'on considère les marqueurs d'atteinte hépatique, l'ensemble des travaux présentés dans ce travail de thèse ne met pas en évidence une **hépatotoxicité de l'uranium**. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus au laboratoire et présentés dans le **tableau 17** qui ne montrent pas d'hépatotoxicité de l'uranium aux concentrations inférieures ou égales à 40 mg/L. A 120 mg/L, on note une élévation du taux des transaminases plasmatiques (ALAT (+200%) et ASAT (+90%)) corrélée à une augmentation de la gamma-GT (+150%, $p < 0,05$). Bien que ces augmentations ne soient pas significatives, elles laissent suggérer une atteinte hépatique pour la concentration de 120 mg/L. L'augmentation des transaminases du fait d'une exposition à l'uranium a déjà été décrite dans le cadre d'une exposition aiguë (Gueguen et al. 2006a; Ozmen et al. 1998). Ces résultats confirment que le foie est une cible potentielle de la toxicité de l'uranium. Après exposition aiguë, l'élévation des transaminases est corrélée à une augmentation des marqueurs plasmatiques d'une atteinte rénale (créatinine et urée). Il est difficile de conclure à ce niveau si les effets décrits sur le foie sont consécutifs à une atteinte rénale ou s'ils sont directement liés à une action toxique de l'uranium sur le foie.

Dans nos conditions expérimentales, il n'y a pas d'atteinte hépatique sévère.

Concernant l'atteinte fonctionnelle, il est décrit que les métaux lourds ont la capacité d'altérer les CYPs. Michael Moore, dans une revue de 2004, indique que le plomb, le cadmium ou l'arsenic affectent l'activité oxydative médiée par les CYPs et ce du fait de l'inhibition de la synthèse de l'hème ou de l'activation de sa dégradation (Moore 2004). Par ailleurs, il a été montré qu'une exposition chronique au cadmium altère le système monooxygénase (altération du cytochrome b5 et des activités réductases) des CYPs de manière dépendante du temps et de la dose d'exposition chez le rat (Plewka et al. 2004).

Tableau 18 : Expression et activité des enzymes du métabolisme des xénobiotiques après contamination par l'uranium appauvri en fonction la quantité administrée (0.2 à 120 mg/L d'eau de boisson)

+/- x% : pourcentage de variation significative du groupe UA par rapport au groupe témoin. = : pas de variation significative du groupe UA par rapport au groupe témoin. Test t de Student.

FOIE									
	10			40			120		
	Gène	Protéine	Activité	Gène	Protéine	Activité	Gène	Protéine	Activité
CYP 3A1	=	=	=	=	=	=	=	=	=
CYP 3A2	=	=	=	=	=	=	- 45%	+ 75%	- 44%
CYP 2C11	=	=	- 32 %	=	=	=	=	=	=
CYP 2B1	=	=	=	=	=	=	=	=	=
CYP 2E	=	=	=	=	=	=	- 45%	=	=
CYP 1A1	=	=	=	=	=	=	=	=	=
GST A2	+ 82%	=	=	+ 102%	=	=	=	=	=
UGT 2B1	+ 97%	=	=	=	=	=	=	=	=
UGT 1A1	+ 42%	=	=	=	=	=	=	=	=
ST1A1	=	=	=	=	=	=	=	=	=
MRP2	=	=	=	=	=	=	=	=	=
MDR1	=	=	=	=	=	=	=	=	=

Plus récemment, Mudipalli précise que l'effet du plomb sur les CYPs peut être également lié à un effet inhibiteur du composé au moment de la transcription des gènes (Mudipalli 2007). Par ailleurs, de nombreuses études montrent que l'arsenic, le chrome, le cadmium, le cobalt ou encore le plomb sont susceptibles d'induire l'expression de gènes codant pour les enzymes du métabolisme des xénobiotiques dont CYP1A1 et GST (Elbekai and El-Kadi 2007; Korashy and El-Kadi 2004b; Korashy and El-Kadi 2005; Korashy and El-Kadi 2006; Miller et al. 2004; Tully et al. 2000).

Au regard des résultats présentés dans ce manuscrit et de ceux décrits dans des études antérieures, il est difficile de conclure sur un effet précis d'une contamination chronique à l'uranium seul sur l'expression des EMXs. En effet, l'analyse de nos résultats, indépendamment des co-expositions au paracétamol ou à la gentamicine, montre une réponse variable de l'organisme face à une exposition à l'uranium. Les résultats obtenus dans le cadre d'un traitement répété au paracétamol sont en accord avec ceux d'une étude préalable (Souidi et al. 2005) et montrent une augmentation de l'expression génique de CYP3A2 et CYP3A1 hépatiques. Cependant, des diminutions de l'expression génique de CYP3A2 et de CYP3A1 ainsi que CYP2C11 et CYP2E1 sont observées chez les rats contaminés à l'UA dans le protocole relatif à un traitement unique et non hépatotoxique de paracétamol. Enfin, la contamination à l'uranium n'induit pas de changement des CYPs pour les animaux appartenant au protocole « Gentamicine ».

Concernant les enzymes de phase II, alors qu'aucune variation n'est observée dans une étude de contamination chronique à l'UA menée préalablement (Gueguen et al. 2005), l'expression génique de ST1A1 et de UGT1A1 et UGT2B1 est diminuée dans le protocole « traitement unique au paracétamol » et augmentée dans celui « traitement répété au paracétamol ». Aucune modification n'est observée dans le cadre de l'expérimentation « gentamicine ».

Par ailleurs, dans l'ensemble de nos résultats, lorsque l'étude des taux protéiques a été réalisée, les modifications géniques observées n'ont pas été corrélées à des modifications des taux protéiques et/ou des activités étudiés.

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, la contamination à l'uranium n'induit pas de modification systématique de l'expression génique des EMXs. Néanmoins, il s'avère qu'une des enzymes dont la modification est la plus fréquente est la CYP3A, CYP majoritaire du métabolisme hépatique des xénobiotiques.

Tableau 19 : Expression et activité des enzymes du métabolisme des xénobiotiques après contamination par l'uranium appauvri en fonction du temps de contamination (1 à 18 mois)

+/- x% : pourcentage de variation significative du groupe UA par rapport au groupe témoin. = : pas de variation significative du groupe UA par rapport au groupe témoin. Ces données sont tirées des publications suivantes : Souidi et al., Toxicology 2005; Guéguen et al., Proceeding 14th International Conference on P450 2005; Guéguen et al., Drug Metabolism Reviews 2009. Test t de Student.

	FOIE									
	1 mois		3 mois		6 mois		9 mois		18 mois	
	Gène	Activité	Gène	Activité	Gène	Activité	Gène	Activité	Gène	Activité
CYP 3A1	=	=	=	=	=	=	+240%	=	=	=
CYP 3A2	=	=	=	=	=	=	+74%	=	=	=
CYP2C11					-49%		=	=	=	=
CYP 2B1					=		=	=	=	=
CYP 1A1					=		=	=	=	=
GST A2					=		=	=	=	=
UGT 2B1										
UGT1A1							=	=	=	=
MRP2					+298%		=	=	=	=
MDR1					+243%		=	=	=	=

Discussion et Perspectives

Les résultats présentés dans le **tableau 18** montrent les variations d'expression génique des différentes EMXs en fonction de la dose d'exposition à l'UA. Au niveau du foie, les variations les plus fréquentes concernent l'expression génique des EMXs et particulièrement celle des enzymes de phase I pour une exposition à 120 mg/L. L'effet le plus prononcé concerne une nouvelle fois CYP3A2 puisqu'après une exposition à 120 mg/L, la diminution de son expression génique est corrélée à une diminution du taux protéique et à une diminution de l'activité CYP3A totale.

De plus, les effets de différents temps de contamination chronique par une concentration de 40 mg/L d'UA sur les EMXs ont été étudiés récemment au sein du laboratoire. Les résultats montrent une réponse variable de l'expression génique de CYP3A selon le temps d'exposition à l'UA. Après 1, 3 et 18 mois d'exposition, aucune modification de l'expression génique n'est observée. Après 6 mois d'exposition, l'expression génique est diminuée alors qu'elle augmente après 9 mois (**Tableau 19**). Ces variations au cours du temps suggèrent qu'il existe probablement des phénomènes d'adaptation ou de compensation au niveau de l'organisme et des tissus aboutissant à une variation du niveau d'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Par ailleurs, on sait que l'accumulation d'uranium dans les tissus n'est pas graduelle en fonction du temps et n'aboutit pas à un état d'équilibre (**Tableau 16**) (**Paquet et al. 2006**). Les modifications biologiques observées peuvent donc être dépendantes de la concentration d'uranium présent dans le tissu. En effet, on note des effets plus importants après 9 mois de contamination, temps auquel l'uranium est présent en quantité plus importante dans le foie.

Bien que peu d'études s'intéressent au problème de contamination chronique et d'adaptabilité de l'organisme aux effets d'un xénobiotique, l'une d'entre elles discute de certains mécanismes qui peuvent se mettre en place en cas d'exposition à un xénobiotique avec notamment le dérèglement qui en découle sur les voies de métabolisme des endobiotiques (**Barouki 2010**). Ceci souligne que suite à l'exposition à un xénobiotique, l'organisme met en place des réponses adaptées qui peuvent varier en fonction de la durée d'exposition.

Dans nos conditions expérimentales, l'uranium n'induit pas d'hépatotoxicité mais modifie l'expression des EMXs et préférentiellement CYP3A.

En cas de traitement par l'uranium à une dose induisant une néphrotoxicité sévère, le **métabolisme de certains xénobiotiques** (théophylline, ipriflavone, chlorzoxazone) est modifié du fait des changements d'expression génique et/ou protéique des enzymes impliquées dans les voies métaboliques (CYP2E1, CYP2C11) (Chung et al. 2006; Chung et al. 2003; Moon et al. 2003; Yu et al. 2002).

Au regard de l'effet d'une contamination chronique à l'uranium sur les EMXs, le laboratoire avait émis l'hypothèse que la pharmacocinétique -donc la biodisponibilité- des médicaments pourrait être modifiée par ce type de contamination et conduire à une toxicité médicamenteuse ou une inefficacité thérapeutique lors d'un traitement médicamenteux. L'hypothèse a été testée avec un traitement par un médicament potentiellement hépatotoxique, le paracétamol.

Les premiers résultats obtenus dans cette problématique sont ceux relatifs à **des animaux traités par une dose hépatotoxique de paracétamol** (400 mg/kg, ip) à la fin des 9 mois de contamination par l'uranium (40 mg/L).

Les animaux contaminés par l'UA éliminent moins rapidement le paracétamol plasmatique que les animaux non-contaminés. De plus, des altérations histologiques rénales et une augmentation transitoire des marqueurs d'atteinte hépatique tels que les transaminases ont été observées plus fréquemment dans le groupe contaminé par l'UA (Gueguen et al. 2007). Cette étude montre donc pour la première fois qu'une contamination chronique par l'uranium potentialise la toxicité du paracétamol administré et ralentit son élimination.

Les effets d'un traitement unique par une dose « thérapeutique » de paracétamol ont alors été entrepris afin de comparer les résultats à la dose hépatotoxique précédemment utilisée. Les résultats montrent que dans ces conditions de traitement au paracétamol (50 mg/kg), la contamination à l'uranium n'induit pas de modification majeure du métabolisme et de la pharmacocinétique du médicament. Néanmoins, une augmentation du taux protéique de la CYP3A2 a été observée 3 heures après le traitement au paracétamol sans modification de l'expression génique du fait de l'exposition à l'uranium (Rouas et al. 2009). Une des hypothèses serait que l'augmentation du taux protéique de CYP3A2 serait liée à une régulation post-traductionnelle ; comme ceci a été observé après une contamination à des métaux (plomb, cuivre) pour la CYP1A1 (Korashy et al. 2005).

Discussion et Perspectives

Afin de se situer à l'interface entre les conditions toxiques initialement étudiées et celles thérapeutiques, la troisième approche consiste à traiter les animaux par **deux doses de paracétamol proches du seuil d'hépatotoxicité (100 et 200 mg/kg, *per os*) administrées selon un schéma thérapeutique sur 3,5 jours**. La contamination à l'uranium n'induit pas de modification de la pharmacocinétique ou de la toxicité du médicament. Néanmoins, l'étude de l'expression génique met en évidence quelques modifications de l'expression génique de CYP3A1 et CYP3A2 ainsi que ST1A1, UGT1A1 et UGT2B1 au niveau du foie des animaux traités par 100 mg/kg de paracétamol.

L'ensemble de ces résultats tend à montrer qu'une contamination chronique à l'uranium (40 mg/L, 9 mois) n'induit de changement majeur dans la pharmacocinétique du paracétamol que si celui-ci est administré à une dose toxique (400 mg/kg, *ip*).

Des modifications de l'expression génique des EMXs (dont particulièrement CYP3A) sont néanmoins observées. Les approches *in vivo* utilisées jusqu'à présent, ne permettent cependant pas de savoir comment l'uranium intervient sur la régulation génique de ces EMXs. L'analyse des données *in vitro* permettra d'apporter des éléments de réponse relative à la question suivante : **les effets de l'uranium sont ils des effets directement liés à une interaction du radionucléide sur sa cible (les EMXs) ou sont-ils la conséquence d'une adaptation de l'homéostasie de l'organisme entier face à cette exposition?**

Au niveau cellulaire, un certain nombre de travaux ont analysé les effets d'une contamination aux métaux lourds sur l'induction de l'expression génique codant pour des protéines dont les CYPs. Sur des cellules HepG2 transfectées par les promoteurs de régulation de CYP1A1 et GST, l'exposition à l'arsenic, au plomb et au cadmium induit l'expression génique du gène régulée par ces promoteurs (Miller et al. 2004; Tully et al. 2000). Concernant CYP1A1, le plomb, le mercure et le cuivre peuvent directement moduler son expression par activation d'Ahr (Korashy et al. 2005). Parallèlement, la même équipe montre que le mécanisme de régulation transcriptionnelle de GST suite à l'exposition au mercure, au plomb ou cuivre est dépendant aussi bien d'Ahr-XRE que de Nrf2-XRE (Korashy et al. 2006).

Par ailleurs, un traitement au cadmium induit une augmentation de l'expression génique de CYP2A5 probablement *via* un mécanisme impliquant Nrf2. Cette augmentation est corrélée avec une augmentation de l'activité (Abu-Bakar et al. 2004).

Discussion et Perspectives

L'expression des transporteurs de la phase III est également sensible à l'exposition à certains métaux lourds. L'arsenic induit, sur des hépatocytes de rats, l'augmentation de l'expression génique de MRP2 par des mécanismes vraisemblablement liés à une diminution du glutathion cellulaire et à l'activation des voies liées aux kinases N-terminales c-Jun (Vernhet et al. 2001). La production d'espèces réactives de l'oxygène dans des cellules tubulaires rénales du fait d'une exposition au cadmium, induit une surexpression de MDR1 (Thevenod and Friedmann 1999).

Globalement, et à la vue de l'ensemble de ces données, l'induction génique des EMXs par les métaux lourds serait liée aux facteurs de transcription induit notamment par le stress oxydant ou les dommages à l'ADN : Ahr et Nrf2 (NF-E2-related factor 2). Concernant l'uranium, on sait qu'une des hypothèses des voies de cytotoxicité de l'uranium dépendrait de la P450 réductase et des CYPs réduits ; ce qui serait à l'origine d'un stress oxydant (Pourahmad et al. 2006). Nous pourrions donc émettre comme hypothèse que l'uranium induirait la production des acteurs du stress oxydant qui serait à l'origine de l'activation du récepteur nucléaire AhR ou du facteur de transcription Nrf2 et ainsi de l'induction génique de certains EMXs.

Cependant, compte tenu qu'une des principales régulations transcriptionnelles concerne le CYP3A, dont la transcription est principalement dépendante de PXR ou de CAR (*a priori* moins sensibles aux effets du stress oxydant), il semble donc **que l'uranium soit responsable d'une régulation transcriptionnelle indépendante du stress oxydant.**

Au cours de nos travaux *in vitro*, l'expression génique de plusieurs EMXs a été étudiée après exposition à différentes concentrations cytotoxiques ou non d'UA. L'exposition à l'uranium appauvri (10, 100 et 500 μM) n'a pas induit ni inhibé l'expression génique de CYP1A1 et GSTA1 et A2 dans les cellules hépatiques humaines (données non montrées) à la différence des effets relatifs à d'autres métaux lourds. Néanmoins, une étude menée sur des cellules HepG2, montre qu'une exposition à l'uranium appauvri n'induit que faiblement l'activité transcriptionnelle de CYP1A1 et GST et que l'induction a lieu à des concentrations cytotoxiques d'uranium (Miller et al. 2004). Ces résultats suggèrent qu'en comparaison à d'autres métaux lourds, l'uranium n'induit pas de manière importante l'expression génique de CYP1A1 et des GSTs. De ce fait, l'hypothèse d'un mode de régulation complémentaire est renforcée.

Discussion et Perspectives

Discussion et Perspectives

Concernant CYP3A, les résultats obtenus *in vitro* sur les microsomes de rat montrent que l'uranium seul ne modifie pas les activités CYP3A. Par ailleurs, les résultats relatifs aux hépatocytes humains, montrent que l'exposition à l'uranium seul n'induit pas l'expression génique des 3 principaux isoformes humains (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7). L'activité de CYP3A4 est également inchangée dans les hépatocytes humains en cas d'exposition à l'uranium seul.

En cas de co-exposition avec un inducteur enzymatique (rifampicine ou dexaméthasone), l'induction de l'expression génique des isoformes de CYP3A est inchangée à des concentrations non cytotoxiques d'UA (10 et 100 μM) mais diminuée pour une concentration cytotoxique (500 μM). Cette diminution n'est pas systématiquement statistique mais est constatée pour l'ensemble des isoformes et pour les deux types de cellules hépatiques étudiés. De plus, elle est corrélée à une diminution de l'activité CYP3A totale pour les hépatocytes humains exposés à 500 μM d'uranium. Ces résultats suggèrent que l'uranium, à une concentration cytotoxique, inhibe l'effet inducteur de la dexaméthasone ou de la rifampicine.

Une des premières hypothèses de cette inhibition serait liée à la cytotoxicité de l'uranium. En effet, la cytotoxicité entraîne par définition une diminution du nombre de cellules et donc, une diminution de l'ARN messenger et de l'activité cellulaire. Ceci peut expliquer l'effet de l'uranium sur l'activité, néanmoins, cette hypothèse n'explique pas la diminution de l'expression génique puisque celle de CYP3A est rapporté à un gène référent qui diminuerait également en cas de mort cellulaire. Le rapport de l'expression de notre gène d'intérêt sur celui du gène de référence masquerait l'effet de l'inhibition si celle-ci était simplement due à une diminution du nombre de cellules. Par ailleurs, l'inhibition de l'action des inducteurs utilisés peut être due à de nombreux mécanismes (inhibition de l'activité, diminution du taux protéique, perturbation transcriptionnelle, *etc.*). Nos résultats montrent une diminution de l'activité corrélée à une diminution du taux ARNm dans les hépatocytes co-exposés à l'inducteur et à l'uranium. Ceci suggère que l'uranium pourrait inhiber l'effet inducteur de la rifampicine ou de la dexaméthasone par un mécanisme pré-transcriptionnelle. Des résultats similaires ont été décrits pour une exposition d'hépatocytes humains à l'arsenic à des concentrations n'induisant pas de toxicité sévère (2,5 et 5 μM). Cette étude montre que l'exposition simultanée à l'arsenic et à un inducteur enzymatique spécifique prévenait de l'augmentation de l'ARNm, de la protéine et de l'activité de CYP3A4.

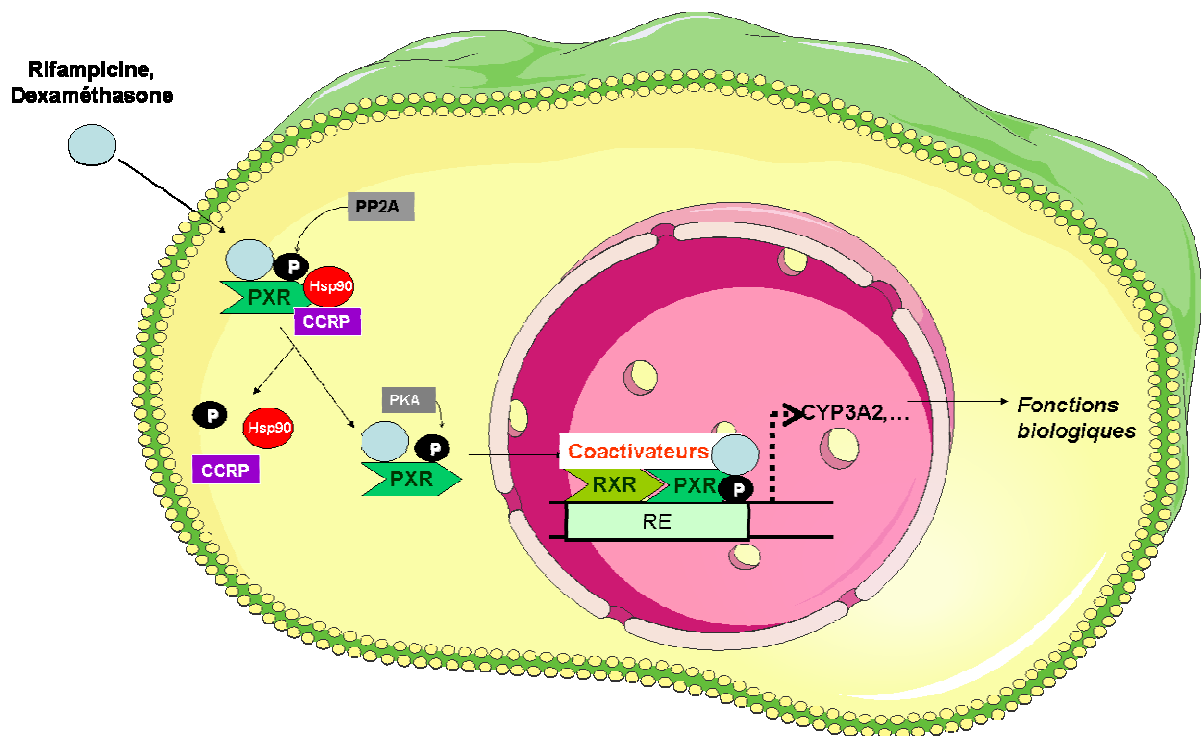


Figure 72 : Schéma de l'activation de PXR et de la transcription de CYP3A2

PXR a une localisation initialement cytoplasmique. Il y est complexé à de nombreuses protéines comprenant la protéine de rétention de CAR cytoplasmique (CCRP, CAR cytoplasmic retention protein) et la protéine de choc thermique (Hsp 90, heat shock protein 90). Après liaison à son ligand (rifampicine ou dexaméthasone par exemple), PXR se dissocie de son complexe multiprotéique et transloque dans le noyau. Il s'hétérodimérise alors avec RXRalpha et active ainsi la transcription de gènes par fixation sur l'élément de réponse (RE) présent dans la séquence promotrice des gènes cibles. PXR peut être phosphorylé par la protéine kinase A (PKA) ce qui lui permet une meilleure activation avec les co-activateurs, ou déphosphorylé par la protéine phosphatase PP2A ce qui déclenche son activation. Parmi les co-activateurs, on note la présence des protéines de la famille p160, la protéine de liaison à PPAR (PBP, PPAR binding protein) et le co-activateur de PPAR gamma (PGC1-alpha, PPAR-gamma, co-activator-1). La transcription peut également être inhibée par des co-répresseurs dont le récepteur nucléaire co-répresseur (NcoR, nuclear receptor co-repressor), la protéine 140 (RIP140, receptor_interacting protein 140), un partenaire de l'hétérodimérisation (SHP, short heterodimer partner) et SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors).

Figure réalisée à partir de (A. Di Masi, 2009)

De plus, une diminution de l'activité de PXR et du taux protéique nucléaire de RXR alpha

Discussion et Perspectives

sans perturbation de l'expression de PXR est décrite. A la différence de nos résultats *in vitro*, l'arsenic induit également une diminution de l'expression de CYP3A4 dans les hépatocytes non traités par un inducteur (Noreault et al. 2005).

La dexaméthasone et la rifampicine sont deux inducteurs de CYP3A qui agissent par fixation sur le récepteur nucléaire PXR. PXR a une localisation cytosolique mais son activation débute par sa translocation dans le noyau où il s'hétérodimérise avec RXR (9-cis retinoic acid receptor) (di Masi et al. 2009; Kliewer et al. 2002; Mottino and Catania 2008; Wang et al. 2003).

Comme l'illustre la figure 72, de très nombreux facteurs interviennent au moment de l'induction génique de CYP3A par la dexaméthasone ou la rifampicine. Certains d'entre eux sont dits pré-nucléaires puisqu'ils participent au maintien de PXR dans le cytoplasme.

On peut notamment citer les éléments du complexe dont les protéines de choc thermique ou encore les protéines de rétention cytoplasmique. Interviennent également à ce niveau, les phosphatases et les protéines kinases qui jouent sur la phosphorylation de PXR avant son entrée dans le noyau. D'autres sont dits nucléaires et interviennent au moment de l'hétérodimérisation de PXR avec RXR ou en tant que cofacteur de transcription. Tous ces acteurs sont potentiellement une cible, directe ou indirecte, de l'uranium qui, à concentration cytotoxique, induirait un dysfonctionnement aboutissant à une diminution de la transcription de CYP3A.

Aucun élément à l'heure actuelle ne nous permet de conclure sur le mécanisme par lequel l'uranium perturberait l'induction génique. Plusieurs hypothèses sont possibles : interaction des acteurs de la mort cellulaire avec ceux de la régulation transcriptionnelle, impossibilité du complexe contenant PXR de transloquer dans le noyau, inhibition ou destruction des produits de la transcription par des enzymes apoptotiques, etc.

Discussion et Perspectives

Discussion et Perspectives

Une première approche a été entreprise afin de savoir par quel(s) mécanisme(s) l'uranium agit au niveau de la cellule. Une des questions à laquelle nous nous sommes particulièrement intéressés concernait l'entrée du composé dans la cellule. En effet, l'étude de la localisation de l'uranium dans la cellule permet d'apporter des éléments de réponse complémentaires quant à un effet direct du composé sur sa cible moléculaire ou un effet passant par des voies de signalisation contournées (interaction de l'uranium sur des récepteurs membranaires par exemple). Cette partie sera abordée dans les paragraphes à venir.

Au niveau cellulaire, l'uranium seul ne modifie pas l'expression génique des EMXs étudiées. Néanmoins, par un mécanisme qui reste encore à élucider, il semble qu'une co-exposition uranium/inducteur puisse perturber l'homéostasie des EMXs via un facteur lié à la mort de la cellule

En conclusion, à l'échelle de l'organisme, l'exposition des rats à une concentration non néphrotoxique d'uranium (40 mg/L) induit des variations ponctuelles de l'expression génique des EMXs étudiés (dont particulièrement CYP3A) sans conséquence notable sur leur activité mais variant en fonction des durées d'exposition. Le mécanisme de cette régulation est actuellement inconnu. Néanmoins, compte tenu de l'absence d'effet de l'uranium seul sur l'expression génique de CYP3A au niveau cellulaire et par conséquent de l'absence de corrélation entre nos résultats *in vivo* et *in vitro*, il semble qu'un second mécanisme de régulation, essentiellement génique, intervienne. Ce dernier semble complexe puisque dépendant de l'uranium mais de manière indirecte.

L'organisme de l'animal est exposé dans son ensemble à la contamination par l'uranium et les effets de cette contamination sont dépendants du temps d'exposition et vraisemblablement de la présence d'uranium au niveau de l'organe au temps considéré. Ces effets sont également intégrés à l'homéostasie de l'organisme entier et donc à des phénomènes complexes de compensation et d'adaptation des effets continuellement induits par l'exposition chronique à l'uranium. Ainsi, les effets décrits *in vivo* sur CYP3A2 ne sont certainement pas uniquement dus à l'exposition des cellules hépatiques à l'uranium mais également à l'exposition de ces mêmes cellules à tous les signaux provenant des autres tissus et pouvant interagir avec les voies de régulation des EMXs.

Ce phénomène a été décrit dans une étude qui montre qu'une insuffisance rénale chronique est à l'origine d'une diminution du taux des CYPs au niveau hépatique (principalement CYP2C11, CYP3A1 et CYP3A2) (Leblond et al. 2001). Ceci serait en partie lié à des taux anormaux de l'hormone parathyroïdienne provoqués par l'insuffisance rénale et qui contribueraient à une diminution du taux des CYPs hépatiques (Michaud et al. 2010). Ces données bibliographiques soulignent l'impact de l'atteinte d'un organe sur un second et donc le rôle de l'organisme dans une réponse adaptative.

Par ailleurs, dans le cas de conditions expérimentales similaires aux nôtres, d'autres métabolismes impliquant des acteurs communs à celui des xénobiotiques sont affectés par l'exposition à l'uranium. On compte parmi eux, celui du métabolisme du cholestérol dont la contamination à l'uranium induit une diminution de l'activité d'un CYP particulier (CYP7A1) et la régulation génique de transporteurs de type ABC intervenant également dans l'élimination des xénobiotiques hors de la cellule (Racine et al. 2010). Dans le métabolisme de la vitamine D, l'exposition à l'uranium induit des perturbations de l'expression génique de certains acteurs dont ceux qui appartiennent à la famille des CYPs (CYP24A1, CYP27A1) (Tissandie et al. 2007).

La régulation de ces métabolismes passe donc, comme dit ci-dessus, par des enzymes communes mais également par des récepteurs nucléaires communs comme par exemple RXR. Globalement, les perturbations induites ne modifient pas de manière pathologique l'homéostasie des systèmes étudiés. La corrélation des modifications d'expression génique observées dans le métabolisme des xénobiotiques avec celles d'autres systèmes, ainsi que l'absence de conséquence phénotypiques **suggèrent que le caractère mesuré et sporadique de ces modifications entre dans un contexte d'adaptation et de réponse physiologique de l'organisme face à l'uranium.**

Concernant les effets de l'uranium sur le métabolisme du paracétamol, nous pouvons conclure que lorsque celui-ci est administré à une dose non hépatotoxique, sa pharmacocinétique ainsi que son élimination ne sont pas affectées. Compte tenu du fait que le paracétamol est un inducteur de l'expression génique des EMXs, l'inhibition de l'expression génique décrite pour un certain nombre d'EMXs (dont CYP3A) pour les rats traités sub-chroniquement par 100 mg/kg et sacrifiés 2 heures après, pourrait être attribuée à un effet inhibiteur de l'uranium sur l'induction du paracétamol.

Discussion et Perspectives

En effet, nous pourrions penser que bien que l'uranium soit administré à une dose non toxique, le paracétamol (100 mg/kg) induirait les prémices d'une hépatotoxicité et donc quelques signaux de mort cellulaire. L'uranium, en présence de ces signaux pourrait être à l'origine d'une diminution de l'induction génique provoquée par le paracétamol. Néanmoins, cet effet n'est pas retrouvé pour une dose supérieure de paracétamol (200 mg/kg) ce qui suggère que même si cette régulation s'exerce dans ce protocole, elle est associée à d'autres mécanismes qui peuvent potentiellement la masquer.

De plus, l'augmentation de la protéine CYP3A2 observée 3 heures après le traitement au paracétamol (50 mg/kg) va à l'encontre de l'hypothèse d'une inhibition de l'induction lié au paracétamol et suggère plutôt un mécanisme post-transductionnel, comme par exemple une stabilisation de la protéine. Ceci a d'ailleurs été décrit précédemment dans le cas d'exposition à des métaux lourds (plomb, cuivre) pour la CYP1A1 (Korashy et al. 2005) et confirme l'existence de plusieurs mécanismes de régulation.

Le même type de réflexion peut être mené pour ce qui concerne les effets décrits avec une dose hépatotoxique de paracétamol (400 mg/kg). En effet, la contamination à l'uranium induit une diminution de l'activité de certaines CYPs, 2 heures après l'exposition au paracétamol. Cette diminution de l'activité n'est pas liée à une diminution de l'expression génique ce qui traduit que l'effet est post-transcriptionnel et donc dépendant d'une autre voie de régulation, comme dans les autres protocoles de traitement au paracétamol.

En conclusion, l'exposition chronique à une dose faible d'uranium induit des modifications, principalement géniques, des EMXs. Ces modifications sont régulées par un ensemble de mécanismes complexes qui restent à élucider. Elles ne sont cependant pas suffisamment importantes pour induire des modifications majeures du métabolisme du paracétamol quand ce dernier est administré à des doses non hépatotoxiques.

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, il serait nécessaire de mettre en place des études mécanistiques afin (i) de confirmer l'effet inhibiteur de l'uranium à d'autres concentrations cytotoxiques, (ii) d'estimer si cet effet est lié à l'action toxique de l'uranium ou s'il peut passer par une toxicité induite par un autre mécanisme, comme ce que nous supposons dans les résultats relatifs au paracétamol, (iii), comprendre par quel(s) mécanisme(s) et *via* quel(s) acteur(s) l'uranium peut inhiber l'effet d'un inducteur enzymatique.

Discussion et Perspectives

Discussion et Perspectives

Une des prochaines études qui sera réalisée au sein du laboratoire consistera à traiter les animaux avec des doses croissantes d'uranium afin de déterminer à partir de quelle dose, l'uranium est susceptible d'induire les marqueurs de l'hépatotoxicité et voire, de modifier la pharmacocinétique d'un médicament. Cette approche toxicologique nous permettra de mieux évaluer le risque de voir apparaître ces effets à des concentrations environnementales.

Il serait également intéressant de compléter nos études avec l'analyse d'autres marqueurs de toxicité dont les acteurs du stress oxydant. Nos résultats montrent que l'expression génique de GST est susceptible de diminuer du fait de l'exposition à l'uranium. L'étude d'autres enzymes (dont la catalase, la superoxyde dismutase ou la glutathion peroxydase), de molécules antioxydantes (vitamine C et vitamine E) ou encore de facteurs de transcription (dont Nrf2) renseignera sur les effets de l'uranium sur le statut oxydatif. Ces analyses pourront être effectuées chez des animaux uniquement exposés à l'uranium ou chez ceux co-exposés à l'uranium et à un xénobiotique (paracétamol, gentamicine, ou autre). En effet, le stress oxydant résultant du traitement à ces deux xénobiotiques fait l'objet d'une large bibliographie et il serait intéressant d'étudier l'effet combiné des deux expositions.

Dans le cas d'une co-exposition au paracétamol, il sera également intéressant d'étudier les effets de l'uranium sur la formation du métabolite réactif et toxique du paracétamol : NAPQI. En effet, la mesure de ses adduits moléculaires nous renseignera sur l'activité globale de CYPs impliqués dans sa formation ainsi que sur l'éventuel impact d'une exposition à l'uranium.

Par ailleurs, à court terme, nous pourrions compléter les résultats obtenus sur les microsomes de rats par des expériences de co-expositions (uranium et inducteur) afin de voir si nous confirmons les effets décrits sur les cellules hépatiques étudiées. Les microsomes ne représentant que la fraction active des CYPs, et ne possédant pas les outils de la transcription génique, l'effet de l'uranium à leur échelle nous permettra de conclure sur un potentiel effet post transcriptionnel.

Enfin, l'étude *in vitro* de l'inductibilité de l'expression génique des EMXs par le paracétamol nous permettra de confirmer l'effet inducteur du composé décrit dans nos approches *in vivo*. De plus, nous pourrions évaluer l'effet de différentes concentrations d'uranium sur des EMXs induit par le paracétamol.

Discussion et Perspectives

Par quel(s) mécanisme(s) l'uranium appauvri agit-t'il au niveau cellulaire ?

Comme mentionné précédemment, les mécanismes d'action de l'uranium sur les systèmes de détoxification (et particulièrement sur les EMXs) restent actuellement méconnus. Nous avons montré que l'uranium seul ne modifie pas l'expression des EMXs à l'échelle de la cellule. Il semble ainsi que les modifications observées soient la conséquence de multiples phénomènes dont certains sont dépendants des processus d'adaptation de l'organisme et d'autres sont plus directement liés à l'interaction directe de l'uranium sur une cible cellulaire en condition de cytotoxicité.

Une des exigences nécessaires à l'action directe de l'uranium sur une cible cellulaire est que ce dernier entre dans la cellule. Ainsi, nous nous sommes intéressés à **la localisation de l'uranium dans les cellules.**

Dans de précédents travaux, les observations réalisées en condition de cytotoxicité provoquée par l'uranium montrent la présence d'accumulation de micro-cristaux ou de précipités de phosphate d'uranyle au sein du cytoplasme cellulaire. Ce phénomène est couramment associé à la précipitation du composé au sein du lysosome consécutivement à son endocytose par la cellule (Galle 1997; Mirto et al. 1999). Ce phénomène d'endocytose serait l'un des processus par lequel l'uranium serait réabsorbé *in vivo* au niveau du TCP. Pendant longtemps cette hypothèse s'est révélée être la plus vraisemblable et récemment, un travail de thèse a permis à la fois d'apporter des précisions sur le mécanisme d'endocytose et de montrer que cette endocytose n'était pas le seul moyen d'entrée de l'uranium dans la cellule (Muller 2002).

L'hypothèse de la présence de l'uranium au sein de la cellule, sous une forme soluble et/ou précipitée a plusieurs fois été évoquée (Carriere et al. 2005; Carriere et al. 2008; Muller et al. 2006; Muller et al. 2008). Les techniques utilisées jusqu'à présent, dont le MET, permettaient de localiser l'uranium uniquement sous une forme précipitée (Carriere et al. 2008; Ghadially et al. 1982a). L'utilisation du SIMS, nous a permis de confirmer la présence de ces précipités d'uranium mais également, et ce pour la première fois, de mettre en évidence une forme soluble de l'uranium dans les cellules. Nos résultats décrits sur des lignées cellulaires hépatiques et rénales sont en accord avec ceux obtenus au sein du laboratoire sur une lignée de cellules neuronales (Bensoussan 2009).

Discussion et Perspectives

Par ailleurs, nos résultats montrent que la formation des précipités est dépendante de la concentration d'uranium dans le milieu de culture ainsi que de la durée d'exposition. De plus, le seuil de précipitation de l'uranium diffère en fonction des cellules exposées à une même concentration d'uranium. Ceci suggère une influence soit du type cellulaire soit de la composition du milieu de culture sur la formation des précipités. On peut en effet noter que le milieu de culture des cellules HepG2, cellules pour lesquelles le nombre de précipités décrits est le plus important, est celui qui est le plus riche en phosphate de sodium. Cependant, pour ce qui concerne les cellules HEK-293, il est intéressant de noter que leur milieu de culture à la même concentration en phosphate de sodium que celui des IMR-32. Néanmoins, le nombre de précipités observés pour les cellules IMR-32 est plus important que pour les cellules HEK-293 (*voir article en annexe VI*). Ceci suggère que la composition du milieu, ou du moins, la teneur en phosphate, peut certainement influencer sur le nombre de précipités observés mais que ce n'est vraisemblablement pas le seul facteur.

L'uranium est présent sous forme soluble et précipitée dans les cellules

Quelques études se sont intéressées **au(x) mécanisme(s) d'entrée de l'uranium dans la cellule**. Celui de l'endocytose a récemment été décrit comme étant dépendant des clathrines (Muller 2002). Aucune donnée ne précise à l'heure actuelle si ce mécanisme d'entrée prend en charge la forme soluble ou précipitée de l'uranium.

Concernant l'hypothèse d'une voie d'entrée autre que l'endocytose, il a été décrit que l'uranium soluble rentre dans la cellule par l'intermédiaire d'une famille de transporteur particulier de type NaPi (Muller 2002).

Par ailleurs, au niveau plasmatique, l'uranium est capable de se lier à des macromolécules de type transferrine, albumine, metallothionéine ou encore ferritine (Michon et al. 2010; Montavon et al. 2009). L'uranium par la liaison à ce type de molécule pourrait entrer dans certaines structures. Ainsi, dans une étude montrant le passage de l'uranium dans les différents compartiments cérébraux, les auteurs suggèrent que le récepteur de la transferrine (TfR) ou les transporteurs 1 de des métaux divalents (DMT1) pourraient intervenir lors de ce passage. Aucun mécanisme impliquant ces derniers n'a cependant été mis en évidence (Fitsanakis et al. 2006).

