

**UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE
AIX-MARSEILLE II
FACULTES DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**

**THESE DE DOCTORAT
Spécialité : ENVIRONNEMENT ET SANTE**

Présentée par
Carine DAROLLES

En vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université de la Méditerranée

**Discrimination des effets chimiotoxiques et
radiotoxiques de l'uranium: définition de marqueurs
biologiques pour l'évaluation des risques professionnels
dans l'industrie du nucléaire**

Thèse dirigée par le Docteur Michel DE MEO et le Docteur Fabrice PETITOT



Soutenue le 6 Mai 2010

Devant le jury composé de :
M. le Pr A. BOTTA (président)
M. le Pr P. GAUDUCHON (rapporteur)
Mme le Pr M. KIRSCH-VOLDERS (rapporteur)
M. le Dr B. AURIOL (examineur)
M. le Dr E. QUEMENEUR (examineur)
M. le Dr M. DE MEO (directeur de thèse)
M. le Dr F. PETITOT (tuteur de thèse)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'examiner ce travail :

Tout d'abord, les Professeurs **Micheline Kirsch-Volders** et **Pascal Gauduchon** qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs pour cette thèse ainsi que pour l'intérêt porté à ce travail et leur examen critique et pertinent.

Monsieur le Professeur **Alain Botta** qui a accepté de présider mon jury de thèse.

Messieurs les Docteurs **Eric Quémeneur** et **Bernard Auriol** d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse.

Mon directeur de thèse, Monsieur le Docteur **Michel De Méo** (Maître de Conférence à la Faculté de Pharmacie de Marseille), pour avoir accepté d'encadrer ce travail et de suivre sa progression au nom de l'Université de la Méditerranée. Sa bienveillance et sa sympathie ont toujours rendu nos discussions scientifiques très agréables et enrichissantes.

Enfin, Monsieur le Docteur **Fabrice Petitot**, tuteur IRSN, pour avoir initié ce travail, pour sa disponibilité, son encadrement, son soutien et sa confiance. Mais particulièrement pour avoir su me guider avec finesse et persévérance jusqu'à l'aboutissement de cette grande étape pour un jeune chercheur.

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

Les Docteurs **Patrick Gourmelon**, **Jocelyne Aigueperse**, **Philippe Voisin** et **Patrick Lalo** pour leur accueil à l'IRSN et plus particulièrement au sein du Service de RadioBiologie et d'Epidémiologie, ainsi qu'aux Drs **François Paquet** et **Isabelle Dublineau** pour m'avoir accueillie au Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale.

L'ensemble des personnes qui ont participé aux différents comités de thèse qui ont jalonné et rythmé ce travail : Mrs **Michel De Méo**, **Bernard Auriol**, **Alain Acker**, **Philippe Voisin**, **Fabrice Petitot**, **François Paquet** et Mmes **Laurence Roy** et **Isabelle Dublineau** pour leurs discussions constructives et passionnées.

Le groupe AREVA, co-financeur de mon travail de recherche et en particulier Mrs les Docteurs **Bernard Auriol**, **Alain Acker** et **Stephan Henry** ayant suivi avec intérêt l'avancement de mes travaux.

Les membres du service médical du travail du site du Tricastin et plus particulièrement Mme **Dominique Bernard** et ses collègues infirmières pour leur disponibilité, leur accueil très chaleureux et leur collaboration technique indispensable à l'aboutissement de cette thèse.

Un brin de physique est essentiel à l'aboutissement d'un tel projet scientifique. Merci aux Docteurs **David Broggio** et **Aurélien Desbree**, pour leurs précieux calculs de dose et leurs vulgarisations de théories obscures pour un biologiste.

Mesdames les Docteurs **Laurence Roy** et tout particulièrement **Sandrine Roch-Lefevre** pour leur accueil au sein du Laboratoire de Dosimétrie Biologique de l'IRSN et pour la mise en place et l'analyse des immunomarquages de γ -H2AX.

A l'ensemble des membres du **LRTOX** (anciens et actuels), pour leur soutien, leur aide et leur sympathie.

Plus particulièrement aux stagiaires du LRTOX (Céline, Estelle et Jonathan) avec qui j'ai passé des moments au laboratoire et à l'extérieur inoubliables. Merci pour votre aide précieuse et votre gentillesse. En espérant que vous avez eu autant de plaisir à travailler avec moi que moi avec vous !

Aux Docteurs **Sandrine Frelon** et **Benjamin Tournier** ainsi qu'**Olivia Delissen** pour l'aide apportée dans la réalisation des dosages ICPMS.

Une fois les expérimentations menées, les analyses effectuées et les résultats compilés... Il a encore fallu passer le tout à la moulinette statistique. Pour cela, tout un arsenal de tests statistiques a été déployé afin d'estimer si les mois de travail nécessaires à générer les jeux de données ont été fructueux. C'est donc à ce moment que le Docteur **Alexandre Feugier** est intervenu, prêt à réduire des centaines d'heures de comptage, de préparations d'échantillons, de réalisation d'analyses, de traitement des données... à un résultat unique : « chimiotox ou radiotox » ???

Delphine Lurmin « ma secrétaire préférée », merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta pugnacité à résoudre aux mieux les problèmes administratifs...

Elie Tournalias (ou Tournolias !) et **Fred Voyer** (compère de bureau), merci pour votre écoute réconfortante...Et oui, quand je commence, je ne m'arrête plus... Ne perdez pas votre joie de vivre !

J'adresse toute ma reconnaissance et mes remerciements à mon acolyte et collègue de bureau **Charline Mazzucco** pour tout ce qu'elle m'a apporté et pour tout ce qu'elle a supporté au cours de ma thèse qui n'aurait pas été ce qu'elle est sans elle. Merci beaucoup pour ta bonne humeur, ta capacité à positiver, tes délires, tes grandes discussions d'avenir et tes hystéries hippiques. Merci pour tous les bons moments et les fous rires que j'ai passé avec toi ! Reste comme tu es et n'écoutes que toi.

Merci à **Julie Briard**, **Bernadette Dhieux-Lestaevel**, **Philippe Lestaevel**, **Thierry Loiseau**, **Véronique Navarro**, **Chrytelle Ibanez** et **Claire Faure** pour leur bonne humeur ! Et surtout à **Sébastien Jacquinet** pour son petit humour décalé...