Discussion et Perspectives

Il a également été montré que l'uranium est susceptible de moduler l'expression génique de protéines impliquées dans le transport de certains solutés ou qui contribuent à la fluidité des membranes comme ABCC8 ou ABCF2 respectivement impliquées dans les flux du potassium et du fer (Prat et al. 2005). Nous pourrions donc penser que l'uranium peut moduler l'expression de certains transporteurs qui le prendraient en charge ce qui faciliterait son entrée dans la cellule. Ce genre de mécanisme a déjà été décrit comme l'une des hypothèses de passage du cadmium à travers les cellules épithéliales apicales (Endo 2002).

Les résultats présentés dans ce manuscrit avec ceux présentés dans un travail de thèse réalisé au sein du laboratoire (Bensoussan 2009) sont les premiers à montrer la **présence de l'uranium soluble au niveau des noyaux cellulaires** et ce sur différents types de cellules : HepG2, HEK-293 et IMR-32. De plus, très récemment, une cinétique de localisation de l'uranium a été menée sur les cellules HepG2. Nos résultats montrent que très rapidement après l'exposition des cellules à une solution contenant de l'uranium (100 μM), ce dernier entre dans les cellules et s'accumule préférentiellement dans les noyaux (moins de 30 minutes). Dans les minutes qui suivent, des précipités d'uranium apparaissent dans le cytoplasme (moins de 60 minutes). Plusieurs hypothèses quant à leur apparition et leur localisation peuvent être faites. La première est que les cellules captent de l'uranium du milieu extérieur par endocytose et que celui-ci précipite dans les vésicules lysosomales au moment de l'acidification du milieu. La deuxième est que l'uranium précipite dans le milieu extérieur et que la cellule endocyte l'uranium sous forme précipitée. La troisième est qu'au moment de l'entrée de l'uranium dans les cellules, la majorité du composé pénètre dans les noyaux avant d'en ressortir et de se redistribuer dans la cellule. Un mécanisme encore inconnu induit alors sa précipitation.

Aucun élément ne nous permet pour l'instant de pencher pour l'une ou l'autre de ces hypothèses. Nos résultats sont en accord avec ceux d'une autre étude qui montre la présence d'autres métaux dans les compartiments cellulaires. Chez le cochon exposé au mercure à des concentrations environnementales hautes, une répartition majoritairement nucléaire du mercure et du sélénium dans le foie et le rein a en effet été montrée (Chen et al. 2006)

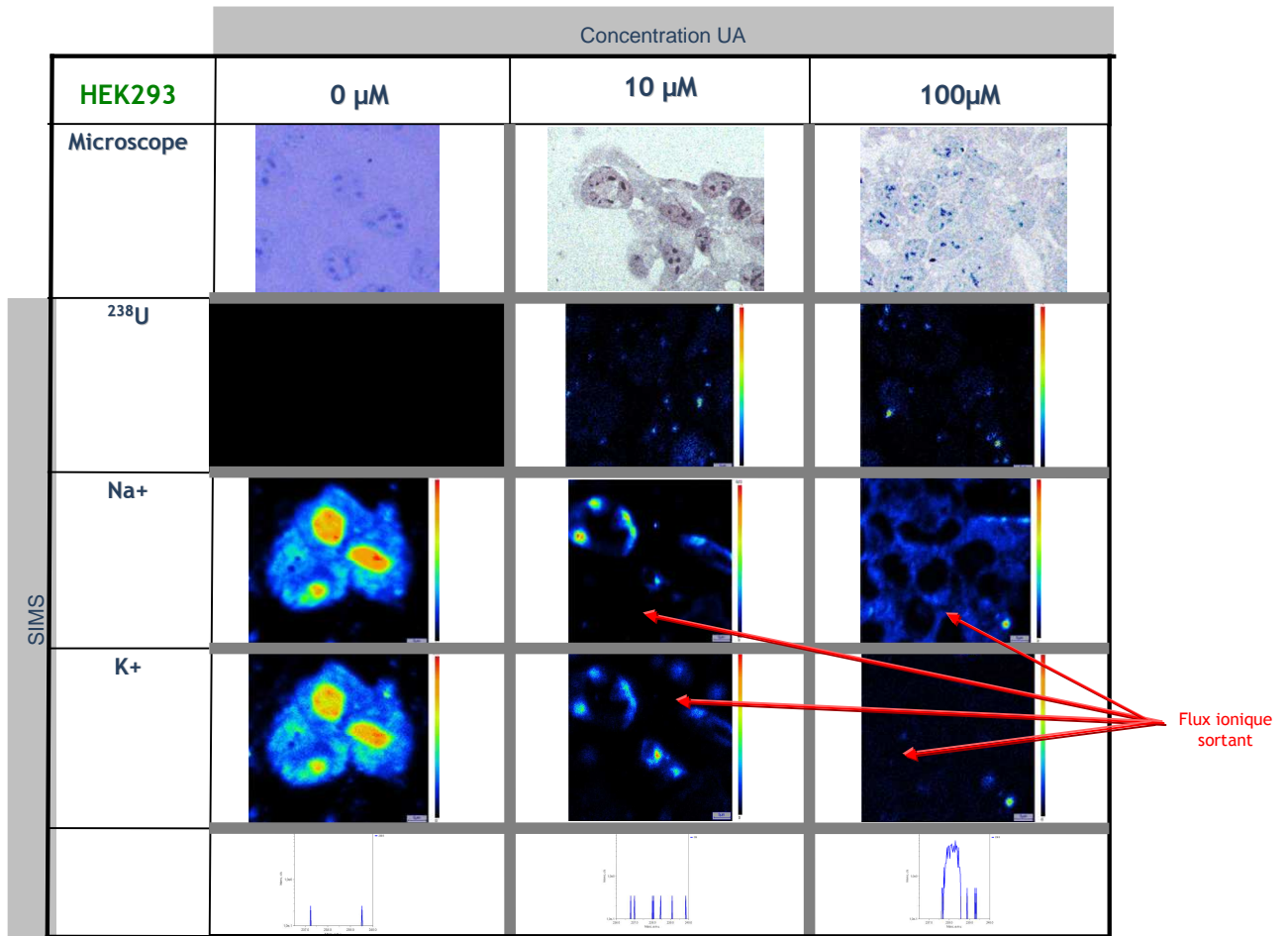


Figure 73 : Représentation des mouvements ioniques pour des cellules HEK293 exposées à des concentrations croissantes mais non cytotoxiques d'uranium.

Discussion et Perspectives

La présence de l'uranium au sein des cellules est susceptible d'engendrer un certain nombre de mécanismes de réponse ou de défense. La présence des métaux lourds au sein d'une cellule a en effet été associée à **des changements de distribution des éléments ioniques** avec principalement une augmentation du sodium et du chlore et à une diminution du potassium intracellulaire (Zierold 2000). Les auteurs suggèrent que les mouvements ioniques au niveau cellulaire seraient un indicateur prédictif et sensible de la viabilité cellulaire. Au cours de nos analyses SIMS, nous avons pu constater des mouvements ioniques sodium, potassium et calcium sortant de la cellule en fonction de la concentration d'uranium comparativement aux cellules témoins exposées au véhicule (bicar) (Figure 73). Des analyses complémentaires sont en cours afin de voir si les mouvements ioniques ne peuvent pas être influencés par la technique de fixation des cellules.

Par ailleurs, comme nous l'avons évoqué dans la partie résultat, **l'uranium induit une cytotoxicité** qui est dépendante de la durée et de la concentration d'exposition ainsi que de la présence ou non de SVF. Des incertitudes demeurent quant au mode d'action cytotoxique de l'uranium. Une partie des mécanismes induisant la mort cellulaire est liée à la présence de radicaux libres de l'oxygène (Miller et al. 2004; Periyakaruppan et al. 2007; Pourahmad et al. 2006). Le lien direct entre la cytotoxicité induite et la présence de précipités d'uranium dans les cellules restent à établir mais il apparaît qu'à concentration cytotoxique, l'uranium dans les cellules est principalement sous forme précipitée.

Les effets décrits ci-dessus sur les perturbations ioniques peuvent également aboutir à la mort de cellules rénales (NRK-52e) avec notamment la chute du potentiel membranaire mitochondrial et l'activation des caspases 3 et 9 (Thiebault et al. 2007). Par ailleurs, une publication plus ancienne avait montré qu'une injection intrapéritoineale de nitrate d'uranyle chez le rat provoquait une importante accumulation de calcium dans les mitochondries des cellules rénales. D'après les auteurs, ceci pourrait entraîner la mort des cellules (Carafoli et al. 1971).

Une autre hypothèse à envisager tient compte des propriétés génotoxiques de l'uranium. En effet, l'uranium présent dans les noyaux, et donc proche de l'ADN, est susceptible d'être à l'origine des dommages à l'ADN observés dans d'autres études, provoquant ainsi la mort cellulaire (Darolles et al. 2010; Thiebault et al. 2007).

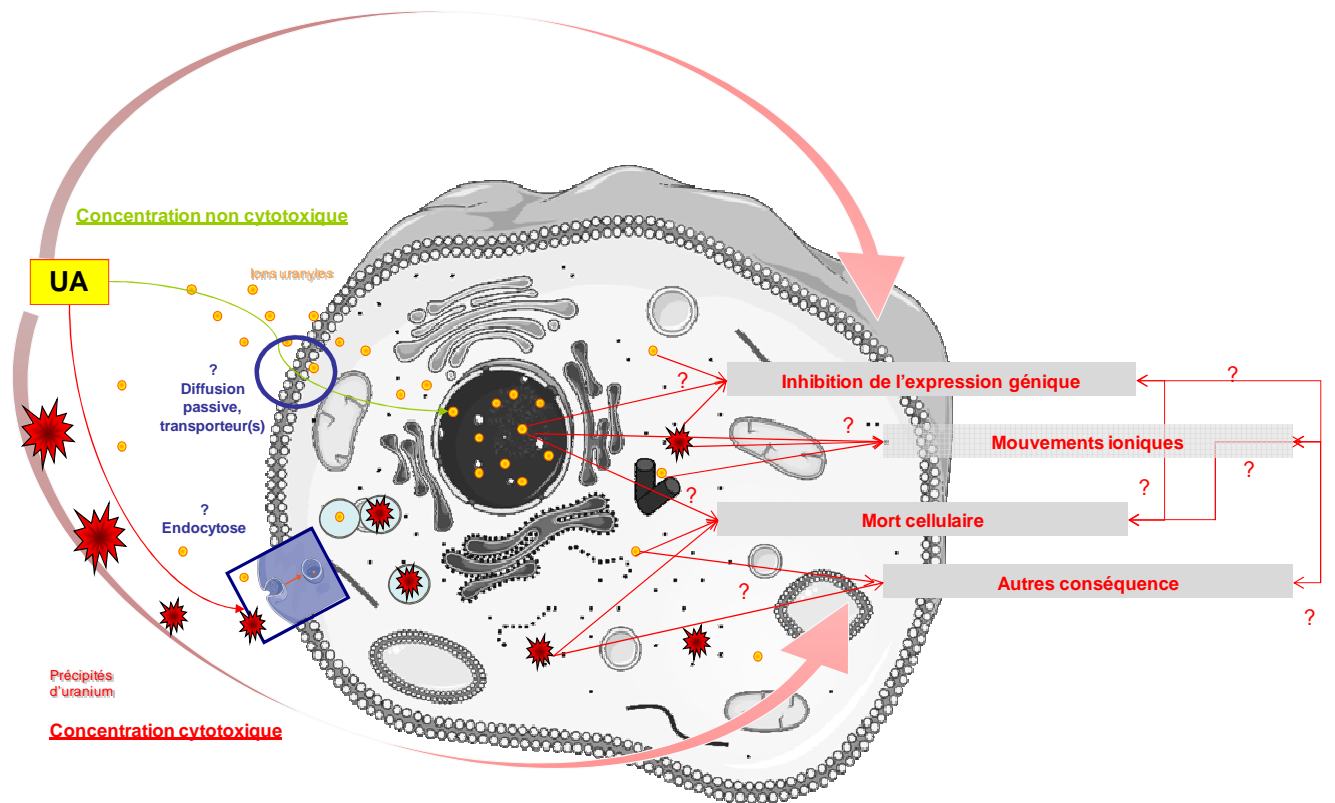


Figure 74 : Représentation des hypothèses d'action de l'uranium sur les cellules

Discussion et Perspectives

Enfin, d'après les résultats relatifs aux EMXs, la co-exposition de l'uranium avec un inducteur enzymatique peut, dans des conditions de toxicité, induire **l'inhibition de l'effet inducteur**. Ceci suggère deux hypothèses.

La première est liée à la présence de précipités dans le cytoplasme des cellules. En effet, selon nos résultats *in vitro*, l'effet inhibiteur apparaît à une concentration où une partie de l'uranium est sous forme précipité dans la cellule. Il est probable que la présence de ces précipités perturbe les fonctions cytosoliques (dont celle de la synthèse protéique) de part leur taille. Cette hypothèse ne peut cependant pas expliquer à elle seule l'effet inhibiteur observé sur l'expression génique.

La seconde hypothèse est liée à la présence de l'uranium soluble dans les noyaux. Il est en effet envisageable que l'uranium se fixe sur certains co-activateurs nucléaires de la transcription induits par la présence d'un inducteur enzymatique. On sait en effet que l'uranium se fixe sur les groupements phosphates. Nous pouvons donc penser que ce dernier interagirait avec les phosphatases et les kinases intervenant dans la régulation de la transcription génique (Figure 72). Il est également possible que l'uranium interagisse avec l'ADN au moment de la transcription. Ces deux mécanismes seraient à l'origine d'une inhibition de la synthèse des EMXs. Compte tenu de nos résultats, nous pouvons penser qu'en condition de non cytotoxicité, les effets de l'uranium seraient maîtrisés par un mécanisme de régulation encore inconnu mais qu'en condition de cytotoxicité, ce mécanisme ne fonctionnerait plus.

La figure 74 représente des hypothèses d'action de l'uranium sur la cellule.

En conclusion, nos résultats montrent que l'uranium entre dans les cellules sous forme soluble dès les premières minutes d'exposition. Sous cette forme, il se localise préférentiellement dans les noyaux. Dans un second temps, des précipités d'uranium se forment dans le compartiment cytoplasmique. L'exposition à l'uranium induit une cytotoxicité par des mécanismes restant encore méconnus. Néanmoins, la présence de l'uranium dans les cellules est vraisemblablement liée à l'apparition d'un déséquilibre ionique, de dommages à l'ADN et de perturbation de l'expression génique de certaines protéines dont les EMXs.

Discussion et Perspectives

A court terme, l'entrée de l'uranium dans la cellule durant les 30 premières minutes d'exposition sera étudiée. De plus, il serait intéressant de coupler les analyses SIMS avec une étude ayant pour but d'inhiber certains transporteurs (dont ceux de la famille des NaPi) afin d'évaluer par quel mécanisme l'uranium pénètre dans la cellule. Par ailleurs, l'ensemble des résultats obtenus pourra être corrélé à des tests de cytotoxicité et nous permettra ainsi de conclure sur le rôle de la forme soluble de l'uranium dans la mortalité cellulaire.

A moyen terme, il sera également intéressant de comparer les résultats obtenus après fixation des cellules au glutaraldéhyde avec ceux que nous obtiendrions par cryo-fixation. En effet, dans l'état actuel des choses, nous ne pouvons pas conclure avec certitude sur l'impact de l'exposition à l'uranium sur l'équilibre ionique au sein de la cellule et donc aux effets cellulaires qui en découlent (dont la cytotoxicité).

L'étude approfondie des mécanismes de mort cellulaire sera également entreprise afin de distinguer si cette dernière est consécutive à des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose et/ou la nécrose. De même, il sera intéressant d'estimer l'impact du stress oxydant induit par l'uranium sur la viabilité cellulaire. L'étude de certains facteurs pro- et anti-oxydants à l'échelle cellulaire sera réalisée au cours d'une thèse qui débutera très prochainement au laboratoire. L'étude d'autres biomarqueurs de toxicité cellulaire (transaminases, KIM-1, ostéopontine ou autre) pourrait être réalisée afin de compléter les données de mort cellulaire par des marqueurs plus sensibles de la souffrance cellulaire.

Par ailleurs, il sera intéressant de comprendre par quel(s) mécanisme(s) (récepteurs nucléaires, co-activateur transcriptionnel, inhibition de la transcription ou autre), les signaux liés à la mort de la cellule sont susceptibles d'induire une inhibition de l'induction des EMXs pour les cellules co-exposées à l'uranium.

A moyen terme, des études pourront être entreprises afin de comparer la localisation de l'uranium avec celle d'autres métaux lourds (plomb et cadmium) en utilisant la technique SIMS. Ceci permettra de conclure si la localisation nucléaire à l'échelle de la cellule est spécifique de l'uranium ou si cela est une propriété commune à d'autres métaux lourds.

Discussion et Perspectives

Conclusion générale

Discussion et Perspectives

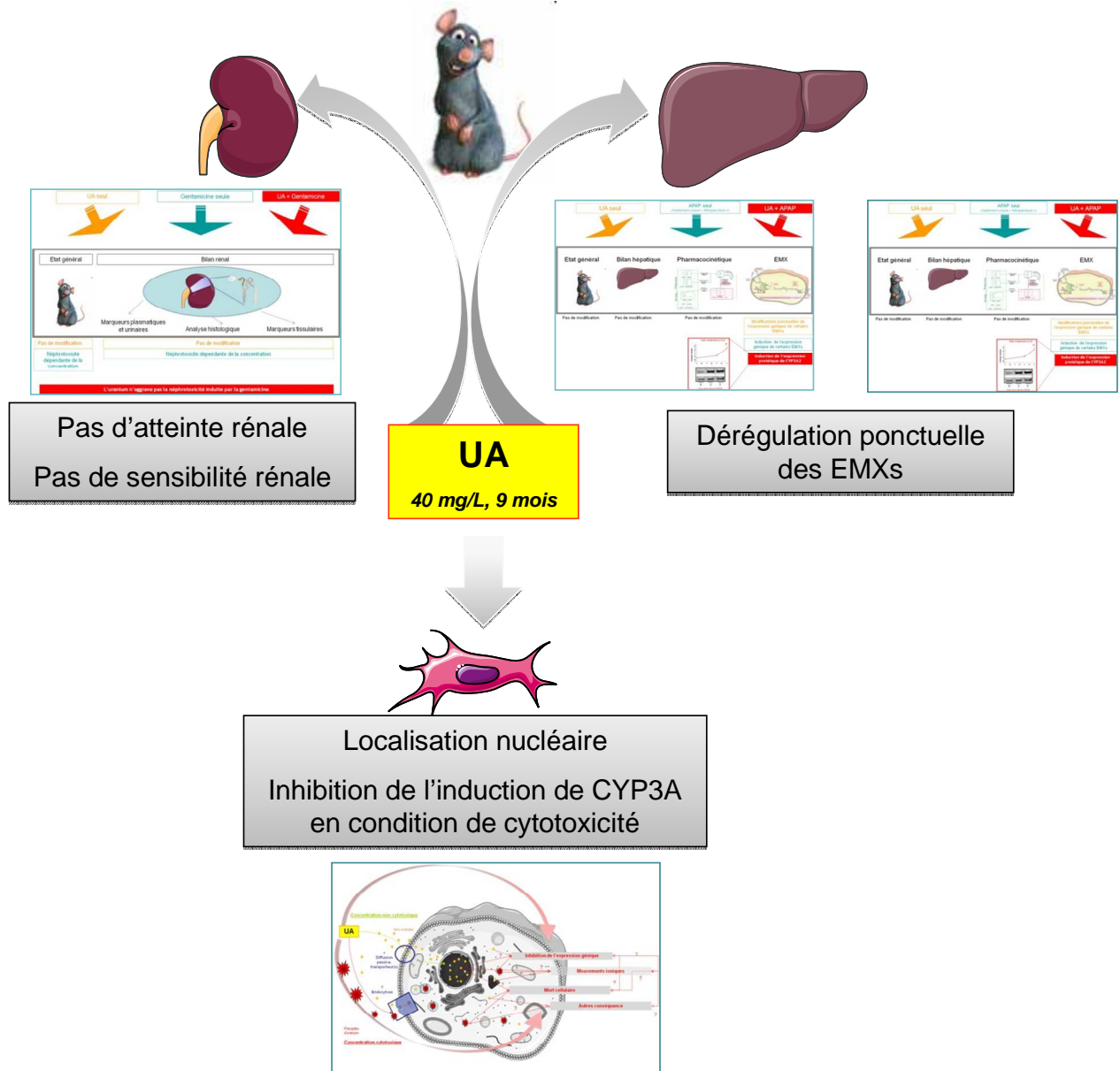


Figure 75 : Représentation du résumé des résultats obtenus

La **figure 75** représente l'ensemble des résultats obtenus dans ce travail de thèse.

Ce travail montre qu'une contamination chronique à l'uranium administré chez le rat *per os* à des concentrations environnementales (40 mg/L, 9mois):

- N'induit pas néphrotoxicité ou de sensibilité rénale
- Induit des modifications ponctuelles de l'expression génique des EMXs par des mécanismes complexes probablement liés à l'adaptation de l'organisme face à la contamination
- Ne modifie la pharmacocinétique d'un médicament que lorsqu'il est administré à une concentration toxique

L'approche *in vitro* montre que l'uranium :

- Est présent dans les cellules sous forme précipitée et soluble
- N'induit une inhibition des CYPs que lorsque les cellules sont soumises à l'action d'un inducteur enzymatique et dans des conditions de cytotoxicité.

Quelque soit le modèle expérimental, l'exposition à l'uranium n'induit pas de modification de l'état général des animaux. L'accumulation de l'uranium dans les organes de détoxification (le foie et le rein) est dépendante de la durée et de la concentration d'exposition.

Concernant le rein, la contamination à l'uranium n'induit aucun des marqueurs de toxicité rénale étudiés (plasmatique, urinaire et/ou tissulaire). Pour la première fois, nous montrons également que l'uranium n'induit pas de sensibilité accrue du rein suite à une toxicité rénale induite par la gentamicine.

Les effets de l'uranium à différentes doses supérieures à celles étudiées seront prochainement évalués afin de mieux estimer le risque d'une exposition à l'uranium sur les fonctions rénales. Par ailleurs, dans le but de répondre à une problématique d'exposition chronique dans un contexte de multi-pollutions, une contamination chronique à l'uranium et à un autre néphrotoxique (tel que le cadmium) apporterait des résultats complémentaires à ceux obtenus avec la gentamicine.

Discussion et Perspectives

Concernant le foie, l'exposition à l'uranium seul n'induit pas d'hépatotoxicité sévère. Elle est cependant responsable de variations ponctuelles de l'expression génique de certaines EMXs, et particulièrement de CYP3A. Ces variations ne sont pas corrélées avec des modifications des taux protéiques ou des activités enzymatiques. En cas de traitement des rats au paracétamol, l'uranium n'est responsable de modification de son métabolisme que lorsque ce dernier est administré à une dose toxique. L'approche *in vitro* réalisée en parallèle tend à montrer que l'uranium agit sur les EMXs *via* des mécanismes complexes. En effet, les modifications de l'expression génique des EMXs observées *in vivo* semblent liées à des phénomènes d'adaptation de l'organisme face à l'exposition à l'uranium. Elles sont ponctuelles puisque certainement dépendantes d'un équilibre instable des mécanismes de régulation tentant de maintenir l'homéostasie de l'organisme entier. Par ailleurs, les résultats obtenus *in vitro*, montrent pour la première fois, que l'uranium est susceptible d'agir de manière directe sur une cible cellulaire intervenant dans la régulation de l'expression génique des EMXs. Cette action est cependant dépendante d'une co-exposition de la cellule à un inducteur enzymatique et d'une condition de cytotoxicité. Cet effet « direct » de l'uranium n'est pour l'instant pas démontré mais est renforcé par l'observation d'uranium dans la cellule. En effet, l'utilisation du SIMS nous a permis de cartographier une localisation cellulaire et nucléaire de l'uranium sous sa forme précipitée mais également soluble. Ceci renforce l'hypothèse que ce dernier pourrait interagir avec des mécanismes impliqués dans la transcription génique au niveau nucléaire ou cytoplasmique et en provoquer un dysfonctionnement.

Ces résultats ouvrent des pistes de recherche diverses autant sur la compréhension des mécanismes d'entrée de l'uranium dans la cellule que sur ceux impliqués dans la régulation de l'expression des EMXs. Il serait ainsi intéressant de développer des études mécanistiques plus fondamentales afin de mieux comprendre l'interaction de l'uranium à l'échelle cellulaire sur les différents acteurs impliqués dans ces mécanismes d'entrée, dans la régulation d'expression génique et dans l'induction de la cytotoxicité.

Valorisations

Publications

A Publiées

Acetaminophen induces xenobiotic-metabolizing enzymes in rat: impact of a uranium chronic exposure. C. Rouas, M. Souidi, L. Grandcolas, S. Grison, C. Baudelin, P. Gourmelon, M. Pallardy et Y. Gueguen. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28 (2009) 363-369.

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

Effect of nephrotoxic treatment with gentamicin on rats chronically exposed to uranium. C. Rouas, J. Stefani, S. Grison, L. Grandcolas, C. Baudelin, I. Dublineau, M. Pallardy et Y. Gueguen. *Toxicology*, *sous presse*

B En cours de révision ou de rédaction

Distribution of soluble uranium in the nuclear cell compartment at subtoxic concentration C. Rouas, H. Bensoussan, D. Suhard, C. Tessier, L. Grandcolas, F. Rebière, I. Dublineau, M. Taouis, M. Pallardy, P. Lestaevel et Y. Gueguen. *Chemical Research in Toxicology*, *en révision*

Les néphrotoxicités induites par des xénobiotiques : causes, conséquences et outils d'évaluation. C. Rouas, F. Leblond et Y. Gueguen. *Thérapie*, *en rédaction*

Effects of uranium on the CYP3A expression *in vitro*. C. Rouas, L. Grandcolas, I. Dublineau, Y. Gueguen, *en préparation*

Communications

A Affichées

Localisation de l'uranium au niveau cellulaire par la technique d'imagerie SIMS : cas des HepG2. Congrès SPTC 2010, Paris, France, mai 2010

Effects of uranium on viability of human liver and kidney cells. Congrès EUROTOX 2009, Dresden, Allemagne, Septembre 2009

Cytotoxicité de l'uranium sur des cellules hépatiques et rénales d'origine humaine. Journée de l'école doctorale « Innovation Thérapeutique », Châtenay-Malabry (92), Mai 2009

Effects of an acetaminophen administration on xenobiotic-metabolizing enzymes time-course expression in rats chronically contaminated with uranium. Congrès Microsomes and Drug Oxidation, Saratoga Springs, Etats-Unis. Juillet 2008

Effets d'une contamination à l'uranium sur la cinétique d'induction des enzymes du métabolisme des xénobiotiques due à un traitement au paracétamol Journée de l'école doctorale « Innovation Thérapeutique », Châtenay-Malabry (92), Mai 2008

B Orales

Etude des mécanismes mis en jeu lors d'une exposition par l'uranium appauvri sur le métabolisme des médicaments in vivo et in vitro. Journées des thèses de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Arles (13), Septembre 2010

Etude des mécanismes mis en jeu lors d'une exposition par l'uranium appauvri sur le métabolisme des médicaments in vivo et in vitro. Séminaires de la Radiobiologie et de la Radioprotection (92), Septembre 2010

Effet d'un traitement néphrotoxique par la gentamicine sur des rats exposés à long terme à l'uranium. Journée de l'école doctorale « Innovation Thérapeutique Orsay (92), Mai 2010

Etude des mécanismes mis en jeu lors d'une exposition par l'uranium appauvri sur le métabolisme des médicaments in vivo et in vitro. Journées des thèses de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Aussois (73), Septembre 2009

Effets d'une contamination chronique à l'uranium sur la cinétique du métabolisme du paracétamol après une administration unique chez le rat. Journées des thèses de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Vogüé (07). Octobre 2008

Annexes

Annexes

Annexe I : Revues et articles

I a : Revue, Uranium : propriétés et effets biologiques après contamination interne

I b : Revue, Les néphrotoxicités induites par des xénobiotiques : causes, conséquences et outils d'évaluation

I c : Article, Effect of nephrotoxic treatment with gentamicin on rats chronically exposed to uranium

I d : Article, Acetaminophen induces xenobiotic-metabolizing enzymes in rat : impact of a uranium chronic exposure

I e : Article, Distribution of soluble uranium in the nuclear cell compartment at subtoxic concentration

Annexe II : Fiches produits

Annexes

Annexe I a : Uranium : propriétés et effets biologiques après contamination interne

Annexes

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 fissile 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 µg d'uranium (sous forme d'uranyl) dans l'alimentation et à 1,5 µg 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 ⁴	48,2
²³⁵ U	0,7 milliard d'années	0,72	5,8.10 ⁵	2,3
²³⁴ U	0,25 million d'années	5,40.10 ⁻⁵	12,5.10 ⁷	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

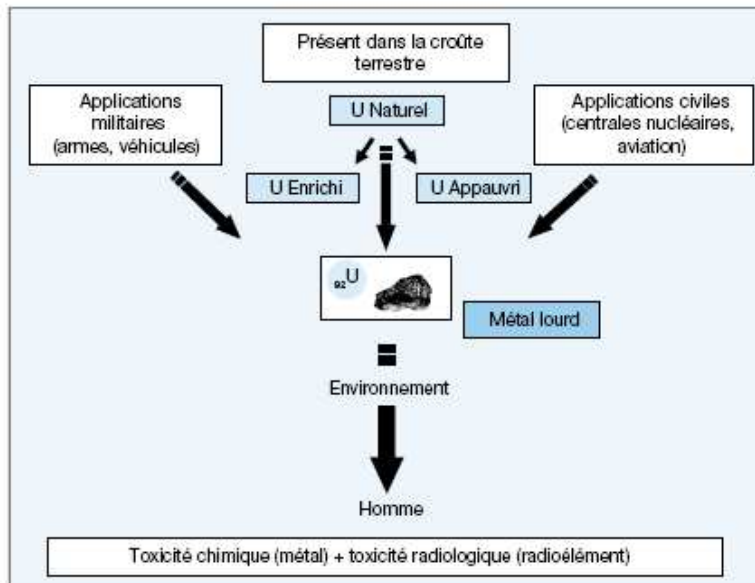


Figure 1. Sources d'exposition à l'uranium : origine naturelle et activité humaine.

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

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 . A 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

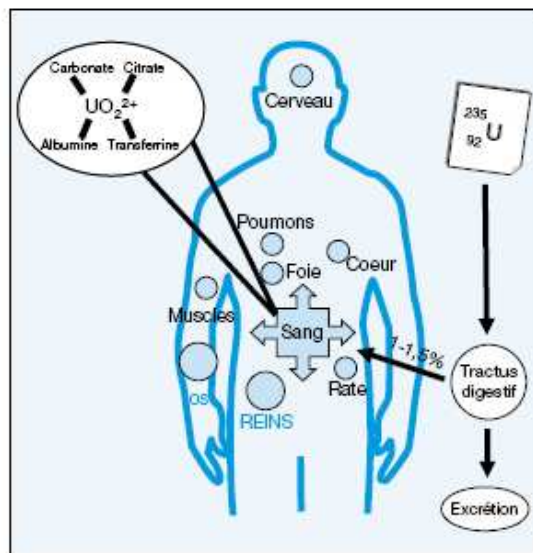


Figure 2. Distribution de l'uranium dans l'organisme.

revue générale

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 radio-nucléide.

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	Tissandé <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> 1988
	Données animales	2 mg d'U/kg de poids corporel (injection intrapéritonéale)	Inhibition formation osseuse	Giuglielmotti <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	Lestavel <i>et al.</i> 2005b
Reproduction	Données animales	Implants sous-cutanés contenant 99,25% d'U	Modifications de l'électrophysiologie de l'hippocampe	Pelmar <i>et al.</i> 1998b
		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	Palemain <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	Guéguen <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	Dubineau <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

revue générale

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, Lobet *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 trans-cellulaire 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 comète 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-

revue générale

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
		40 mg d'U/l d'eau de boisson	Atteintes tubulaires
		40 mg d'U/l d'eau de boisson	Modifications du métabolisme de la vitamine D
	Données humaines	2 à 781 g d'U/l d'eau de boisson	Atteintes tubulaires
		28 g d'U/l d'eau de boisson	Atteintes tubulaires
		0,71, 16,6 ou 14,7 g d'U/l d'eau de boisson	Atteintes tubulaires
Os	Données animales	0,125 mg de U/kg de poids corporel pendant 30 jours (implantation sous-cutanée)	Inhibition formation osseuse
	Données humaines	27 g d'U/l d'eau de boisson	Augmentation turnover osseux
Foie	Données animales	1 à 9 mg d'U/kg de poids corporel/jour dans eau de boisson pendant 4 semaines	Atteinte fonction hépatique
		0,96 à 600 mg d'U/l d'eau de boisson pendant 91 jours	Lésions histologiques
		40 mg d'U/l d'eau de boisson	Modifications du métabolisme des xénobiotiques
Système nerveux central	Données animales	40 mg d'U/l d'eau de boisson	Modification comportement
		40 mg d'U/l d'eau de boisson	Augmentation sommeil paradoxal
	Données humaines	Soldats exposés à U à partir de fragments d'obus	Perturbation neurotransmission
Gonades	Données animales	40 mg d'U/l d'eau de boisson	Déficits neurocognitifs
		0,5 à 60 g U/l d'eau de boisson	Augmentation testostérone
			Modification de la maturation folliculaire ovarienne

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 (téllopeptide 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 prépondérants 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 émis 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

revue générale

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.
- Madić 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, Kurtio 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.
- Hakanson-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. *Etelä-Suomen Kallioporakaivojen uraani- ja radon- näikmukset (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 Medter 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.
- Saucia 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.

revue générale

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, Tomás 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, Pamer 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, Avosean 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, Dobyson 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. Tissandière 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. Lestaevél P, Houpert P, Bussy C, Dhieux B, Goumélon 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, Fuciere AF, Ejnåk JW, et al. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci* 1999; 49 : 29-39.
53. Barber DS, Ehrlich 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. Lemerrier V, Millot X, Ansoberlo 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. Passanen 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, Donnadiéu-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, Rasmakrishnan 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, Saylor 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 Yi 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 transport 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, Gleis M, Weise A, *et al.* Uranyl nitrotriacetate, a stabilized salt of uranium, is genotoxic in nontransformed human colon adenoma cell line LT97. *Toxicol Sci* 2006 ; 93 : 286-97.
79. Mao Y, Desneuxes 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. Kurtio P, Auvinen A, Salonen L, *et al.* Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 2002 ; 110 : 337-42.
82. Kurtio 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. Donnadiéu-Claraz M, Bonnehorngne M, Dhieux B, *et al.* Chronic exposure to uranium leads to iron accumulation in rat kidney cells. *Radiat Res* 2007 ; 167 : 454-64.
85. Tissandé 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. Tissandé 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, Lestaevl 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, Lestaevl 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. Lestaevl 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, Bellés 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

revue générale

- 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, Ansoberlo E, Henge-Napoli MH, Donnadiu-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 : 145-51.
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. Vaequier 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. Carnignani 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.

Annexe I b : Les néphrotoxicités induites par des xénobiotiques : causes, conséquences et outils d'évaluation

Revue visée : Thérapie

Caroline ROUAS*, François Leblond ¹ et Yann Guéguen*

* : Institut de RadioProtection et de Sûreté Nucléaire, Direction de la Radioprotection de l'Homme, Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale, BP17, F-92262 Fontenay-aux-Roses, France

¹ : Centre de Recherche, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Laboratoire de néphro-pharmacologie , 5415 Boul de l'Assomption, Montréal, Qc, Canada

Annexes

2 Classement des atteintes rénales constatées en clinique

2.1 Résumé des données d'épidémiologie des atteintes rénales

Les études épidémiologiques récentes démontrent la grande variabilité des étiologies et des facteurs de risque associés. L'incidence des déficiences rénales et la mortalité associée varie selon le type de patients (âge, sexe), le pays (pays développés ou en voie de développement) et est plus faible dans la population générale que chez les patients admis à l'hôpital. Globalement une augmentation de l'incidence mondiale est observée et elle conduit à une mortalité élevée (Hilton 2006; Cerda, Lameire et al. 2008)

Quelques dizaines de cas de déficience rénale aiguë pour les adultes de moins de 50 ans; à quelques centaines de cas, pour les adultes de 80-89 ans, par million et par an sont observées dans la population générale (Hilton 2006). L'incidence observée dans d'autres études réalisées en Angleterre, en Espagne aux Etats-Unis ou en France est comparable (Kleinknecht, Antignac et al. 1990; Kaufman, Dhakal et al. 1991; Feest, Round et al. 1993; Liano and Pascual 1996)

D'autre part, d'après des études sur la population générale en Europe, la prévalence des atteintes rénales serait de 5 à 7% pour les stades 1 et 2 (microalbuminurie et variation modéré de la filtration glomérulaire) de la déficience rénale chronique (de Jong, van der Velde et al. 2008)(de Jong et al, 2008)(Fig ou tableau). Ces prévalences sont similaires aux données obtenues au Etats-Unis qui montrent que 6,3 % de la population est au stade 1 ou 2 de déficience rénale chronique (Johnson, Levey et al. 2004)

Moins de 1 % des admissions à l'hôpital seraient due à une insuffisance rénale (Kaufman, Dhakal et al. 1991; Liano and Pascual 1996). Toutefois, selon les populations étudiés et les critères retenus, 1 à 25 % des patients hospitalisés en soins intensifs développent une pathologie rénale. Dans ces conditions, la mortalité peut aller de 28 à 90 % (Bellomo, Ronco et al. 2004)

2.2 Critères officiels de classification des atteintes rénales

Jusqu'à récemment, il n'y avait pas de consensus pour les critères de diagnostics ou la définition clinique de la déficience rénale. De nombreux termes, comprenant la déficience rénale, l'insuffisance rénale, la lésion rénale ou l'atteinte rénale avec diverses définitions qui ont été utilisées jusqu'à présent

Il est primordial de faire la distinction entre déficience rénale aiguë ou chronique, étant donné que la démarche de prise en charge de ces patients diffère grandement. Les facteurs suggérant une chronicité sont généralement des symptômes de longue durée, l'absence de maladie aiguë, une anémie monocyttaire et monochrome, une hyperphosphatémie, hypercalcémie voire une atrophie rénale.

La déficience rénale chronique est définie par la présence de lésion rénale ou une diminution de la fonction rénale, évaluée par le débit de filtration glomérulaire et l'albuminurie (Tableau

1), pendant au moins 3 mois alors qu'une atteinte aigue sera définie par les mêmes critères mais avec une survenue de moins de 3 mois (Johnson, Levey et al. 2004; Mehta, Kellum et al. 2007).

[Tableau 1 : Les cinq stades de déficience rénale chronique selon le débit de filtration glomérulaire (DFG) et la présence d'une albuminurie élevée]

Stade	Description	DFG (ml/min/1,73 m ³)	Albuminurie élevée
1	DFG normal ou augmenté	≥ 90	Oui
2	Limitée	60 à 89	Oui
3	Modérée	30 à 59	Oui/non
4	Sévère	15 à 29	Oui/non
5	Terminale	< 15	Oui/non

Depuis 2004, une nouvelle classification (Figure 1) a été mise en place pour les déficiences rénales aiguës, identifié par l'acronyme RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss of kidney function, End-stage kidney disease) (Bellomo, Ronco et al. 2004). Plus récemment, ces critères ont été modifiés par une classification remplaçant les termes de risque, lésion et insuffisance par une graduation de 1 à 3. Les niveaux suivants (perte de fonction, pathologie) étant supprimés et restant uniquement en tant que conséquence clinique (Mehta, Kellum et al. 2007).