Enfin, à tous les **Fontenaisiens** croisés au détour d'un passage éclair à Pierrelatte.

Je remercie aussi ma famille et mes amis !

Et oui, je ne fais pas dans l'originalité pour ce dernier paragraphe. Il est dédié du fond du coeur à ceux qui me permettent, même durement, de garder les pieds sur terre et de la trouver belle.

Tous mes amis et tout ce qui, d'une manière plus générale, ont subi patiemment mes sautes d'humeur au cours de ces années de thèse, seront ici aujourd'hui j'espère enfin un peu récompensés : Delphine, Benoit, Cloclo, Poney, John, Julien, Vaness, Marjo, Moumou, Aline, Guigui... Merci pour votre soutien et pour m'avoir permis de me changer les idées lors de nos nombreux w.e de ouf ! C'est promis, d'ici quelques temps, mes week-ends leurs seront entièrement consacrés.

Bien évidemment le plus courageux de tous, ce fut incontestablement Damien, mais ce n'est pas pour rien que j'ai décidé de l'épouser ! Tu es la personne à qui j'adresse ma plus grande reconnaissance, pas seulement pour ton soutien de tous les jours, mais aussi pour ton amour, ton attention, ta compréhension et ton humour, en bref, d'être simplement toi et toujours là...

Théo, notre petit bout, a plus d'une fois ces derniers temps grimpé sur mes genoux pour tapoter avec moi sur le clavier de mon ordinateur, en espérant que je lui accorderais ainsi un peu plus d'attention. Merci mon bébé d'avoir accepté que ta maman y passe du temps, j'espère que tu comprendras à travers ces lignes l'importance que cela avait à mes yeux.

A mes parents et mon frère qui ont toujours été présents et su dire des mots fort réconfortants quand j'en avais besoin....Merci pour tout... C'est grâce à vous que j'ai trouvé la force de me dépasser et d'arriver jusque là.

VALORISATION

Publications

- **Darolles C**, Broggio D, Feugier A, Frelon S, Dublineau I, De Meo M, Petitot F. Different genotoxic profiles between depleted and enriched uranium. *Toxicol Lett.* 2010 Feb 15;192(3):337-48

- **Darolles C**, Broggio D, Feugier A, Tournier B, De Meo M, Petitot F. Discrimination of radiotoxic and chemotoxic effects of uranium with the micronucleus centromere assay (en cours de soumission)

Présentations orales

- **Darolles C**, De Meo M, Petitot F. Micronoyaux et ponts nucléoplasmiques: deux marqueurs de génotoxicité de l'uranium appauvri et de l'uranium enrichi. Congrès annuel de l'Ecole Doctorale "Sciences de l'Environnement" (EDSE). Parc du Pharo, Marseille (2009)

- **Darolles C**, Roch-Lefèvre S, Dublineau I, Petitot F. Discrimination of radiotoxic and chemotoxic effects of uranium on mouse embryo fibroblasts. *Radioprotection*- Vol. 43 - N° 5 (2008). 36ième congrès European Radiation Research Society, Tours

- Petitot F, **Darolles C**, Monleau M. Genotoxicity of Depleted Uranium: towards a discrimination of radiotoxic and chemotoxic effects. *Depleted Uranium Research: An Update*. Workshop at Instituto Superiore Di Sanità (2008), Rome

Poster

- **Darolles C**, Paquet F, Voisin P, Petitot F (2007), Discrimination of radiotoxic and chemotoxic effects of uranium: Definition of biological markers for occupational risk assessment in the nuclear industry. *Toxicol Lett* 172S: S1-S240-S166. 44ième congrès European Societies of Toxicology, Amsterdam

SOMMAIRE

<i>LISTE DES FIGURES.....</i>	<i>15</i>
<i>LISTE DES TABLEAUX.....</i>	<i>21</i>
<i>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</i>	<i>23</i>
<i>INTRODUCTION.....</i>	<i>25</i>
<i>ETAT DE L'ART SUR L'URANIUM.....</i>	<i>29</i>
<i>PARTIE A. L'URANIUM.....</i>	<i>31</i>
I. L'uranium : un radioélément naturellement présent dans l'environnement	33
1.1 La découverte de l'uranium	33
1.2 L'uranium dans l'environnement.....	34
1.2.1 Les familles radioactives naturelles.....	34
1.2.2 Carte d'identité de l'uranium	35
1.2.3 Les réactions de fission naturelle de l'uranium : exemple du réacteur naturel d'Oklo au Gabon.....	37
1.2.4 La dispersion de l'uranium dans l'environnement liée aux activités humaines	38
II. Les propriétés physico-chimiques de l'uranium	40
II.1 Les principales propriétés chimiques de l'uranium.....	40
II.2 Les principales propriétés physiques de l'uranium	42
II.2.1 L'uranium naturel.....	42
II.2.2 Particularités de l' ²³⁵ U : la fission nucléaire, ses applications et l'uranium enrichi en ²³⁵ U.....	43
II.2.3 L'uranium appauvri.....	44
III. Les utilisations de l'uranium par l'Homme.....	45
III.1 Les utilisations militaires.....	45
III.1.1 Bombe atomique	45
III.1.2 Obus perforants, blindages.....	46
III.2 Les utilisations non militaires	46
III.3 Le cycle du combustible nucléaire.....	47
III.3.1 L'extraction du minerai et la production du « yellow cake »	49
III.3.2 La conversion en UF ₆	50
III.3.3 L'enrichissement en ²³⁵ U.....	50
III.3.4 La conversion en UO ₂ enrichi et la fabrication du combustible.....	51
III.3.5 Le retraitement et le stockage	51
IV. L'uranium - Synthèse	53
<i>PARTIE B. EXPOSITION INTERNE À L'URANIUM.....</i>	<i>55</i>
I. Les risques liés à l'emploi de l'uranium dans l'industrie du nucléaire.....	58
1.1 Les voies d'atteinte de l'homme : distinction entre exposition externe et contamination	58
1.2 Les modes de contamination interne à l'uranium.....	59
1.2.1 Contamination par inhalation.....	60
1.2.2 Contamination par passage percutanée (blessure ou dépôt).....	61
1.2.3 Contamination par ingestion.....	63
II. Voies d'entrée, distribution, rétention et élimination de l'uranium chez l'Homme.....	64