Ces critères ont été développés pour standardiser le diagnostic de la déficience rénale. Ainsi, ce système permet de regrouper l'ensemble des déficiences rénales, incluant les lésions moins sévères qui ne sont pas nécessairement des atteintes structurelles mais également des atteintes fonctionnelles.

L'objectif est ainsi de faciliter la comparaison des conséquences entre les études, développer un système de pronostique, interpréter les stratégies thérapeutiques mises en place et concevoir des études multicentriques.

Dés lors, un certain nombre d'études épidémiologiques ont montré l'utilité et les limites de ces critères pour détecter et classer les déficiences rénales selon leur sévérité (Bellomo, Kellum et al. 2004; Ricci, Cruz et al. 2008). Les recherches futures devraient permettre de préciser quels types d'interventions médicales devraient être mises en place selon le niveau d'atteinte. Dans cette perspective, les nouveaux biomarqueurs seront utiles et pourront compléter les critères cliniques de la classification RIFLE.

	DFG	Excrétion urinaire
Risque	Augmentation de la créatinine x1,5 ou DFG diminuée > 25%	< 0,5 ml / kg / h x 6 h
Lésion	Augmentation de la créatinine x2 ou DFG diminuée > 50%	< 0,5 ml / kg / h x 12 h
Insuffisance	Augmentation de la créatinine x3 ou DFG diminuée > 75%	< 0,3 ml / kg / h x 24 h ou anurie x 12h
Déficience	Déficience rénale persistante = perte complète de fonction > 4 semaines	
Pathologie	Pathologie rénale irréversible	

[Figure 1 : Les classifications des atteintes rénales selon les critères RIFLE]

3 Principaux mécanismes des néphrotoxicités induites par des xénobiotiques

La plupart des néphrotoxicités induites sont rapportées comme étant consécutive à un traitement médicamenteux et certaines substances (aminosides, AINS, Rifampicine, Indinavir, ...) sont couramment citées comme modèle de néphrotoxicité. Néanmoins, de très nombreuses autres substances possèdent des propriétés néphrotoxiques et l'Homme y est journalièrement potentiellement exposé (Werner, Costa et al. 1995; Cooper 2006; Bohatyrewicz, Urasinska et al. 2007; Bacchetta, Dubourg et al. 2009). Pour certaines substances (venins de méduse, médecine chinoise, champignon...), seulement quelques cas cliniques ont été rapportés et les mécanismes de l'induction de l'atteinte rénale ne sont pas aujourd'hui complètement connus. Il est néanmoins important de ne pas les négliger en tant que substance néphrotoxique.

Même si les atteintes rénales peuvent être classées en fonction du type de structure touchée ou du mécanisme mis en œuvre, chaque molécule est susceptible d'induire une néphrotoxicité par un mécanisme qui lui est propre. La figure 2 illustre la grande variabilité des substances néphrotoxiques ainsi que leur(s) cible(s) réciproque.

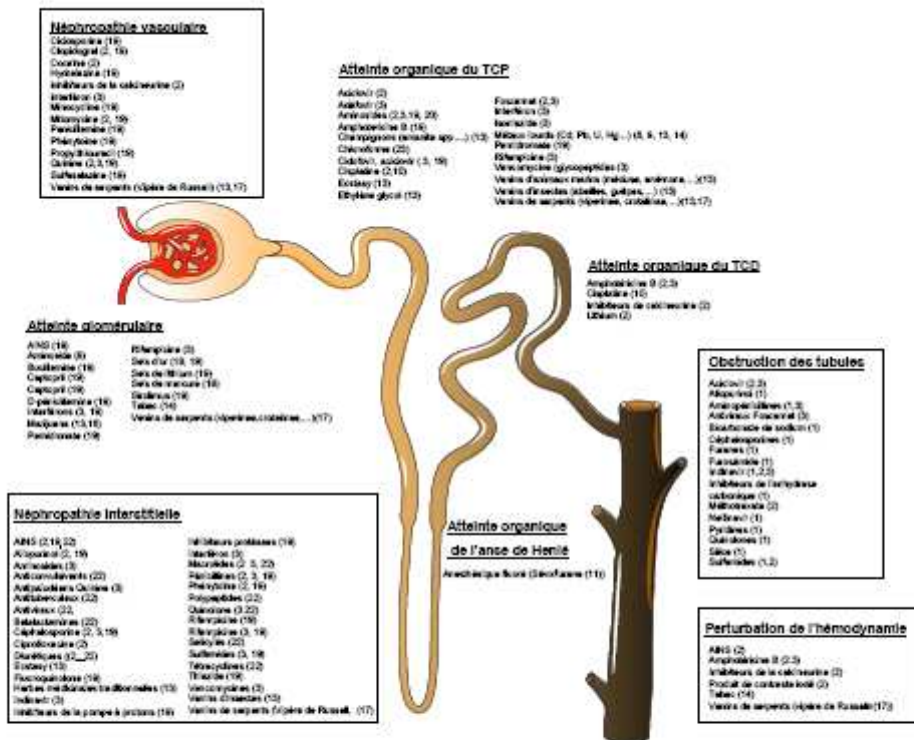


Figure 2 : Exemple de substances associées avec des atteintes rénales : sites et mécanismes d'atteinte.

Dans cette revue, seuls quelques exemples représentatifs de xénobiotiques néphrotoxiques seront développés pour chaque type d'atteinte.

3.1 Les néphropathies pré-rénales

Ces atteintes représentent 25 % des IRA

3.1.1. Atteinte fonctionnelle

L'insuffisance rénale est dite fonctionnelle lorsqu'elle touche un rein sain mis dans des conditions d'hypoperfusion. L'autorégulation de la filtration glomérulaire est indépendante du débit sanguin rénal mais fixée par les modifications des résistances artériolaires pré et postglomérulaires via le système rénine-angiotensine. L'IRF peut être provoquée par une diminution du flux sanguin rénal secondaire à un dérèglement de la balance entre les signaux vasoconstricteurs et vasodilatateurs.

L'IRF est généralement réversible si l'hypoperfusion rénale est corrigée. Aucune lésion histologique n'y est associée si le xénobiotique responsable est arrêté rapidement. Elle est le plus souvent associée à une oligurie.

Les signes biologiques permettant de distinguer une IRF sont une augmentation de l'urée et de la créatinine plasmatique et un rapport sodium/potassium urinaire inférieur à 1 (contrairement à l'atteinte organique).

Les anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS) induisent une insuffisance rénale aigue fonctionnelle du fait qu'ils inhibent la synthèse des prostaglandines. Ce déficit conduit à une prédominance des forces vasoconstrictrices notamment au niveau du glomérule et à une diminution de la filtration glomérulaire. Rapidement, une augmentation de l'urée et de la créatinine plasmatique est observée (John and Herzenberg 2009).

3.1.2. Néphropathies vasculaires

Les néphropathies vasculaires sont un ensemble de maladies qui atteignent les reins par l'intermédiaire de lésions artérielles. Elles sont souvent caractérisées par l'apparition ou l'aggravation d'une hypertension, l'installation d'une insuffisance rénale avec une absence de protéinurie et de leucocyturie.

En cas de nécrose ou d'inflammation des artéioles et des capillaires glomérulaires, des myalgies et de la fièvre sont associés à une augmentation de la créatininémie et de la LDH plasmatique. Les médicaments souvent impliqués sont les propylthiouracil, hydralazine, sulfasalazine, etc.

Les néphropathies vasculaires peuvent être également liées à des microangiopathies thrombotiques. Dans ce cas, on observe une fièvre, une oligo-anurie, une hypertension artérielle ainsi que des troubles neurologiques. Les signes biologiques sont ceux d'une anémie hémolytique mécanique (présence de schizocyte, diminution de l'haptoglobine), d'une thrombopénie avec augmentation de la LDH plasmatique et d'une insuffisance rénale souvent oligo-anurique. Ce type d'atteinte peut être provoqué par la quinine, la ciclosporine ou encore le clopidogrel.

Les mécanismes de ces atteintes sont divers et restent souvent mal connus. En effet, les néphropathies vasculaires liées à l'exposition à un xénobiotique peuvent être la conséquence d'une toxicité directe sur les cellules endothéliales, d'une action procoagulante de la substance ou de la formation d'anticorps auto-immuns dirigés contre les cellules endothéliales (John and Herzenberg 2009; Karie, Launay-Vacher et al. 2010).

3.2 Les néphropathies rénales

Ces atteintes représentent 65 % des IRA

Ce type de néphrotoxicité est directement lié à l'interaction d'une substance endogène ou exogène avec une structure rénale (glomérulaire, tubulaire, interstitielle ou vasculaire). Elle est généralement dose-dépendante et cumulative. Dans la plupart des cas, ce type d'atteinte est réversible à l'arrêt de l'exposition au toxique mais dans certaines situations, la néphropathie aiguë peut évoluer vers une néphropathie chronique.

La figure 3 illustre le rôle de chaque structure dans les échanges entre le sang et les urines, en condition physiologique.

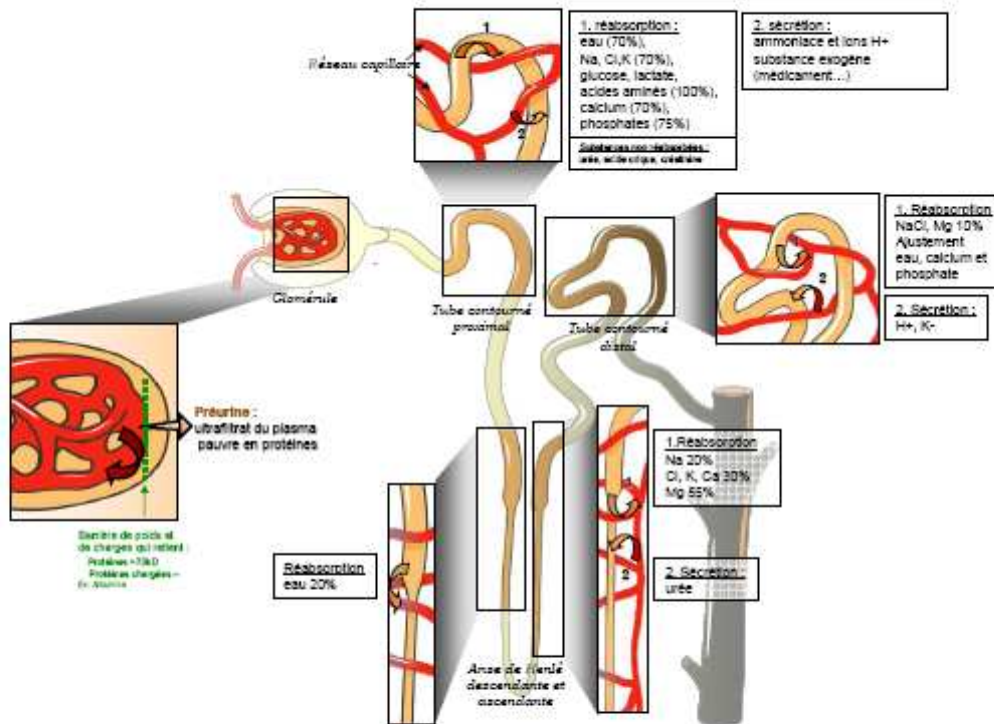


Figure 3 : Schéma des mécanismes de filtration, réabsorption et sécrétion nécessaire à la formation des urines à l'échelle d'un néphron.

3.2.1. Atteinte glomérulaire

Le glomérule constitue le principal filtre du néphron. Il est situé dans la capsule de Bowman. Il a pour but d'épurer par filtration le sang et d'éliminer les substances non retenues par l'organisme dans les urines. Au niveau du glomérule commence la production d'urine avec la formation d'un filtrat aqueux à partir du sang des capillaires glomérulaires. La barrière de filtration du glomérule est semi perméable. Elle assure le passage de substance comme l'eau, le sodium, l'urée, le glucose et les petites protéines, mais empêche celui des éléments cellulaires du sang (leucocytes, érythrocytes, etc.) et des macromolécules dont le poids moléculaire est égal ou supérieur à 68 000 Da.

L'atteinte des glomérules se traduit généralement par une protéinurie voire un syndrome néphrotique mais également par une hématurie, la formation d'œdèmes ou encore l'apparition d'une hypertension artérielle. Le dosage de certaines protéines spécifiques du glomérule permet donc l'identification de l'origine de l'atteinte rénale.

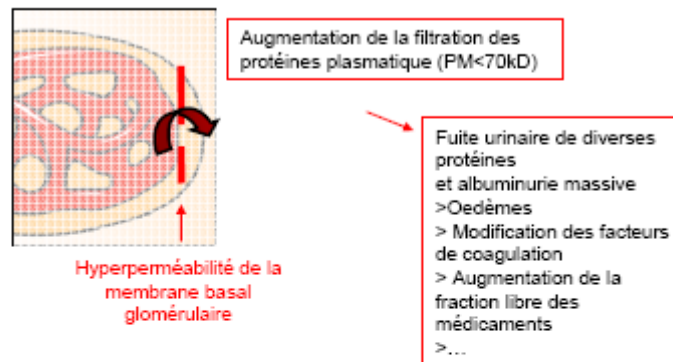


Figure 4 : Exemple d'atteinte glomérulaire et ses conséquences physiopathologiques

Les néphropathies glomérulaires sont souvent secondaires à des processus immunoallergiques. Des xénobiotiques peuvent être la cause de lésions glomérulaires minimes et/ou de lésions segmentaires et focales (AINS, lithium, interférons alpha et beta, pamidronate, sirolimus) ou de glomerulonéphrite membranaire (sels d'or, D-penicillamine, bucillamine, AINS, captopril) (John and Herzenberg 2009).

Parmi les xénobiotiques les plus souvent mis en cause dans les glomérulopathies, on note les sels d'or, prescrits dans le cadre du traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Tout comme d'autres métaux (mercure, ...), l'exposition à l'or peut induire des réponses autoimmunes. Les autoanticorps induits par l'or sont susceptibles de former des complexes immuns à l'origine de pathologies rénales. Des études histologiques menées sur des reins d'animaux traités aux sels d'or ont ainsi montré, au niveau des glomérules, un épaissement diffus des parois des capillaires ainsi que des dépôts granulaires d'immunoglobulines et de compléments (Bigazzi 1999).

Par ailleurs, les aminosides ont récemment été décrits comme ayant pour cible les cellules mésangiales. En induisant leur contraction, leur prolifération et leur apoptose, les aminosides diminuent les fonctions d'épuration du glomérule (Martinez-Salgado, Lopez-Hernandez et al. 2007).

3.2.2. Atteinte du tubule contourné proximal (TCP)

La structure la plus susceptible d'être soumise à l'action toxique d'un xénobiotique est la structure tubulaire et plus précisément, le tubule contourné proximal. Il représente en effet la structure clé du rein puisqu'étant placé à la sortie du glomérule, il est le premier à être exposé aux xénobiotiques. De plus, il est le siège de la majorité des échanges sang/urine et de l'activité métabolique du rein. L'atteinte du tubule proximal représente 50% des insuffisances rénales aiguës.

L'urine primitive évacuée par le pôle urinaire du glomérule, passe par le TCP où une activité intense de réabsorption et de sécrétion a lieu *via* de nombreux transporteurs, des vésicules d'endo- et d'exocytose et un passage paracellulaire important.

En fin de TCP, les substances utiles à l'homéostasie de l'organisme (glucose, acides aminés, peptides) ainsi que plus des 2/3 de l'eau et des électrolytes sont réabsorbés. Un processus d'acidification des urines débute et on note une élimination des déchets du métabolisme (notamment des médicaments).

Une atteinte toxique de TCP se manifeste généralement en syndrome de Fanconi (troubles hydroélectrolytiques : hypophosphatémie, hypokaliémie, hypo-uricémie, glycosurie normoglycémique, acidose métabolique à trou anionique normal, hyperaminoacidurie et protéinurie tubulaire). Une enzymurie peut également être secondaire à une nécrose des cellules tubulaire.

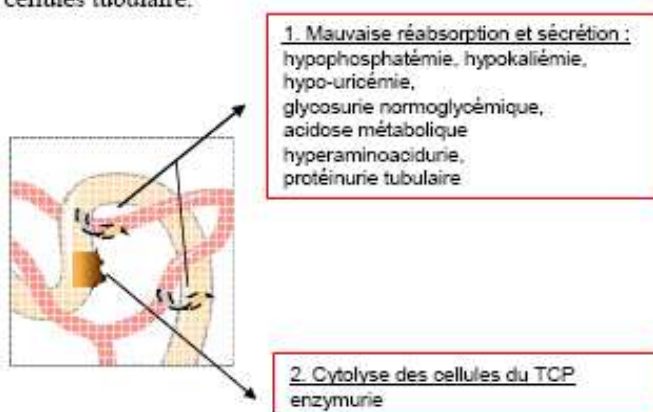


Figure 5: Exemple d'atteinte du tube contourné proximal et des conséquences physiopathologiques

Les trois exemples qui suivent, illustrent le fait que l'atteinte du TCP dépend des propriétés pharmacologiques et physicochimiques de chaque molécule. Certaines substances possèdent des propriétés cytotoxiques directes et induisent des altérations des fonctions mitochondriales (aminosides, divers antiviraux,...) alors que d'autres ont une action indirecte par des modifications du système vasculaire environnant (voir le paragraphe des atteintes périphériques)

La gentamicine est l'un des exemples les plus utilisés pour décrire une néphropathie tubulaire. La néphrotoxicité induite par la gentamicine est liée à son accumulation dans les cellules épithéliales du TCP après la filtration glomérulaire. La pénétration cellulaire s'effectue par endocytose et est à l'origine d'une accumulation de la molécule dans les lysosomes. Ce phénomène provoque la formation de corps myéloïdes qui induisent une phospholipidose. A partir d'un certain seuil, la phospholipidose induit des foyers d'apoptose et de nécrose (Mingeot-Leclercq and Tulkens 1999).

De très nombreux métaux (Cd, Cr, Hg, Pb, U,...) s'accumulent au niveau du rein et principalement au niveau du TCP. Ils engendrent alors des dommages structuraux et fonctionnels qui résultent en des défauts de sécrétion et de réabsorption tubulaire. Bien que les mécanismes exacts de ces atteintes restent aujourd'hui relativement mal connus, différentes études ont montré le rôle des acteurs du stress oxydant et de la peroxydation lipidique dans l'induction de la mort cellulaire et donc de la néphrotoxicité (Sabolic 2006). Dans le cas du cadmium, le composé est endocyté par les cellules du TCP puis complexé avec une protéine métallothionéine. Cette dernière est dégradée dans les endo-lysosomes ce qui induit une libération de la forme ionique du métal Cd^{2+} . Des formes réactives de l'oxygène sont alors engendrées ce qui aboutit à un stress oxydant qui, s'il n'est pas contrôlé, induit la mort des cellules et des dysfonctionnements des fonctions rénales (Thevenod 2003).

L'atteinte du TCP peut également être liée au fait que le rein est un organe qui métabolise les xénobiotiques. En effet, à moindre proportion que le foie, le rein *via* particulièrement le TCP, possède des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Quelques rares études montrent ainsi qu'un xénobiotique peut être métabolisé *in situ* en un composé toxique. Les cytochromes P450 du rein jouent, par exemple, un rôle important dans la formation d'un métabolite néphrotoxique du chloroforme (Fang, Behr et al. 2008).

Dans d'autres cas, une action directe du xénobiotiques sur les cellules endothéliales peut être observée. C'est notamment le cas dans les néphropathies induites par morsure de serpents. Les métalloprotéases du venin de certains serpents des familles *Viperinae* ou *Crotalinae* ou les phospholipidases contenues également chez les *crotalids*, *viperids*, *elapids* ou *hydrophids*, ont une action directe sur les jonctions cellulaires ou sur les cellules elles-mêmes et sont à l'origine d'atteinte membranaire et de nécrose tubulaires (Sitprija 2006).

3.2.3. Atteinte de l'anse de Henlé

L'anse de Henlé est la section du néphron bordée par les tubes contournés proximal et distal. Elle se caractérise par une branche descendante et une branche ascendante formant le U responsable de la concentration des urines par réabsorption d'eau et de NaCl.

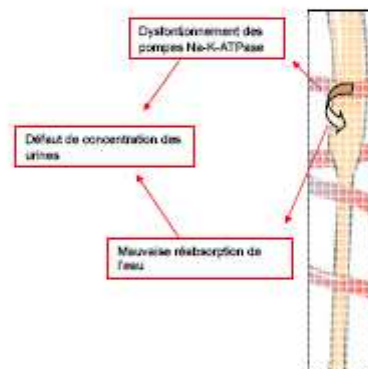


Figure 6 : Exemple d'atteinte de l'Anse de Henlé et ses conséquences physiopathologiques

Une conséquence de la néphrotoxicité ciblée sur l'anse de Henlé est une diminution du gradient osmotique cortico-papillaire, ce qui entraîne une perte du pouvoir de concentration des urines et une polyurie iso-osmotique.

L'anse de Henlé ne représente pas une cible majeure de la toxicité des xénobiotiques. Certains composés, comme les ions fluorures, ont cependant la propriété de perturber la pompe Na-K-ATPase de la branche ascendante de l'anse de Henlé ce qui induit un défaut de concentration des urines (Cittanova, Estepa et al. 2002). Le métabolisme d'un certain nombre d'agents halogénés anesthésiants est à l'origine de la libération d'ions fluorures. Parmi les rares médicaments responsables d'une toxicité de l'anse de Henlé, on note ainsi le méthoxyflurane (aujourd'hui retiré du marché) ou le sévoflurane (Cittanova, Estepa et al. 2002).

3.2.4. Atteinte du tubule contourné distal (TCD)

Le tubule distal participe à l'élaboration de l'urine définitive en ajustant la concentration urinaire en électrolyte et en sécrétant des ions H^+ . Peu de xénobiotiques sont décrits comme possédant des propriétés toxiques dirigés contre le TCD et la plupart de ces atteintes ne sont pas spécifiques de ce segment. Néanmoins, certaines molécules peuvent pénétrer les structures tubulaires (y compris le TCD) et y induire des désordres d'ordre inflammatoire, oxydatif et/ou apoptotique. C'est notamment, ce qui est décrit pour la tubulopathie induite par le cisplatine (Pabla and Dong 2008).

3.2.5. Néphropathie interstitielle

L'interstitium représente 10% du parenchyme rénale à l'état physiologique il constitue les espaces inter-tubulaires, non vasculaire du cortex et du la médullaire. Ses fonctions sont diverses (soutien des tissus, lieu de transit du fluide tubulaire vers les capillaires, sécrétion endocrine). Les néphropathies interstitielles relèvent d'étiologies multiples (bactériennes, virales, médicamenteuses,...) et sont une cause importante d'IRA iatrogène (5-10%). Elle survient généralement dans un contexte d'allergie systémique avec des manifestations extrarénales (fièvre, hyperéosinophilie, éruption diffuse cutanée, ...). Sur le plan clinique, on note une insuffisance rénale associée à une protéinurie, une hématurie et une leucocyturie. Comme pour toute réaction immunoallergique, la toxicité interstitielle n'est pas dose-dépendante. De très nombreux xénobiotiques peuvent être responsables de ce type d'atteinte mais parmi les plus fréquents, on retrouve les bêtalactamines, la rifampicine, les AINS, les diurétiques,... (Caillard and Moulin 2003)

3.3 Néphropathies post-rénales ou par obstruction des tubules

Ce terme définit l'atteinte rénale secondaire à une uropathie obstructive, c'est à dire les obstacles anatomiques ou fonctionnels capables d'entraîner une augmentation de la pression intraluminaire. Anatomiquement, on observe des lésions tubulaires (dilatation, atrophie) prédominante sur le tube distal, de la fibrose interstitielle avec peu d'infiltrats cellulaires, des vaisseaux normaux, des glomérules normaux ou avec une fibrose de la capsule de Bowman.

Les causes sont multiples (inflammatoire, infectieuse, tumorale, médicamenteuse,...). Certains xénobiotiques habituellement éliminés par voie rénale sont peu solubles dans les urines. Ils sont susceptibles de précipités ou de former des agrégats (lithiase) dans les tubules urinaire en cas d'augmentation de leur concentration. Les lithiases urinaires peuvent être divisées en deux catégories : lithiase résultant de la cristallisation urinaire d'un xénobiotique ou lithiase résultant d'une activité métabolique calcique, potassique ou autre. Les principaux médicaments incriminés sont l'indinavir, les sulfamides, ou encore des antibiotiques (Servais, Daudon et al. 2004).

4 Les marqueurs des néphrotoxicités

Un biomarqueur est une substance trouvée dans le sang, les sécrétions ou les tissus qui fournit une mesure de l'état biologique normal, pathologique ou d'une réponse à un médicament ou une autre substance étrangère. Il existe un vaste choix de biomarqueurs comprenant les ARN messagers, les protéines, les peptides et les molécules lipidiques. On peut aussi les diviser selon le type d'atteinte qu'ils identifient soit, fonctionnelle (marqueurs de fonction) ou organique (marqueurs d'intégrité tissulaire). Ces derniers peuvent encore être subdivisés selon le type cellulaire : on parlera de marqueurs glomérulaires et de marqueurs tubulaires.

Malgré leurs limites bien connues, actuellement les biomarqueurs les plus utilisés pour la détection de déficiences rénales aiguës ou chroniques sont la protéinémie, la créatininémie et le débit urinaire. Ces marqueurs fonctionnels en plus d'être à la fois peu sensibles et non spécifiques de l'atteinte aiguë de la fonction rénale ou d'une lésion structurelle sont détectés tardivement après le processus lésionnel. Toutefois, l'avancement des connaissances a permis dans les dernières années de mettre en évidence de nouvelles molécules susceptibles d'être utilisées comme marqueurs de l'intégrité et de la fonction rénale.

Le développement de ces nouveaux biomarqueurs de déficience rénale doit faciliter (1) sa détection précoce pour améliorer la prise en charge lorsque l'incidence est faible ou la pathologie est compliquée, (2) son diagnostic précis pour le différencier d'autres lésions, (3) la détermination de son étiologie et du site lésé pour sélectionner la thérapie appropriée, (4) la prédiction de sa gravité pour aider à la classification des patients à l'hôpital, à envisager le pronostic et les effets secondaires et ainsi évaluer le traitement et (5) le suivi de la thérapie mise en place.

Dans cette section, nous tenterons de dresser un tableau des différents biomarqueurs rénaux, de leurs avantages et de leurs limites. Mais il faut d'ores et déjà mentionner que malgré tous les efforts déployés pour identifier le biomarqueur caractéristique de l'IRA, il apparaît qu'il faudra nécessairement recourir à l'utilisation de plusieurs paramètres pour obtenir un diagnostic fiable et précis.

Bio marqueur	Fonction ou Structure cible	Utilisation expérimentale/clinique
Marqueurs classiques Créatinine, urée, Electrolytes, glucose, pH et volume urinaire	Clairance de la créatinine permet d'estimer le débit de filtration glomérulaire. Fonction tubulaire (réabsorption) évaluée même en cas de faible altération	Marqueur de référence pour classer les atteintes rénales en clinique mais déficit de sensibilité et de spécificité Utilisation clinique malgré un manque de spécificité
Protéines de haut PM Albumine, Immunoglobuline, transferrine, haptoglobine	Excrétion élevée de protéines indique une altération glomérulaire	Marqueur d'atteinte aiguë ou chronique en clinique (microalbuminurie), degré d'atteinte glomérulaire
Protéines de bas PM α 1-microglobuline, β 2-microglobuline, β -trace protein, cystatine C, retinol binding protein, kim-1	Marqueurs précoces de dysfonction tubulaire BTP et RBP permettent une meilleure estimation du débit de filtration glomérulaire	Utilisation pour prévoir si une greffe rénale est nécessaire. Kim-1 mesuré en clinique pour évaluer l'IRA et pour surveiller les atteintes médicamenteuses
Enzymes N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG), phosphatase alcaline γ -glutamyl transpeptidase alanine aminopeptidase glutathion-S-transférase (GST) LDH, AST	Tubule proximale, papille rénale, glomérule Tubule proximale (spécifique du segment S3) Tubule proximal (S3 chez les rongeurs) Tubule proximal GST α (tubules proximaux) et GST π ou μ (tubules distaux) Néphron entier	Utilisation comme marqueur prédictif et/ou pour la sévérité des dommages en clinique ou expérimentalement Utilisation comme marqueur tubulaire peut être limité car augmentation lors de pathologies glomérulaires chroniques LDH et AST sont peu spécifiques
Marqueurs de l'inflammation NGAL, IL-18 L-FABP, H-FABP Cyr61 CXCR3-binding chemokines platelet activating factor	Tubule distal et proximal Marqueurs des tubules proximaux ou distaux Induction dans la médulla externe et excrétion urinaire Inflammation tubulaire Tubes collecteurs, excrétion urinaire	Marqueurs de diagnostic et pronostique masqué en cas d'atteinte glomérulaire chronique Utilisation clinique comme marqueur précoce de dysfonction rénale Test clinique lors de traitement anti-rejet études expérimentales
Autres biomarqueurs clusterine, collagène IV endothéline Fibronectine NHE-3 Ostéopontine RPA1...	Marqueur d'altération structurelle du TCP Glomérule Endothélium vasculaire Marqueur tubulaire retrouvée dans les urines Marqueur d'atteinte tubulaire Tubule proximal Marqueur du tube collecteur lors de nécrose papillaire rénale	Marqueur précoce et sensible d'atteintes rénales en l'absence d'atteinte fonctionnelle Lésion glomérulaire chronique chez le rat et l'Homme Détection chez les patients ayant une nécrose tubulaire aiguë Augmentation lors de néphrotoxicité médicamenteuse chez le rat Lésion tubulaire discriminant l'étiologie (pré/post rénale) Augmentation lors d'inflammation rénale chez le rat et l'Homme Néphrotoxicité médicamenteuse chez le rat

4.1 Marqueurs classiques

La dysfonction rénale est, depuis très longtemps, diagnostiquée par certains marqueurs comme la créatininémie ou l'urémie, deux marqueurs produits par le corps et s'accumulant dans le sérum en cas de ralentissement de la fonction rénale (Baum, Dichoso et al. 1975). D'après les études urinaires toxicologiques standards le volume, l'osmolarité, le pH, la protéinurie et la glycosurie sont également recommandés (Weingand, Brown et al. 1996). D'autres paramètres tels la fraction d'excrétion du sodium, de l'urée, de l'acide urique, du lithium ou du chlore peuvent également être utilisées (Miller, Anderson et al. 1978; Espinel and Gregory 1980; Steinhauslin, Burnier et al. 1994). Toutefois, ces marqueurs souffrent d'un manque important de sensibilité et nécessitent une atteinte avancée pour être significativement modifiés (Bagshaw and Gibney 2008)(9).

4.1.1. Créat, urée

La créatinine (PM 113 Da) est produite à un rythme quasi constant par le catabolisme musculaire et filtrée par le glomérule sans réabsorption ni métabolisme rénal (Bagshaw and Gibney 2008)(9). En clinique, on considère généralement que sa concentration circulante varie inversement avec le taux de filtration glomérulaire (Eneigh Hart 2005). Toutefois, bien que son augmentation signe presque inévitablement une perturbation de la fonction rénale, la mesure de la créatininémie présente plusieurs lacunes pour constituer un marqueur fiable de l'IRA (Shemesh, Golbetz et al. 1985; Eneigh Hart 2005; Bagshaw and Gibney 2008). Tout d'abord, ce paramètre manque cruellement de sensibilité puisque plus de 50% des néphrons doivent être touchés pour que sa concentration circulante commence à changer (Kelly and Molitoris 2000). La modification de la créatininémie surviendra donc plusieurs heures après le début de la défaillance rénale et ne sera pas décelable en cas d'atteinte modérée ou faible. De plus, la concentration circulante de créatinine est influencée par plusieurs paramètres dont la race, le sexe, la masse musculaire, l'apport alimentaire en protéine, la prise de médicaments (cefexitin, flucytosine) ou de créatine (par les athlètes) et différentes pathologies autres que rénales tel que la rhabdomyolyse. C'est pourquoi la plage de valeurs normales pour ce paramètre est très large (de 70 à 130 micromoles/l). Par ailleurs, une proportion non-négligeable (10-40%) de la créatinine étant sécrétée par le tubule, ceci peut occulter un déclin de la filtration glomérulaire. Enfin, plusieurs substances (acétoacetate) et médicaments (triméthoprim, cimetidine, salicylates) peuvent également interférer avec son dosage.

L'urée (BUN ou Blood Urea Nitrogen, PM 60 Da), premier marqueur utilisé pour mesurer le taux de filtration glomérulaire, provient, elle aussi, de la dégradation des protéines dans l'organisme. Elle est éliminée par filtration glomérulaire bien qu'une partie soit réabsorbée au niveau du tubule (40-50%). Tout comme la créatinine, l'urée est un piètre marqueur pour l'IRA car il faut plusieurs heures de dysfonction rénale sévère pour que sa concentration circulante augmente significativement. De nombreux facteurs extra-rénaux peuvent l'influencer dont ceux conduisant à une augmentation du catabolisme protéique (Eneigh Hart 2005; Bagshaw and Gibney 2008). Sa concentration normale est de 2,49 à 6,3 mmol/L dans le sérum. Par ailleurs, à l'inverse de la créatinine, l'élévation de sa concentration conduit à des manifestations cliniques importantes puisque l'urée est toxique à forte concentration. On

utilise le rapport urémie/créatininémie augmenté comme indice d'une insuffisance rénale d'origine pré-rénale.

En dehors de ces facteurs endogènes permettant d'estimer le débit de filtration glomérulaire, notamment par le calcul de la clairance de la créatinine, des marqueurs exogènes (inuline, iohalamate, iohexol) sont parfois utilisés. Néanmoins, leur utilisation reste complexe, coûteuse et inadapté au diagnostic précoce et rapide de l'IRA.

4.1.2. Protéines de haut poids moléculaire

L'excrétion urinaire de protéines est décrite dans de nombreuses études portant sur la déficience rénale et est fréquemment détectée dans l'urine de patients hospitalisés. L'albumine est la protéine urinaire la plus abondante chez la plupart des espèces. Alors qu'un fort taux urinaire (protéiurie ou macroalbuminurie, concentration supérieure à 300mg/g créatinine) est invariablement associée à un dommage fonctionnel ou structurel du glomérule, une faible augmentation (microalbuminurie, concentration inférieure à 300 mg/g créatinine) peut résulter soit d'une augmentation de la filtration glomérulaire ou d'une diminution de la réabsorption tubulaire (de Jong and Curhan 2006; Russo, Sandoval et al. 2007). Dans ce cas, son interprétation doit être faite en comparaison de l'excrétion d'autres marqueurs protéiques. L'augmentation concomitante d'une ou plusieurs protéines de faible poids moléculaire (cf § 3.2.1) indique que cette protéinurie résulte d'une diminution de la réabsorption tubulaire, alors que l'augmentation d'albumine seule ou concomitante à celle d'une autre protéine de poids moléculaire élevé indique une lésion primaire du glomérule.

Cette mesure est notamment utilisée comme marqueur de déficience rénale chronique (stade 1 ou 2) du fait d'un diabète ou d'une hypertension. Une microalbuminurie est également rapportée lors de l'administration de certains agents pharmacologiques comme les antibiotiques et les agents chimiothérapeutiques. Néanmoins, son interprétation doit rester prudente car une microalbuminurie peut également avoir lieu dans les cas d'exercice physique important, hématurie, déshydratation, fièvre ou infection du tractus urinaire. Plus récemment, les taux urinaires d'autres protéines de haut poids moléculaire (transferrine, d'immunoglobuline G, haptoglobine ou α_2 -macroglobuline) ont été utilisés afin d'estimer le degré d'atteinte glomérulaire (Tencer, Bakoush et al. 2000; Emeigh Hart 2005).

4.2 Marqueurs en développement

Depuis quelques années, nous assistons à l'émergence de plusieurs nouveaux marqueurs présentant un potentiel intéressant pour le diagnostic de l'IRA. Il s'agit de protéines ou d'enzymes dont l'excrétion urinaire augmente lorsque que les cellules tubulaires sont endommagées.

Ces marqueurs sont plus précoces et plus sensibles (Trof, Di Maggio et al. 2006; Ferguson, Vaidya et al. 2008) et pourraient permettre (1) d'établir l'origine de l'IRA et (2) d'aider à établir l'approche thérapeutique à privilégier et (3) contribuer à établir le pronostic de la maladie avant même l'apparition des premiers signes cliniques (Bagshaw, Langenberg et al. 2007).

4.2.1. Protéines de bas poids moléculaires

L'augmentation de l'excrétion urinaire de protéines de faible poids moléculaire (<70kD) reflète une déficience de la réabsorption tubulaire qui peut avoir lieu lorsque les cellules du tubule contourné proximal sont lésées ou surchargées (Figure 4). Ces protéines sont produites dans différents tissus autres que le rein à un rythme constant qui n'est pas affecté par la condition pathologique du patient. Elles sont filtrées librement par les glomérules et réabsorbées par les tubules mais ne sont pas sécrétées. Certaines comme la cystatin C (Cys-C), les α 1- et β 2-microglobulines (α 1-MG et β 2-MG), la « β -trace protein» (BTP) et la «retinol-binding protein» (RBP) ont prouvé leur valeur comme marqueurs plus précoces et plus fiables d'une réduction du débit de filtration glomérulaire que la créatinine ou comme index de lésion tubulaire rénale (Emeigh Hart 2005; Ferguson, Vaidya et al. 2008). Le dosage de ces protéines est majoritairement effectué par des méthodes immunologiques.

Alphal microglobuline

L' α 1-microglobuline (α 1-MG) est une protéine de 27-33 kD de la superfamille des lipocalines. Elle est synthétisée par le foie et sa production tout comme son excrétion n'est pas influencés par des facteurs extra-rénaux. De plus elle est dégradée très lentement dans les urines ce qui facilite son utilisation en clinique (Emeigh Hart 2005). C'est un marqueur sensible de dysfonctionnement cellulaire des tubules proximaux.

L' α 1-MG serait également un excellent outil pour prédire la nécessité de recourir aux thérapies de remplacement rénale jusqu'à 4 jours à l'avance sur des patients ne présentant que peu de signes cliniques (Herget-Rosenthal, Poppen et al. 2004). On note toutefois que certaines pathologies hépatiques et l'infection au VIH peuvent affecter sa concentration circulante (Penders and Delanghe 2004).

Beta 2 microglobuline

La β 2-microglobuline (β 2-MG) est une protéine de 12 kD qui fait partie du complexe majeur d'histocompatibilité exprimé à la surface des cellules nucléées. Elle est filtrée par le glomérule avant d'être presque entièrement réabsorbée et catabolisée par les cellules du tubule contourné proximal (Miyata, Jadoul et al. 1998). A l'instar de l' α 1-MG, elle souffre d'un manque de stabilité dans l'urine si celle-ci est légèrement acide. Toutefois elle est beaucoup plus sensible et son augmentation peut servir de marqueur tubulaire en cas d'exposition à des substances néphrotoxiques, ou dans certaines conditions chirurgicales.

Bien que sa concentration circulante soit indépendante de l'âge et de la masse musculaire du patient (Grubb, Simonsen et al. 1985), la teneur urinaire en β 2-MG est influencée par certaines pathologies comme le lupus néphrétique, les tumeurs malignes, les désordres lymphoprolifératifs et les maladies infectieuses (Bataille, Durie et al. 1983). On dit toutefois de cette protéine qu'elle est le meilleur indicateur du DFG, sa concentration augmentant avec les atteintes glomérulaires. Ainsi la β 2-MG ne serait pas un marqueur spécifique de l'atteinte tubulaire (Trof, Di Maggio et al. 2006).

Cystatine C

La cystatine C (Cys-C) est une protéine de 13 kD produite à un rythme relativement constant par toutes les cellules nucléées (Herget-Rosenthal, Poppen et al. 2004). Sa concentration sérique serait indépendante du sexe, de l'âge et de la masse musculaire du patient (Randers and Erlandsen 1999) quoique des données contradictoires aient aussi été rapportées à ce sujet (Knight, Verhave et al. 2004). Elle est filtrée librement par les glomérules puis réabsorbée et catabolisée mais non sécrétée par les tubules. Sa concentration sérique serait donc inversement proportionnelle au débit de filtration glomérulaire. Pratiquement absente de l'urine en condition normale, sa concentration urinaire augmente d'environ 200 fois en cas de dysfonction tubulaire et constituerait par conséquent un bon facteur prédictif de la nécessité de procéder à une thérapie de remplacement rénale (Herget-Rosenthal, Poppen et al. 2004). Elle est un marqueur beaucoup plus sensible et précoce que la créatinine pour des modifications modérées de la fonction rénale (Parikh and Devarajan 2008).