II.1 Voies d'entrée de l'uranium dans l'organisme	64
II.2 Distribution de l'uranium	65
II.3 Rétention dans les organes	67
II.3.1 L'uranium et les os	67
II.3.2 L'uranium et les reins	68
II.3.3 L'uranium et le foie.....	68
II.3.4 L'uranium et les poumons.....	69
II.3.5 L'uranium et le système nerveux	69
II.3.6 L'uranium et le système reproducteur.....	70
II.4 Élimination de l'uranium	70
III. Les risques sanitaires liés à une exposition interne à l'uranium.....	71
III.1 Le risque radiologique : radiotoxicité de l'uranium.....	71
III.1.1 Interaction des rayonnements avec les milieux biologiques	72
III.1.2 Les effets radiotoxiques sur les tissus.....	73
III.2 Le risque chimique : chimiotoxicité de l'uranium.....	76
III.2.1 Interaction de l'uranium avec les tissus biologiques.....	77
III.2.1.c Interaction de l'uranium avec les protéines.....	78
III.2.2 Les effets chimiotoxiques sur les tissus	79
IV. La protection contre les risques sanitaires liés à une exposition interne à l'uranium	85
IV.1 La radioprotection	85
IV.2 La protection contre le risque chimique	87
V. La surveillance médicale des personnes exposées à un risque d'exposition interne à l'uranium.....	88
V.1 La surveillance du poste de travail (surveillance collective)	88
V.2 La surveillance toxicologique (surveillance individuelle).....	89
V.2.1 Biomarqueurs d'exposition	90
V.2.2 Biomarqueurs d'effets	92
V.3 Prise en charge du personnel en cas de contamination par l'uranium.....	93
VI. L'exposition interne à l'uranium - Synthèse	94
<i>PARTIE C. GÉNOTOXICITÉ DE L'URANIUM.....</i>	<i>95</i>
I. Les effets génotoxiques : généralités	97
I.1 Lésions de la molécule d'ADN	97
I.2 Les autres cibles cellulaires.....	99
II. Les lésions primaires de l'ADN induites par l'uranium	102
II.1 Les cassures simple brin (CSB).....	102
II.1.1 La contribution des effets chimiques de l'uranium.....	102
II.1.2 La contribution des effets radiologiques de l'uranium	103
II.2 Les cassures double brin (CDB).....	104
II.2.1 La contribution des effets chimiques de l'uranium.....	104
II.2.2 La contribution des effets radiologiques de l'uranium	105
II.3 Les bases modifiées.....	106
II.4 Les pontages ADN-protéines.....	107
II.4.2 La contribution des effets radiologiques de l'uranium	108
III. Les conséquences cellulaires des lésions de l'ADN induites par l'uranium	108
III.1 Les points de contrôle du cycle cellulaire.....	109
III.1.1 Les senseurs du dommage à l'ADN	111
III.1.2 Les médiateurs du dommage à l'ADN.....	112
III.1.3 Les transducteurs du dommage à l'ADN.....	112
III.1.4 Les effecteurs du dommage à l'ADN.....	114
III.2 Les arrêts de cycle	115
III.3 La réparation des lésions de l'ADN.....	116
III.3.1 Mécanismes de réparation des lésions touchant un brin de l'ADN.....	117
III.3.2 Mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN.....	120
III.4 L'instabilité génomique induite par l'uranium	124

III.4.1 Instabilité génomique : généralités	124
III.4.2 Instabilité génomique induite par l'uranium	125
III.5 La mort cellulaire induite par l'uranium	131
III.6 Les effets de voisinage des radiations ionisantes.....	131
III.6.1 Effet de voisinage (« effet bystander »).....	132
III.6.2 Réponse adaptative aux radiations ionisantes.....	136
III.7 Le potentiel effet carcinogène de l'uranium	137
IV. Génotoxicité de l'uranium - Synthèse	139
<i>PARTIE D. DIFFÉRENTES APPROCHES EN GÉNOTOXICOLOGIE.....</i>	<i>141</i>
I - Les biomarqueurs : Notions et concepts.....	143
1.1 Définition et rôle(s) biologique(s).....	143
1.2 Qualités requises.....	146
1.3 Biomarqueurs de génotoxicité	146
II. Les biomarqueurs de génotoxicité : intérêt pour la discrimination des effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'uranium.....	148
II.1 Le test des comètes	149
II.1.1 Principe du test des comètes et ses applications	149
II.1.2 Avantages et inconvénients	151
II.2 L'immunomarquage de l'histone γ -H2AX : une nouvelle technique de détection des CDBs.....	152
II.3 Le test des micronoyaux.....	154
II.3.1 Mécanisme de formation des micronoyaux.....	154
II.3.2 Principe du test de numération des micronoyaux et son application.....	157
II.3.3 Numération des micronoyaux associée à l'hybridation <i>in situ</i> de sondes pancentromériques	159
II.3.4 Mesure d'autres anomalies avec le test des micronoyaux: étude des ponts nucléoplasmiques et des cellules mononucléées avec un MN.....	163
II.3.5 Facteur de variation	165
II.3.6 Avantages et limites	168
II.3.7 Micronoyaux et polymorphisme génétique	168
III. Effets génotoxiques de l'uranium observés avec le test des comètes, l'immunomarquage de γ -H2AX et le test des MNx	169
IV - Différentes approches en génotoxicologie - Synthèse.....	171
<i>STRATÉGIE DE RECHERCHE.....</i>	<i>173</i>
<i>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</i>	<i>183</i>
I. Modèles expérimentaux	185
1.1 Fibroblastes embryonnaires de souris (lignée C3H10T1/2).....	185
1.1.1 Culture cellulaire	185
1.1.2 Préparation des solutions de contamination	186
1.1.3 Traitement des fibroblastes embryonnaires de souris (C3H10T1/2).....	187
1.2 Lymphocytes de rat.....	188
1.2.1 Préparation des solutions de contamination d'uranium	188
1.2.2 Contamination <i>in vivo</i> des rats par l'uranium.....	189
1.2.3 Culture des lymphocytes de rat	190
1.3 Lymphocytes humains	190
1.3.1 Prélèvements sanguins sur les donneurs sélectionnés	190
1.3.2 Mise en culture du sang total humain.....	191
1.3.3 Préparation des solutions de contamination	191
1.3.3 Contamination des lymphocytes	193
II. Test de cytotoxicité : évaluation de la mortalité cellulaire par coloration au Bleu Trypan.....	193
III. Étude des lésions primaires de l'ADN.....	194