β-trace protein

Comme α1-MG, la protéine β-Trace (BTP), aussi connue sous le nom de L-PGDS (prostaglandine D synthétase de type lipocaline) est une glycoprotéine de 23-29 kD provenant principalement du liquide cébrospinal. Sa production serait indépendante de l'âge et du sexe du patient. Sa concentration sérique et urinaire est augmentée chez les patients souffrant d'une maladie rénale et est considérée comme un meilleur marqueur d'une diminution modérée du débit de filtration glomérulaire que la créatininémie ou la β2-MG (Filler, Priem et al. 2002; Oda, Shiina et al. 2002). Toutefois son dosage demeure encore expérimental.

Retinol Binding protein

La protéine de transport du rétinol (retinol binding protein- RBP, 21 kD), synthétisée par le foie, est responsable du transport de la vitamine A vers les autres tissus. Comme les autres marqueurs de ce groupe, elle est filtrée librement par le glomérule et réabsorbée puis catabolisée par le tubule proximal en conditions normales (Ferguson, Vaidya et al. 2008). Elle constitue un marqueur très sensible et précoce de dysfonction tubulaire et serait détectable, même dans l'urine acide, dès l'apparition d'une diminution mineure de la fonction tubulaire (Bernard, Vyskocil et al. 1987; Herget-Rosenthal, Poppen et al. 2004). Toutefois sa concentration circulante peut être modulée par une carence en vitamine A ce qui pourrait conduire à des faux-négatifs dans ces conditions (Tolkoff-Rubin, Rubin et al. 1988).

4.2.2. Protéines urinaires à activité enzymatique

L'activité enzymatique de nombreuses enzymes sécrétées dans les urines est également un moyen pour déterminer la présence et la localisation d'une atteinte tubulaire. Leur présence urinaire résulte de la libération à partir des cellules tubulaires endommagées ou secondairement à une induction enzymatique pendant le processus de réparation ou de régénération (Figure 5). L'intérêt de ces marqueurs réside dans le fait qu'ils permettent la mise en évidence de dommages encore légers et réversibles. L'enzymurie permet de détecter les dommages tubulaires entre 12 heures et 4 jours plus tôt que les marqueurs classiques, mais certaines pathologies glomérulaires chroniques peuvent aussi affecter ces marqueurs (Scherberich 1990; Emeigh Hart 2005).

De plus, des études ont permis d'établir la distribution des marqueurs enzymatiques le long du tubule ainsi que dans les différents compartiments cellulaires (membrane à bordure en brosse, lysosomes, cytoplasme). Ainsi, on a pu établir une certaine corrélation entre la sévérité des dommages subits et l'origine des enzymes détectés dans l'urine en identifiant le premier site lésé (D'Amico and Bazzi 2003; Westhuyzen, Endre et al. 2003). Toutefois il est important de noter que l'évaluation de ces marqueurs présente certains désavantages tel que leur stabilité dans l'urine -qui parfois n'excède pas 4 heures- ainsi que la présence d'autres substances, dont l'urée pouvant les inhiber (Eneigh Hart 2005).

NAG

La N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) est un enzyme lysosomal exprimé principalement dans le tubule proximal. Elle est l'un des marqueurs urinaires les plus étudiés comme indicateur d'insuffisance rénale tubulaire. Une augmentation de l'activité basale de cette enzyme dans l'urine serait donc le reflet d'un dommage à cette section du néphron (Chew, Lins et al. 1993; D'Amico and Bazzi 2003; Eneigh Hart 2005). Une augmentation de l'excrétion urinaire de NAG a été observée suite à l'absorption d'agents néphrotoxiques (D'Amico and Bazzi 2003; Eneigh Hart 2005) et a été corrélée avec la nécessité d'initier une thérapie de remplacement (Westhuyzen, Endre et al. 2003; Herget-Rosenthal, Poppen et al. 2004). Toutefois, l'excrétion urinaire de NAG peut également être élevée dans le cas de pathologies glomérulaires, de néphropathie diabétique ou même en l'absence d'atteinte rénale comme lors d'arthrite rhumatoïde ou d'hyperparathyroïdie (Ferguson, Vaidya et al. 2008).

GST

Les glutathion-S-transférases forment une famille d'enzymes cytoplasmiques présentes dans les cellules du tubule proximal (α -GST) ou distal (π -GST). Une augmentation de la sécrétion urinaire de ces deux isoformes est observée dans des études prospectives chez des malades souffrant d'IRA (Westhuyzen, Endre et al. 2003). Notons que le dosage de ces marqueurs urinaires nécessite la stabilisation préalable avec un tampon spécifique.

PAL, γ GT et AAP

Parmi les autres enzymes de la bordure en brosse, on peut citer la phosphatase alcaline (PAL), la γ -Glutamyl transpeptidase (γ GT) et l'alanine aminopeptidase (AAP) qui constituent les enzymes tubulaires les plus abondantes dans l'urine (Scherberich 1990; Chew, Lins et al. 1993; Westhuyzen, Endre et al. 2003; Herget-Rosenthal, Poppen et al. 2004). L'augmentation précoce de leur excrétion urinaire et leur dosage simple en font de bons marqueurs prédictifs d'IRA. Néanmoins, tout comme la NAG, leur valeur prédictive peut être confondue lors de néphropathie diabétique (Ikenaga, Suzuki et al. 1993).

4.2.3. Marqueurs de l'inflammation / cytokines

Parmi les nouvelles molécules identifiées comme marqueurs potentiels de trouble rénaux, plusieurs proviennent du processus inflammatoire accompagnant la dysfonction rénale.

NGAL

La lipocaline associée à la gélatinase des polynucléaires neutrophiles (NGAL) est une protéine de 25kD initialement identifiée dans les neutrophiles activés (Kjeldsen, Cowland et al. 2000). Elle est produite à un très faible niveau par de nombreux épithélium dont celui du tubule proximal rénal (Parikh and Devarajan 2008). Lors d'une atteinte rénale, sa sécrétion augmente significativement (jusqu'à 30 fois) et ce très tôt (2h) après le début de l'atteinte rénale, comme lors de l'administration d'un médicament néphrotoxique (Mishra, Mori et al. 2004). Sa concentration tant sérique qu'urinaire représenterait l'un des biomarqueurs les plus prometteurs pour le diagnostic précoce de l'IRA et l'établissement d'un pronostic quant à la nécessité de recourir au thérapie de remplacement et à l'issue de l'IRA (Parikh and Devarajan 2008; Haase, Bellomo et al. 2009).

IL18

L'interleukine 18 (IL-18) est une cytokine pro-inflammatoire produite lors de lésion inflammatoire ou ischémique de nombreux organes dont le tubule proximal lors de l'IRA. Sa concentration urinaire, s'élève significativement environ 6 heures après le début de l'atteinte rénale pour atteindre son maximum (25 fois sa concentration en conditions normales) après 12 heures (Parikh and Devarajan 2008). L'IL-18 est un marqueur hautement spécifique mais peu sensible de l'IRA, plus particulièrement des IRA d'origine ischémique et autre forme de nécrose tubulaire. Toutefois son rôle dans le diagnostic de l'IRA d'origine néphrotoxique reste peu étudié (Ferguson, Vaidya et al. 2008). Elle pourrait être particulièrement utile pour établir l'étiologie de l'IRA.

Protéines liant les acides gras

Deux types de protéines liant les acides gras libres ont été identifiés dans le rein, la forme hépatique (L-FABP) est retrouvée dans le tubule proximal rénal et la forme cardiaque (H-FABP) au niveau du tubule distal (Ferguson, Vaidya et al. 2008).

La L-FABP est détectable dans l'urine 4 heures après le début de l'atteinte rénale et serait un indicateur fiable et sensible de la présence de dommages tissulaires rénaux souvent indétectables par les marqueurs conventionnels (Negishi, Noiri et al. 2009). L'accroissement de son excrétion urinaire serait indépendant de sa concentration sérique. Son efficacité comme marqueur précoce de dysfonction rénale a été démontrée dans plusieurs pathologie comme l'insuffisance rénale chronique, la néphropathie diabétique, la néphropathie à IgA et la néphrotoxicité induite par des médicaments (Kamijo, Sugaya et al. 2006; Nakamura, Sugaya et al. 2006).

La concentration urinaire de H-FABP serait significativement augmentée dans les cas de néphrotoxicité aux aminoglycosides chez le rat ou lors de perfusion rénale (Pelsers, Hermens et al. 2005).

Cystéine-rich protein 61

Cyr61 est une protéine sécrétée, riche en Cystéine, appartenant à la famille des régulateurs angiogéniques et se liant à l'héparine. Elle est exprimée dans les tissus en réparation. Elle est rapidement induite dans les tubules proximaux et a été proposé comme marqueur précoce de l'IRA. On a montré sa présence dans l'urine de rongeurs 3 à 6 heures après l'induction d'une ischémie rénale, atteignant son maximum entre 6 et 9 heures puis déclinant ensuite

rapidement malgré la poursuite des dommages (Muramatsu, Tsujie et al. 2002). La validation de ce marqueur chez l'homme est encore à faire.

4.2.4. Nouveaux biomarqueurs

A la recherche des meilleurs biomarqueurs d'insuffisance rénale, les chercheurs explorent sans cesse de nouvelles pistes. C'est ainsi qu'un nombre sans cesse grandissant de molécules apparaît dans la littérature. Nous en dressons ici une liste non-exhaustive.

KIM-1

KIM-1 (kidney injury molecule-1) est une protéine transmembranaire qui est surexprimée dans les cellules tubulaires proximales après une déficience rénale aiguë ou chronique du fait d'ischémie ou d'une néphrotoxicité. L'isolement et la caractérisation de cette protéine est décrite en 1998 par Ichimura et al (Ichimura, Bonventre et al. 1998) qui suggèrent que Kim-1 jouerait un rôle dans le processus de régénération rénal. Néanmoins, des études approfondies sur le rôle fonctionnel de Kim-1 sont nécessaires afin de définir s'il régule le processus inflammatoire ou si son expression est juste une réponse à l'atteinte, la tentative de guérison ou de réparation rénale. Récemment, il a été montré que des cellules épithéliales exprimant Kim-1 ont des propriétés phagocytaires. Kim-1 permet ainsi la reconnaissance spécifique d'épitopes phosphatidylsérine sur les cellules apoptotiques (Ichimura, Asseldonk et al. 2008). Une augmentation du taux urinaire de Kim-1 est fortement corrélée à l'expression tubulaire de Kim-1 suite à une déficience rénale humaine ou expérimentalement chez le rat après exposition à divers agents néphrotoxiques (gentamicine, cadmium) ou en cas d'ischémie rénale. Ce serait également un marqueur prédictif d'atteinte rénale aiguë ou chronique. Kim-1 est augmenté avant qu'une augmentation de la créatinine sérique puisse être mesurée. Cette molécule serait donc un candidat prometteur pour le suivi de ce processus physiopathologique ainsi que lors de traitement néproprotecteur (pour revue (Waanders, van Timmeren et al.). De ce fait, Kim-1 a été récemment qualifié par la Food and Drug Administration (FDA) et l'agence européenne de médecine comme un biomarqueur sensible et spécifique pour contrôler les atteintes rénales médicamenteuses dans les études pré-clinique ou clinique (Vaidya et al, 2009).

De plus, des études de cohortes ou de cas ont montré que le taux urinaire de Kim-1 pouvait servir de méthode non invasive pour surveiller les greffes rénales; son taux urinaire permettant de prédire un éventuel rejet de greffe (Rosner et al, 2009).

Transporteur Na/H isoforme 3

NHE3 est le transporteur le plus abondant dans les tubules rénaux et est localisé sur la membrane apicale des cellules des tubules proximaux. Après ischémie et/ou nécrose chez le rat, l'expression tissulaire de NHE3 diminue et son taux urinaire augmente (Kwon et al, 2000). Une étude de cohorte a également montré une augmentation de la concentration urinaire de NHE3 chez des patients avec une nécrose tubulaire aiguë (du Cheyron et al, 2003). Il pourrait donc être utilisé comme marqueur spécifique de nécrose tubulaire aiguë à condition que des tests rapides et facile à mettre en place soient développés.

Marqueurs en développement

Récemment de nouveaux marqueurs géniques ont été proposés pour détecter des lésions rénales, la variation d'expression des ARNm étant considérée comme l'un des événements les plus précoces suite à un stress cellulaire ou un dommage tissulaire. Dans différents modèles animaux de déficience rénale, une augmentation de l'ostéopontine (OPN), la lipocaline-2 (NGAL), Kim-1, le tissu inhibitor of metalloprotéinase (Timp-1), la clusterine, la vimentine, l'hème oxygénase (HO) ou une diminution de la kallikréine ont été observés (Amin, Vickers et al. 2004; Rached, Hoffmann et al. 2008)(Hoffman et al, 2010).

L'étape suivante de développement de ces marqueurs est la mesure dans l'urine ou le tissu rénal tel que cela a été mis au point pour la clusterine (Silkensen, Agarwal et al. 1997; Hidaka, Kranzlin et al. 2002), l'ostéopontine (Verstrepen, Persy et al. 2001; Xie, Sakatsume et al. 2001; Alchi, Nishi et al. 2005), la kallikréine (Murakami, Yayama et al. 1998), l'antigène papillaire rénal (RPA-1) (Price, Davies et al. 2010) en plus de Kim-1 et NGAL décrit précédemment.

A un stade de développement moins avancé, on peut également citer la Fetuin A, une protéine exosomale excrétée dans l'urine (Zhou, Pisitkun et al. 2006), l'endotheline-1, un puissant vasoconstricteur sécrété par les cellules de l'endothélium vasculaire (Fujisaki, Kubo et al. 2003); les protéines Perforin et Granzyme B impliquée dans les phénomènes de lyse cellulaire et d'apoptose (Li, Hartono et al. 2001) ou de nombreuses chemokines tel que celles liant l'élément CXCR3 (Hu, Aizenstein et al. 2004).

Conclusion

Les modifications d'expression génique ou protéique de ces biomarqueurs sont corrélées avec les altérations histopathologiques et sont fréquemment détecté plus précocement et pour de plus faibles concentrations de substances néphrotoxiques que les paramètres cliniques traditionnels, créatinine et urée, qui indiquent plutôt une déficience fonctionnelle qu'une altération tissulaire.

Dans le futur, l'utilisation des paramètres cliniques traditionnels (débit urinaire, créatinine et urée) devraient être avantageusement remplacé ou complété par des marqueurs lésionnels permettant de diagnostiquer le désordre avant le déclin fonctionnel. Mis à part Kim-1 et NGAL, la capacité de ces marqueurs potentiels à indiquer ou même prédire des changements histopathologiques modérés suite à une exposition chronique à divers substances néphrotoxiques doit encore être évaluée dans de larges études à grande échelle.

Ainsi, du fait de la complexité des atteintes rénales et de la diversité des étiologies et des causes physiopathologiques (toxines, inflammation, hypoperfusion...), il est probable que chaque biomarqueur aura une sensibilité et une spécificité différente selon le scénario clinique. L'utilisation simultanée d'un panel de biomarqueurs couvrant différents aspects physiopathologiques de l'atteinte rénale sera d'une importance critique.

- Alchi, B., S. Nishi, et al. (2005). "Osteopontin expression in acute renal allograft rejection." *Kidney Int* 67(3): 886-896.
- Amin, R. P., A. E. Vickers, et al. (2004). "Identification of putative gene based markers of renal toxicity." *Environ Health Perspect* 112(4): 465-479.
- Bacchetta, J., L. Dubourg, et al. (2009). "Non-drug-induced nephrotoxicity." *Pediatr Nephrol* 24(12): 2291-2300.
- Bagshaw, S. M. and R. T. Gibney (2008). "Conventional markers of kidney function." *Crit Care Med* 36(4 Suppl): S152-158.
- Bagshaw, S. M., C. Langenberg, et al. (2007). "Urinary biomarkers in septic acute kidney injury." *Intensive Care Med* 33(7): 1285-1296.
- Bataille, R., B. G. Durie, et al. (1983). "Serum beta2 microglobulin and survival duration in multiple myeloma: a simple reliable marker for staging." *Br J Haematol* 55(3): 439-447.
- Baum, N., C. C. Dichoso, et al. (1975). "Blood urea nitrogen and serum creatinine. Physiology and interpretations." *Urology* 5(5): 583-588.
- Bellomo, R., J. A. Kellum, et al. (2004). "Defining acute renal failure: physiological principles." *Intensive Care Med* 30(1): 33-37.
- Bellomo, R., C. Ronco, et al. (2004). "Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group." *Crit Care* 8(4): R204-212.
- Bernard, A. M., A. A. Vyskocil, et al. (1987). "Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury." *Clin Chem* 33(6): 775-779.
- Bigazzi, P. E. (1999). "Metals and kidney autoimmunity." *Environ Health Perspect* 107 Suppl 5: 753-765.
- Bohatyrewicz, M., E. Urasinska, et al. (2007). "Membranous glomerulonephritis may be associated with heavy marijuana abuse." *Transplant Proc* 39(10): 3054-3056.
- Caillard, S. and B. Moulin (2003). "Drug-induced acute interstitial nephritis." *Réanimation* 12: 306-312.
- Cerda, J., N. Lameire, et al. (2008). "Epidemiology of acute kidney injury." *Clin J Am Soc Nephrol* 3(3): 881-886.
- Chew, S. L., R. L. Lins, et al. (1993). "Urinary enzymes in acute renal failure." *Nephrol Dial Transplant* 8(6): 507-511.
- Cittanova, M. L., L. Estepa, et al. (2002). "Fluoride ion toxicity in rabbit kidney thick ascending limb cells." *Eur J Anaesthesiol* 19(5): 341-349.
- Cooper, R. G. (2006). "Effect of tobacco smoking on renal function." *Indian J Med Res* 124(3): 261-268.
- D'Amico, G. and C. Bazzi (2003). "Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12(6): 639-643.
- de Jong, P. E. and G. C. Curhan (2006). "Screening, monitoring, and treatment of albuminuria: Public health perspectives." *J Am Soc Nephrol* 17(8): 2120-2126.
- de Jong, P. E., M. van der Velde, et al. (2008). "Screening for chronic kidney disease: where does Europe go?" *Clin J Am Soc Nephrol* 3(2): 616-623.
- Eneigh Hart, S. G. (2005). "Assessment of renal injury in vivo." *J Pharmacol Toxicol Methods* 52(1): 30-45.

- Espinel, C. H. and A. W. Gregory (1980). "Differential diagnosis of acute renal failure." *Clin Nephrol* 13(2): 73-77.
- Fang, C., M. Behr, et al. (2008). "Mechanism of chloroform-induced renal toxicity: non-involvement of hepatic cytochrome P450-dependent metabolism." *Toxicol Appl Pharmacol* 227(1): 48-55.
- Feest, T. G., A. Round, et al. (1993). "Incidence of severe acute renal failure in adults: results of a community based study." *Bmj* 306(6876): 481-483.
- Ferguson, M. A., V. S. Vaidya, et al. (2008). "Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury." *Toxicology* 245(3): 182-193.
- Filler, G., F. Priem, et al. (2002). "Beta-trace protein, cystatin C, beta(2)-microglobulin, and creatinine compared for detecting impaired glomerular filtration rates in children." *Clin Chem* 48(5): 729-736.
- Fujisaki, K., M. Kubo, et al. (2003). "Infusion of radiocontrast agents induces exaggerated release of urinary endothelin in patients with impaired renal function." *Clin Exp Nephrol* 7(4): 279-283.
- Grubb, A., O. Simonsen, et al. (1985). "Serum concentration of cystatin C, factor D and beta 2-microglobulin as a measure of glomerular filtration rate." *Acta Med Scand* 218(5): 499-503.
- Haase, M., R. Bellomo, et al. (2009). "Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis." *Am J Kidney Dis* 54(6): 1012-1024.
- Herget-Rosenthal, S., D. Poppen, et al. (2004). "Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis." *Clin Chem* 50(3): 552-558.
- Hidaka, S., B. Kranzlin, et al. (2002). "Urinary clusterin levels in the rat correlate with the severity of tubular damage and may help to differentiate between glomerular and tubular injuries." *Cell Tissue Res* 310(3): 289-296.
- Hilton, R. (2006). "Acute renal failure." *Bmj* 333(7572): 786-790.
- Hu, H., B. D. Aizenstein, et al. (2004). "Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction." *Am J Transplant* 4(3): 432-437.
- Ichimura, T., E. J. Asselton, et al. (2008). "Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells." *J Clin Invest* 118(5): 1657-1668.
- Ichimura, T., J. V. Bonventre, et al. (1998). "Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury." *J Biol Chem* 273(7): 4135-4142.
- Ikenaga, H., H. Suzuki, et al. (1993). "Enzymuria in non-insulin-dependent diabetic patients: signs of tubular cell dysfunction." *Clin Sci (Lond)* 84(4): 469-475.
- John, R. and A. M. Herzenberg (2009). "Renal toxicity of therapeutic drugs." *J Clin Pathol* 62(6): 505-515.
- Johnson, C. A., A. S. Levey, et al. (2004). "Clinical practice guidelines for chronic kidney disease in adults: Part I. Definition, disease stages, evaluation, treatment, and risk factors." *Am Fam Physician* 70(5): 869-876.
- Kamijo, A., T. Sugaya, et al. (2006). "Urinary liver-type fatty acid binding protein as a useful biomarker in chronic kidney disease." *Mol Cell Biochem* 284(1-2): 175-182.
- Karie, S., V. Launay-Vacher, et al. (2010). "[Drugs renal toxicity]." *Nephrol Ther* 6(1): 58-74.

- Kaufman, J., M. Dhakal, et al. (1991). "Community-acquired acute renal failure." *Am J Kidney Dis* **17**(2): 191-198.
- Kelly, K. J. and B. A. Molitoris (2000). "Acute renal failure in the new millennium: time to consider combination therapy." *Semin Nephrol* **20**(1): 4-19.
- Kjeldsen, L., J. B. Cowland, et al. (2000). "Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse." *Biochim Biophys Acta* **1482**(1-2): 272-283.
- Kleinknecht, C., C. Antignac, et al. (1990). "[Kidney functional reserve. Studies in humans]." *Ann Pediatr (Paris)* **37**(2): 105-108.
- Knight, E. L., J. C. Verhave, et al. (2004). "Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement." *Kidney Int* **65**(4): 1416-1421.
- Li, B., C. Hartono, et al. (2001). "Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine." *N Engl J Med* **344**(13): 947-954.
- Liano, F. and J. Pascual (1996). "Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group." *Kidney Int* **50**(3): 811-818.
- Martinez-Salgado, C., F. J. Lopez-Hernandez, et al. (2007). "Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides." *Toxicol Appl Pharmacol* **223**(1): 86-98.
- Mehta, R. L., J. A. Kellum, et al. (2007). "Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury." *Crit Care* **11**(2): R31.
- Miller, T. R., R. J. Anderson, et al. (1978). "Urinary diagnostic indices in acute renal failure: a prospective study." *Ann Intern Med* **89**(1): 47-50.
- Mingeot-Leclercq, M. P. and P. M. Tulkens (1999). "Aminoglycosides: nephrotoxicity." *Antimicrob Agents Chemother* **43**(5): 1003-1012.
- Mishra, J., K. Mori, et al. (2004). "Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity." *Am J Nephrol* **24**(3): 307-315.
- Miyata, T., M. Jadoul, et al. (1998). "Beta-2 microglobulin in renal disease." *J Am Soc Nephrol* **9**(9): 1723-1735.
- Murakami, H., K. Yayama, et al. (1998). "Human kallikrein gene delivery protects against gentamycin-induced nephrotoxicity in rats." *Kidney Int* **53**(5): 1305-1313.
- Muramatsu, Y., M. Tsujie, et al. (2002). "Early detection of cysteine rich protein 61 (CYR61, CCN1) in urine following renal ischemic reperfusion injury." *Kidney Int* **62**(5): 1601-1610.
- Nakamura, T., T. Sugaya, et al. (2006). "Urinary excretion of liver-type fatty acid-binding protein in contrast medium-induced nephropathy." *Am J Kidney Dis* **47**(3): 439-444.
- Negishi, K., E. Noiri, et al. (2009). "Monitoring of urinary L-type fatty acid-binding protein predicts histological severity of acute kidney injury." *Am J Pathol* **174**(4): 1154-1159.
- Oda, H., Y. Shiina, et al. (2002). "Development and evaluation of a practical ELISA for human urinary lipocalin-type prostaglandin D synthase." *Clin Chem* **48**(9): 1445-1453.
- Pabla, N. and Z. Dong (2008). "Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies." *Kidney Int* **73**(9): 994-1007.

- Parikh, C. R. and P. Devarajan (2008). "New biomarkers of acute kidney injury." Crit Care Med 36(4 Suppl): S159-165.
- Pelsers, M. M., W. T. Hermens, et al. (2005). "Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury." Clin Chim Acta 352(1-2): 15-35.
- Penders, J. and J. R. Delanghe (2004). "Alpha 1-microglobulin: clinical laboratory aspects and applications." Clin Chim Acta 346(2): 107-118.
- Price, S. A., D. Davies, et al. (2010). "Characterization of renal papillary antigen 1 (RPA-1), a biomarker of renal papillary necrosis." Toxicol Pathol 38(3): 346-358.
- Rached, E., D. Hoffmann, et al. (2008). "Evaluation of putative biomarkers of nephrotoxicity after exposure to ochratoxin a in vivo and in vitro." Toxicol Sci 103(2): 371-381.
- Randers, E. and E. J. Erlandsen (1999). "Serum cystatin C as an endogenous marker of the renal function--a review." Clin Chem Lab Med 37(4): 389-395.
- Ricci, Z., D. Cruz, et al. (2008). "The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review." Kidney Int 73(5): 538-546.
- Russo, L. M., R. M. Sandoval, et al. (2007). "The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states." Kidney Int 71(6): 504-513.
- Sabolic, I. (2006). "Common mechanisms in nephropathy induced by toxic metals." Nephron Physiol 104(3): p107-114.
- Scherberich, J. E. (1990). "Urinary proteins of tubular origin: basic immunochemical and clinical aspects." Am J Nephrol 10 Suppl 1: 43-51.
- Servais, A., M. Daudon, et al. (2004). "[Drug-induced renal calculi]." Ann Urol (Paris) 40(2): 57-68.
- Shemesh, O., H. Golbetz, et al. (1985). "Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients." Kidney Int 28(5): 830-838.
- Silkensen, J. R., A. Agarwal, et al. (1997). "Temporal induction of clusterin in cisplatin nephrotoxicity." J Am Soc Nephrol 8(2): 302-305.
- Sitprija, V. (2006). "Snakebite nephropathy." Nephrology (Carlton) 11(5): 442-448.
- Steinhauslin, F., M. Burnier, et al. (1994). "Fractional excretion of trace lithium and uric acid in acute renal failure." J Am Soc Nephrol 4(7): 1429-1437.
- Tencer, J., O. Bakoush, et al. (2000). "Diagnostic and prognostic significance of proteinuria selectivity index in glomerular diseases." Clin Chim Acta 297(1-2): 73-83.
- Thevenod, F. (2003). "Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium." Nephron Physiol 93(4): p87-93.
- Tolkoff-Rubin, N. E., R. H. Rubin, et al. (1988). "Noninvasive renal diagnostic studies." Clin Lab Med 8(3): 507-526.
- Trof, R. J., F. Di Maggio, et al. (2006). "Biomarkers of acute renal injury and renal failure." Shock 26(3): 245-253.
- Verstrepen, W. A., V. P. Persy, et al. (2001). "Renal osteopontin protein and mRNA upregulation during acute nephrotoxicity in the rat." Nephrol Dial Transplant 16(4): 712-724.
- Waanders, F., M. M. van Timmeren, et al. "Kidney injury molecule-1 in renal disease." J Pathol 220(1): 7-16.
- Weingand, K., G. Brown, et al. (1996). "Harmonization of animal clinical pathology testing in toxicity and safety studies. The Joint Scientific Committee for International Harmonization of Clinical Pathology Testing." Fundam Appl Toxicol 29(2): 198-201.

Annexes

- Werner, M., M. J. Costa, et al. (1995). "Nephrotoxicity of xenobiotics." Clin Chim Acta **237**(1-2): 107-154.
- Westhuyzen, J., Z. H. Endre, et al. (2003). "Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit." Nephrol Dial Transplant **18**(3): 543-551.
- Xie, Y., M. Sakatsume, et al. (2001). "Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney." Kidney Int **60**(5): 1645-1657.
- Zhou, H., T. Pisitkun, et al. (2006). "Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury." Kidney Int **70**(10): 1847-1857.

Annexe I c : Effect of nephrotoxic treatment with gentamicin on rats chronically exposed to uranium

Sous presse dans *Toxicology*

Annexes

Materials and methods

Animals

Experiments were performed with male Sprague-Dawley rats (250 g) obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Animals were housed at constant room temperature ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$) with a 12 h:12 h light-dark cycle. The Animal Care Committee of the Institute approved the experiments, which were conducted in accordance with French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 2001-464, May 2001).

Experimental design

Animal DU exposure

The rats in the contaminated group (n=48) were exposed to uranyl nitrate (U238: 99.74%, U235: 0.26%, U234: 0.001%) *via* drinking water for 9 months, at a dose of 40 mg/l (about 1 mg/rat/day) (AREVA-NC, France). This dose corresponds to twice the highest uranium concentration found naturally— in well-water in Finland (Salonen 1994). Animals were carefully monitored once a week (body weight, food and water intake) throughout the DU exposure period and until the end of the experiment. Exposure to DU did not influence the rats' food consumption, body weight or general health status (data not shown). Control animals (n=48) had normal drinking water. DU kidney concentration was quantified by ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrophotometer).

Animal gentamicin treatment

During the last week of uranium contamination, the rats in both groups received gentamicin treatment. The gentamicin sulfate (Sigma, G3632, Saint Quentin Fallavier, France) was administrated by subcutaneous injection for 4 consecutive days (0, 5, 25, 100 and 150 mg gentamicin per kg of body weight) in NaCl 0.9% using an injection volume of 1 ml/kg (n=8 for each condition). During gentamicin treatment, rats were weighed daily.

Urine, plasma, serum and tissue collection

Urine was collected and quantified for 24 hours immediately after the fourth injection. To allow the animals to adapt to the change of cage, they were placed in standard metabolic cages 24 hours

Annexes

before urine collection. Urine was centrifuged at 3000 g for 10 minutes (4°C), and supernatants were collected and stored at -80°C.

After the 24-h period of urine collection following the fourth injection, rats were euthanised by terminal exsanguination (intracardiac puncture) under isofluorane anaesthesia. For each rat, both kidneys were collected and weighed. Half of each kidney was placed in formaldehyde 4% for histological analysis. The cortex and medulla sections of the other half were meticulously separated, flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. The blood was centrifuged at 4000 g for 10 minutes (4°C) to prepare plasma and serum, which were then stored at -80°C.

Plasma and urine biochemical indicators

We used an automated Konelab 20 to measure gentamicin, creatinine, urea, calcium (Ca), chloride (Cl), potassium (K) and sodium (Na) in plasma and gentamicin, creatinine, urea, total proteins, uric acid, Ca, K, phosphorus (P) and Na in urine (biological chemistry reagents, Thermo Electron Corporation, Villebon sur Yvette, France).

Histopathology

The preserved kidney sections were cut with a microtome, stained with hematoxylin and eosin, and examined by light microscope. Damage was assessed by an expert pathology laboratory (Biodoxis, Romainville, France) according to standard criteria. The glomerular damage was estimated according to mesangial proliferation, glomerulosclerosis and glomerular cystic dilatation. The tubulointerstitial damage was estimated based on necrosis, atrophy and dilatation of the tubules and interstitial inflammation and fibrosis.

Real-time RT-PCR

Total RNA from the renal cortex was extracted with the RNeasy Total RNA Isolation Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse-transcribed with random hexamers, with the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Real-time PCR was used to analyse the mRNA level of nephrotoxicity biomarkers (KIM-1, osteopontin and kallikrein) and major xenobiotic metabolising enzymes – cytochromes P450 (CYP) 3A1, 3A2 and 1A1, glutathione-S-transferase A2 (GSTA2), UDP-glucuronyl transferase 1A1 and 2B1 (UGT1A1 and UGT2B1) and sulfotransferase 1A1 (ST1A1). An AbiPrism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems,

Annexes

Courtaboeuf, France) was used with 4 ng of cDNA for each reaction. A mix of primers (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) (2.5% v/v), SYBR (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) (83% v/v) and sterile water (14.5% v/v) was added to each well to yield a final volume of 10 μ l. Samples were normalised to hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (HPRT) and fold induction calculated relative to the control (untreated and unexposed group). Sequences of forward and reverse primers are listed in Table 1 (Gueguen et al. 2007; Rekka et al. 2002; Ropenga et al. 2004; Rouas et al. 2009; Su and Waxman 2004; t Hoen et al. 2002).

Western Blot

Proteins from renal cortex homogenate were loaded, separated by 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked for 1 hour in 5% non-fat dry milk in TBS. The blots were incubated overnight with antibodies diluted in 2% non-fat dry milk in TBS at 4°C. UGT1A1 and ST1A proteins were detected with goat polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), GSTY α protein with goat antibody (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, USA) and KIM-1 protein with goat polyclonal antibody (R&D systems, Lille, France). Immune complexes were revealed by rabbit anti-goat IgG and goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) coupled to horseradish peroxidase (HRP) and the luminol derivative of Immobilon Western (Millipore, Billerica, USA). Samples were normalised to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), which was detected with rabbit anti-rat antibody (Santa Cruz Biotechnology). Reaction intensity was determined by camera coupled with computer-assisted densitometry (Fuji Las3000, Raytest, France).

Beta2-microglobulin assay

Beta2-microglobulin was detected in the urine using a sandwich enzyme immunoassay, according to the manufacturer's instructions (Gentaur, Paris, France).

KIM-1 assay in urine

KIM-1 was detected in the urine using an ELISA kit and according to the manufacturer's instructions (R&D, Lille, France). To comply with the concentration intervals of the assay, urine was diluted per 10 or 100 according to the gentamicin concentration administered.

Statistical analysis

To compare the effects of gentamicin treatment on rats that were and were not exposed to chronic uranium contamination, statistical analyses used two-way analysis of variance (ANOVA), with DU contamination and gentamicin dose as the two factors. All results were expressed as mean \pm S.E.M. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Concentrations of plasma and urine gentamicin were measured 24 hours after the last treatment and were correlated with the gentamicin doses administered. The values in DU-exposed group and in non-exposed groups did not differ at any gentamicin concentration (data not shown). The uranium concentration in kidney was less than 0.15 μg per g of kidney.

Markers of renal pathology

Weight, plasma and urinary biochemical measurements

Table 2 shows the data for final body weight and percentage of weight loss during gentamicin treatment for both groups. A statistically significant decrease in body weight during gentamicin treatment was observed in the control group treated with 150 mg/kg of gentamicin (-5.3%, $p < 0.01$) and in the DU-exposed group treated with 100 mg/kg and 150 mg/kg of gentamicin (-5.3 and 5.4%, $p < 0.01$). Neither gentamicin treatment nor uranium exposure induced a significant change in kidney weight (Table 3).

Kidney function was evaluated by standard markers such as plasma and urine urea, diuresis and creatinine clearance, all shown in Table 3. Although the gentamicin treatment did not affect diuresis, creatinine clearance decreased in a dose-dependent fashion, with significant changes only in non-DU-exposed rats ($p < 0.001$ at 25 to 150 mg/kg) (Table 3). Nevertheless, no significant difference was observed between DU-exposed and control rats. Accordingly, the mean plasma creatinine and urea concentrations increased after gentamicin treatment (150 mg/kg) by more than 50% in both groups, and DU exposure had no synergistic effect. Neither gentamicin treatment nor uranium exposure induced changes in plasma electrolyte levels.

After gentamicin treatment (100 and 150 mg/kg), various urine parameters (calcium, phosphate, sodium, and urea) differed between the two study groups. Moreover, calcium was more than twice

higher in control rats than in DU-exposed rats in the groups treated by 150 mg/kg of gentamicin ($p < 0.001$).

Urinary protein analysis showed that gentamicin induced a slight increase in total proteins, associated with a concentration-dependent rise in B2-microglobulin, a low molecular weight protein. Uranium exposure did not affect these indicators.

Renal histopathology

Representative microphotographs of lesions in rat kidneys 24 hours after the last administration of gentamicin are shown in figure 1. No damage was observed in rats treated with less than 25 mg/kg of gentamicin. At 25 mg/kg and above that concentration, tubulointerstitial lesions predominated; they were minimal to moderate, rarely marked, but dose-dependent (+100% at 150 mg/kg, $p < 0.001$) (figure 2A). These lesions were primarily subacute to chronic tubulointerstitial nephritis, characterised by multifocal, mononuclear inflammatory infiltrates (minimal to moderate), atrophic or distended tubules (hyaline casts, minimal to severe) (figure 1A), multifocal interstitial fibrosis (minimal to moderate) (figure 1B), and acute to subacute tubular necrosis (absent to severe) (figure 1C-F). Tubular necrosis was induced by gentamicin treatment beginning at a dose of 25 mg/kg and was statistically increased at 100 mg/kg (+25%, $p < 0.001$) and 150 mg/kg (+29%, $p < 0.001$). Significant increases in tubular necrosis were also observed at 100 and 150 mg/kg in DU-exposed compared to non-exposed rats (+30%, $p < 0.05$) (figure 2B).

Glomerular lesions were mostly minimal to mild. They were independent of the gentamicin dose and probably due to ageing (figure 2A). Glomerular lesions consisted mainly in a slight thickening of the glomerular mesangium, sometimes with mild features of segmental to global glomerulosclerosis, and minimal to mild glomerular cystic atrophy (figure 1G-H).

Protein markers of nephrotoxicity

KIM-1

Gentamicin significantly increased levels of KIM-1 gene expression and protein in the renal cortex and the urine (figure 3). Gene expression of KIM-1 gradually increased in the renal cortex in both groups, from 20-fold (in DU-exposed rats treated by 25 mg/kg of gentamicin, $p < 0.001$) to 100-fold (in DU-exposed rats treated by 150 mg/kg, $p < 0.001$) (figure 3 A). The protein level also increased significantly after large gentamicin doses (150 mg/kg) in DU-exposed rats (27-fold, $p < 0.001$) (figure

Annexes

3 B). Nevertheless, no significant difference was observed between the DU-exposed and non-exposed groups: at the same gentamicin concentration (150 mg/kg), KIM-1 concentration in the urine increased significantly in both groups (20-fold, $p < 0.001$).

Osteopontin and kallikrein

In the renal cortex, gene expression of the novel kidney biomarkers osteopontin and kallikrein was significantly modified by gentamicin treatment (figure 4). Osteopontin gene expression started to increase in both groups at a concentration as low as 25 mg/kg, with significant changes occurring at 100 mg/kg (more than 500%, $p < 0.001$). A dose-dependent decrease in kallikrein gene expression was observed in rats treated by 5 mg/kg to 150 mg/kg of gentamicin in both groups (-80%, $p < 0.001$).

Impact on XME in kidney

Figure 5 shows the effects of gentamicin treatment and uranium contamination on xenobiotic metabolising enzymes (XME) in the renal cortex.

Starting at a concentration of 100 mg/kg, gentamicin treatment induced a decrease in gene expression of both GSTA2 (-75% at 150 mg/kg, $p < 0.001$) and UGT1A1 (-50% at 150 mg/kg, $p < 0.001$) in the DU-exposed and control rats. In DU-exposed rats, the gene expression of ST1A1 also decreased starting at a concentration of 100 mg/kg (-60%, $p < 0.001$). The DU exposure associated with gentamicin treatment also induced some changes in gene expression of GSTA2 (+82% at 150 mg/kg, $p < 0.05$), UGT1A1 (-35% at 100 mg/kg, $p < 0.01$), and CYP3A2 (+200% at 25 mg/kg, $p < 0.05$ and -70% at 100 mg/kg, $p < 0.05$), compared with rats not exposed to DU. Nevertheless, the protein level of these enzymes (UGT1A1, GSTa and ST1) remained unchanged, regardless of gentamicin concentration or DU exposure. Gene expression of CYP3A1, UGT2B and CYP1A1 was not affected by either gentamicin or uranium exposure (data not shown).

Discussion

Many studies have shown that the kidney is the first organ to be affected by uranium exposure (Diamond et al. 1989; Haley 1982; Leggett 1989). Its accumulation in the proximal tubules induces severe kidney injury and impairs kidney function and physiology. Only few studies have shown the impact on kidneys of chronic low-level uranium exposure. Under our experimental conditions, the uranium concentration was less than 0.4 $\mu\text{g/g}$ kidney, the threshold for kidney damage (Gilman et al. 1998). It is so no surprising that we do not observe any increase of nephrotoxic indicators in rats

Annexes

no treated by gentamicin. In addition, no study has yet examined the cumulative effect of co-exposure to a nephrotoxic xenobiotic treatment on kidneys chronically exposed to a low uranium concentration. For this purpose, rats exposed to chronic low-level uranium contamination were then treated with increasing gentamicin doses (5 to 150 mg/kg). Kidney and especially tubular injuries were estimated with physiological, biological, histological and functional indicators.

At a physiological level, starting at a dose of 100 mg/kg, gentamicin induced weight loss during the four days of treatment. At the same dose, creatinine clearance decreased and plasma creatinine increased. These parameters did not differ significantly between the DU-exposed and non-exposed rats. These results suggest that DU exposure does not aggravate the gentamicin-induced reduction in glomerular filtration. We also noted an increase in plasma urea, consistent with the decline in its urinary level. Moreover, changes in electrolyte (Ca, K, Na, and P) concentrations in the urine show that gentamicin treatment equal or above 100 mg/kg impaired tubular reabsorption functions. Only a few studies have thus far used electrolyte assays to describe gentamicin nephrotoxicity, but our results are consistent with previous publications (Cuzzocrea et al. 2002; Luft et al. 1978; Murakami et al. 1999; Priyamvada et al. 2008). Globally, gentamicin affected most kidney measurements in a concentration dependent manner, with significant differences beginning at 100 mg/kg and without aggravation induced by uranium exposure.

The renal histopathology study confirmed that gentamicin treatment induces tubular damage without impairing glomerular structure. As expected, this study showed necrosis of the kidney tubules due to gentamicin treatment, appearing at 25 mg/kg and worsening as the concentration increased. Interestingly, tubular necrosis was aggravated in the DU-exposed rats treated with the highest gentamicin concentrations. This result suggests that chronic uranium exposure may slightly potentiate gentamicin-induced tubular necrosis.

To evaluate with precision the kidney injuries induced by DU exposure and gentamicin treatment, gene expression of novel tubular kidney toxicity markers was investigated in the kidney cortex. KIM-1 is a type 1 transmembrane protein whose expression is markedly up-regulated in proximal tubule injuries. KIM-1 was elevated earlier in the course of renal tubular injury than are currently accepted nephrotoxicity biomarkers. KIM-1 gene expression increased significantly beginning at 25 mg/kg of gentamicin, although the change appeared at the protein level only from 150 mg/kg. Gene expression appeared to be more sensitive than either the KIM-protein level or urine assay. Similarly,

Annexes

gene expression of osteopontin increased and that of kallikrein decreased after gentamicin treatment exceeding 100 mg/kg (Amin et al. 2004). Under our experimental conditions, KIM-1 was the most sensitive biomarker for gentamicin nephrotoxicity, but it did not show that chronic DU exposure aggravated the kidney injuries.

To estimate the impact of gentamicin-uranium co-exposure on one of the primary metabolic functions in the tubular section of kidney, we assessed the gene and protein expression of xenobiotic metabolising enzymes. Globally, gene expression of GSTA2, ST1A1 and UGT1A1 decreased slightly in the renal cortex of rat treated with gentamicin (100 and 150 mg/kg). Some minor variations were noted between DU-exposed and control rats, especially for gene expression of CYP3A2 and UGT1A1. Induction of some CYP gene expression (CYP2B1, CYP3A1 and CYP2C11) has previously been described in studies following the same uranium exposure protocol (Gueguen et al. 2005; Souidi et al. 2005). Moreover, CYP3A has already been mentioned as a potential sensitive target of uranium chronic exposure in the liver (Rouas et al. 2009). GST, which also belongs to the XME family, is used as a nephrotoxicity marker (Westhuyzen et al. 2003). Its gentamicin concentration-dependent decrease may thus supplement the analysis of other protein markers, such as KIM-1, osteopontin and kallikrein. Moreover, GST protein plays an important role in protection against oxidative stress. Experiments suggest that reactive oxygen species play a role in gentamicin-induced nephrotoxicity (Banday et al. 2008; Cuzzocrea et al. 2002). Several studies describe modifications of oxidative stress factors and especially decreased GST activity in the kidneys after gentamicin exposure (Ekor et al. 2006; Silan et al. 2007). In vivo, the role of oxidative stress factors in the renal effects of uranium has also been demonstrated for chronic exposure (Linares et al. 2006). Although GST gene expression differed only slightly between DU-exposed and control rats treated with the highest concentration of gentamicin, our result confirm interest to study the oxidative stress system in chronic exposure condition in depth.

In conclusion, we used different types of analyses (plasma, urine and tissue biomarkers, histopathology, and cortical gene and protein expression) to study the cumulative effects of co-exposure to uranium and another nephrotoxic agent, i.e. gentamicin. Our results about gentamicin are consistent with previous reports of a nephrotoxicity threshold around 100 mg/kg. Overall, our results indicate that chronic exposure to depleted uranium does not aggravate gentamicin-induced nephrotoxicity. Nevertheless, it would be interesting to evaluate the impact of chronic co-exposure

to uranium and several nephrotoxic xenobiotics, such as cadmium, tobacco, or other drugs (diuretic, etc.).

Acknowledgments

The authors thank O. Delissen for her assistance during the animal experiments. This study was part of the ENVIRHOM research program supported by Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN).

Bibliography

- Amin RP, Vickers AE, Sistare F et al (2004) Identification of putative gene based markers of renal toxicity. *Environ Health Perspect* 112:465-79
- Banday AA, Farooq N, Priyamvada S et al (2008) Time dependent effects of gentamicin on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane and oxidative stress in rat kidney tissues. *Life Sci* 82:450-9
- Cuzzocrea S, Mazzone E, Dugo L et al (2002) A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 450:67-76
- Diamond GL, Morrow PE, Panner BJ et al (1989) Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam Appl Toxicol* 13:65-78
- Ekor M, Farombi EO, Emerole GO (2006) Modulation of gentamicin-induced renal dysfunction and injury by the phenolic extract of soybean (*Glycine max*). *Fundam Clin Pharmacol* 20:263-71
- Gilman AP, Villeneuve DC, Secours VE et al (1998) Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci* 41:117-28
- Gueguen Y, Grandcolas L, Baudelin C et al (2007) Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium. *Toxicology* 229:62-72
- Gueguen Y, Paquet F, Voisin P et al (2005). Effects of chronic contamination with depleted uranium on xenobiotic biotransformation enzymes in the rat. 14th international conference on cytochromes P450, Dallas, Texas.
- Gueguen Y, Souidi M, Baudelin C et al (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
- Haley DP (1982) Morphologic changes in uranyl nitrate-induced acute renal failure in saline- and water-drinking rats. *Lab Invest* 46:196-208
- Kurtio P, Auvinen A, Salonen L et al (2002) Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 110:337-42
- Leggett RW (1989) The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys* 57:365-83
- Linares V, Belles M, Albina ML et al (2006) Assessment of the pro-oxidant activity of uranium in kidney and testis of rats. *Toxicol Lett* 167:152-61
- Luft FC, Bloch R, Sloan RS et al (1978) Comparative nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics in rats. *J Infect Dis* 138:541-5
- Magdo HS, Forman J, Graber N et al (2007) Grand rounds: nephrotoxicity in a young child exposed to uranium from contaminated well water. *Environ Health Perspect* 115:1237-41
- Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM (1999) Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1003-12
- Moon YJ, Lee AK, Chung HC et al (2003) Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats. *Drug Metab Dispos* 31:776-84
- Murakami H, Yayama K, Chao J et al (1999) Atrial natriuretic peptide gene delivery attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant* 14:1376-84
- Ortega A, Domingo JL, Llobet JM et al (1989) Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 42:935-41

Annexes

- Ozaki N (2009) Identification of genes involved in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats - A toxicogenomic investigation. *Experimental and Toxicologic Pathology*
- Pasanen M, Lang S, Kojo A et al (1995) Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environ Res* 70:126-33
- Priyamvada S, Priyadarshini M, Arivarasu HA et al (2008) Studies on the protective effect of dietary fish oil on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 78:369-81
- Rekka E, Evdokimova E, Eeckhoudt S et al (2002) Role of temperature on protein and mRNA cytochrome P450 3A (CYP3A) isozymes expression and midazolam oxidation by cultured rat precision-cut liver slices. *Biochem Pharmacol* 64:633-43
- Ropenga A, Chapel A, Vandamme M et al (2004) Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat. *Radiat Res* 161:597-602
- Rouas C, Souidi M, Grandcolas L et al (2009) Acetaminophen induces xenobiotic-metabolizing enzymes in rat: Impact of a uranium chronic exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology* in press:
- Salonen L (1994) 238U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock. *IAHS* 222:
- Silan C, Uzun O, Comunoglu NU et al (2007) Gentamicin-induced nephrotoxicity in rats ameliorated and healing effects of resveratrol. *Biol Pharm Bull* 30:79-83
- Souidi M, Gueguen Y, Linard C et al (2005) In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* 214:113-22
- Su T, Waxman DJ (2004) Impact of dimethyl sulfoxide on expression of nuclear receptors and drug-inducible cytochromes P450 in primary rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 424:226-34
- t Hoen PA, Rooseboom M, Bijsterbosch MK et al (2002) Induction of glutathione-S-transferase mRNA levels by chemopreventive selenocysteine Se-conjugates. *Biochem Pharmacol* 63:1843-9
- Westhuyzen J, Endre ZH, Reece G et al (2003) Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant* 18:543-51
- Zamora ML, Tracy BL, Zielinski JM et al (1998) Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol Sci* 43:68-77

Figures and tables

Table 1: Primer sequences for rat gene encoding xenobiotic-metabolizing enzymes and markers of nephrotoxicity

Gene	Forward	Reverse	Accession n°	Reference
HPRT	GCT CGA GAT GTC ATG AAG GAG A	TCA GCG CTT TAA TGT AAT CCA GC	NM_012663	Ropenga et al. 2004
CYP3A1	AGG CAC CTC CGA CCT ATG ATA C	TGG GCA TAA ACA CAC CAT TGA	M10101	Su et al. 2004
CYP3A2	AGT AGT GAC GAT TCC AAC ATA T	TCA GAG GTA TCT GTG TTT CCT	NM_153312.2	Rekka et al. 2002
CYP1A1	CCT GGA GAC CTT CCG ACA TTC	GGG ATA TAG AAG CCA TTC AGA CTT G	NM_012640	Su et al. 2004
GSTA2	TTG ACA TGT ATT CAG AGG GT	TTG TTT TGC ATC CAT GGC TG	N30190	Hoen et al. 2002
UGT1A1	TGG CTA CCC CAA AAC GAT CT	GGA ACC GGA GTG TGT GAT GAA	NM_175646.2	Rouas et al., 2009
UGT2B1	TGG AGA ACA TGG TGT AGT GGT	TTG GCT TTT TCT TCA GTA GTC AGG	NM_173295.1	Gueguen et al., 2007
ST1A1	AGG GTGGCAAGCTAGAGAAGTG	GAGGGAAACCCCTGGACATTT	NM_031634	Rouas et al., 2009
KIM-1	CCAGAGAAACCCGACTAAG	CAAAGCTCAGAGGCCCATC	AF35983	Amin et al. 2004
Kallikrein	GCACCGGCTTGTGAGTCAA	TGGGTGTGGTTCCTCATG	M19047	Amin et al. 2004
Osteopontin	CCAGCACACAAGCAGAGGTTT	CAGTCCGTAAGCCAAGCTATCA	M89252	Amin et al. 2004

Annexes

gentamicin dose (mg/kg)	NE					DU				
	0	5	25	100	150	0	5	25	100	150
Final body weight (g)	617 ± 18	681 ± 23	638 ± 15	592 ± 16	592 ± 21	604 ± 26	595 ± 17	601 ± 14	608 ± 20	594 ± 17
Weight loss during gentamicin treatment (%)	1.3 ± 0.7	1.4 ± 0.55	1.6 ± 0.8	3.5 ± 1.5	5.3 ± 0.5*	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.6	2.9 ± 0.8	5.3 ± 0.5*	5.4 ± 0.5*

Table 2: Final body weight and weight loss 4 days after the first gentamicin treatment (5 to 150mg/kg) in non-exposed (NE) (n=8) and DU-exposed (n=8) rats. Asterisk represents a significant difference between gentamicin treated and untreated (D) rats (Two-way ANOVA, *p<0.01).

gentamicin concentration (mg/kg)	NE					DU				
	0	5	25	100	150	0	5	25	100	150
Physiological parameters										
Kidney (g/100g body weight)	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.03	0.56 ± 0.01	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.01	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.01
Creatinin clearance (ml/min/kg)	4.4 ± 0.6	3.5 ± 0.3	2.70 ± 0.23**	2.5 ± 0.1**	1.7 ± 0.4**	3.4 ± 0.1	3.2 ± 0.3#	3.0 ± 0.2	2.2 ± 0.1	2.7 ± 0.2
Diuresis (μl/min)	6.6 ± 0.8	7.1 ± 0.6	6.20 ± 0.24	7.0 ± 0.5	7.8 ± 1.0	5.1 ± 0.8	6.2 ± 0.6	5.4 ± 0.6	5.8 ± 1.0	8.9 ± 1.0#
Plasmatic parameters										
Creatinin (μM)	42.0 ± 4.3	41.2 ± 2.9	52.9 ± 2.7	85.4 ± 4.0**	71.2 ± 4.5**	46.1 ± 1.9	46.6 ± 1.7	52.8 ± 2.1	84.0 ± 0.3	72.4 ± 10.0**
Uree (mmol)	3.6 ± 0.2	3.7 ± 0.3	4.3 ± 0.3	6.6 ± 0.6**	5.9 ± 0.6**	4.4 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.4	5.6 ± 0.6	6.3 ± 0.9
Cl (mmol)	79.9 ± 7.9	76.9 ± 5.4	85.9 ± 3.2	84.9 ± 3.3	85.8 ± 4.5	91.8 ± 2.3	90.9 ± 4.4	93.8 ± 3.2	86.9 ± 2.5	84.0 ± 5.8
B (mmol)	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.3	3.9 ± 0.2	3.1 ± 0.2	3.2 ± 0.2	4.8 ± 0.3	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.4 ± 0.1	3.1 ± 0.2
Na (mmol)	105.2 ± 9.9	102.5 ± 6.5	126.6 ± 3.6	121.5 ± 4.1	123.1 ± 5.6	128.7 ± 2.8	128.4 ± 3.1	132.2 ± 3.8	124.9 ± 3.2	119.9 ± 6.8
Ca (mmol)	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.1	2.3 ± 0.09	2.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.04	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.09	2.0 ± 0.2
Urinary parameters										
Ca (mmol/mol Ucreat)	0.09 ± 0.01	0.2 ± 0.05	0.2 ± 0.04	0.5 ± 0.1**	0.8 ± 0.1**	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.05	0.2 ± 0.03	0.6 ± 0.1**	0.4 ± 0.08**#
B (mmol/mol Ucreat)	8.5 ± 1.2	9.7 ± 1.0	8.8 ± 1.2	7.7 ± 0.6	10.6 ± 0.7	9.2 ± 1.5	10.0 ± 1.1	7.2 ± 1.0	8.4 ± 0.5	9.3 ± 0.7
Na (mmol/mol Ucreat)	7.8 ± 1.0	7.9 ± 0.3	7.0 ± 1.0	4.6 ± 0.3*	5.4 ± 0.6	7.2 ± 1.1	8.5 ± 0.9	5.2 ± 0.9*	5.1 ± 0.6*	5.2 ± 0.5*
Uric acid (mmol/mol Ucreat)	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.01*	0.1 ± 0.01*	0.2 ± 0.02	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01**	0.09 ± 0.01**
Phosph (mmol/mol Ucreat)	2.1 ± 0.3	3.7 ± 0.7*	3.0 ± 0.3	4.5 ± 0.2**	6.0 ± 0.5**	2.8 ± 0.2	2.4 ± 0.3#	2.7 ± 0.5	4.4 ± 0.4**	4.9 ± 0.4**
Uree (mmol/mol Ucreat)	71.3 ± 3.2	77.5 ± 7.2	85.9 ± 5.4	48.1 ± 3.0*	50.8 ± 1.3**	71.7 ± 3.3	69.0 ± 3.9	60.8 ± 6.6	48.9 ± 2.7**	46.6 ± 2.5**
Total protein (g/mmol Ucreat)	0.3 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.2 ± 0.04	0.4 ± 0.06	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.06	0.4 ± 0.08	0.5 ± 0.1
B2-microglobulin (g/mmol Ucreat)	2.4 ± 1.3	2.1 ± 1.4	1.3 ± 1.1	6.3 ± 1.4	8.1 ± 2.4*	1.8 ± 0.7	1.9 ± 0.7	0.8 ± 0.4	3.2 ± 0.9	8.1 ± 3.2
Creatinin (mmol)	17.5 ± 2.5	14.7 ± 1.3	16.2 ± 2.5	14.9 ± 2.1	10.9 ± 1.5	18.3 ± 2.7	15.2 ± 1.2	20.0 ± 3.1	15.0 ± 1.5	11.6 ± 1.7

Table 3: Kidney physiological, plasmatic and urinary parameters in non-exposed (n=8) and in DU-exposed (n=8) rats treated or not by gentamicin (5 to 150mg/kg) for 4 days. Asterisk represents a significant difference between gentamicin treated and untreated (D) rats (Two-way ANOVA, *p<0.01, **p<0.001). Sharp sign represents a significant difference between DU exposed (DU) and non-exposed (NE) rats (Two-way ANOVA, #p<0.05, ##p<0.001).

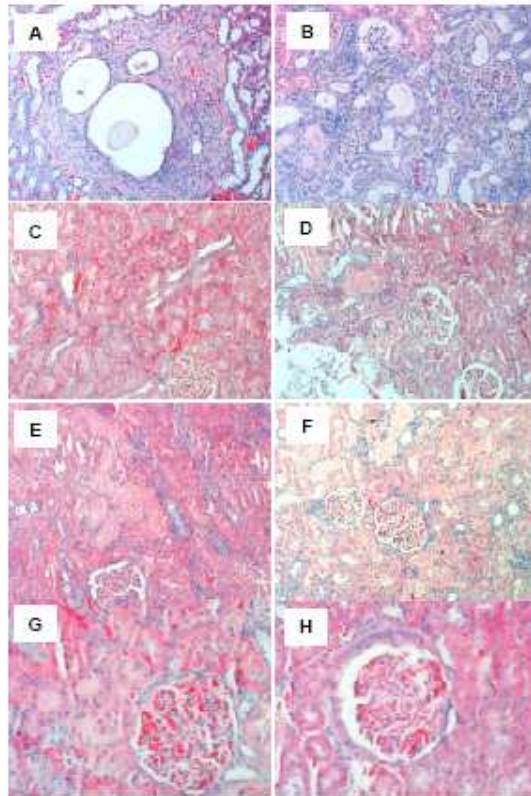


Figure 1 :Representative photomicrographs of renal lesions in rats at 24 hours following treatment with gentamicin. Panels A,G, H (x200), B,C,D, E and F (x100); HES staining. Panel A-gentamicin 5 mg/kg : Mild focal interstitial fibrosis with tubular dilatation and interstitial inflammation. Panel B- gentamicin 150 mg/kg : Moderate interstitial inflammation and moderate interstitial fibrosis. Panel C-gentamicin 5 mg/kg: Normal tubules, no necrosis. Panel D-gentamicin 25 mg/kg: Tubular necrosis in single tubules. Panel E-gentamicin 100 mg/kg: Tubular necrosis in <20% of the tubules. Panel F-gentamicin 150 mg/kg: Tubular necrosis in 20-50% of the tubules. Panel G-gentamicin 150 mg/kg : Normal glomerules. Panel H- gentamicin 5 mg/kg : Slight mesangial thickening without hypercellularity, in few glomerules

Annexes

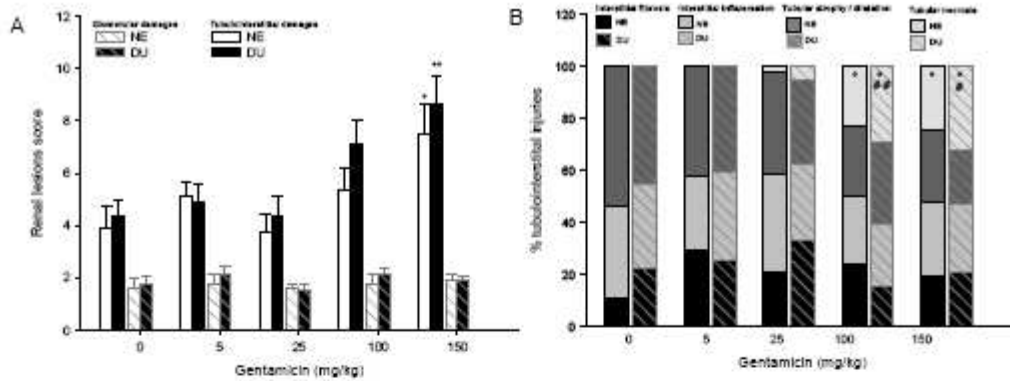


Figure 2 : Renal lesions score (A) and percentage of types of tubule and interstitium injuries (Interstitial fibrosis, Interstitial inflammation, tubular atrophy/dilatation, tubular necrosis) in tubulointerstitial damages (B). The DU exposed and non exposed (NE) rats were treated with different doses of gentamicin (5 to 150 mg/kg). Histological study of kidneys have been undertaken (n=8 for each group). Asterisk represents a significant difference between gentamicin treated and untreated (D) rats (Two-way ANOVA, *p<0.001). Sharp sign represents a significant difference between DU exposed (DU) and non-exposed (NE) rats (Two-way ANOVA, #p<0.05, ## p<0.01)

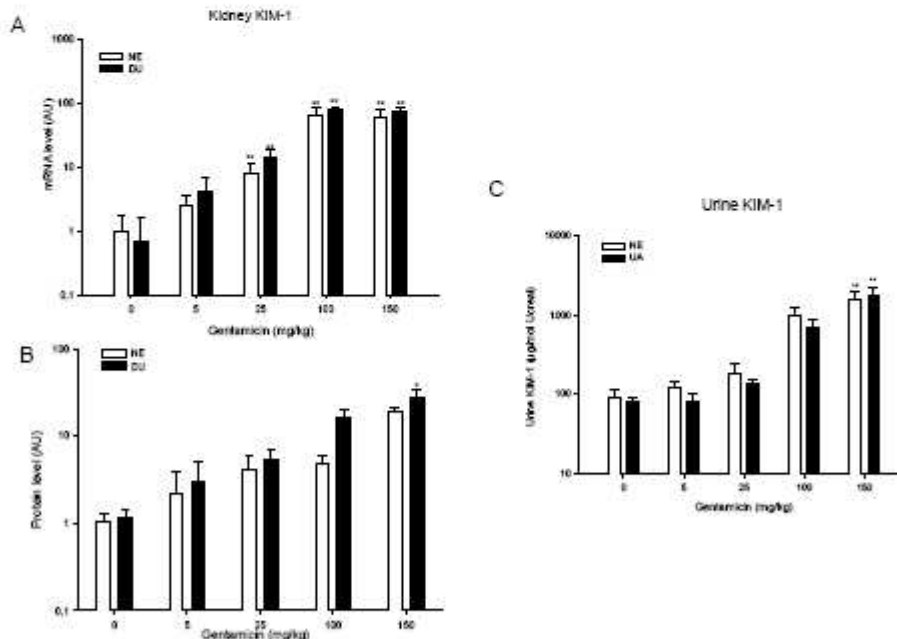


Figure 3 : KIM-1 gene expression (A) and protein level (B) in renal cortex of kidney and in urine (C) in DU-exposed (DU) and non exposed (NE) rats treated or not by gentamicin . Following the fourth daily injection of gentamicin, urines were collected for 24 hours via metabolism cage until the rats were euthanized and blood and kidney were collected. The cortex section of kidney was separated (n=8 for each group). The results are expressed as a ratio to the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA levels, AU : arbitrary unit. Asterisk represents a significant difference between gentamicin treated and untreated (D) rats (Two-way ANOVA, **p<0.001, *p<0.01). Sharp sign represents a significant difference between DU exposed (DU) and non-exposed (NE) rats (Two-way ANOVA, #p<0.05, ## p<0.01)

Annexes

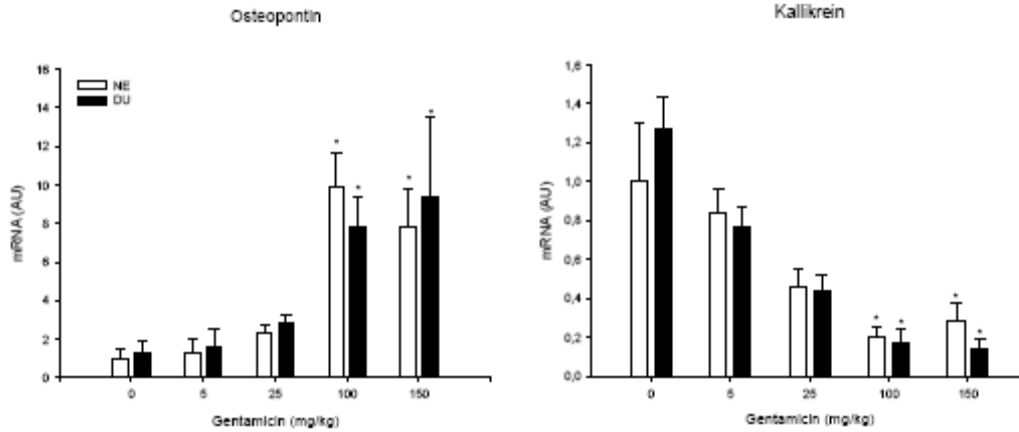


Figure 4 : Gene expression of osteopontin and kallikrein in renal cortex of DU-exposed (DU) and non exposed (NE) rats treated or not by gentamicin (n=8 for each group). The results are expressed as a ratio to the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA levels, AU : arbitrary unit. Asterisk represents a significant difference between gentamicin treated and untreated (0) rats (Two-way ANOVA, *p<0.001).

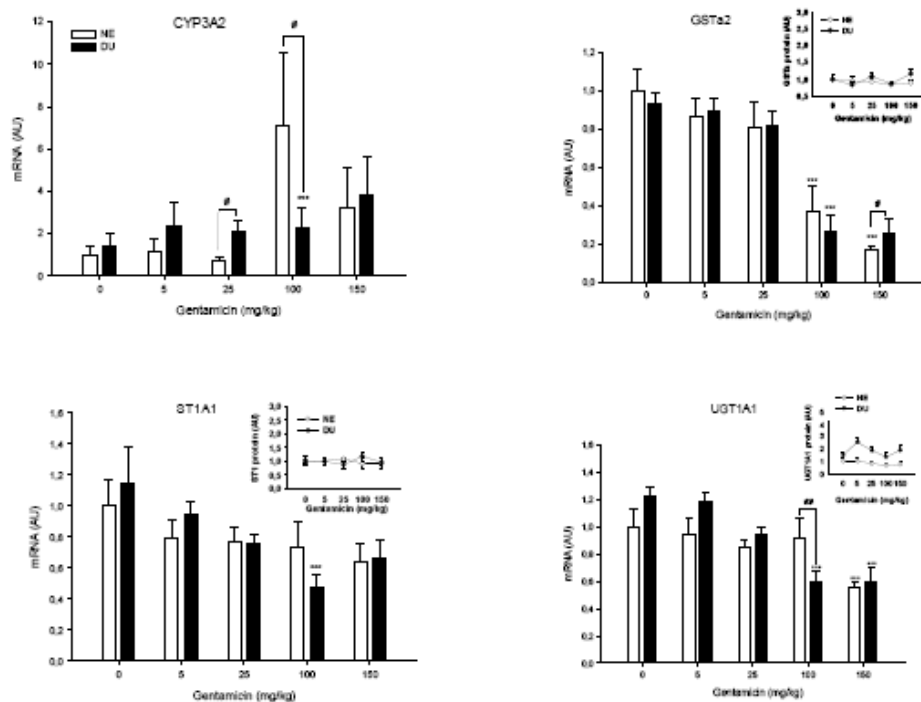


Figure 5 : Gene and protein expression of xenobiotic metabolizing enzymes in renal cortex of DU-exposed (DU) and non exposed (NE) rats treated or not by gentamicin (n=8 for each group). The results of RNAm are expressed as a ratio to the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA levels. The results of protein are expressed as a ratio to the housekeeping gene Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) protein levels, AU : arbitrary unit, AU : arbitrary unit Asterisk represents a significant difference between gentamicin treated and untreated (0) rats (Two-way ANOVA, *p<0.001). Sharp sign represents a significant difference between DU exposed (DU) and non-exposed (NE) rats (Two-way ANOVA, #p<0.05, ## p<0.01)

Annexes

Annexe I d : Acetaminophen induces xenobiotic-metabolizing enzymes in rat : impact of a uranium chronic exposure

Annexes

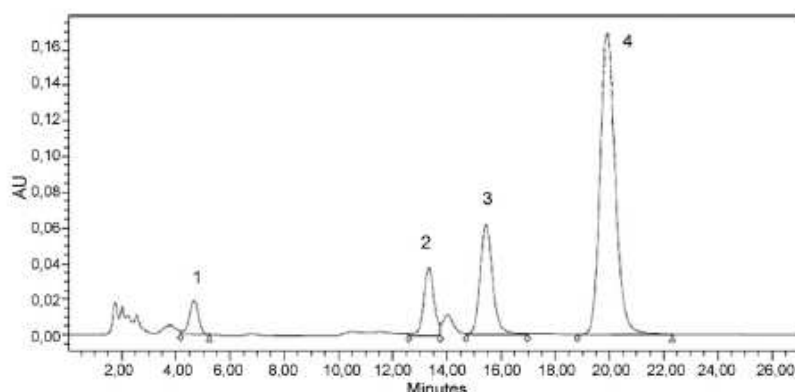


Fig. 1. HPLC elution profile of acetaminophen (APAP) and its major metabolites in plasma of rats sacrificed 0.5 h after APAP treatment. Peaks: 1 = APAP-glucuronide, 2 = APAP-sulfate, 3 = APAP, 4 = theophylline (internal standard).

2.9. Plasma APAP and metabolites analysis

APAP and its major metabolites, APAP-sulfate (APAP-sulf) and APAP-glucuronide (APAP-gluc), were measured in the plasma using the method of Tran et al. (2001) with modifications. Plasma samples (90 μ l) were mixed with theophylline as an internal standard in order to give a total volume of 100 μ l. Plasma proteins were precipitated with 10 μ l of 30% (w/v) perchloric acid (Sigma-Aldrich, France). The samples were mixed using a Vortex[®] shaker for 10 s and centrifuged twice for 15 min at 10,000 \times g. The supernatant was filtered through a 0.2 μ m filter. A volume of 20 μ l of this supernatant was injected into the HPLC system (column SymmetryShield RP18, 4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m, Waters) and components were quantified at 254 nm. An elution gradient was applied, beginning with 100% of 20 mM phosphate buffer at a flow rate of 1 ml/min for 6 min. During the 7th minute, phosphate buffer was decreased to 96% and acetonitrile was increased to 4%. The composition remained unchanged until the end of the cycle. Typical retention times were 4 min for APAP-gluc, 12 min for APAP-sulf, 15 min for APAP and 20 min for theophylline (Fig. 1). We used purified APAP (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), APAP-sulf (Sigma-Aldrich, Manchester, UK), APAP-gluc (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) as reference standards.

2.10. Statistical analysis

To compare time-course effects of APAP treatment, statistical analyses were performed with a two-way analysis of variance (ANOVA) using DU contamination and time after APAP treatment as two factors. For Western blot results and for gene expression comparison of APAP treated rats versus non-treated rats, statistical analysis was performed using Student's *t*-test (*p* is given between brackets). All results were expressed as mean \pm S.E.M. The acceptable level of significance was established as *p* < 0.05.

3. Results

3.1. Liver xenobiotic-metabolizing enzymes

3.1.1. Gene expression in the liver

The kinetic of XME gene expression was studied in the liver of control and DU-exposed animals treated or not by acetaminophen. First, we noted a time-dependent induction of XME gene expression by APAP (Fig. 2). Compared with the untreated group (T0), most of gene expressions reached a peak at roughly 2 h after APAP treatment: CYP2E1 (approx. 12-fold, *p* < 0.001 and 11-fold, *p* < 0.001 for non-exposed and DU exposed rats respectively), GSTA2 (approx. 18-fold, *p* < 0.001 and 17-fold, *p* < 0.001 for non-exposed and DU exposed rats respectively), UGT1A1 (approx. 7-fold, *p* < 0.001 for both non-exposed and DU exposed rats), CYP2C11 (5-fold, *p* < 0.001 for both non-exposed and DU exposed rats), MRP2 (4-fold, *p* < 0.01 for both non-exposed and DU exposed rats) and UGT2B1 (3-fold, *p* < 0.01 for both non-exposed and DU exposed rats). In the case of CYP3A gene expression, the increase started 0.5 h after APAP treat-

ment (4-fold, *p* < 0.001 and 3-fold, *p* < 0.001 for CYP3A1 and CYP3A2 respectively for both non-exposed and DU exposed rats).

So, XME gene expressions were time-dependently induced in DU-exposed rats similarly to non-exposed rats (Fig. 2). A statistical analysis via a two-way ANOVA confirms there was no difference between DU exposed and non-exposed rats for all genes studied except UGT2B1 (*p* = 0.04). With a view to kinetics cutting across each other, the statistically difference for UGT2B1 gene expression was probably not physiologically relevant.

3.1.2. Protein level in the liver

The protein level of major XME was determined in the liver of DU-exposed or unexposed rats that had been treated with APAP 2 and 3 h earlier. The time 0 corresponds to rats that had been treated with saline only. Western blot analysis showed a significant increase in CYP3A2 in DU-exposed rats 3 h after APAP treatment (4-fold, *p* < 0.05) in comparison with unexposed rats (Fig. 3). For the other XME proteins studied, no difference was observed between the DU-exposed and the DU-unexposed groups at the studied times (0, 2 and 3 h) (Fig. 3).

Besides, compared with non-treated rats protein levels (T0), the CYP3A2 level increased in DU-exposed rats 3 h after APAP treatment (*p* < 0.05) whereas CYP3A2 level in the non-exposed group did not (Fig. 4).

3.1.3. Cytochrome P450 activities in the liver

Liver cytochrome P450 activities were measured 0.5, 1.5 and 3 h after APAP treatment. Testosterone metabolism is a widely used indicator of CYP2A, 2B, 2C and 3A enzyme activities. The hepatic activity of CYP3A as well as CYP2A, CYP2B and CYP2C (data not shown) were not affected by DU exposure at these times.

3.2. APAP and major APAP metabolites levels in plasma

APAP, APAP-gluc and APAP-sulf assay in plasma allowed us to evaluate metabolites formation and APAP elimination. Our results showed that the plasma APAP time-profile in DU-exposed and in non-exposed rats have roughly the same characteristics (half-life ($T_{1/2}$), maximal concentration (C_{max}), time of peak concentration (T_{max}) and area under the curve (AUC)) (Fig. 5). In the same way, APAP metabolites (APAP-gluc and APAP-sulf) plasma levels were not impaired by DU exposure (Fig. 6).

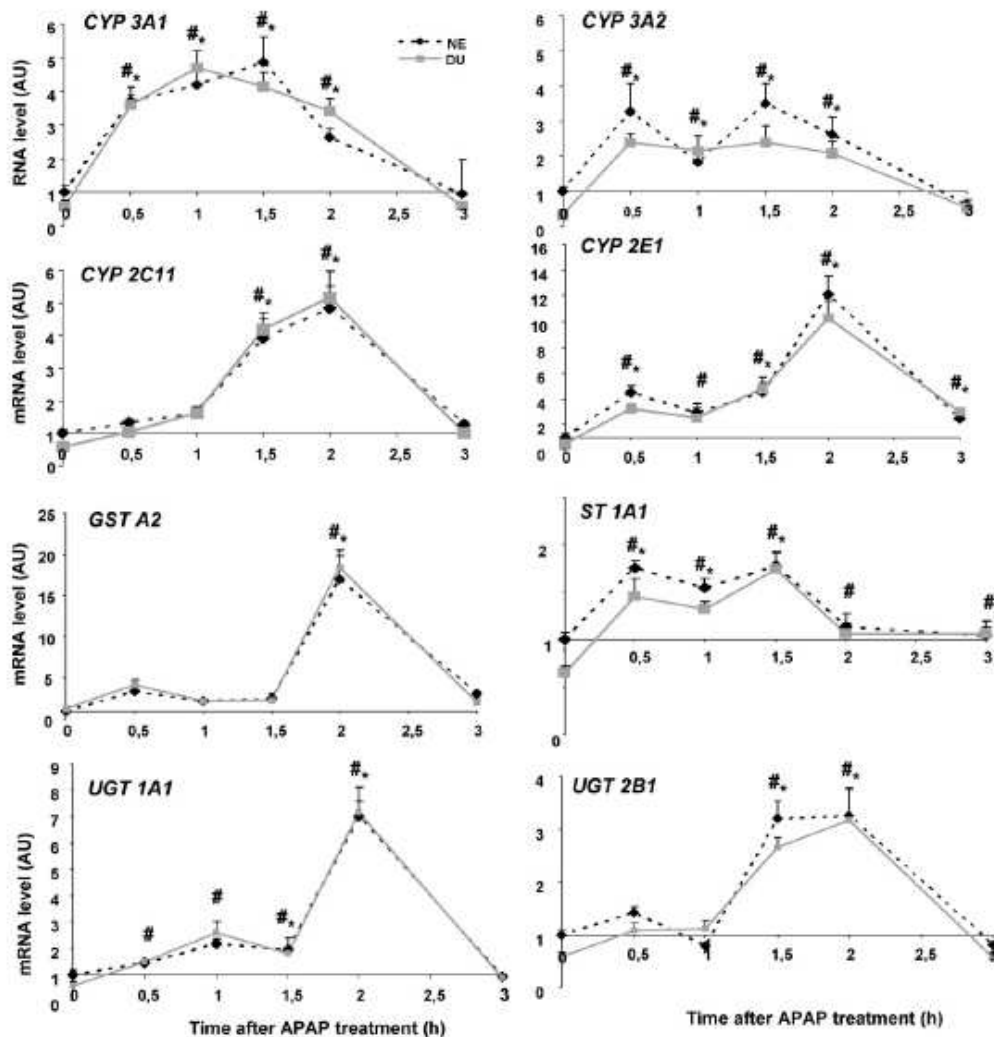


Fig. 2. Gene expression of xenobiotic metabolizing enzymes in the liver after acetaminophen (APAP) treatment for 0.5, 1, 1.5, 2 and 3 h. mRNA levels of CYP3A1, CYP3A2, CYP2E1, CYP2C11, GSTA2, ST1A1, UGT1A1 and UGT2B1 were measured by real-time semi-quantitative RT-PCR in DU exposed (DU) and non-exposed rats (NE) treated with APAP (50 mg/kg) ($n=6$ for each group of rats). The results were expressed as a ratio to the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA levels. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Asterisk and sharp sign represent a significant difference between APAP treated and sham-treated (T0) rats in non-exposed and DU exposed group respectively (Student's *t*-test; ** $p < 0.05$).