III.1 Le test des comètes	194
III.1.1 Étude des lésions primaires de l'ADN	194
III.1.2 Mode opératoire (cf. Figure 65)	195
III.2 L'immunofluorescence : γ -H2AX	198
III.2.1 Étude des cassures double brin	198
III.2.2 Mode opératoire (cf. Figure 67)	198
IV. Évaluation du stress oxydant au niveau cellulaire	200
IV.1 Étude de la production d'espèces réactives de l'oxygène	200
IV.2 Mode opératoire	201
IV.2.1 Incubation avec le DCFH-DA	201
IV.2.2 Culture des fibroblastes sans incubation au DCFH-DA	201
IV.2.3 Analyse en cytométrie de flux	201
IV.2.4 Expression des résultats	201
V. Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR	202
V.1 Extraction d'ARN	202
V.2 Transcription inverse des ARN en ADNc	203
V.3 PCR en temps réel	203
V.3.1 PCR de vérification	203
V.3.2 Plaque PCR	204
VI. Les analyses du cycle cellulaire en cytométrie de flux	206
VI.1 L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux	206
VI.1.1 La préparation des échantillons	206
VI.1.2 Le marquage	206
VI.1.3 L'analyse et l'acquisition des données	207
VI.2 L'analyse en cytométrie de flux d'un pool de cellules par incorporation de BrdU lors d'un pulse après contamination par l'uranium	208
VI.2.1 Le principe de l'expérimentation	208
VI.2.2 Mode opératoire (cf. Figure 72)	208
VI.2.3 Analyse du cycle	210
VII. Test de numération des micronoyaux	210
VII.1 Le test de numération des micronoyaux (Cytokinesis Block Micronucleus assay CBMN assay)	211
VII.1.1 Rappel sur les cultures cellulaires	212
VII.1.2 Ajout de la cytochalasine B	214
VII.1.3 Choc hypotonique puis fixation des cellules	214
VII.1.4 Lecture des lames	215
VII.1.5 Expression des résultats	216
VII.2 Hybridation in situ de sondes pancentromériques	218
VII.2.1 Prétraitement des lames	219
VII.2.2 Dénaturation de l'ADN cible	219
VII.2.3 Hybridation	220
VII.2.4 Rinçage post-hybridation	220
VII.2.5 Coloration	220
VII.2.6 Lecture des lames	220
VII.2.7 Expression des résultats	221
VIII. Détermination de la dose reçue par les cellules	221
VIII.1 Dosage de l'uranium: Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS)	222
VIII.2.1 Préparation des solutions de milieux cellulaires	222
VIII.2.2 Préparation des solutions pour les culots cellulaires	223
VIII.2 Calcul Monte-Carlo de la dose induite par UE et UA pour des fibroblastes <i>in vitro</i>	223
VIII.2.1 Position du problème	223
VIII.2.2 Développement d'un code de calcul	223
IX. Traitement statistique des résultats	227
IX.1 Fibroblastes embryonnaires de souris	227
IX.1.1 Schéma factoriel	227
IX.1.2 Test des comètes	228
IX.1.3 Expression des gènes de réparation de l'ADN	229

IX.2 Lymphocytes de rat	229
IX.3 Lymphocytes humains.....	230
<i>RESULTATS / DISCUSSION.....</i>	<i>233</i>
<i>PARTIE A. ÉTUDE SUR LES FIBROBLASTES EMBRYONNAIRES DE SOURIS IN VITRO.....</i>	<i>237</i>
<i>RESULTATS.....</i>	<i>241</i>
I. Mortalité cellulaire des fibroblastes embryonnaires après exposition à l'uranium appauvri ou à l'uranium enrichi	241
I.1 Test de cytotoxicité	241
I.2 Évaluation de la population cellulaire en sub G0-G1	242
II. Etude des lésions primaires de l'ADN.....	242
II.1 Le test des comètes	242
II.1.1 Contrôle positif (10 µM H ₂ O ₂)	243
II.1.2 Contamination à l'uranium appauvri ou à l'uranium enrichi.....	243
II.2 Visualisation par immunofluorescence de l'histone γ-H2AX.....	246
II.2.1 Contrôles positifs	246
III. Étude du stress oxydant (formation d'espèces réactives de l'oxygène (EROs))	249
IV. Mécanismes de réparation des dommages à l'ADN entrant en jeu après contamination par différents mélanges isotopiques de l'uranium	250
V. Influence de l'uranium sur le cycle cellulaire.....	255
V.1 Etude des différentes phases du cycle cellulaire.....	256
V.2 Analyse en cytométrie de flux d'un pool de cellules par incorporation de BrdU lors d'un pulse après contamination à l'uranium.....	257
VI. Le test de numération des micronoyaux et hybridation <i>in situ</i> de sondes pancentromériques (FISH)	262
VI.1 Les cellules binucléées avec un micronoyau (BN-1MN).....	263
VI.2 Hybridation <i>in situ</i> fluorescente de sondes pancentromériques (FISH)	266
VI.3 Cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs)	268
VI.4 Cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx)	270
VII. Estimation des doses reçues par les cellules.....	272
VII.1 Quantité d'uranium dans les cellules	272
VII.2 Estimation des doses reçues par les cellules.....	272
VII.3 Corrélation de la dose reçue par les cellules avec les effets biologiques observés	275
<i>DISCUSSION.....</i>	<i>279</i>
I. Cytotoxicité de l'uranium.....	280
II. Anomalies cytogénétiques induites par l'uranium	280
II.1 Les cellules binucléées avec un micronoyau (BN-1MN)	281
II.2 Hybridation <i>in situ</i> de sondes pancentromériques	282
II.3 Les cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs)	284
II.4 Les cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx).....	285
III. Visualisation globale des lésions primaires de l'ADN.....	287
III.1 Induction de cassures double brin (CDBs) par l'uranium	290
III.2 Induction d'un stress oxydant par l'U	293
IV. Influence de l'uranium sur le cycle de division cellulaire.....	294

<i>PARTIE B. ÉTUDE SUR LES LYMPHOCYTES DE RAT IN VIVO</i>	301
<i>RESULTATS</i>	305
I. Lymphocytes binucléés avec des micronoyaux.....	305
II. Lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques.....	307
III. Lymphocytes mononucléés avec des micronoyaux.....	308
<i>DISCUSSION</i>	311
<i>PARTIE C. ÉTUDE SUR LES LYMPHOCYTES HUMAINS IN VITRO</i>	313
<i>RESULTATS</i>	317
I. Étude des anomalies cytogénétiques spontanées via le test CBMN.....	317
II. Étude des anomalies cytogénétiques après exposition aux témoins génotoxiques via le test CBMN319	
II.1 Fréquence des cellules binucléées avec des micronoyaux (BN-MNx).....	320
II.2 Contenu centromérique des cellules binucléées avec des MNx.....	320
II.3 Évaluation du nombre de signaux centromériques dans les MNx centromères-positifs.....	322
II.4 Cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs).....	323
II.5 Cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx).....	324
III. Étude des anomalies cytogénétiques après exposition à différents mélanges isotopiques de l'uranium via le test CBMN.....	325
III.1 Les cellules binucléées avec des micronoyaux après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U (BN-MNx).....	325
III.2 Hybridation <i>in situ</i> de sondes pancentromériques (FISH).....	328
III.2.1 Contenu centromérique (avec ou sans centromère).....	328
III.2.2 Nombre de signaux centromériques dans les micronoyaux centromères-positifs.....	332
III.3 Les cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques.....	334
III.4 Les cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx).....	336
<i>DISCUSSION</i>	339
I. Anomalies cytogénétiques spontanées.....	340
II. Anomalies cytogénétiques dans les témoins positifs (aneugènes et clastogènes).....	342
III. Anomalies cytogénétiques après exposition à différents mélanges isotopiques de l'uranium.....	343
III.1 Cellules binucléées avec des MNx.....	343
III.2 Contenu centromérique des micronoyaux.....	344
III.3 Autres anomalies cytogénétiques observées avec le test CBMN.....	348
III.3.1 Cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs).....	348
III.3.2 Cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx).....	351
<i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>	353
I. Synthèse des effets génotoxiques induits par l'uranium.....	355
I.1 Effets génotoxiques induits par l'uranium observés au cours de ces travaux.....	355
I.2 Perspectives d'études pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors d'une contamination à l'uranium.....	359
II. Le test CBMN bien adapté pour définir des marqueurs biologiques de contamination à l'uranium.....	361
II.1 Marqueurs de chimiotoxicité et de radiotoxicité de l'uranium définis lors de nos travaux.....	362

Sommaire

II.2 Proposition d'indicateurs de l'effet chimiotoxique ou radiotoxique de l'uranium.....	363
II.3 Perspectives de développement	364
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</i>	<i>367</i>
<i>GLOSSAIRE.....</i>	<i>391</i>
<i>ANNEXES.....</i>	<i>399</i>
<i>PUBLICATIONS.....</i>	<i>413</i>
<i>RESUME.....</i>	<i>453</i>
<i>ABSTRACT.....</i>	<i>455</i>

Liste des figures

Figure 1. Famille radioactive naturelle de l'uranium 235 (A), du Thorium 232 (B) et de l'uranium 238 (C)	35
Figure 2. Réserves mondiales prouvées d'uranium à la surface du globe (1999)	36
Figure 3. Gisement d'uranium d'Oklo au Gabon	37
Figure 4. Une des multitudes fissions nucléaires de l'uranium 235 induite par la capture d'un neutron	38
Figure 5. Répartition des centrales nucléaires en France et dans le monde (d'après Brunet R, Centrales nucléaires et uranium dans le monde, Mappemonde, 2000)	39
Figure 6. Carte des cibles d'armes à l'UA au Kosovo lors du conflit en ex-Yougoslavie en 1999 (d'après NATO, Balkan unit - UNEP, Geneva, 2000)	40
Figure 7. La radioactivité : désintégration d'un noyau instable s'accompagnant de l'émission de rayonnements et/ou de particules (Delacroix <i>et al.</i> , 2006).....	42
Figure 8. Principe de la fission	43
Figure 9. Photographie d'un obus (A) et esquisse d'un char de combat principal américain Abrams M1A2HA montrant l'emplacement du blindage de protection en UA (B).....	46
Figure 10. Photographie d'un voilier avec une quille en UA	47
Figure 11. Carte des sites nucléaires industriels français (<i>Source</i> : Observatoire de l'Energie)	48
Figure 12. Le cycle du combustible nucléaire (site du CEA, 2004).....	49
Figure 13. Le yellow cake (<i>Source</i> : AREVA)	50
Figure 14. Préparation des assemblages de combustibles	51
Figure 15. Le devenir du combustible	52
Figure 16. Irradiation externe et contamination interne	58
Figure 17. Le pouvoir de pénétration des rayonnements émis lors de la désintégration des radionucléides (CEA2)	59
Figure 18. Le modèle biocinétique d'inhalation par l'uranium	61
Figure 19. Le modèle biocinétique de plaie contaminée par des radionucléides (NCRP, 2007).....	63
Figure 20. Le modèle biocinétique d'ingestion par l'uranium (CIPR-100, 2006)	64
Figure 21. Le modèle biocinétique systémique de l'uranium chez l'homme adulte (CIPR-69, 1995)67	
Figure 22. Représentation schématique des ionisations générées sur la trajectoire des différents rayonnements dans une cible biologique	73
Figure 23. Présentation générale des biomarqueurs (d'après E. Quémeneur/CEA).....	90
Figure 24. Procédure de déshabillage d'une victime valide (à gauche) et invalide (à droite) (ASN 2008).....	93
Figure 25. Diversité des altérations de l'ADN (d'après Orsière <i>et al.</i> , 2005)	98
Figure 26. Divers devenirs d'une cellule exposée à un toxique	99