4. Discussion

Due to human activities or natural presence, toxic metals (including uranium) can be found at low concentration throughout the environment. In comparison with other heavy metals, uranium toxicity is still poorly described. Several studies have reported the effects of uranium as well as other metals (cadmium, chromium, arsenic, etc.) on xenobiotic-metabolizing enzymes (Miller et al., 2004; Noreault et al., 2005; Pasanen et al., 1995; Tully et al., 2000) suggesting alterations in drug metabolism (Chung et al., 2003; Moon et al., 2003; Moore, 2004). We have previously established that XME disturbances could be induced by acute and toxic uranium exposure (Gueguen et al., 2006a) but also by chronic exposure to non-nephrotoxic uranium dose (Souidi et al., 2005). To evaluate the impact of these impairments on metabolizing functions, studies

using acetaminophen as a drug candidate have been undertaken. Indeed, we recently described modifications of APAP metabolism and toxicity after administration of a single toxic dose of APAP to DU-exposed rats (400 mg/kg) (Gueguen et al., 2007).

In the present study, a single therapeutic dose of APAP (50 mg/kg) was administered to rats chronically exposed to DU (40 mg/l) to determine the impact of DU on the metabolism of a drug at a therapeutic concentration. Unchanged plasma indicators of liver impairment (AST, ALT and AP), liver function (albumin, total bilirubin) and kidney function (creatinine, urea) (data not shown) confirmed the lack of nephrotoxicity and hepatotoxicity of both DU exposure (Souidi et al., 2005) and APAP treatment (Islam et al., 2005; Morishita et al., 2006; Nagakura et al., 2003; Tran et al., 2001).

The study of XME during APAP metabolism and elimination shows an unexpected but very interesting result; the gene expres-

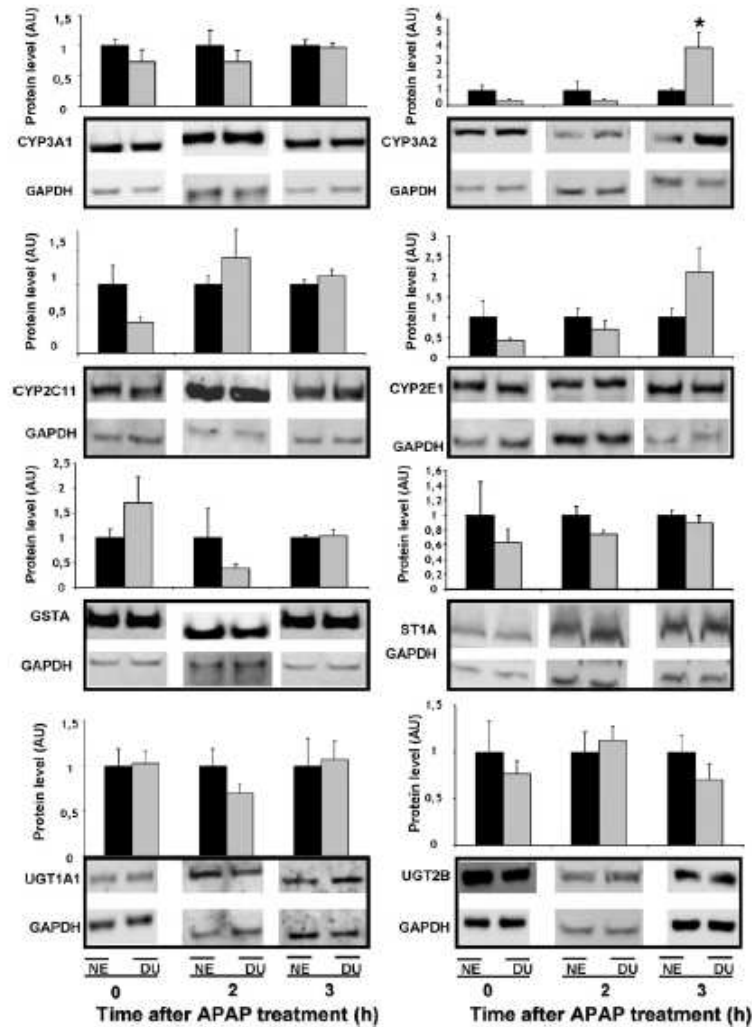


Fig. 3. Level of XME proteins in the liver of rats exposed or non-exposed (NE) to depleted uranium (DU) and treated with acetaminophen (APAP). Rats were sacrificed 2 and 3 h after a single APAP treatment (50 mg/kg) or after the vehicle only treatment (time 0). Bands resolved by Western blotting were quantified densitometrically for comparison. Each value represents mean \pm S.E.M for 6 rats. Western blots corresponding at each time were realized independently. Asterisk: represents a significant difference between DU-exposed and non-exposed rats (Student's *t*-test; **p* < 0.05).

sion induction due to APAP treatment. Up to now, few studies have shown that APAP treatment induces hepatic enzymes expression. Kim et al. (2007) recently showed that in female rats, 18 h after a single APAP treatment (500 mg/kg), protein levels of CYP2E1 and CYP3A were induced but total hepatic CYPs activity was unchanged. We also previously showed that mRNA level of CYP3A2, CYP2C11, CYP2E1, GSTA2, UGT2B1 and ST1B1 was elevated 2 h after APAP treatment and returned to basal level 24 h after a similar APAP treatment (Gueguen et al., 2007). Moreover, increased expression of canalicular MRP and P-gp in response to a single administration of APAP to rats was recently described (Aleksunes et al., 2008; Ghanem et al., 2004). This present work is the first one to show a time-dependent mRNA induction for almost all XME studied after a single therapeutic APAP treatment. Most of the mRNA levels reached a peak approximately 2 h after APAP treatment except for CYP3A1

and CYP3A2, whose mRNA expressions increased earlier than other XME (Fig. 2).

Despite these gene expression inductions, no increase of hepatic XME protein level was noticed except for CYP3A2. Indeed, the second key result of this work was this increase in CYP3A2 protein level. We first show this protein level time-dependant rise in DU-exposed rats in comparison to unexposed rats which reinforced that CYP3A could be a target of DU (Figs. 3 and 4). In a previous study, some alterations of CYP3A due to DU exposure have been already observed. Gueguen et al. (2006a) have shown some differences of CYP3A1 mRNA and total CYP3A activity one day after a single subcutaneous administration of DU (11.5 mg/kg). Moreover, in conditions of chronic exposure to non-nephrotoxic dose of DU (1 mg/rat/day), CYP3A1 and CYP3A2 mRNA were also significantly higher in several organs, especially in the liver (Souidi et al., 2005). The functions of

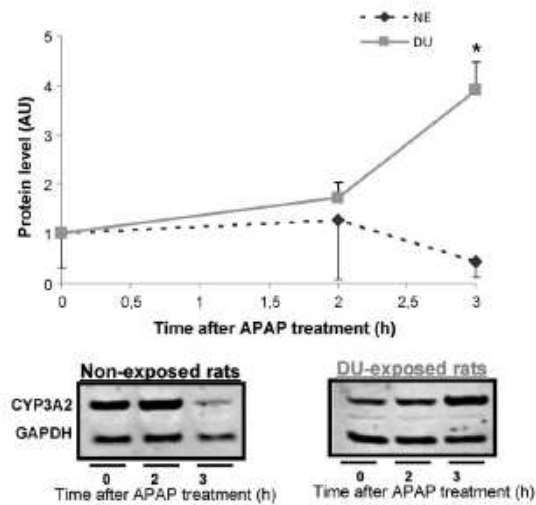


Fig. 4. Time-course of CYP3A2 protein level in the liver of rats non-exposed (NE) exposed to depleted uranium (DU). Rats were sacrificed 2 and 3 h after acetaminophen (APAP) treatment or after vehicle only treatment (time 0). Bands resolved by Western blotting were quantified densitometrically for comparison. Each value represents mean \pm S.E.M. for 5 rats. Asterisk represents a significant difference between APAP treated and untreated (T0) rats (two-way ANOVA; * $p < 0.05$).

CYP3A1 and CYP3A2 in rats are very similar to CYP3A4 in humans known to metabolize 50% of marketed pharmaceuticals and representing 30% of total CYP in the liver (Gueguen et al., 2006; Lewis, 2004). Surprisingly, CYP3A1 protein level was not increased in our study. However, the regulation of the CYP isoforms varies with age and with gender (Kato and Yamazoe, 1992; Mahnke et al., 1997; Wauthier et al., 2004) and since the predominant CYP in male adult rat is CYP3A2 (Mugford and Kedderis, 1998), it could explain the lack of effect on CYP3A1 protein level. Interestingly, 3 h after APAP treatment, CYP3A2 protein increased in DU-exposed animals whereas CYP3A2 mRNA was not higher than in non-exposed group. These

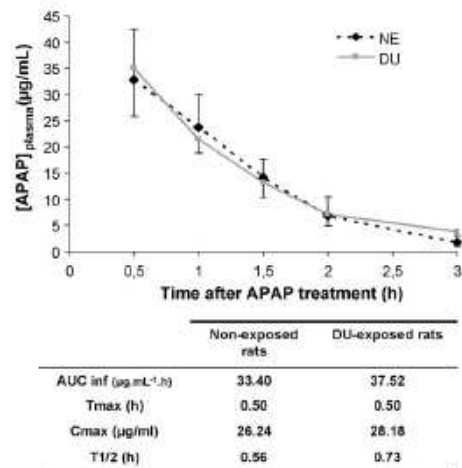


Fig. 5. Mean plasma concentration of acetaminophen (APAP) after a single administration. Plasma concentration of APAP was determined by HPLC method in non-exposed rats (NE) and in rats exposed to depleted uranium (DU) after APAP treatment (50 mg/kg) ($n = 6-8$ for each group of rats). Data are expressed as mean \pm S.E.M.

results suggested a post-translational regulation (as protein stabilization) of CYP3A2 by DU, as already described with heavy metal and CYP1A1 (Korashy and El-Kadi, 2005). In our conditions, any modification of CYP3A activity is observed at the studied times despite an increase of CYP3A2 protein level. This effect was already observed after an APAP treatment (Kim et al., 2007). That could suggest that this enhance of CYP3A2 protein level is not strong enough to unbalance total CYP3A activity. In this way, we could imagine that an exposure to an APAP repeated dosage could increase gene expression induction and could impair CYP3A activity also.

In conclusion, we observed; (i) an APAP-dependent increase of XME gene expression due to a single APAP therapeutic treatment and (ii) a DU-dependent increase in CYP3A2 protein level in the liver

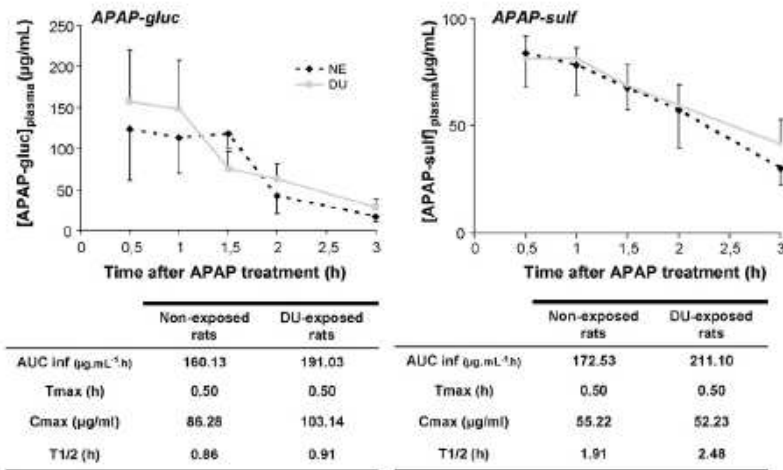


Fig. 6. Mean plasma concentration of major acetaminophen (APAP) metabolites (APAP-glucuronide and APAP-sulfate), ($n = 6-8$ for each group of rats). Plasma concentrations of APAP and of its metabolites were determined by HPLC method in non-exposed rats (NE) and in rats exposed to depleted uranium (DU) after APAP treatment (50 mg/kg) ($n = 6-8$ for each group of rats). Data are expressed as mean \pm S.E.M.

that strengthens that CYP3A seems to be a target of DU. Despite the high CYP3A2 protein level, APAP elimination is unchanged in our experimental conditions but regarding both our present and previous results, it would be interesting to evaluate the effects of DU chronic contamination on APAP metabolism after repeated dosages mimicking a standard human treatment.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN). The authors thank T. Loiseau and P. Lestavel for their assistance during the animal pre-treatment period and the experimentation and I. Dublineau for the re-reading of the manuscript.

References

- Aleksunes, L.M., Slitt, A.L., Maher, J.M., Augustine, L.M., Goedken, M.J., Chan, J.Y., Cherrington, N.J., Klaassen, C.D., Manautou, J.E., 2008. Induction of Mrp3 and Mrp4 transporters during acetaminophen hepatotoxicity is dependent on Nr2f. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 226 (1), 74–83.
- Chung, W., Kim, E.J., Lee, I., Kim, S.G., Lee, M.G., Kim, S.H., 2003. Effects of recombinant human growth hormone on the pharmacokinetics of intravenous chlorzoxazone in rats with acute renal failure induced by uranyl nitrate. *Life Sci.* 73 (3), 253–263.
- Domingo, J.L., 2001. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. *Reprod. Toxicol.* 15 (6), 603–609.
- Ghanem, C.I., Gomez, P.C., Arana, M.C., Perassolo, M., Ruiz, M.L., Villanueva, S.S., Ochoa, E.J., Catania, V.A., Bengochea, L.A., Mottino, A.D., 2004. Effect of acetaminophen on expression and activity of rat liver multidrug resistance-associated protein 2 and P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* 68 (4), 791–798.
- Gilman, A.P., Villeneuve, D.C., Secours, V.E., Yagminas, A.P., Tracy, B.L., Quinn, J.M., Valli, V.E., Willes, R.J., Moss, M.A., 1996. Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague–Dawley rat. *Toxicol. Sci.* 41 (1), 117–128.
- Gueguen, Y., Grandcolas, L., Baudelin, C., Grison, S., Tissandie, E., Jourdain, J.R., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., et al., 2007. Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium. *Toxicology* 229 (1–2), 62–72.
- Gueguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J.M., Batt, A.M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., et al., 2006. Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 64 (6), 535–548.
- Gueguen, Y., Souidi, M., Baudelin, C., Dudoignon, N., Grison, S., Dublineau, I., Marquette, C., Voisin, P., Gourmelon, P., Aigueperse, J., 2006a. Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch. Toxicol.* 80 (4), 187–195.
- Islam, N., Siddique, M.A., Misbahuddin, M., 2005. Absorption and metabolism of paracetamol in rats drinking high concentration of arsenic. *Mymensingh Med. J.* 14 (2), 145–151.
- Kato, R., Yamazoe, Y., 1992. Sex-specific cytochrome P450 as a cause of sex- and species-related differences in drug toxicity. *Toxicol. Lett.* 64–65, 661–667, Spec No.
- Kim, S.N., Seo, J.Y., Jung da, W., Lee, M.Y., Jung, Y.S., Kim, Y.C., 2007. Induction of hepatic CYP2E1 by a subtoxic dose of acetaminophen in rats: increase in dichloromethane metabolism and carboxyhemoglobin elevation. *Drug Metab. Dispos.* 35 (10), 1754–1758.
- Korashy, H.M., El-Kadi, A.O., 2005. Regulatory mechanisms modulating the expression of cytochrome P450 1A1 gene by heavy metals. *Toxicol. Sci.* 88 (1), 39–51.
- 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 (2), 147–162.
- Lewis, D.F., 2004. 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* 5 (3), 305–318.
- Mahnke, A., Strotkamp, D., Roos, P.H., Hanstein, W.G., Chabot, G.G., Nef, P., 1997. Expression and inducibility of cytochrome P450 3A9 (CYP3A9) and other members of the CYP3A subfamily in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 337 (1), 62–68.
- Miller, A.C., Brooks, K., Smith, J., Page, N., 2004. Effect of the militarily-relevant heavy metals, depleted uranium and heavy metal tungsten-alloy on gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). *Mol. Cell Biochem.* 255 (1–2), 247–256.
- Moon, Y.J., Lee, A.K., Chung, H.C., Kim, E.J., Kim, S.H., Lee, D.C., Lee, I., Kim, S.G., Lee, M.G., 2003. Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats. *Drug Metab. Dispos.* 31 (6), 776–784.
- Moore, M.R., 2004. A commentary on the impacts of metals and metalloids in the environment upon the metabolism of drugs and chemicals. *Toxicol. Lett.* 148 (3), 153–158.
- Morishita, K., Mizukawa, Y., Kasahara, T., Okuyama, M., Takashima, K., Toritsuka, N., Miyagishima, T., Nagao, T., Urushidani, T., 2006. Gene expression profile in liver of differing ages of rats after single oral administration of acetaminophen. *J. Toxicol. Sci.* 31 (5), 491–507.
- Mugford, C.A., Kedderis, G.L., 1998. Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metab. Rev.* 30 (3), 441–498.
- Nagakura, Y., Okada, M., Kohara, A., Kiso, T., Toya, T., Iwai, A., Wanibuchi, F., Yamaguchi, T., 2003. Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306 (2), 490–497.
- Noreault, T.L., Kostubsky, V.E., Wood, S.G., Nichols, R.C., Strom, S.C., Trask, H.W., Wrighton, S.A., Evans, R.M., Jacobs, J.M., Sinclair, P.R., et al., 2005. Arsenite decreases CYP3A4 and RXRalpha in primary human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 33 (7), 993–1003.
- 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 (2), 139–147.
- Pasanen, M., Lang, S., Kojo, A., Kosma, V.M., 1995. Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environ. Res.* 70 (2), 126–133.
- Rekka, E., Evdokiimova, E., Eekhoudt, S., Labar, G., Calderon, P.B., 2002. Role of temperature on protein and mRNA cytochrome P450 3A (CYP3A) isozymes expression and midazolam oxidation by cultured rat precision-cut liver slices. *Biochem. Pharmacol.* 64 (4), 633–643.
- 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 (5), 597–602.
- Salonen, L., 1994. 238U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock. *IAHS*, 222.
- 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 (1–2), 113–122.
- t Hoen, P.A., Rooseboom, M., Bijsterbosch, M.K., van Berkel, T.J., Vermeulen, N.P., Commandeur, J.N., 2002. Induction of glutathione-S-transferase mRNA levels by chemopreventive selenocysteine Se-conjugates. *Biochem. Pharmacol.* 63 (10), 1843–1849.
- Theron, D., Barraud de Lagerie, S., Tardivel, S., Pelerin, H., Demeuse, P., Mercier, C., Mabondzo, A., Farinotti, R., Lacour, B., Roux, F., et al., 2003. Influence of tumor necrosis factor-alpha on the expression and function of P-glycoprotein in an immortalized rat brain capillary endothelial cell line, GPNT. *Biochem. Pharmacol.* 66 (4), 579–587.
- 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 (2), 266–272.
- Tracy, B.L., Quinn, J.M., Lahey, J., Gilman, A.P., Mancuso, K., Yagminas, A.P., Villeneuve, D.C., 1992. Absorption and retention of uranium from drinking water by rats and rabbits. *Health Phys.* 62 (1), 65–73.
- Tran, A., Treluyer, J.M., Rey, E., Barbet, J., Ferracci, G., d'Athis, P., Vincent, J., Pons, G., 2001. Protective effect of stiripentol on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170 (3), 145–152.
- Tully, D.B., Collins, B.J., Overstreet, J.D., Smith, C.S., Dinse, G.E., Mumtaz, M.M., Chapin, R.E., 2000. Effects of arsenic, cadmium, chromium, and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168 (2), 79–90.
- Wauthier, V., Verbeek, R.K., Buc Calderon, P., 2004. The use of precision-cut liver slices from male Wistar rats as a tool to study age related changes in CYP3A induction and in formation of paracetamol conjugates. *Toxicol. In Vitro* 18 (6), 879–885.

Annexes

Annexe I e : Distribution of soluble uranium in the nuclear cell compartment at subtoxic concentration

En révision dans *Chemical Research in Toxicology*

Annexes

question, our experiment used three human cell lines to assess the effect of uranium: HEK-293 (a kidney cell line), HepG2 (an hepatocyte cell line), and IMR-32 (a neuronal cell line). All three are frequently used in toxicology studies and allowed to test uranium cytotoxicity (26-28).

A pertinent explanation of uranium cytotoxicity is link with its accumulation inside the cell (21, 29, 30). Recent investigations have shown that uranium enters renal cells and precipitates in the cytoplasm as uranyl needles, at cytotoxic concentrations (from 400 to 1000 μM) (20, 21, 31). Until now, transmission electron microscopic (TEM) or X-ray absorption fine structure spectroscopy technologies have allowed uranium clusters to be observed in cells (20, 29, 31) but did not allow the detection of soluble uranium.

The present study is the first to use the SIMS (secondary ion mass spectrometry) technology to study uranium distribution in human cell lines. This very sensitive imaging technique, introduced in the early 1960s, is used for the chemical characterization of solid surfaces. SIMS is the most sensitive surface analysis technique, able to detect the presence of elements in the parts-per-billion range. Its use in the biomedical field has developed progressively, and a few studies have recently described uranium detection in biological samples with this technique (32, 33).

The aim of this work was to assess subtoxic concentrations and to study localization of DU in our human kidney, liver, and brain cell models.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1 MATERIALS

A solution of uranyl nitrate hexahydrate ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (AREVA-COGEA, France) was prepared to a DU concentration of 10 mM by dissolving the powder in 100 mM bicarbonate (HCO_3^-). The radioactive specific activity of DU is $1.4 \cdot 10^{-4}$ Bq/g and its isotopic composition is $^{238}\text{U} = 99.74\%$, $^{235}\text{U} = 0.255\%$, and $^{234}\text{U} = 0.0055\%$.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, ref 11880-036), Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640, ref 21875034), Minimum Essential Medium (MEM, ref 51200), penicillin/streptomycin 10000 U/mL (PS, ref 15140), fetal bovine serum (FBS, ref 10270-106), and L-glutamine (ref 25030-024) were purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Non-essential amino acids (NEAA, ref M7145), amphotericin B (ref A2942), and retinoic acid (ref R4643) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Annexes

HEK-293 and HepG2 cells were obtained from ATCC (Molsheim, France). IMR-32 cells were a generous gift from Dr Denis Servent, at the CEA laboratory of toxins, receptors, and ionic channels (CEA, DSV, Saclay, France).

Plastics used for cell culture were purchased from VWR (Fontenay-sous-bois, France).

3.2 CELL CULTURE

All cells were grown in incubator with humidified atmosphere (i.e., 37°C, 5% CO₂) to a confluence of 80%. HEK-293 cells were grown in a monolayer culture in DMEM supplemented with 10% FBS, 2% L-glutamine, 1% PS, HEPG2 in a monolayer culture in RPMI supplemented with 10% FBS, 1% PS, and IMR-32 in a monolayer culture in MEM supplemented with 10% FBS, 1% PS, 1% NEAA, 1% L-glutamine, 0.4% amphotericin B. Before each test, IMR-32 cells were differentiated by a 14-day retinoic acid (10 nM) exposure.

3.3 DU EXPOSURE

A DU stock solution (10 mM, pH 6.8) was prepared by dissolving 0.005% (w/v) of uranium in NaHCO₃ solution (0.1 M). DU solutions used for experiments were prepared by diluting stock solution in cell culture media. Cells were incubated with 9 increasing DU concentrations (from 1 µM to 1000 µM) for 24 or 48 hours. Because DU precipitates in cell culture media at higher concentrations, 1000 µM was set as the maximal concentration.

3.4 CELL VIABILITY TESTS

DU cytotoxicity was determined by calculating cell viability or cell death compared with that of untreated cells, with LDH (lactate dehydrogenase) and protease assays.

The LDH test (Cytotox detection kit, Roche Diagnostic; Meylan, France) and the protease assay (Cytotox-Glo™ Cytotoxicity Assay, Promega; Charbonnières, France) were used according to the manufacturer's instructions.

3.5 SIMS (SECONDARY ION MASS SPECTROMETRY)

The aim of SIMS microscopy is the elemental and isotopic analysis of a solid surface by an ion beam coupled with a mass spectrometer. The principle of this technique is based upon the sputtering of a few atomic layers from the surface of a sample, induced by the bombardment of focused primary ions (O₂⁺, O⁺, Cs⁺, Ar⁺) with sufficiently high energy (several keV). These primary ions penetrate the solid surface and transfer some of their kinetic energy to the target particles,

Annexes

creating collision cascades which induce the emission of surface particles (atoms or molecules) in a charged or uncharged state. The “secondary ions” are representative of the elemental and isotopic composition of the bombarded analyzed area. They are accelerated and analyzed by mass spectrometer (electrostatic sector and magnetic sector) on the basis of mass-to-charge ratio. The sputtered ions stemming from each point of the bombarded surface are focused into an image by an immersion objective lens. A more detailed description of the physical phenomenon is provided in the literature (34). The SIMS analyses were performed using a CAMECA IMS 4F E7 instrument. For this study, O_2^+ beam bombardment was used to enhance the ionization field of electropositive species such as uranium. In this scanning microscope, the primary beam is focused into a small (around 0.5 μm), which scans the sample surface. The collected secondary ions can be measured with an electron multiplier and also sequentially converted into an image. Mass resolution can reach $M/\Delta M = 10000$ and the lateral resolution of the imaging is only 0.5 μm . Table 1 summarizes the experimental conditions for this work. For each area analyzed, mass spectra at around the mass of isotope 238 of uranium, and ion images were obtained. $^{40}\text{Ca}^+$ images give the histological structure of the cells and $^{238}\text{U}^+$ images show uranium fixation within the structures.

3.6 PREPARATION OF THE BIOLOGICAL SAMPLES FOR SIMS ANALYSIS.

After the exposure phase (24 hours), the culture media was removed and the cells underwent a standard chemical fixation procedure. Cells were fixed on their culture plates with a solution containing 2.5% glutaraldehyde for 1 hour at room temperature, then dehydrated in ethanol baths, and permeabilized with a propylene oxide/Epon mixture. Finally, cells were embedded in pure EPOH-type resin. Serial thin sections (0.5 μm) embedded in resin were cut and laid on polished ultrapure silicium holders for SIMS analysis (to avoid relief effects and minimize charge effects) or on glass slides for histological controls with an optical microscope. This procedure allows the cells to be observed in their physiologic state.

3.7 STATISTICAL ANALYSIS

To compare concentration effect of uranium on cytotoxicity, statistical analyses were performed using Student's *t* test (comparison of each conditions with the control (C-)). All results were expressed as mean \pm S.E.M.. The acceptable level of significance was established as $p < 0.05$.

4. RESULTS

4.1 CYTOTOXICITY STUDIES

Figures 1, 2, and 3 show the percentage of cytotoxicity with solutions of 0 to 1000 μM of DU after exposures of 24 and 48 hours.

4.1.1 HEK-293

After a 24-hour exposure period, a basal level of mortality lower than 10% was observed (Fig. 1A). Cell mortality did not increase at DU concentrations from 0 to 500 μM , but did rise at 700 μM (+12%, $p < 0.01$) and reached 26% ($p < 0.001$) at 1000 μM .

After a 48-hour exposure period, a basal level of mortality lower than 10% was observed (Fig. 1B). No additional cell mortality was observed at DU concentrations from 0 to 100 μM . At 300 μM of DU, mortality increased (+18%, $p < 0.01$) and rose gradually to reach 59% at 1000 μM ($p < 0.001$).

4.1.2 HepG2

After a 24-hour exposure period, a basal level of mortality lower than 20% was observed. Cell mortality did not increase at DU concentrations of 0 to 100 μM . At 300 μM of DU, mortality increased (+37%, $p < 0.001$) and reached a plateau around 40% ($p < 0.01$) from 500 μM (Fig. 2A).

After a 48-hour exposure period, a basal level of mortality lower than 20% was observed. No cell mortality was observed between 0 to 100 μM of DU. Mortality began at 300 μM of DU (50%, $p < 0.001$), peaked at 500 μM (90%, $p < 0.001$), and stayed around 50% ($p < 0.001$) at higher DU concentrations (Fig. 2B).

4.1.3 IMR-32

After a 24-hour exposure period, a basal level of mortality lower than 30% was observed. Cell mortality did not increase at DU concentrations of 0 to 300 μM . At 500 μM of DU, the mortality rate increased; it reached a plateau around total cell-death ($p < 0.001$) (Fig. 3A).

After a 48-hour exposure period, a basal level of mortality higher than 50% was observed. As after 24 hours of DU exposure, DU did not induce increased cell mortality at from 0 to 300 μM ; the mortality level increased, reaching a plateau around total cell death at 500 μM ($p < 0.001$) (Fig. 3B).

4.2 ^{238}U LOCALIZATION IN CELL

Figures 4 to 6 show the histological views at each DU concentration, ^{238}U and calcium localization in cells, and ^{238}U spectra. In the SIMS images, the hot colors represent the highest

Annexes

concentrations. Under these SIMS experimental conditions, the mass spectra of the cells that were not exposed to uranium, recorded at around the mass of isotope 238 of uranium at a low mass resolution ($M/\Delta M = 300$), do not show the presence of significant peak at mass 238. This result suggests that natural uranium is not detected by SIMS and no polyatomic ions are overloading on the element of interest at a low mass resolution. In this case, working at high mass resolution is not essential, which will improve secondary ion transmission and therefore also the detection threshold.

Superposition of the calcium distribution with the histological views allowed us to determine cell structure and localize ^{238}U in cells. Red arrows indicate ^{238}U precipitates, and pink triangles were used as a reference mark between the different views.

4.2.1 HEK293

After a 24-hour exposure period, no uranium was observed in control cells or in cells exposed to 10 μM of uranium. At 50 and 100 μM , uranium was detected inside the cells, mainly in the nucleus (Fig.4).

4.2.2 HepG2

After a 24-hour exposure period, no uranium was observed in control cells. At 10 μM , uranium was found inside cells in both the nuclear and extranuclear compartments. At 50 μM , uranium was detected mainly in the cell nucleus. At this concentration, few extracellular uranium precipitates were observed (data not shown). At 100 μM , most uranium had precipitated and was detected in both intra- and extracellular compartments (Fig. 5).

4.2.3 IMR-32

After a 24-hour exposure period, no uranium was observed in either control cells or in the cells exposed to 10 μM of DU. At concentrations of 50 and 100 μM , uranium was found inside cells, especially in the nucleus. (Fig. 6). At 100 μM , a substantial number of uranium precipitates were also observed (data not shown)

5. DISCUSSION

The cytotoxicity of DU was concentration-dependent in all three cell lines. Indeed, mortality was never induced at less than 300 μM and the cytotoxicity threshold was around 300-500 μM for all three cell lines. This threshold has already been mentioned in other cell lines: HRK-52 (Normal rat

Annexes

kidney cells) (23, 24), HK-2 (human kidney cells) (35), and Ros 17/2.8 (osteoblast cell line) (31). Cell mortality was also higher after 48 hours than 24 hours in our cell models

Despite these common properties, sensitivity to DU differed according to cell line. Uranium cytotoxicity on HEK-293 and HepG2 did not exceed 50% whereas it reached 100% on IMR-32 at 700 μM after 24 hours of DU exposure. The detoxification and sensitivity properties of the cell lines may explain this difference: HEK-293 and HepG2 are derived from organs that possess active systems of xenobiotic detoxification, unlike neuron cells such as IMR-32 (36), and may thus be more resistant than IMR-32. Secondly, as previously suggested, the differences in cytotoxicity may be due to the different composition of the culture media used for each cell line (24), or to the speciation of uranium in these media (20), or both.

Precipitates have been found in both intracellular and extracellular areas after uranium exposure at cytotoxic concentrations (around 300-500 μM), especially in kidney cells (20, 21, 25, 29, 31). Electron-probe X-ray analysis of uranium deposits, formerly called uraniosomes, showed that these precipitates contain uranium, potassium, calcium, and phosphorus (20, 25). We further showed the formation of uranium precipitates at a subtoxic concentration (100 μM). These new observations allowed us to confirm that cytotoxicity is not only linked to the formation of uranium precipitates (30). Nonetheless, the uranium precipitation threshold fluctuated between the cell lines. There were more precipitates in HepG2 exposed to 100 μM of uranium than in IMR-32 or HEK-293 at the same concentration. Nevertheless, whatever the number of uranium precipitates, they did not influence the cell viability at this concentration.

In addition to the study of uranium precipitates, the SIMS technology allowed us for the first time to localize soluble uranium in cells at concentrations lower or equal than 50 μM . We observed soluble uranium in all three of the cell lines studied. A new and intriguing result was that at 50-100 μM soluble uranium is localized in the cytoplasmic area but also and mainly in the nucleus.

Uranium has been known for several years to induce DNA damage (37) especially in kidney cells (23) and at non-cytotoxic concentrations (38). This finding shows the need for studies to clarify whether the genotoxic effect of uranium is due to its nuclear distribution, close to DNA.

Similarly, the presence of uranium in the cell raises the question of the mechanism by which it enters cells and their nuclei. Until now, the most common hypothesis for this mechanism was linked to an endocytosis process supposed to induce uranium precipitation into lysosomes. The failure of

this hypothesis to account for the presence of uranium in the nucleus led to the suggestion of a second entry mechanism, involving transporters such as the Na-Pi co-transporter family (30, 39). Moreover, uranium interacts with other transporters as the metallothioneins (40), or glucose transporters (22). It would thus be interesting to explore both the common and the different mechanisms by which uranium enters the cell cytoplasm but also the nuclear compartment during exposure to both high and low concentrations of uranium.

In conclusion, this paper describes DU cytotoxic concentrations in different cell lines (300 μM in HEK293 and HEPG2, and 500 μM in IMR-32) and reports uranium distribution in both the cytoplasmic and nuclear compartments at high and low concentrations (10 μM) as well as the appearance of precipitates at higher concentrations (100 μM). Further *in vitro* studies exploring the time course of uranium intake, precipitation, and output in different cell compartments will improve our understanding of the effect of uranium on cell viability and functions.

6. ACKNOWLEDGEMENT

This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN).

7. BIBLIOGRAPHY

- (1) Leggett, R. W. (1989) The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys* 57, 365-383.
- (2) Haley, D. P. (1982) Morphologic changes in uranyl nitrate-induced acute renal failure in saline- and water-drinking rats. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 46, 196-208.
- (3) Diamond, G. L., Morrow, P. E., Panner, B. J., Gelein, R. M. and Baggs, R. B. (1989) Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam Appl Toxicol* 13, 65-78.
- (4) Paquet, F., Houpert, P., Blanchardon, E., Delissen, O., Maubert, C., Dhieux, B., Moreels, A. M., Frelon, S. and Gourmelon, P. (2006) Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys* 90, 139-147.
- (5) La Touche, Y. D., Willis, D. L. and Dawydiak, O. I. (1987) Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health Phys* 53, 147-162.
- (6) Li, W. B., Roth, P., Wahl, W., Oeh, U., Hollriegel, V. and Paretzke, H. G. (2005) Biokinetic modeling of uranium in man after injection and ingestion. *Radiation and environmental biophysics* 44, 29-40.
- (7) Rouas, C., Souidi, M., Grandcolas, L., Grison, S., Baudelin, C., Gourmelon, P., Pallardy, M. and Gueguen, Y. (2009) Acetaminophen induces xenobiotic-metabolizing enzymes in rat: Impact of a uranium chronic exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology in press*.
- (8) Gueguen, Y., Grandcolas, L., Baudelin, C., Grison, S., Tissandie, E., Jourdain, J. R., 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.
- (9) Moon, Y. J., Lee, A. K., Chung, H. C., Kim, E. J., Kim, S. H., Lee, D. C., Lee, I., Kim, S. G. and Lee, M. G. (2003) Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats. *Drug Metab Dispos* 31, 776-784.
- (10) Pasanen, M., Lang, S., Kojo, A. and Kosma, V. M. (1995) Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environ Res* 70, 126-133.
- (11) 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, 113-122.
- (12) Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J. M., 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, 266-272.
- (13) 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. *Neurotoxicology and teratology* 27, 135-144.
- (14) Pellmar, T. C., Fuciarelli, A. F., Ejnik, J. W., Hamilton, M., Hogan, J., Strocko, S., Emond, C., Mottaz, H. M. and Landauer, M. R. (1999) Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci* 49, 29-39.
- (15) Racine, R., Gueguen, Y., Gourmelon, P., Veyssiere, 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.
- (16) Bussy, C., Lestaevel, 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, 245-252.
- (17) Bensoussan, H., Grandcolas, L., Dhieux-Lestaevel, B., Delissen, O., Vacher, C. M., Dublineau, I., Voisin, P., Gourmelon, P., Taouis, M. and Lestaevel, P. (2009) Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure. *Toxicology* 261, 59-67.
- (18) 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.

Annexes

- (19) Linares, V., Albina, M. L., Belles, M., Mayayo, E., Sanchez, D. J. and Domingo, J. L. (2005) Combined action of uranium and stress in the rat. II. Effects on male reproduction. *Toxicol Lett* 158, 186-195.
- (20) Mirto, H., Henge-Napoli, M. H., Gibert, R., Ansoborlo, E., Fournier, M. and Cambar, J. (1999) Intracellular behaviour of uranium(VI) on renal epithelial cell in culture (LLC-PK1): influence of uranium speciation. *Toxicology letters* 104, 249-256.
- (21) Carriere, M., Gouget, B., Gallien, J. P., Avoscan, L., Gobin, R., Verbavatz, J. M. and Khodja, H. (2005) Cellular distribution of uranium after exposure of renal epithelial cells: SEM, TEM and nuclear microscopy analysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 231, 268-273.
- (22) Goldman, M., Yaari, A., Doshnitzki, Z., Cohen-Luria, R. and Moran, A. (2006) Nephrotoxicity of uranyl acetate: effect on rat kidney brush border membrane vesicles. *Archives of toxicology* 80, 387-393.
- (23) Thiebault, C., Carriere, M., Milgram, S., Simon, A., Avoscan, L. and Gouget, B. (2007) Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (IRK-52E) proximal cells. *Toxicol Sci* 98, 479-487.
- (24) Carriere, M., Avoscan, L., Collins, R., Carrot, F., Khodja, H., Ansoborlo, E. and Gouget, B. (2004) Influence of uranium speciation on normal rat kidney (IRK-52E) proximal cell cytotoxicity. *Chemical research in toxicology* 17, 446-452.
- (25) Ghadially, F. H., Lalonde, J. M. and Yang-Steppuhn, S. (1982) Uraniosomes produced in cultured rabbit kidney cells by uranyl acetate. *Virchows Archiv* 39, 21-30.
- (26) Miller, A. C., Brooks, K., Smith, J. and Page, H. (2004) Effect of the military-relevant heavy metals, depleted uranium and heavy metal tungsten-alloy on gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). *Molecular and cellular biochemistry* 255, 247-256.
- (27) Cova, D., Perego, R., Nebuloni, C., Fontana, G. and Molinari, G. P. (1995) In vitro cytotoxicity of fenthion and related metabolites in human neuroblastoma cell lines. *Chemosphere* 30, 1709-1715.
- (28) Park, E. K., Mak, S. K., Kultz, D. and Hammock, B. D. (2008) Determination of cytotoxicity of nephrotoxins on murine and human kidney cell lines. *Journal of environmental science and health. Part A* 43, 71-74.
- (29) Carriere, M., Proux, O., Milgram, S., Thiebault, C., Avoscan, L., Barre, N., Den Auwer, C. and Gouget, B. (2008) Transmission electron microscopic and X-ray absorption fine structure spectroscopic investigation of U repartition and speciation after accumulation in renal cells. *J Biol Inorg Chem* 13, 655-662.
- (30) Muller, D., Houpert, P., Cambar, J. and Henge-Napoli, M. H. (2006) Role of the sodium-dependent phosphate co-transporters and of the phosphate complexes of uranyl in the cytotoxicity of uranium in LLC-PK1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 214, 166-177.
- (31) Milgram, S., Carriere, M., Malaval, L. and Gouget, B. (2008) Cellular accumulation and distribution of uranium and lead in osteoblastic cells as a function of their speciation. *Toxicology* 252, 26-32.
- (32) Tessier, C., Suhard, D., Simon, O., Floriani, M., Rebiere, F. and Jourdain, J. R. (2009) Detection and analysis of the microdistribution of uranium in the gills of freshwater *Corbicula fluminea* by SIMS technique. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 267, 1931-1935.
- (33) Guerquin-Kern, J. L., Wu, T. D., Quintana, C. and Croisy, A. (2005) Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy). *Biochimica et biophysica acta* 1724, 228-238.
- (34) Hernandez, R. (1973) Surface Analysis of Ion Implants by Secondary-Emission Mass Spectrography. I ANALYSE SUPERFICIELLE D'IMPLANTATIONS IONIQUES PAR SPECTROGRAPHIE DE MASSE A EMISSION SECONDAIRE. *Mem Sci Rev Metal* 70, 47-51.
- (35) Prat, O., Berenguer, F., Steinmetz, G., Ruat, S., Sage, H. and Quemeneur, E. (2009) Alterations in gene expression in cultured human cells after acute exposure to uranium salt: Involvement of a mineralization regulator. *Toxicol In Vitro*.
- (36) Anzenbacher, P. and Anzenbacherova, E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 58, 737-747.
- (37) Lin, R. H., Wu, L. J., Lee, C. H. and Lin-Shiau, S. Y. (1993) Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutation research* 319, 197-203.
- (38) Darolles, C., Broggio, D., Feugier, A., Frelon, S., Dublineau, I., De Meo, M. and Petitot, F. (2010) Different genotoxic profiles between depleted and enriched uranium. *Toxicology letters* 192, 337-348.