Figure 27. Les diverses cibles des agents génotoxiques (d'après Mateuca et al., 2006)	100
Figure 28. Mécanismes d'action des métaux (d'après Mateuca et al., 2006).....	101
Figure 29. Lésions de l'ADN (www-dsv.cea.fr).....	102
Figure 30. Relation entre lésions létales par cassure double brin (DSB) (axe de gauche) ou cassures double brin par lésion létale (axe de droite) et TEL dans les cellules V79 irradiées avec plusieurs types de rayonnements et un agent radiomimétique, le peroxyde d'hydrogène (d'après Fox et al., 1992)	106
Figure 31. Schéma d'oxydation de la guanine (Cadet et al., 2003).....	107
Figure 32. Le cycle cellulaire et les points de contrôle	110
Figure 33. Organisation générale de l'activation des points de contrôle et de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN.....	111
Figure 34. Organisation moléculaire des <i>checkpoints</i> de dommage à l'ADN au cours du cycle Cellulaire	112
Figure 35. Signalisation des cassures double-brins via les protéines ATM et ATR (tiré de Maurisse, 2003).....	114
Figure 36. Arrêt du cycle cellulaire en réponse aux lésions de l'ADN.....	115
Figure 37. Réparation par excision de nucléotides (Nucleotide Excision Repair ou NER)	118
Figure 38. Mécanismes d'excision de bases (BER, base-excision repair) (Hoeijmakers, 2001)	120
Figure 39. Mécanismes de recombinaison homologue (homologous recombinaison) et de religation non homologue (end joining) (Hoeijmakers, 2001)	123
Figure 40. Nature et formation des aberrations chromosomiques	124
Figure 41. Chronologie des effets biologiques déclenchés par l'exposition aux RI. Évolutions possibles au niveau cellulaire en fonction du temps	128
Figure 42. Schéma de l'effet de voisinage (« <i>effet bystander</i> »)	133
Figure 43. Représentation graphique des niveaux de réponses attendus en fonction du niveau d'exposition à un facteur de stress (d'après van der Oost et al., 2003).....	144
Figure 44. Différents niveaux de biomarqueurs (avec quelques exemples de biomarqueurs, d'après Perera et Weinstein, 2000)	145
Figure 45. Principaux tests de génotoxicité déclinés en tests mesurant les lésions primaires, les mutations géniques (mutagènes), les dommages chromosomiques (clastogènes) et les dommages génomiques (aneugènes) (d'après Orsière et al., 2005)	147
Figure 46. Principe du test des comètes	150
Figure 47. Différents niveaux de fragmentation de l'ADN observables par le test des comètes	151
Figure 48. Représentation de la phosphorylation de H2AX par ATM en réponse à une lésion double brin de l'ADN	153
Figure 49. Présence de γ -H2AX en foyers (immunofluorescence dans le noyau de fibroblastes après irradiation et immunomarquage par anticorps anti γ -H2AX couplé à un fluorochrome (FITC). 153	
Figure 50. Mécanisme de formation des micronoyaux au cours de la version « <i>cytokinesis-blocked micronucleus assay</i> » (d'après Iarmarcovai et al., 2007)	155
Figure 51. Les différents destins des cellules bloquées en cytodierèse suite à une exposition à des agents génotoxiques ainsi que les divers mécanismes induisant des MNx (ainsi que ponts nucléoplasmiques et bourgeons nucléaires) avec leurs éventuelles origines.....	156

Figure 52. Photographies d'une cellule binucléée avec un micronoyau (a) et d'une cellule binucléée avec trois micronoyaux (b) (d'après Fenech <i>et al.</i> , 2003)	158
Figure 53. Comment se forment les micronoyaux centromériques ? (d'après Iarmarcovai <i>et al.</i> , 2006)	159
Figure 54. Diversité des micronoyaux centromériques (d'après Iarmarcovai <i>et al.</i> , 2007)	160
Figure 55. Mécanismes de formation des MNC1+ (d'après Cimini et Degrossi, 2005)	161
Figure 56. Mécanismes de formation des MNCx+ (d'après D'Assoro <i>et al.</i> , 2002)	162
Figure 57. Photographies de cellules binucléées avec un pont nucléoplasmique (PNP)	163
Figure 58. Les défauts des gènes impliqués dans la réparation des gènes par recombinaison homologue (par exemple ATM, BRCA1, BRCA2 et RAD51) pourraient être détectés en utilisant le test CBMN	164
Figure 59. Facteurs de variation dans la biosurveillance au moyen du test des MN (d'après Iarmarcovai <i>et al.</i> , 2007)	166
Figure 60. Prolifération des fibroblastes de souris C3H/10T1/2	177
Figure 61. Présentation des 8 lots expérimentaux	178
Figure 62. Présentation des neuf lots expérimentaux	181
Figure 63. Neuf lots expérimentaux	192
Figure 64. Neuf lots expérimentaux avec activité spécifique en UA et en ²³³ U	193
Figure 65. Principe du test des comètes	195
Figure 66. Analyse des comètes avec le logiciel Komet 5.5	197
Figure 67. Mode opératoire de l'immunofluorescence de γ-H2AX	199
Figure 68. Principe du test de mesure de la 2',7'-dichlorofluoresceine	200
Figure 69. Mesure du stress oxydatif avec le test de mesure de la 2',7'-dichlorofluoresceine ..	200
Figure 70. Description du protocole de PCR en temps réel sur plaque	205
Figure 71. Cycle cellulaire analysé en cytométrie de flux	208
Figure 72. Principe de l'étude du cycle cellulaire	209
Figure 73. Étude du cycle cellulaire avec CellQuest Pro après marquage au BrdU	210
Figure 74. Protocole culture cellulaire des fibroblastes embryonnaires de souris (C3H10T1/2) en vue de la numération des MNx	212
Figure 75. Protocole de la numération des MNx après contamination <i>in vivo</i>	213
Figure 76. Protocole de numération des micronoyaux sur sang humain (exemple pour un donneur)	214
Figure 77. Hybridation <i>in situ</i> de sondes pancentromériques	218
Figure 78. Photographie de fibroblastes à confluence	224
Figure 79. Modélisation des fibroblastes	225
Figure 80. Construction d'un réseau de fibroblastes	226
Figure 81. Modèle mathématique dans lequel deux mélanges isotopiques d'U (UA et UE) sont	

combinés dans un schéma factoriel à 4 concentrations (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM)	227
Figure 82. Schéma factoriel défini pour discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'uranium	230
Figure 83. Conventions graphiques respectées dans ce manuscrit	235
Figure 84. Effet de l'uranium appauvri (UA : barres blanches) ou de l'uranium enrichi (UE : barres hachurées et grisées) (A) et de la Mitomycine C (contrôle positif clastogène : barre grise) ou de la Vincristine Sulfate (contrôle positif aneugène : barre noire) (B) sur la mortalité cellulaire (moyenne du pourcentage de fibroblastes morts \pm SD) après 24 heures d'exposition à l'aide d'une coloration au bleu Trypan	241
Figure 85. Effet de l'uranium appauvri (UA : barres blanches) ou de l'uranium enrichi (UE : barres hachurées et grisées) (A) et de la Mitomycine C (contrôle positif clastogène : barre grise) ou de la Vincristine Sulfate (contrôle positif aneugène : barre noire) (B) sur la mortalité cellulaire (sub G0-G1)	242
Figure 86. Noyaux des cellules traitées avec une solution d' H_2O_2 à 10 μM (A) ; Distribution des $\text{OTM}\chi^2$ après contamination de cellules avec une solution d' H_2O_2 à 10 μM (B).....	243
Figure 87. Différents niveaux de fragmentation de l'ADN observables par le test des comètes après contamination des cellules C3H/10T1/2 par l'uranium enrichi	244
Figure 88. Histogrammes des distributions de fréquences rangées par classes d'OTM (pas de variation 2 ua OTM) pour chaque concentration de contamination d'UA (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM)	244
Figure 89. Histogrammes des distributions de fréquences rangées par classes d'OTM (pas de variation 2 ua OTM) pour chaque concentration de contamination de UE (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM)	245
Figure 90. Observation microscopique (x60) d'une cellule C3H10T1/2 après contamination par la Mitomycine C et après marquage immunologique de l'histone H2AX phosphorylée (γ -H2AX)	246
Figure 91. Induction de cassures double brin dans les cellules C3H10T1/2 après exposition aux différentes concentrations d'UA ou d'UE (5 μM , 50 μM et 500 μM).....	247
Figure 92. Induction de cassures double brin dans les cellules C3H10T1/2 après contamination par l'uranium appauvri (UA : barres blanches) ou par l'uranium enrichi (UE : barres hachurées et grisées) après marquage immunologique de l'histone H2AX phosphorylée (γ -H2AX)	248
Figure 93. Production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) après exposition des fibroblastes embryonnaires de souris aux différentes concentrations (5 μM , 50 μM et 500 μM) d'uranium appauvri (UA : barres blanches) ou d'uranium enrichi (UE : barres hachurées et grisées)	250
Figure 94. Étude du cycle cellulaire après 24 heures de contamination des fibroblastes aux différentes concentrations d'UA ou d'UE (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM)	256
Figure 95. Exemple d'histogrammes de la quantité de BrdU en fonction de la quantité d'IP pour le contrôle non exposé et la contamination 500 μM d'UE après analyse en cytométrie de flux.....	258
Figure 96. Étude des différentes sous populations (A : R2, B : R4) cellulaires pour les différentes concentrations en uranium testées (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM UA (bleu) ou UE (rose)).....	259
Figure 97. Histogrammes représentant la quantité de BrdU en fonction de la quantité d'IP après analyse en cytométrie de flux	261
Figure 98. (A) Étude des sous populations cellulaires, R2 (A1) et R3 (A2), pour les différentes concentrations en uranium testées (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM). (B) Comparaison des cellules en phase S entre les deux conditions étudiées	262
Figure 99. Proportions de fibroblastes binucléés avec un micronoyau (BN-1MN) après exposition à différentes concentrations (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM) d'uranium appauvri (UA : barres blanches) ou d'uranium enrichi (UE : barres hachurées et grisées) (A) et de Mitomycine C (1,5 μM . contrôle positif clastogène : barre grise) ou de Vincristine Sulfate (16 μM . contrôle positif aneugène : barre noire) (B).....	264

Figure 100. Contenu centromérique des micronoyaux dans les fibroblastes embryonnaires de souris binucléés après exposition à différentes concentrations en uranium appauvri (UA) ou en uranium enrichi (UE) (A1 et B1) et à la Mitomycine C ou à la Vincristine Sulfate (A2 et B2)..	268
Figure 101. Proportion (moyenne ± écart type) de cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) contaminées avec différentes concentrations (0 µM, 5 µM, 50 µM et 500 µM) d'uranium appauvri (UA : barres blanches) ou d'uranium enrichi (UE : barres hachurées et grisées) (A) et de Mitomycine C (contrôle positif clastogène, 1,5 µM : barre grise) ou de Vincristine Sulfate (contrôle positif aneugène, 16 µM : barre noire) (B).....	270
Figure 102. Pourcentage (moyenne ± écart type) de cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx) contaminées avec différentes concentrations (0 µM, 5 µM, 50 µM et 500 µM) d'uranium appauvri (UA : barres blanches) ou d'uranium enrichi (UE : barres hachurées et grisées) (A) et de Mitomycine C (contrôle positif clastogène : barre grise) ou de Vincristine Sulfate (contrôle positif aneugène : barre noire) (B)	271
Figure 103. Distribution de l'énergie d'un impact unique délivrée à la cellule par l'uranium inter-cellulaire, UA (barres) et UE (point)	273
Figure 104. Relation dose-réponse des cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmique (A) et des cellules binucléées avec un micronoyau centromère-négatif (B)	276
Figure 105. Résultats (moyenne ± écart type) du test de numération des micronoyaux sur lymphocytes de rats	306
Figure 106. Pourcentage (moyenne ± écart type) de cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs)	307
Figure 107. Pourcentage (moyenne ± écart type) de cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx)	308
Figure 108. Résultats (moyenne ± écart type) du test de numération des micronoyaux	320
Figure 109. Contenu centromérique des micronoyaux dans les lymphocytes binucléés après exposition aux contrôles génotoxiques (Mitomycine C : barre grise et Vincristine Sulfate : barre noire) ainsi que dans le contrôle (barre à points noirs)	321
Figure 110. Proportion de cellules BN-MNC+ et BN-MNC- après exposition à la Mitomycine C et à la Vincristine Sulfate ainsi que dans le contrôle	322
Figure 111. Nombre de signaux centromériques des les micronoyaux centromères-positifs après exposition aux contrôles génotoxiques (Mitomycine C : barre grise et Vincristine Sulfate : barre noire) ainsi que dans le contrôle (barre à points noirs)	323
Figure 112. Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) après exposition aux contrôles génotoxiques (Mitomycine C : barre grise et Vincristine Sulfate : barre noire) ainsi que dans le contrôle (barre à points noirs)..	324
Figure 113. Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes mononucléés avec des micronoyaux (Mono-MNx) après exposition aux contrôles génotoxiques (Mitomycine C : barre grise et Vincristine Sulfate : barre noire) ainsi que dans le contrôle (barre à points noirs)	325
Figure 114. Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux (BN-MNx) après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U (9 conditions expérimentales) ainsi que dans le contrôle	326
Figure 115. (A) Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux (BN-MNx) en fonction des différentes concentrations molaires testées (C1, C2 et C3) pour les 10 donneurs. (B) Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux (BN-MNx) en fonction des différentes activités volumiques testées (A1, A2 et A3) pour les 10 donneurs.....	327
Figure 116. Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-positifs (BN-MNC+) après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U (9 conditions expérimentales) ainsi que dans le contrôle	328