Annexes

- (39) Muller, D. S., Houpert, P., Cambar, J. and Henge-Napoli, M. H. (2008) Role of the sodium-dependent phosphate cotransporters and absorptive endocytosis in the uptake of low concentrations of uranium and its toxicity at higher concentrations in LLC-PK1 cells. *Toxicol Sci* 101, 254-262.
- (40) Jiang, G. C., Hughes, S., Sturzenbaum, S. R., Evje, L., Syversen, T. and Aschner, M. (2009) *Caenorhabditis elegans* metallothioneins protect against toxicity induced by depleted uranium. *Toxicol Sci* 111, 345-354.

8. TABLE

Table 1: Experimental analysis conditions for SIMS technique

SIMS experimental conditions	1
Primary ion beam	O ₂ ⁺
Primary beam energy	12.5 keV
Primary beam intensity	1.5 · 10 ⁻⁹ A
Secondary beam energy	4.5 keV
Primary beam raster	50 × 50 μm ²
Mass resolution	M/ΔM = 300

9. FIGURE LEGENDS

Figure 1: DU cytotoxicity in HEK-293 cells.

Cells were exposed for 24 (A) or 48 (B) hours to DU. Cell cytotoxicity was quantified with a protease assay test. DU toxicity was normalized for each well with the total number of cells. Data are expressed as mean ± SEM (data are representative of 3 independent experiments with 4 wells for each condition). Student's t-test was used for statistical analysis. Data analysis compared the untreated cells and the cells exposed to DU *p<0.01; **p<0.001.

Figure 2: DU cytotoxicity in HepG2 cells.

Cells were exposed for 24 (A) or 48 (B) hours to DU. Cell cytotoxicity was quantified with an LDH assay test. Data are expressed as mean ± SEM (data are representative of 3 independent experiments with 4 wells for each condition). Student's t-test was used for statistical analysis. Data analysis compared control cells and cells exposed to DU *p<0.01; **p<0.001.

Figure 3: DU cytotoxicity in IMR-32 cells.

Cells were exposed for 24 (A) or 48 (B) hours to DU. Cell cytotoxicity was quantified with a protease assay test. DU toxicity was normalized for each well with the total number of cells. Data are expressed as means ± SEM (data are representative of 3 independent experiments with 4 wells for each condition). Student's t-test was used for statistical analysis. Data analysis compared control cells and cells exposed to DU *p<0.01; **p<0.001.

Annexes

Figure 4: DU localization in HEK-293 cells.

Cells were exposed for 24 hours to DU. Optical microscope image was obtained after Toluidine blue staining. Ionic $^{40}\text{Ca}^+$, $^{238}\text{U}^+$ images and ^{238}U mass spectra was obtained with SIMS technology. All views are presented at each DU concentration exposure. Red arrows indicated ^{238}U precipitates, pink triangles were used as reference mark between the different views. ND means not detected.

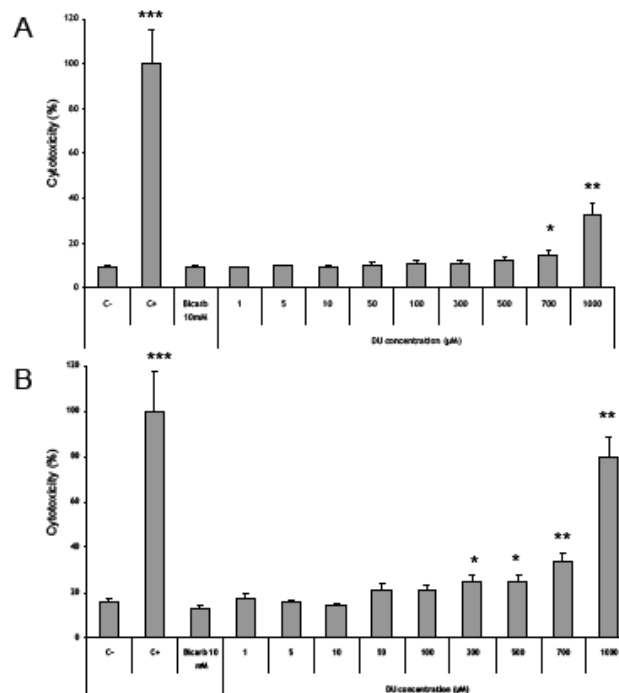
Figure 5: DU localization in HepG2 cells.

Cells were exposed for 24 hours to DU. Optical microscope image was obtained after Toluidine blue staining. Ionic $^{40}\text{Ca}^+$, $^{238}\text{U}^+$ images and ^{238}U mass spectra was obtained with SIMS technology. All views are presented at each DU concentration exposure. Red arrows indicate ^{238}U precipitates.

Figure 6: DU localization in IMR-32 cells.

Cells were exposed for 24 hours to DU. Optical microscope image was obtained after Toluidine blue staining. Ionic $^{40}\text{Ca}^+$, $^{238}\text{U}^+$ images and ^{238}U mass spectra was obtained with SIMS technology. All views are presented at each DU concentration exposure. Red arrows indicated ^{238}U precipitates, pink triangles were used as reference mark between the different views. ND means not detected.

Figure 1



Annexes

Figure 3

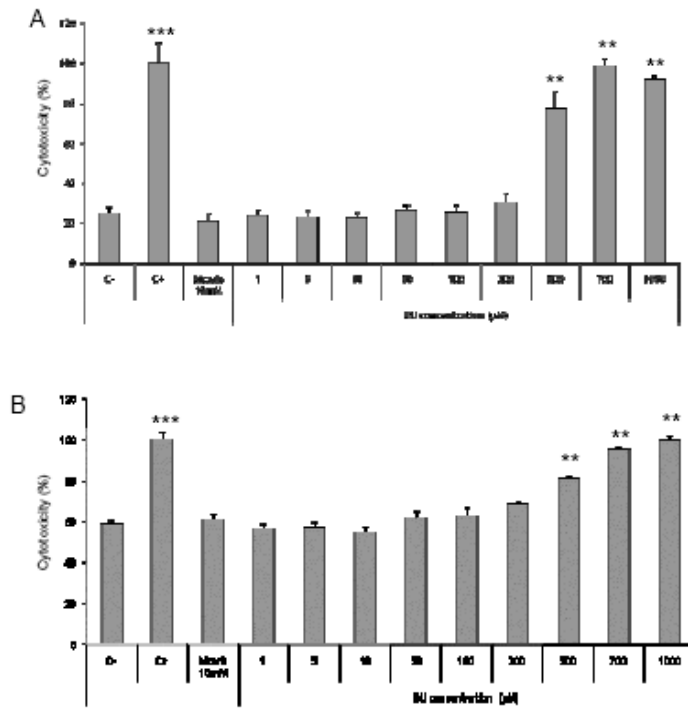
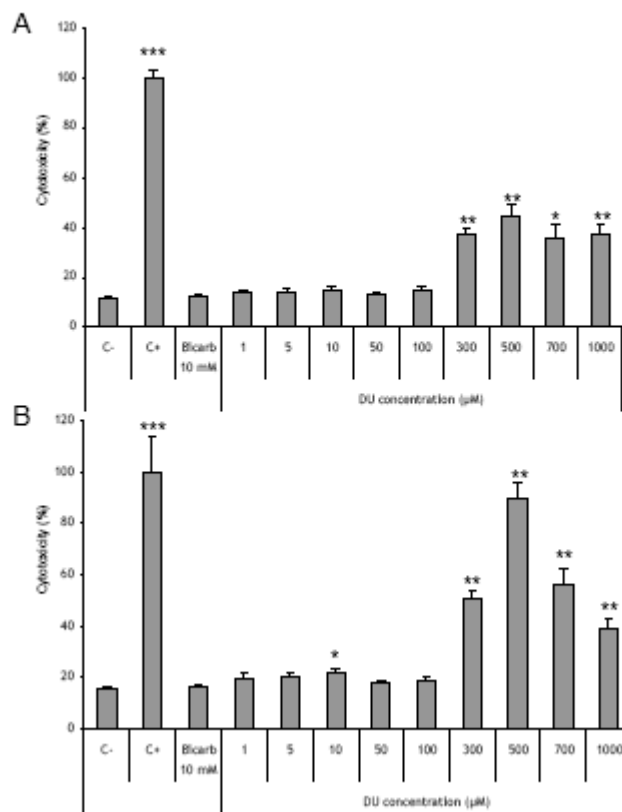


Figure 2



Annexes

Figure 4

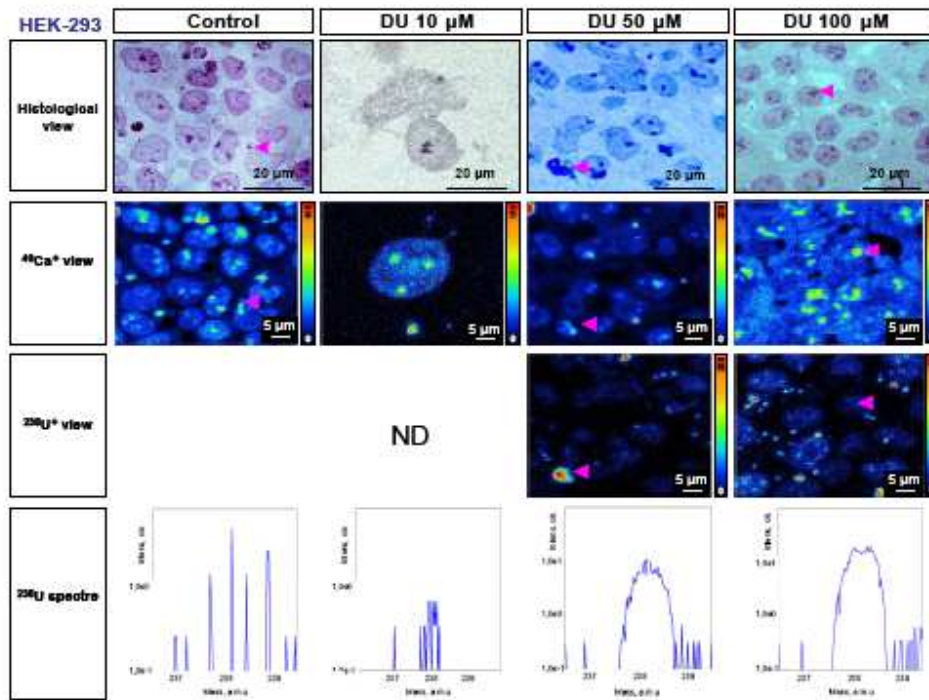
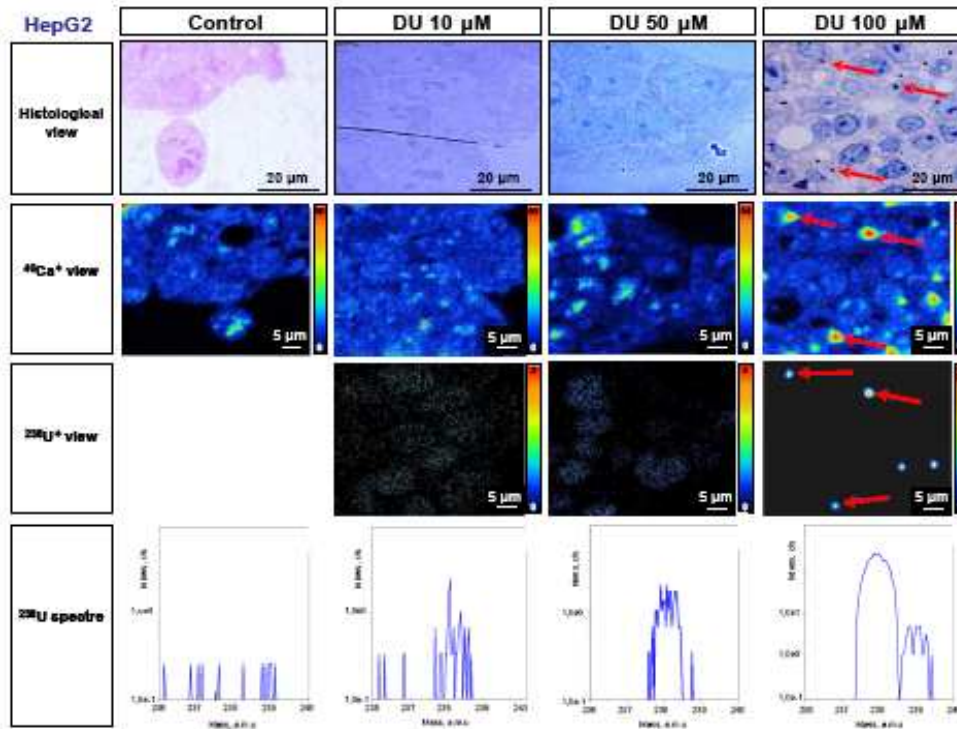
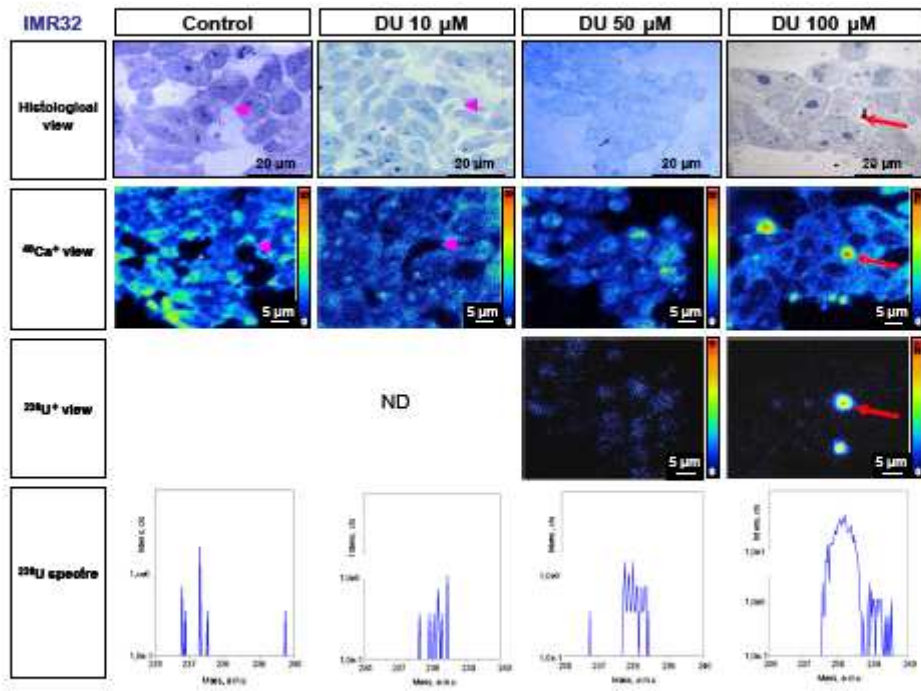


Figure 5



Annexes

Figure 6



Annexes

Annexes

Annexe II : Fiches produits

A Paracetamol (Sigma-Aldrich, ref A7085)

Synonym: 4'-Hydroxyacetanilide, 4-Acetamidophenol, N-Acetyl-4-aminophenol, APAP
 CAS Number: 103-90-2
 Linear Formula: CH₃CONHC₆H₄OH
 Molecular Weight: 151.16
 Beilstein Registry Number: 2208089
 EC Number: 203-157-5
 MDL number: MFCD00002328
 PubChem Substance ID: 24891173

Properties

grade SigmaUltra
 assay ≥99.0%
 total impurities ≤0.0005% Phosphorus (P)
 ≤0.1% Insoluble matter
 ign. residue ≤0.1%
 mp 168-172 °C (lit.)
 solubility ethanol: 0.5 M, clear, colorless
 anion traces chloride (Cl⁻): ≤0.05%
 sulfate (SO₄²⁻): ≤0.05%
 cation traces Al: ≤0.0005%
 Ca: ≤0.0005%
 Cu: ≤0.0005%
 Fe: ≤0.0005%
 K: ≤0.005%
 Mg: ≤0.0005%
 NH₄⁺: ≤0.05%
 Na: ≤0.005%
 Pb: ≤0.001%
 Zn: ≤0.0005%

Safety

Personal Protective Equipment dust mask type N95 (US), Eyeshields, Gloves
 Hazard Codes Xn
 Risk Statements 22-36/37/38
 Safety Statements 26-36
 WGK Germany 1
 RTECS AE4200000

B Gentamicine (sulphate) (Sigma-Aldrich, G3632)

CAS Number: 1405-41-0
 EC Number: 215-778-9
 MDL number: MFCD00270181

Properties

potency ≥590 µg Gentamicin per mg
 EQP level Premium

Annexes

storage temp. 2-8°C

Safety

Personal Protective Equipment dust mask type N95 (US), Eyeshields, Faceshields, Gloves

Hazard Codes Xn

Risk Statements 42/43

Safety Statements 22-36/37-45

WGK Germany 2


RTECS LY2625000

C Uranium

C O G E M A		FEUILLE	LE: 7/07/99 P: 1
ETABLISSEMENT DE PIERRELATTE		DES	
LABORATOIRES		RESULTATS	DEMANDE DU 17/05/99 Révision : 0
DEMANDEUR J51 PRO/TU2 Ateliers UO2			
V/REF PROTU2990222		TU2 17 T2 408BE04 0222	
N/REF 112914 U55348		Bioxyde d'Uranium	
TACHE	RESULTAT	UNITE	PRECISION SPECIF. LIMITE
Argent	<2	µg/gU	<10 2
Aluminium	2	µg/gU	<100 1
Bore	<0,2	µg/gU	<0,5 0,2
Bismuth	<1	µg/gU	<4 1
Carbone	14	µg/gU	<100 10
Calcium	<1	µg/gU	<100 1
Cadmium	<0,2	µg/gU	<1 0,2
Chlorures	<20	µg/gU	<20 20
Cobalt	<1	µg/gU	<25 1
Chrome	5	µg/gU	<150 2
Cuivre	<1	µg/gU	<100 1
Coulabilité	21,6	g/s	>10
Dysprosium	<0,1	µg/gU	* 0,1
Europium	<0,1	µg/gU	* 0,1
Equivalent Bore	<=0,9860	µg/gU	<1
Fluorures	17	µg/gU	<50 10
Fer	9	µg/gU	<150 1
Gadolinium	<0,1	µg/gU	<0,1 0,1
Granulométrie <100µm	99,7	%	>97,5%
Granulo.>=100 <=200µm	0,3	%	< 2 %
Granulométrie >200µm	0	%	< 0,5%
Granulométrie laser	FAIT		NEANT
Teneur en Eau	0,12	%gU	+5% <3000
Indium	<3	µg/gU	<5 3
Lithium	<0,2	µg/gU	<100 0,2
Magnésium	3	µg/gU	<50 1
Manganèse	<1	µg/gU	<100 1
Molybdène	2	µg/gU	<100 1
Masse Volumique Apparente	2,07	g/Cm3	1,7<2,5
Masse Volumique Tassée	2,62	g/Cm3	2<<3,2
Sodium	10	µg/gU	<50 2
Niobium	<0,5	µg/gU	<100 0,5
Nickel	8	µg/gU	<100 2
Azote Total	<10	µg/gU	<30 10
Rapport Oxygène Uranium	2,11		2,08/04
Phosphore	<10	µg/gU	<100 10
Plomb	<2	µg/gU	<100 2
Silicium	<2	µg/gU	<75 2
Samarium	<0,1	µg/gU	* 0,1
Etain	<1	µg/gU	<25 1
Somme des Impuretés	<=135,2	µg/gU	<1500
Somme des Terres Rares	<0,4	µg/gU	<0,6
Surface Spécifique	2,71	m²/g	2,5/3,8
Tantale	<0,5	µg/gU	<50 0,5

Annexes

C O G E M A		FEUILLE		LE: 7/07/99 P: 2	
ETABLISSEMENT DE PIERRELATTE		DES		DEMANDE DU 99/05/17	
LABORATOIRES		RESULTATS		Révision : 0	
DEMANDEUR J51 PRO/TU2 Ateliers UO2					
V/REF	PROTU2990222	TU2 17 T2	408BE04	0222	
N/REF	112914	U55348	Bioxyde d'Uranium		
TACHE	RESULTAT	UNITE	PRECISION	SPECIF.	LIMITE
Thorium	<1	µg/gU		<5	1
Titane	<0,7	µg/gU		<50	0,7
Uranium Précis	87,47	%	+0,2%	>87,4	
Uranium 234	0,0009	% pond.	0,0003	NEANT	0,0003
Uranium 235	0,2516	% pond.	0,0005	A+0,02	0,0003
Uranium 236	<=0,0003	% pond.	0,0003	NEANT	0,0003
Uranium 238	99,7472	% pond.	0,0011	NEANT	0,0003
Vanadium	<1	µg/gU		<1,5	1
Tungstène	<0,5	µg/gU		<50	0,5
Zinc	<5	µg/gU		<50	5
TOTAL UOANA ---->					19,75
Coulabilité faite avec amorçages					


J.P.-JOURNOUX

D Dexaméthasone (Sigma-Aldrich, D1756)

≥98% (HPLC), powder

Synonym: 9α-Fluoro-16α-methylprednisolone, Prednisolone F, (11β,16α)-9-Fluoro-11,17,21-trihydroxy-16-methylpregna-1,4-diene-3,20-dione, 9α-Fluoro-16α-methyl-11β,17α,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione

CAS Number: 50-02-2

Linear Formula: C₂₂H₂₉F₀₅

Molecular Weight: 392.46

Beilstein Registry Number: 2066651

EC Number: 200-003-9

MDL number: MFCD00064136

PubChem Substance ID: 24893536

Properties

assay ≥98% (HPLC)

form powder

color off-white

mp 262-264 °C(lit.)

solubility ethanol: 1 mg/mL

Tnf(21926)

storage temp. 2-8 °C

Safety

Personal Protective Equipment dust mask type N95 (US), Eyeshields, Faceshields, Gloves

Hazard Codes Xi

Risk Statements 43

Safety Statements 36/37

WGK Germany 2

RTECS TU3980000

E Rifampicine (Sigma-Aldrich, R3501)

≥97% (HPLC), powder

Synonym: 3-(4-Methylpiperazinyliminomethyl)rifamycin SV, Rifampin, Rifamycin AMP

CAS Number: 13292-46-1

Linear Formula: C₄₃H₅₈N₄O₁₂

Molecular Weight: 822.94

Beilstein Registry Number: 5723476

EC Number: 236-312-0

MDL number: MFCD00151389

PubChem Substance ID: 24899363

Properties

assay ≥97% (HPLC)

form powder

color orange-brown to red-brown

solubility H₂O: 1.3 mg/mL (pH 4.3)

DMSO: 100 mg/mL

H₂O: 2.5 mg/mL at 25 °C (pH 7.3)

storage temp. -20 °C

Safety

Personal Protective Equipment dust mask type N95 (US), Eyeshields, Gloves

Hazard Codes Xn

Risk Statements 22-36/37/38

Safety Statements 26-36

WGK Germany 3

RTECS VJ7000000

F Isoniazide (Sigma-Aldrich, I3377)

Synonym: INH, Isonicotinic acid hydrazide, Isonicotinic hydrazide

CAS Number: 54-85-3

Linear Formula: C₆H₇N₃O

Molecular Weight: 137.14

Beilstein Registry Number: 119374

EC Number: 200-214-6

MDL number: MFCD00006426

PubChem Substance ID: 24896031

Properties

assay ≥99% (TLC)

fluorescence λ_{ex} 360 nm; λ_{em} 450 nm (thiol adduct)

mp 171-173 °C(lit.)

Safety

Personal Protective Equipment dust mask type N95 (US), Eyeshields, Gloves

Hazard Codes Xn

Risk Statements 22-38

Safety Statements 26-37

WGK Germany 3

RTECS NS1751850

Bibliographie

Bibliographie

- Abou-Donia MB, Dechkovskaia AM, Goldstein LB, Shah DU, Bullman SL, Khan WA (2002) Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72:881-90
- Abu-Bakar A, Satarug S, Marks GC, Lang MA, Moore MR (2004) Acute cadmium chloride administration induces hepatic and renal CYP2A5 mRNA, protein and activity in the mouse: involvement of transcription factor NRF2. *Toxicol Lett* 148:199-210
- Ademuyiwa O, Agarwal R, Chandra R, Behari JR (2010) Effects of sub-chronic low-level lead exposure on the homeostasis of copper and zinc in rat tissues. *J Trace Elem Med Biol* 24:207-11
- AFSSA (2010). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la détermination d'une exigence de qualité en uranium pondéral dans les eaux destinées à la consommation humaine. Maison-Alfort.
- Albina ML, Belles M, Gomez M, Sanchez DJ, Domingo JL (2003) Influence of maternal stress on uranium-induced developmental toxicity in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 228:1072-7
- Albina ML, Belles M, Linares V, Sanchez DJ, 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
- Aleksunes LM, Augustine LM, Cherrington NJ, Manautou JE (2007) Influence of acetaminophen vehicle on regulation of transporter gene expression during hepatotoxicity. *J Toxicol Environ Health A* 70:1870-2
- Aleksunes LM, Campion SN, Goedken MJ, Manautou JE (2008a) Acquired resistance to acetaminophen hepatotoxicity is associated with induction of multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4) in proliferating hepatocytes. *Toxicol Sci* 104:261-73
- Aleksunes LM, Slitt AL, Maher JM, Augustine LM, Goedken MJ, Chan JY, Cherrington NJ, Klaassen CD *et al.* (2008b) Induction of Mrp3 and Mrp4 transporters during acetaminophen hepatotoxicity is dependent on Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol* 226:74-83
- Ali BH, Abdel Gayoum AA, Bashir AA (1992) Gentamicin nephrotoxicity in rat: some biochemical correlates. *Pharmacol Toxicol* 70:419-23
- Ali BH (1995) Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol* 26:1477-87
- Ali BH (2003) Agents ameliorating or augmenting experimental gentamicin nephrotoxicity: some recent research. *Food Chem Toxicol* 41:1447-52

Bibliographie

- Amin RP, Vickers AE, Sistare F, Thompson KL, Roman RJ, Lawton M, Kramer J, Hamadeh HK *et al.* (2004) Identification of putative gene based markers of renal toxicity. *Environ Health Perspect* 112:465-79
- Anke M, Seeber O, Müller R, Schäfer U, Zerull J (2009) Uranium transfer in the food chain from soil to plants, animals and man. *Chemie der Erde* 52:75-90
- Arfsten DP, Schaeffer DJ, Johnson EW, Robert Cunningham J, Still KR, Wilfong ER (2006) Evaluation of the effect of implanted depleted uranium on male reproductive success, sperm concentration, and sperm velocity. *Environ Res* 100:205-15
- Arfsten DP, Wilfong ER, Bekkedal MY, Johnson EW, McInturf SM, Eggers JS, Schaeffer DJ, 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
- Arfsten DP, Still KR, Wilfong ER, Johnson EW, McInturf SM, Eggers JS, Schaeffer DJ, Bekkedal MY (2009) Two-generation reproductive toxicity study of implanted depleted uranium (DU) in CD rats. *J Toxicol Environ Health A* 72:410-27
- Arnault E, Doussau M, Pesty A, Gouget B, Van der Meeren A, Fouchet P, Lefevre B (2008) Natural uranium disturbs mouse folliculogenesis in vivo and oocyte meiosis in vitro. *Toxicology* 247:80-7
- Arruda-Neto JD, Guevara MV, Nogueira GP, Saiki M, Cestari AC, Shtejer K, Deppman A, Pereira Filho JW *et al.* (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 for ionizing radiation agency for toxic substances and diseases registry (ATSDR). Public health service Atlanta. U. S. D. o. h. a. h. services.
- Auvinen A, Salonen L, Pekkanen J, Pukkala E, Ilus T, Kurttio P (2005) Radon and other natural radionuclides in drinking water and risk of stomach cancer: a case-cohort study in Finland. *Int J Cancer* 114:109-13
- Banday AA, Farooq N, Priyamvada S, Yusufi AN, Khan F (2008) Time dependent effects of gentamicin on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane and oxidative stress in rat kidney tissues. *Life Sci* 82:450-9
- Barber DS, Hancock SK, McNally AM, Hinckley J, Binder E, Zimmerman K, Ehrich MF, Jortner BS (2007) Neurological effects of acute uranium exposure with and without stress. *Neurotoxicology* 28:1110-9
- Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Cougnon M, Poujeol P (2005) Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiol* 99:p105-10
- Barouki R (2010) Linking long-term toxicity of xeno-chemicals with short-term biological adaptation. *Biochimie*

Bibliographie

- Belles M, Linares V, Luisa Albina M, Sirvent J, Sanchez DJ, Domingo JL (2007) Melatonin reduces uranium-induced nephrotoxicity in rats. *J Pineal Res* 43:87-95
- Bennett WM (1989) Mechanisms of aminoglycoside nephrotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 16:1-6
- Bensoussan H (2009). Effets d'une contamination chronique à l'uranium sur le système cholinergique : approches in vivo et in vitro (thèse). *Neurosciences*. Paris XI, Université Paris XI: 306.
- Bernard AM, de Russis R, Amor AO, Lauwerys RR (1988) Potentiation of cadmium nephrotoxicity by acetaminophen. *Arch Toxicol* 62:291-4
- Bhattacharjee R, Sil PC (2006) The protein fraction of *Phyllanthus niruri* plays a protective role against acetaminophen induced hepatic disorder via its antioxidant properties. *Phytother Res* 20:595-601
- Blantz RC (1975) The mechanism of acute renal failure after uranyl nitrate. *J Clin Invest* 55:621-35
- Bledsoe G, Shen B, Yao YY, Hagiwara M, Mizell B, Teuton M, Grass D, Chao L *et al.* (2008) Role of tissue kallikrein in prevention and recovery of gentamicin-induced renal injury. *Toxicol Sci* 102:433-43
- Boice JD, Jr., Cohen SS, Mumma MT, Chadda B, Blot WJ (2007) Mortality among residents of Uravan, Colorado who lived near a uranium mill, 1936-84. *J Radiol Prot* 27:299-319
- Boice JD, Jr., Bigbee WL, Mumma MT, Tarone RE, Blot WJ (2009) County mortality and cancer incidence in relation to living near two former nuclear materials processing facilities in Pennsylvania--an update. *Health Phys* 96:128-37
- Bosque MA, Domingo JL, Llobet JM, Corbella J (1993) Embryotoxicity and teratogenicity of uranium in mice following subcutaneous administration of uranyl acetate. *Biol Trace Elem Res* 36:109-18
- 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* 27:135-44
- Bulman RA (1980) Uranium uptake into the rat liver: effect of thioacetamide and lipophilic glycerophosphate upon hepatic uptake. *Int J Nucl Med Biol* 7:295-8
- Burk O, Wojnowski L (2004) Cytochrome P450 3A and their regulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369:105-24
- Burk RF, Hill KE, Hunt RW, Jr., Martin AE (1990) Isoniazid potentiation of acetaminophen hepatotoxicity in the rat and 4-methylpyrazole inhibition of it. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 69:115-8

Bibliographie

- Bussy C, Lestaevel 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* 27:245-52
- Carafoli E, Tiozzo R, Pasquali-Ronchetti I, Laschi R (1971) A study of Ca²⁺ metabolism in kidney mitochondria during acute uranium intoxication. *Lab Invest* 25:516-27
- Carriere M, Avoscan L, Collins R, Carrot F, Khodja H, Ansoborlo E, Gouget B (2004) Influence of uranium speciation on normal rat kidney (NRK-52E) proximal cell cytotoxicity. *Chem Res Toxicol* 17:446-52
- Carriere M, Gouget B, Gallien JP, Avoscan L, Gobin R, Verbavatz JM, Khodja H (2005) Cellular distribution of uranium after exposure of renal epithelial cells: SEM, TEM and nuclear microscopy analysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 231:268-273
- Carriere M, Proux O, Milgram S, Thiebault C, Avoscan L, Barre N, Den Auwer C, Gouget B (2008) Transmission electron microscopic and X-ray absorption fine structure spectroscopic investigation of U repartition and speciation after accumulation in renal cells. *J Biol Inorg Chem* 13:655-62
- Cazoulat A, Lecompte Y, Bohand S, Castagnet X, Laroche P (2008) [Urinary uranium analysis results on Gulf war or Balkans conflict veterans]. *Pathol Biol (Paris)* 56:77-83
- Chan LM, Lowes S, Hirst BH (2004) The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 21:25-51
- Chen C, Qu L, Zhao J, Liu S, Deng G, Li B, Zhang P, Chai Z (2006) Accumulation of mercury, selenium and their binding proteins in porcine kidney and liver from mercury-exposed areas with the investigation of their redox responses. *Sci Total Environ* 366:627-37
- Cheng J, Ma X, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ (2009) Rifampicin-activated human pregnane X receptor and CYP3A4 induction enhance acetaminophen-induced toxicity. *Drug Metab Dispos* 37:1611-21
- Chung HJ, Lee MG (2006) Pharmacokinetic changes of ipriflavone in rats with acute renal failure induced by uranyl nitrate. *Biopharm Drug Dispos* 27:345-51
- Chung W, Kim EJ, Lee I, Kim SG, Lee MG, Kim SH (2003) Effects of recombinant human growth hormone on the pharmacokinetics of intravenous chlorzoxazone in rats with acute renal failure induced by uranyl nitrate. *Life Sci* 73:253-63
- Cooper JR, Stradling GN, Smith H, 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

Bibliographie

- 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
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Britti D, De Sarro A, Pierpaoli S *et al.* (2002) A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 450:67-76
- Danesi PR, Markowicz A, Chinea-Cano E, Burkart W, Salbu B, Donohue D, Ruedenauer F, Hedberg M *et al.* (2003) Depleted uranium particles in selected Kosovo samples. *J Environ Radioact* 64:143-54
- Darolles C, Broggio D, Feugier A, Frelon S, Dublineau I, De Meo M, Petitot F (2010) Different genotoxic profiles between depleted and enriched uranium. *Toxicol Lett* 192:337-48
- Dhanarajan R, Abraham P, Isaac B (2006) Protective effect of ebselen, a selenoorganic drug, against gentamicin-induced renal damage in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 99:267-72
- Di Lella LA, Nannoni F, Protano G, 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
- di Masi A, De Marinis E, Ascenzi P, Marino M (2009) Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol Aspects Med* 30:297-343
- Diamond GL, Morrow PE, Panner BJ, Gelein RM, 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, Cabrini RL (2002) Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation. *Arch Environ Health* 57:320-5
- Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, Corbella J (1987) Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bull Environ Contam Toxicol* 39:168-74
- Donnadieu-Claraz M, Bonnehogne M, Dhieux B, Maubert C, Cheynet M, Paquet F, Gourmelon P (2007) Chronic exposure to uranium leads to iron accumulation in rat kidney cells. *Radiat Res* 167:454-64
- Dublineau I, Grison S, Baudelin C, Dudoignon N, Souidi M, Marquette C, Paquet F, Aigueperse J *et al.* (2005) Absorption of uranium through the entire gastrointestinal tract of the rat. *Int J Radiat Biol* 81:473-82
- Dublineau I, Grandcolas L, Grison S, Baudelin C, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P (2007) Modifications of inflammatory pathways in rat intestine following chronic ingestion of depleted uranium. *Toxicol Sci* 98:458-68
- Ekor M, Farombi EO, Emerole GO (2006) Modulation of gentamicin-induced renal dysfunction and injury by the phenolic extract of soybean (*Glycine max*).

Bibliographie

- Fundam Clin Pharmacol 20:263-71
- Elbekai RH, El-Kadi AO (2007) Transcriptional activation and posttranscriptional modification of Cyp1a1 by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicol Lett* 172:106-19
- Endo T (2002) Transport of cadmium across the apical membrane of epithelial cell lines. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 131:223-9
- Feierman DE, Melnikov Z, Zhang J (2002) The paradoxical effect of acetaminophen on CYP3A4 activity and content in transfected HepG2 cells. *Arch Biochem Biophys* 398:109-17
- Feugier A, Frelon S, Gourmelon P, Claraz M (2008) Alteration of mouse oocyte quality after a subchronic exposure to depleted Uranium. *Reprod Toxicol* 26:273-7
- Fitsanakis VA, Erikson KM, Garcia SJ, 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* 111:185-97
- Flandre O, Damon M (1967). Experimental study of the nephrotoxicity of gentamicin in rats. First international symposium. Gentamicin. Paris.
- Fukuda S, Ikeda M, Chiba M, Kaneko K (2006) Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium. *Radiat Prot Dosimetry* 118:307-14
- Galle P (1997). Uranium. *Toxiques nucléaires. Masson. Paris.*
- Gamage N, Barnett A, Hempel N, Duggleby RG, Windmill KF, Martin JL, McManus ME (2006) Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol Sci* 90:5-22
- Garcon G, Leleu B, Marez T, Zerimech F, Haguenoer JM, Furon D, Shirali P (2007) Biomonitoring of the adverse effects induced by the chronic exposure to lead and cadmium on kidney function: usefulness of alpha-glutathione S-transferase. *Sci Total Environ* 377:165-72
- Gaudy C, Buxeraud J (2005). chapitre3 Aminocides. *Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. c. Pharma, Elsevier.*
- Gazin V, Kerdine S, Grillon G, Pallardy M, Raoul H (2004) Uranium induces TNF alpha secretion and MAPK activation in a rat alveolar macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 194:49-59
- Ghadially FN, Lalonde JM, Yang-Steppuhn S (1982a) Uraniosomes produced in cultured rabbit kidney cells by uranyl acetate. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 39:21-30
- Ghadially FN, Lalonde JM, Yong NK (1982b) Uraniosomes produced in the synovial

Bibliographie

- membrane by uranyl acetate. *Pathology* 14:121-7
- Ghadially FN, Yang-Steppuhn SE, Lalonde JM (1982c) The effect of uranyl acetate on human lymphoblastoid cells (RPMI 6410) and HeLa cells. *Br J Exp Pathol* 63:227-34
- Ghanem CI, Gomez PC, Arana MC, Perassolo M, Ruiz ML, Villanueva SS, Ochoa EJ, Catania VA *et al.* (2004) Effect of acetaminophen on expression and activity of rat liver multidrug resistance-associated protein 2 and P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 68:791-8
- Ghanem CI, Ruiz ML, Villanueva SS, Luquita MG, Catania VA, Jones B, Bengochea LA, Vore M *et al.* (2005) Shift from biliary to urinary elimination of acetaminophen-glucuronide in acetaminophen-pretreated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 315:987-95
- Ghanem CI, Ruiz ML, Villanueva SS, Luquita M, Llesuy S, Catania VA, Bengochea LA, Mottino AD (2009) Effect of repeated administration with subtoxic doses of acetaminophen to rats on enterohepatic recirculation of a subsequent toxic dose. *Biochem Pharmacol* 77:1621-8
- Ghosh S, Kumar A, Pandey BN, 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
- Gilman AP, Villeneuve DC, Secours VE, Yagminas AP, Tracy BL, Quinn JM, Valli VE, Willes RJ *et al.* (1998) Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci* 41:117-28
- Goasguen J, Lapresle J, Ribot C, Rocquet G (1982) [Chronic neurological syndrome resulting from intoxication with metallic uranium (author's transl)]. *Nouv Presse Med* 11:119-21
- Gueguen Y, Paquet F, Voisin P, Souidi M (2005). Effects of chronic contamination with depleted uranium on xenobiotic biotransformation enzymes in the rat. 14th international conference on cytochromes P450, Dallas, Texas.
- Gueguen Y, Souidi M, Baudelin C, Dudoignon N, Grison S, Dublineau I, Marquette C, Voisin P *et al.* (2006a) Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch Toxicol* 80:187-95
- Gueguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P *et al.* (2006b) [Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]. *Ann Biol Clin (Paris)* 64:535-48
- Gueguen Y, Grandcolas L, Baudelin C, Grison S, Tissandie E, Jourdain JR, Paquet F, Voisin P *et al.* (2007) Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium. *Toxicology* 229:62-72
- Gueguen Y, Grandcolas L, Baudelin C, Grison S, Tissandie E, Jourdain JR, Paquet F,

Bibliographie

- Voisin P *et al.* (2007) Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium. *Toxicology* 229:62-72
- Gueneau P (2006) La saga du paracétamol. *Médecine* avril:158-159
- Guglielmotti MB, Ubios AM, Cabrini RL (1985) Alveolar wound healing alteration under uranyl nitrate intoxication. *J Oral Pathol* 14:565-72
- Guseva Canu I, Cardis E, Metz-Flamant C, Caer-Lorho S, Auriol B, Wild P, Laurier D, Tirmarche M (2009) French cohort of the uranium processing workers: mortality pattern after 30-year follow-up. *Int Arch Occup Environ Health* 83:301-8
- Habdous M, Siest G, Herbeth B, Vincent-Viry M, Visvikis S (2004) [Glutathione S-transferases genetic polymorphisms and human diseases: overview of epidemiological studies]. *Ann Biol Clin (Paris)* 62:15-24
- Hahn FF, Guilmette RA, Hoover MD (2002) Implanted depleted uranium fragments cause soft tissue sarcomas in the muscles of rats. *Environ Health Perspect* 110:51-9
- Hahn FF, Roszell LE, Daxon EG, Guilmette RA, Parkhurst MA (2009) Radiological risk assessment of Capstone depleted uranium aerosols. *Health Phys* 96:352-62
- Hakkola J, Pasanen M, Purkunen R, Saarikoski S, Pelkonen O, Maenpaa J, Rane A, Raunio H (1994) Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human adult and fetal liver. *Biochem Pharmacol* 48:59-64
- Hakonson-Hayes AC, Fresquez PR, Whicker FW (2002) Assessing potential risks from exposure to natural uranium in well water. *J Environ Radioact* 59:29-40
- Haley DP (1982) Morphologic changes in uranyl nitrate-induced acute renal failure in saline- and water-drinking rats. *Lab Invest* 46:196-208
- Haley DP, Bulger RE, Dobyen DC (1982) The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 41:181-92
- Hamilton EI (1971) The concentration and distribution of uranium in human skeletal tissues. *Calcif Tissue Res* 7:150-62
- Hao Y, Li R, Leng Y, Ren J, Liu J, Ai G, Xu H, Su Y *et al.* (2009) A study assessing the genotoxicity in rats after chronic oral exposure to a low dose of depleted uranium. *J Radiat Res (Tokyo)* 50:521-8
- Haouem S, Hmad N, Najjar MF, El Hani A, Sakly R (2007) Accumulation of cadmium and its effects on liver and kidney functions in rats given diet containing cadmium-polluted radish bulb. *Exp Toxicol Pathol* 59:77-80
- Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, Holla V, C. H *et al.* (1999) Human cytochromes P450. *Molecular Aspects of Medicine*

Bibliographie

20:1-137

- Hayes JD, Pulford DJ (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30:445-600
- Houpert P, Lestaevel P, Bussy C, Paquet F, Gourmelon P (2005) Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat. *Neurotoxicology* 26:1015-20
- Hu JJ, Yoo JS, Lin M, Wang EJ, Yang CS (1996) Protective effects of diallyl sulfide on acetaminophen-induced toxicities. *Food Chem Toxicol* 34:963-9
- Jaeschke H, Bajt ML (2006) Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci* 89:31-41
- Jakobsen SS, Danscher G, Stoltenberg M, Larsen A, Bruun JM, Mygind T, Kemp K, Soballe K (2007) Cobalt-chromium-molybdenum alloy causes metal accumulation and metallothionein up-regulation in rat liver and kidney. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 101:441-6
- James LP, Mayeux PR, Hinson JA (2003) Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* 31:1499-506
- Jensen LS, Valentine J, Milne RW, Evans AM (2004) The quantification of paracetamol, paracetamol glucuronide and paracetamol sulphate in plasma and urine using a single high-performance liquid chromatography assay. *J Pharm Biomed Anal* 34:585-93
- Jerez S, Motas M, Canovas RA, Talavera J, Almela RM, Del Rio AB (2010) Accumulation and tissue distribution of heavy metals and essential elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Spanish Mediterranean coastline of Murcia. *Chemosphere* 78:256-64
- Juntunen R (1991). Uranium and radon in wells drilled into bedrock in southern Finland. Geological survey of Finland R. o. i. 98. Espoo.
- Kalinich JF, McClain DE (2001) Staining of intracellular deposits of uranium in cultured murine macrophages. *Biotech Histochem* 76:247-52
- Karahan I, Atessahin A, Yilmaz S, Ceribasi AO, Sakin F (2005) Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 215:198-204
- Kathren RL, McInroy JF, Moore RH, Dietert SE (1989) Uranium in the tissues of an occupationally exposed individual. *Health Phys* 57:17-21
- Khan SA, Priyamvada S, Farooq N, Khan S, Khan MW, Yusufi AN (2009) Protective effect of green tea extract on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Pharmacol Res* 59:254-62

Bibliographie

- Kim HJ, Rozman P, Madhu C, Klaassen CD (1992) Homeostasis of sulfate and 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate in rats after acetaminophen administration. *J Pharmacol Exp Ther* 261:1015-21
- Kim SJ, Lee MY, Kwon do Y, Kim SY, Kim YC (2009) Alteration in metabolism and toxicity of acetaminophen upon repeated administration in rats. *J Pharmacol Sci* 111:175-81
- Kim SN, Seo JY, Jung da W, Lee MY, Jung YS, Kim YC (2007) Induction of hepatic CYP2E1 by a subtoxic dose of acetaminophen in rats: increase in dichloromethane metabolism and carboxyhemoglobin elevation. *Drug Metab Dispos* 35:1754-8
- Kliwer SA, Goodwin B, Willson TM (2002) The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* 23:687-702
- Kobayashi S, Nagase M, Honda N, Hishida A (1984) Glomerular alterations in uranyl acetate-induced acute renal failure in rabbits. *Kidney Int* 26:808-15
- Korashy HM, Elbekai RH, El-Kadi AO (2004a) Effects of renal diseases on the regulation and expression of renal and hepatic drug-metabolizing enzymes: a review. *Xenobiotica* 34:1-29
- Korashy HM, El-Kadi AO (2004b) Differential effects of mercury, lead and copper on the constitutive and inducible expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR)-regulated genes in cultured hepatoma Hepa 1c1c7 cells. *Toxicology* 201:153-72
- Korashy HM, El-Kadi AO (2005) Regulatory mechanisms modulating the expression of cytochrome P450 1A1 gene by heavy metals. *Toxicol Sci* 88:39-51
- Korashy HM, El-Kadi AO (2006) Transcriptional regulation of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and glutathione S-transferase ya genes by mercury, lead, and copper. *Drug Metab Dispos* 34:152-65
- Kostrubsky VE, Szakacs JG, Jeffery EH, Wood SG, Bement WJ, Wrighton SA, Sinclair PR, Sinclair JF (1997) Role of CYP3A in ethanol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 143:315-23
- Krusekopf S, Roots I, Kleeberg U (2003) Differential drug-induced mRNA expression of human CYP3A4 compared to CYP3A5, CYP3A7 and CYP3A43. *Eur J Pharmacol* 466:7-12
- Kundt M, Ubios AM, Cabrini RL (2000) Effects of uranium poisoning on cultured preimplantation embryos. *Biol Trace Elem Res* 75:235-44
- Kundt MS, Martinez-Taibo C, Muhlmann MC, Furnari JC (2009) Uranium in drinking water: effects on mouse oocyte quality. *Health Phys* 96:568-74
- Kurttio P, Auvinen A, Salonen L, Saha H, Pekkanen J, Makelainen I, Vaisanen SB, Penttila IM *et al.* (2002) Renal effects of uranium in drinking water. *Environ*

Bibliographie

- Health Perspect 110:337-42
- Kurttio P, Komulainen H, Leino A, Salonen L, Auvinen A, Saha H (2005) Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 113:68-72
- Kurttio P, Harmoinen A, Saha H, Salonen L, Karpas Z, Komulainen H, Auvinen A (2006) Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *Am J Kidney Dis* 47:972-82
- Kurttio P, Salonen L, Ilus T, Pekkanen J, Pukkala E, Auvinen A (2006) Well water radioactivity and risk of cancers of the urinary organs. *Environ Res* 102:333-8
- La Touche YD, Willis DL, Dawydiak OI (1987) Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health Phys* 53:147-62
- Laine JE, Auriola S, Pasanen M, Juvonen RO (2009) Acetaminophen bioactivation by human cytochrome P450 enzymes and animal microsomes. *Xenobiotica* 39:11-21
- Lariviere D, Packer AP, Marro L, Li C, Chen J, Cornett RJ (2007) Age dependence of natural uranium and thorium concentrations in bone. *Health Phys* 92:119-26
- Leblond F, Guevin C, Demers C, Pellerin I, Gascon-Barre M, Pichette V (2001) Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 12:326-32
- Lee SS, Buters JT, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ (1996) Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *J Biol Chem* 271:12063-7
- 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
- Lemercier V, Millot X, Ansoborlo E, Menetrier F, Flury-Herard A, Rousselle C, 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, 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, Gourmelon P (2009) Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats. *Toxicology* 258:1-9
- Lewis DF (2004) 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics*

Bibliographie

5:305-18

- Lin JH, Levy G (1982) Effect of experimental renal failure on sulfate retention and acetaminophen pharmacokinetics in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 221:80-4
- Lin MC, Wang EJ, Patten C, Lee MJ, Xiao F, Reuhl KR, Yang CS (1996) Protective effect of diallyl sulfone against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Biochem Toxicol* 11:11-20
- Linares V, Albina ML, Belles M, Mayayo E, Sanchez DJ, Domingo JL (2005) Combined action of uranium and stress in the rat. II. Effects on male reproduction. *Toxicol Lett* 158:186-95
- Linares V, Belles M, Albina ML, Sirvent JJ, Sanchez DJ, Domingo JL (2006) Assessment of the pro-oxidant activity of uranium in kidney and testis of rats. *Toxicol Lett* 167:152-61
- Linares V, Sanchez DJ, Belles M, Albina L, Gomez M, Domingo JL (2007) Pro-oxidant effects in the brain of rats concurrently exposed to uranium and stress. *Toxicology* 236:82-91
- Liu L, Klaassen CD (1996) Different mechanism of saturation of acetaminophen sulfate conjugation in mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 139:128-34
- Llobet JM, Sirvent JJ, Ortega A, Domingo JL (1991) Influence of chronic exposure to uranium on male reproduction in mice. *Fundam Appl Toxicol* 16:821-9
- Lohr JW, Willsky GR, Acara MA (1998) Renal drug metabolism. *Pharmacol Rev* 50:107-41
- Luft FC, Bloch R, Sloan RS, Yum MN, Costello R, Maxwell DR (1978) Comparative nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics in rats. *J Infect Dis* 138:541-5
- Ma C, Bi K, Zhang M, Su D, Fan X, Ji W, Wang C, Chen X (2010) Metabonomic study of biochemical changes in the urine of Morning Glory Seed treated rat. *J Pharm Biomed Anal*
- Ma Q, Lu AY (2007) CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metab Dispos* 35:1009-16
- Madden EF, Fowler BA (2000) Mechanisms of nephrotoxicity from metal combinations: a review. *Drug Chem Toxicol* 23:1-12
- Magdo HS, Forman J, Graber N, Newman B, Klein K, Satlin L, Amler RW, Winston JA *et al.* (2007) Grand rounds: nephrotoxicity in a young child exposed to uranium from contaminated well water. *Environ Health Perspect* 115:1237-41
- Malenchenko AF, Barkun NA, 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

Bibliographie

- Mao Y, Desmeules M, Schaubel D, Berube D, Dyck R, Brule D, Thomas B (1995) Inorganic components of drinking water and microalbuminuria. *Environ Res* 71:135-40
- Markich SJ, Jeffree RA, Burke PT (2002) Freshwater bivalve shells as archival indicators of metal pollution from a copper-uranium mine in tropical northern Australia. *Environ Sci Technol* 36:821-32
- Maruyama M, Matsunaga T, Harada E, Ohmori S (2007) Comparison of basal gene expression and induction of CYP3As in HepG2 and human fetal liver cells. *Biol Pharm Bull* 30:2091-7
- McDiarmid MA, Keogh JP, Hooper FJ, McPhaul K, Squibb K, Kane R, DiPino R, Kabat M *et al.* (2000) Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans. *Environ Res* 82:168-80
- McDiarmid MA, Engelhardt SM, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Kabat M, Kaup B *et al.* (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, Engelhardt SM, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Cernich A, Kaup B *et al.* (2007) Health surveillance of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium: updating the cohort. *Health Phys* 93:60-73
- McDiarmid MA, Engelhardt SM, Dorsey CD, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Cernich A *et al.* (2009) Surveillance results of depleted uranium-exposed Gulf War I veterans: sixteen years of follow-up. *J Toxicol Environ Health A* 72:14-29
- Michael SL, Pumford NR, Mayeux PR, Niesman MR, Hinson JA (1999) Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Hepatology* 30:186-95
- Michaud J, Naud J, Ouimet D, Demers C, Petit JL, Leblond FA, Bonnardeaux A, Gascon-Barre M *et al.* (2010) Reduced Hepatic Synthesis of Calcidiol in Uremia. *J Am Soc Nephrol* (Epub ahead of print)
- Michon J, Frelon S, Garnier C, Coppin F (2010) Determinations of uranium(VI) binding properties with some metalloproteins (transferrin, albumin, metallothionein and ferritin) by fluorescence quenching. *J Fluoresc* 20:581-90
- Milacic S, Simic J (2009) Identification of health risks in workers staying and working on the terrains contaminated with depleted uranium. *J Radiat Res (Tokyo)* 50:213-22
- Milgram S, Carriere M, Malaval L, Gouget B (2008) Cellular accumulation and distribution of uranium and lead in osteoblastic cells as a function of their speciation. *Toxicology* 252:26-32

Bibliographie

- Milgram S, Carriere M, Thiebault C, Malaval L, Gouget B (2008) Cytotoxic and phenotypic effects of uranium and lead on osteoblastic cells are highly dependent on metal speciation. *Toxicology* 250:62-9
- Milgram S, Carriere M, Thiebault C, Malaval L, Gouget B (2008a) Cytotoxic and phenotypic effects of uranium and lead on osteoblastic cells are highly dependent on metal speciation. *Toxicology* 250:62-9
- Milgram S, Carriere M, Malaval L, Gouget B (2008b) Cellular accumulation and distribution of uranium and lead in osteoblastic cells as a function of their speciation. *Toxicology* 252:26-32
- Miller AC, Blakely WF, Livengood D, Whittaker T, Xu J, Ejniak JW, Hamilton MM, Parlette E *et al.* (1998a) Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranium chloride. *Environ Health Perspect* 106:465-71
- Miller AC, Fuciarelli AF, Jackson WE, Ejniak EJ, Emond C, Strocko S, Hogan J, Page N *et al.* (1998b) Urinary and serum mutagenicity studies with rats implanted with depleted uranium or tantalum pellets. *Mutagenesis* 13:643-8
- Miller AC, Xu J, Stewart M, McClain D (2001) Suppression of depleted uranium-induced neoplastic transformation of human cells by the phenyl fatty acid, phenyl acetate: chemoprevention by targeting the p21RAS protein pathway. *Radiat Res* 155:163-170
- Miller AC, 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* 99:275-8
- Miller AC, Brooks K, Stewart M, Anderson B, Shi L, McClain D, Page N (2003) Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation. *J Environ Radioact* 64:247-59
- Miller AC, Brooks K, Smith J, Page N (2004) Effect of the militarily-relevant heavy metals, depleted uranium and heavy metal tungsten-alloy on gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). *Mol Cell Biochem* 255:247-56
- Miranda SR, Meyer SA (2007) Cytotoxicity of chloroacetanilide herbicide alachlor in HepG2 cells independent of CYP3A4 and CYP3A7. *Food Chem Toxicol* 45:871-7
- Mirochnitchenko O, Weisbrot-Lefkowitz M, Reuhl K, Chen L, Yang C, Inouye M (1999) Acetaminophen toxicity. Opposite effects of two forms of glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 274:10349-55
- Mirto H, Henge-Napoli MH, Gibert R, Ansoborlo E, Fournier M, Cambar J (1999) Intracellular behaviour of uranium(VI) on renal epithelial cell in culture

Bibliographie

- (LLC-PK1): influence of uranium speciation. *Toxicol Lett* 104:249-56
- Mitchel RE, Jackson JS, Heinmiller B (1999) Inhaled uranium ore dust and lung cancer risk in rats. *Health Phys* 76:145-55
- Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB (1973) Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 187:211-7
- Monleau M, De Meo M, Frelon S, Paquet F, Donnadiou-Claraz M, Dumenil G, Chazel V (2006) Distribution and genotoxic effects after successive exposure to different uranium oxide particles inhaled by rats. *Inhal Toxicol* 18:885-94
- Montavon G, Apostolidis C, Bruchertseifer F, Repinc U, Morgenstern A (2009) Spectroscopic study of the interaction of U(VI) with transferrin and albumin for speciation of U(VI) under blood serum conditions. *J Inorg Biochem* 103:1609-16
- Moon YJ, Lee AK, Chung HC, Kim EJ, Kim SH, Lee DC, Lee I, Kim SG *et al.* (2003) Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats. *Drug Metab Dispos* 31:776-84
- Moore MR (2004) A commentary on the impacts of metals and metalloids in the environment upon the metabolism of drugs and chemicals. *Toxicol Lett* 148:153-8
- Morishita K, Mizukawa Y, Kasahara T, Okuyama M, Takashima K, Toritsuka N, Miyagishima T, Nagao T *et al.* (2006) Gene expression profile in liver of differing ages of rats after single oral administration of acetaminophen. *J Toxicol Sci* 31:491-507
- Mottino AD, Catania VA (2008) Hepatic drug transporters and nuclear receptors: regulation by therapeutic agents. *World J Gastroenterol* 14:7068-74
- Mudipalli A (2007) Lead hepatotoxicity & potential health effects. *Indian J Med Res* 126:518-27
- Muller D (2002). Etude in vitro de la reabsorption tubulaire proximale de l'uranium - conséquences fonctionnelles (thèse). Biologie Santé. Bordeaux, Université Victor Segalen bordeaux. 2: 191.
- Muller D, Houpert P, Cambar J, Henge-Napoli MH (2006) Role of the sodium-dependent phosphate co-transporters and of the phosphate complexes of uranyl in the cytotoxicity of uranium in LLC-PK1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 214:166-77
- Muller DS, Houpert P, Cambar J, Henge-Napoli MH (2008) Role of the sodium-dependent phosphate cotransporters and absorptive endocytosis in the uptake of low concentrations of uranium and its toxicity at higher concentrations in LLC-PK1 cells. *Toxicol Sci* 101:254-62

Bibliographie

- Muller P, van Bakel H, van de Sluis B, Holstege F, Wijmenga C, Klomp LW (2007) Gene expression profiling of liver cells after copper overload in vivo and in vitro reveals new copper-regulated genes. *J Biol Inorg Chem* 12:495-507
- Murakami H, Yayama K, Chao J, Chao L (1999) Atrial natriuretic peptide gene delivery attenuates gentamycin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant* 14:1376-84
- Nagai J, Takano M (2004) Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity. *Drug Metab Pharmacokinet* 19:159-70
- Nagakura Y, Okada M, Kohara A, Kiso T, Toya T, Iwai A, Wanibuchi F, Yamaguchi T (2003) Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. *J Pharmacol Exp Ther* 306:490-7
- Nebert DW, Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360:1155-62
- Neuman WF, Neuman MW, et al. (1949) The deposition of uranium in bone; ion competition studies. *J Biol Chem* 179:341-8
- Newey H, Sanford PA, Smyth DH (1966) The effect of uranyl nitrate on intestinal transfer of hexoses. *J Physiol* 186:493-502
- Noreault TL, Kostrubsky VE, Wood SG, Nichols RC, Strom SC, Trask HW, Wrighton SA, Evans RM *et al.* (2005) Arsenite decreases CYP3A4 and RXRalpha in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 33:993-1003
- Nusinovici S, Vacquier B, Leuraud K, Metz-Flamant C, Caer-Lorho S, Acker A, Laurier D (2010) Mortality from circulatory system diseases and low-level radon exposure in the French cohort study of uranium miners, 1946-1999. *Scand J Work Environ Health*
- Ortega A, Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, 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
- Ozaki N (2009) Identification of genes involved in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats - A toxicogenomic investigation. *Experimental and Toxicologic Pathology*
- Ozmen M, Muhittin Y (1998) Subacute toxicity of uranyl acetate in Swiss-Albino mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 6:111-115
- Paquet F, Houpert P, Blanchardon E, Delissen O, Maubert C, Dhieux B, Moreels AM, Frelon S *et al.* (2006) Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys* 90:139-47
- Pasanen M, Lang S, Kojo A, Kosma VM (1995) Effects of simulated nuclear fuel

Bibliographie

- particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environ Res* 70:126-33
- Paternain JL, Domingo JL, Ortega A, Llobet JM (1989) The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicol Environ Saf* 17:291-6
- Pavek P, Dvorak Z (2008) Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab* 9:129-43
- Pellmar TC, Fuciarelli AF, Ejniak JW, Hamilton M, Hogan J, Strocko S, Emond C, Mottaz HM *et al.* (1999) Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci* 49:29-39
- Periyakaruppan A, Kumar F, Sarkar S, Sharma CS, Ramesh GT (2007) Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells. *Arch Toxicol* 81:389-95
- Petitot F, Moreels AM, 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
- Plewka A, Plewka D, Nowaczyk G, Brzoska MM, Kaminski M, Moniuszko-Jakoniuk J (2004) Effects of chronic exposure to cadmium on renal cytochrome P450-dependent monooxygenase system in rats. *Arch Toxicol* 78:194-200
- Potter WZ, Thorgeirsson SS, Jollow DJ, Mitchell JR (1974) Acetaminophen-induced hepatic necrosis. V. Correlation of hepatic necrosis, covalent binding and glutathione depletion in hamsters. *Pharmacology* 12:129-43
- Pourahmad J, Ghashang M, Ettehadi HA, Ghalandari R (2006) A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity. *Environ Toxicol* 21:349-54
- Pourahmad J, Shaki F, Tanbakosazan F, Ghalandari R, Ettehadi HA, Dahaghin E (2010) Protective effects of fungal β -D-glucan against oxidative stress cytotoxicity induced by depleted uranium in isolated rat hepatocytes. *Hum Exp Toxicol* epub ahead of print:
- Prat O, Berenguer F, Malard V, Tavan E, Sage N, Steinmetz G, Quemeneur E (2005) Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity. *Proteomics* 5:297-306
- Priest ND, Howells GR, Green D, Haines JW (1982) Uranium in bone: metabolic and autoradiographic studies in the rat. *Hum Toxicol* 1:97-114
- Priyamvada S, Priyadarshini M, Arivarasu NA, Farooq N, Khan S, Khan SA, Khan MW, Yusufi AN (2008) Studies on the protective effect of dietary fish oil on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 78:369-81

Bibliographie

- Priyamvada S, Khan SA, Khan MW, Khan S, Farooq N, Khan F, Yusufi AN (2010) Studies on the protective effect of dietary fish oil on uranyl-nitrate-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82:35-44
- Quiros L, Pina B, Sole M, Blasco J, Lopez MA, Riva MC, Barcelo D, Raldua D (2007) Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbus graellsii*: laboratory and field studies. *Chemosphere* 67:1144-54
- Racine R, Grandcolas L, Grison S, Stefani J, Delissen O, Gourmelon P, Veyssiere G, Souidi M (2010) Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) activity is modified after chronic ingestion of depleted uranium in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 120:60-6
- Rekka E, Evdokimova E, Eeckhoudt S, Labar G, Calderon PB (2002) Role of temperature on protein and mRNA cytochrome P450 3A (CYP3A) isozymes expression and midazolam oxidation by cultured rat precision-cut liver slices. *Biochem Pharmacol* 64:633-43
- Ritter JK (2000) Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* 129:171-93
- Roberts RA, Ganey PE, Ju C, Kamendulis LM, Rusyn I, Klaunig JE (2007) Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Sci* 96:2-15
- Ropenga A, Chapel A, Vandamme M, Griffiths NM (2004) Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat. *Radiat Res* 161:597-602
- Rouas C, Souidi M, Grandcolas L, Grison S, Baudelin C, Gourmelon P, Pallardy M, Gueguen Y (2009) Acetaminophen induces xenobiotic-metabolizing enzymes in rat: Impact of a uranium chronic exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology* in press:
- Salonen L (1994) 238U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock. *IAHS* 222:
- Sanchez DJ, Belles M, Albina ML, Gomez M, Linares V, Domingo JL (2006) Exposure of pregnant rats to uranium and restraint stress: effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Toxicology* 228:323-32
- Saueia CH, Mazzilli BP (2006) Distribution of natural radionuclides in the production and use of phosphate fertilizers in Brazil. *J Environ Radioact* 89:229-39
- Selden AI, Lundholm C, Edlund B, Hogdahl C, Ek BM, Bergstrom BE, Ohlson CG (2009) Nephrotoxicity of uranium in drinking water from private drilled wells. *Environ Res* 109:486-94
- Selimoglu E (2007) Aminoglycoside-induced ototoxicity. *Curr Pharm Des* 13:119-26

Bibliographie

- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270:414-23
- Silan C, Uzun O, Comunoglu NU, Gokcen S, Bedirhan S, Cengiz M (2007) Gentamicin-induced nephrotoxicity in rats ameliorated and healing effects of resveratrol. *Biol Pharm Bull* 30:79-83
- Sinclair J, Jeffery E, Wrighton S, Kostrubsky V, Szakacs J, Wood S, Sinclair P (1998) Alcohol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity: role of CYP2E and CYP3A. *Biochem Pharmacol* 55:1557-65
- Soderland P, Lovekar S, Weiner DE, Brooks DR, Kaufman JS (2010) Chronic kidney disease associated with environmental toxins and exposures. *Adv Chronic Kidney Dis* 17:254-64
- Soudi M, Gueguen Y, Linard C, Dudoignon N, Grison S, Baudelin C, Marquette C, Gourmelon P *et al.* (2005) In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* 214:113-22
- Soudi M, Tissandie E, Racine R, Ben Soussan H, Rouas C, Grignard E, Dublineau I, Gourmelon P *et al.* (2009) [Uranium: properties and biological effects after internal contamination]. *Ann Biol Clin (Paris)* 67:23-38
- Squibb KS, McDiarmid MA (2006) Depleted uranium exposure and health effects in Gulf War veterans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:639-48
- Su T, Ding X (2004) Regulation of the cytochrome P450 2A genes. *Toxicol Appl Pharmacol* 199:285-94
- Sullivan MF (1980) Absorption of actinide elements from the gastrointestinal tract of rats, guinea pigs and dogs. *Health physics* 38:159-171
- Sullivan MF, Ruemmler PS, Ryan JL, 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
- Sumanovic-Glamuzina D, Saraga-Karacic V, Roncevic Z, Milanov A, Bozic T, Boranic M (2003) Incidence of major congenital malformations in a region of Bosnia and Herzegovina allegedly polluted with depleted uranium. *Croat Med J* 44:579-84
- Sundin DP, Sandoval R, Molitoris BA (2001) Gentamicin inhibits renal protein and phospholipid metabolism in rats: implications involving intracellular trafficking. *J Am Soc Nephrol* 12:114-23
- Swiergosz-Kowalewska R (2001) Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microsc Res Tech* 55:208-22

Bibliographie

- Swiergosz R, Zakrzewska M, Sawicka-Kapusta K, Bacia K, Janowska I (1998) Accumulation of cadmium in and its effect on bank vole tissues after chronic exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 41:130-6
- Sztajnkrzyca MD, Otten EJ (2004) Chemical and radiological toxicity of depleted uranium. *Mil Med* 169:212-6
- Hoentjens PA, Rooseboom M, Bijsterbosch MK, van Berkel TJ, Vermeulen NP, Commandeur JN (2002) Induction of glutathione-S-transferase mRNA levels by chemopreventive selenocysteine Se-conjugates. *Biochem Pharmacol* 63:1843-9
- Taulan M, Paquet F, Maubert C, Delissen O, Demaille J, Romey MC (2004) Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environ Health Perspect* 112:1628-35
- Taulan M, Paquet F, Argiles A, Demaille J, Romey MC (2006) Comprehensive analysis of the renal transcriptional response to acute uranyl nitrate exposure. *BMC Genomics* 7:2
- Taylor DM, Taylor SK (1997) Environmental uranium and human health. *Rev Environ Health* 12:147-57
- Thevenod F, Friedmann JM (1999) Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na⁺/K⁺-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *FASEB J* 13:1751-61
- Thiebault C, Carriere M, Milgram S, Simon A, Avoscan L, Gouget B (2007) Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicol Sci* 98:479-87
- Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Paquet F, Aigueperse J, Souidi M (2006) Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Arch Toxicol* 80:473-80
- Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, 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* 1770:266-72
- Tomasek L, Darby SC, Swerdlow AJ, Placek V, Kunz E (1993) Radon exposure and cancers other than lung cancer among uranium miners in West Bohemia. *Lancet* 341:919-23
- Tournier BB, Frelon S, Tournalias E, Agez L, Delissen O, Dublineau I, Paquet F, Petitot F (2009) Role of the olfactory receptor neurons in the direct transport of inhaled uranium to the rat brain. *Toxicol Lett* 190:66-73
- Tracy BL, Quinn JM, Lahey J, Gilman AP, Mancuso K, Yagminas AP, Villeneuve DC (1992) Absorption and retention of uranium from drinking water by rats and rabbits. *Health Phys* 62:65-73

Bibliographie

- Tran A, Treluyer JM, Rey E, Barbet J, Ferracci G, d'Athis P, Vincent J, Pons G (2001) Protective effect of stiripentol on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 170:145-52
- Trapp E, Renzetti AD, Jr., Kobayashi T, Mitchell MM, Bigler A (1970) Cardiopulmonary function in uranium miners. *Am Rev Respir Dis* 101:27-43
- Tugcu V, Ozbek E, Tasci AI, Kemahli E, Somay A, Bas M, Karaca C, Altug T *et al.* (2006) Selective nuclear factor kappa-B inhibitors, pyrrolidium dithiocarbamate and sulfasalazine, prevent the nephrotoxicity induced by gentamicin. *BJU Int* 98:680-6
- Tully DB, Collins BJ, Overstreet JD, Smith CS, Dinse GE, Mumtaz MM, Chapin RE (2000) Effects of arsenic, cadmium, chromium, and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 168:79-90
- Tymen H, Gerasimo P, 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, Cabrini RL (1991) Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ Res* 54:17-23
- Ubios AM, Piloni MJ, Marzorati M, Cabrini RL (1994) Bone growth is impaired by uranium intoxication. *Acta Odontol Latinoam* 8:3-8
- Ubios AM, Marzorati M, Cabrini RL (1997) Skin alterations induced by long-term exposure to uranium and their effect on permeability. *Health Phys* 72:713-5
- Vacquier B, Caer S, Rogel A, Feurprier M, Tirmarche M, Luccioni C, Quesne B, Acker A *et al.* (2008) Mortality risk in the French cohort of uranium miners: extended follow-up 1946-1999. *Occup Environ Med* 65:597-604
- Vernhet L, Seite MP, Allain N, Guillouzo A, Fardel O (2001) Arsenic induces expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) gene in primary rat and human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 298:234-9
- Verstrepen WA, Persy VP, Verhulst A, Dauwe S, De Broe ME (2001) Renal osteopontin protein and mRNA upregulation during acute nephrotoxicity in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 16:712-24
- Wang EJ, Snyder RD, Fielden MR, Smith RJ, Gu YZ (2008a) Validation of putative genomic biomarkers of nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 246:91-100
- Wang G, Fowler BA (2008) Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 233:92-9
- Wang H, LeCluyse EL (2003) Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes. *Clin Pharmacokinet* 42:1331-57

Bibliographie

- Wappelhorst O, Kuhn I, Heidenreich H, Markert B (2002) Transfer of selected elements from food into human milk. *Nutrition* 18:316-22
- WHO. (1992). "Cadmium " Environmental health criteria 134.
- WHO (2001). Depleted uranium: Sources, Exposure and Health Effects. Geneva.
- WHO. (2003). "Lead in drinking-water." Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.
- WHO. (2004a). "Uranium in Drinking-water." Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.
- WHO. (2004b). "Cadmium in Drinking-water." Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.
- Wolf G, Arndt D, Kotschy-Lang N, Obe G (2004) Chromosomal aberrations in uranium and coal miners. *Int J Radiat Biol* 80:147-53
- Wolf KK, Wood SG, Allard JL, Hunt JA, Gorman N, Walton-Strong BW, Szakacs JG, Duan SX *et al.* (2007) Role of CYP3A and CYP2E1 in alcohol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity: comparison of wild-type and Cyp2e1(-/-) mice. *Drug Metab Dispos* 35:1223-31
- Wrenn ME, Durbin PW, Howard B, Lipsztein J, Rundo J, Still ET, Willis DL (1985) Metabolism of ingested U and Ra. *Health Phys* 48:601-33
- Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Raucy JL, Molowa DT, Vandenbranden M (1990) Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III_{A5} (HLP3). *Mol Pharmacol* 38:207-13
- Xie Y, Nishi S, Iguchi S, Imai N, Sakatsume M, Saito A, Ikegame M, Iino N *et al.* (2001) Expression of osteopontin in gentamicin-induced acute tubular necrosis and its recovery process. *Kidney Int* 59:959-74
- Yu SY, Chung HC, Kim EJ, Kim SH, Lee I, Kim SG, Lee MG (2002) Effects of acute renal failure induced by uranyl nitrate on the pharmacokinetics of intravenous theophylline in rats: the role of CYP2E1 induction in 1,3-dimethyluric acid formation. *J Pharm Pharmacol* 54:1687-92
- Zaire R, Griffin CS, Simpson PJ, Papworth DG, Savage JR, Armstrong S, 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, Thiel E (1997) Unexpected rates of chromosomal instabilities and alterations of hormone levels in namibian uranium miners. *radiation research* 147:579-584
- Zamora ML, Tracy BL, Zielinski JM, Meyerhof DP, Moss MA (1998) Chronic ingestion

Bibliographie

- of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol Sci* 43:68-77
- Zamora ML, Zielinski JM, Moodie GB, Falcomer RA, Hunt WC, Capello K (2009) Uranium in drinking water: renal effects of long-term ingestion by an aboriginal community. *Arch Environ Occup Health* 64:228-41
- Zangar RC, Novak RF (1998) Posttranslational elevation of cytochrome P450 3A levels and activity by dimethyl sulfoxide. *Arch Biochem Biophys* 353:1-9
- Zhou H, Wu H, Liao C, Diao X, Zhen J, Chen L, Xue Q (2010) Toxicology mechanism of the persistent organic pollutants (POPs) in fish through AhR pathway. *Toxicol Mech Methods* 20:279-86
- Zhou J, Zhang J, Xie W (2005) Xenobiotic nuclear receptor-mediated regulation of UDP-glucuronosyl-transferases. *Curr Drug Metab* 6:289-98
- Zhou Y, Vaidya VS, Brown RP, Zhang J, Rosenzweig BA, Thompson KL, Miller TJ, Bonventre JV *et al.* (2008) Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium. *Toxicol Sci* 101:159-70
- Zhu G, Tan M, Li Y, Xiang X, Hu H, Zhao S (2009a) Accumulation and distribution of uranium in rats after implantation with depleted uranium fragments. *J Radiat Res (Tokyo)* 50:183-92
- Zhu G, Xiang X, Chen X, Wang L, Hu H, Weng S (2009b) Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats. *Arch Toxicol* 83:37-46
- Zierold K (2000) Heavy metal cytotoxicity studied by electron probe X-ray microanalysis of cultured rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 14:557-63
- Zimmerman HJ, Maddrey WC (1995) Acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instances of therapeutic misadventure. *Hepatology* 22:767-73

Bibliographie



Bibliographie

■ L'uranium (U) est un métal lourd naturellement présent dans la croûte terrestre. Le but de cette thèse est d'explorer, *in vivo* et *in vitro*, l'action de l'U sur les principaux protagonistes du système de détoxification de l'organisme : le rein et le foie avec notamment les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX). Dans le but de mimer une contamination chronique de l'organisme à une dose environnementale, le modèle *in vivo* est basé sur une exposition de 9 mois de rats males adultes à l'U (40 mg/L). *In vivo*, les résultats ont montré que nos conditions expérimentales n'induisent ni une néphrotoxicité ni une sensibilité du rein à exacerber une toxicité rénale induite par la gentamicine. Concernant le foie, l'U induit des modifications de l'expression génique de certains EMXs (dont particulièrement CYP3A). Ces modifications ne sont responsables de perturbations de la pharmacocinétique du paracétamol que lorsque ce dernier est administré à une dose hépatotoxique. Les résultats *in vitro* suggèrent que ces modifications des EMXs proviennent vraisemblablement d'un effet indirect de l'U couplé à des phénomènes d'adaptation de l'organisme impliquant des acteurs interagissant avec différentes cibles dont les EMX. Néanmoins, l'étude *in vitro* souligne le potentiel cytotoxique de l'U ainsi que sa présence dans les cellules (cytoplasme et noyau) sous forme soluble et/ou précipitée.

Mots clés : uranium appauvri, contamination interne, contamination chronique, faible dose, foie, rein, enzymes du métabolisme des xénobiotiques, paracétamol, gentamicine

■ Uranium (U) is a heavy metal naturally present in the environment. The aim of this work is to study the effects of a U exposure on organs involved in the detoxification: the kidney and the liver (and notably the xenobiotics metabolizing enzymes (XME)). In order to mimic population chronic exposure, rats were contaminated during 9 months through drinking water (40 mg/L). *In vivo* results show that U, in our experimental conditions, does not induce neither nephrotoxicity nor sensitivity to increase a renal toxicity induced by gentamicin. In the liver, U provokes impairments on the XME gene expression, particularly CYP3A. Nevertheless, paracetamol metabolism is modified only if it is administrated at a hepatotoxic dose. The *in vitro* results suggest an indirect effect of uranium on the XME, probably dependant of body adaptation mechanisms. Besides, *in vitro* studies underlined cytotoxic properties of U as well as the localisation of its soluble and/or precipitated forms in cytoplasmic and nuclear compartments.

Keywords: depleted uranium, internal contamination, chronic contamination, low dose, liver, kidney, xenobiotics metabolizing enzymes, acetaminophen, gentamicin

■ Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale
Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie, Direction de la Radioprotection de l'Homme
Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire

POLE : Pharmacologie-Toxicologie

UNIVERSITE PARIS XI
UFR « FACULTE DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHATENAY-MALABRY Cedex