Figure 117. Pourcentage (moyenne \pm écart type) de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-négatifs (BN-MNC-) après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U (9 conditions expérimentales) ainsi que dans le contrôle	329
Figure 118. Proportion de lymphocytes BN-MNC+ et BN-MNC- après exposition aux différents mélanges isotopiques de l'U ainsi que dans le contrôle	330
Figure 119. Contenu centromérique des micronoyaux dans les lymphocytes binucléés après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U en fonction des différentes concentrations testées pour les cellules BN-MNC+ (A) et en fonction des différentes activités testées pour les cellules BN-MNC- (B)	331
Figure 120. Pourcentage (moyenne \pm écart type) de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-positifs avec un (BN-MNC1+) ou plusieurs (BN-MNCx+) signaux centromériques après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U (9 conditions expérimentales) ainsi que dans le contrôle	332
Figure 121. Pourcentage (moyenne \pm écart type) de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-positifs avec un (BN-MNC1+) ou plusieurs (BN-MNCx+) signaux centromériques après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U en fonction des différentes concentrations testées pour les cellules BN-MNC1+ (A) et les cellules BN-MNCx+ (B).....	333
Figure 122. Pourcentage (moyenne \pm écart type) de lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U (9 conditions expérimentales) ainsi que dans le contrôle	335
Figure 123. Pourcentage (moyenne \pm écart type) de lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) en fonction des différentes activités testées	335
Figure 124. Pourcentage (moyenne \pm écart type) de lymphocytes mononucléés avec des micronoyaux (Mono-MNx) après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U (9 conditions expérimentales) ainsi que dans le contrôle	336
Figure 125. Pourcentage (moyenne \pm écart type) de cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx) en fonction des concentrations testées.....	337
Figure 126. Schéma synthétisant les dommages induits par l'U visualisés lors de nos études.....	358

Liste des tableaux

<u>Tableau 1.</u> Caractéristiques des différents isotopes de l'Uranium Naturel	36
<u>Tableau 2.</u> Composition isotopique en masse et en activité de l'UN, de l'UA à 0,2 % en ²³⁵ U et de l'UE à 12 % en ²³⁵ U.....	44
<u>Tableau 3.</u> Activités spécifiques de l'UN et de l'UA.....	45
<u>Tableau 4.</u> Les principaux composés de l'uranium rencontrés dans le cycle du combustible nucléaire (d'après <i>Ansoborlo et al., 2002</i>)	53
<u>Tableau 5.</u> Classement de la transférabilité des principaux composés de l'U rencontrés dans l'industrie électronucléaire (<i>CIPR -66 1994 ; Le Guen et al., 1998</i>)	65
<u>Tableau 6.</u> Types de lésions spontanées observées en 24 h ou induites après une irradiation de 1 Gy par des radiations à faible transfert linéique d'énergie (radiations γ) (d'après <i>Calmet et al., 2003</i>)	103
<u>Tableau 7.</u> Synthèse des effets génotoxiques de l'U <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	129
<u>Tableau 8.</u> Synthèse des effets génotoxiques de l'U observés avec le test des comètes, le test des MNx et l'immunomarquage de γ -H2AX.....	170
<u>Tableau 9.</u> Composition isotopique et activité spécifique (Bq/g) de l'uranium appauvri en ²³⁵ U à 0,3 %, de l'uranium naturel et de l'uranium enrichi en ²³⁵ U à 12 %.....	187
<u>Tableau 10.</u> Valeurs de pH mesurées au pH-mètre des solutions d'uranium appauvri et enrichi ...	189
<u>Tableau 11.</u> Masses incorporées, activités spécifiques et activités incorporées des mélanges isotopiques d'uranium injectés dans chaque rat contaminé	189
<u>Tableau 12.</u> Oligonucléotides utilisés lors de la PCR de vérification.....	204
<u>Tableau 13.</u> Tableau de synthèse des études réalisées sur les fibroblastes embryonnaires de Souris.....	239
<u>Tableau 14.</u> Variations de l'expression génique des cellules contaminées avec 500 μ M UA ou 500 μ M UE classées selon les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN	253
<u>Tableau 15.</u> CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation Index) chez des fibroblastes traités par de l'uranium appauvri (UA) ou enrichi (UE)	265
<u>Tableau 16.</u> Résultats de la mesure de l'uranium dans les cellules	272
<u>Tableau 17.</u> Résultats des doses reçues par les cellules selon le calcul microdosimétrique (μ Gy)..	274
<u>Tableau 18.</u> Tableau de synthèse des résultats obtenus sur les fibroblastes embryonnaires de souris <i>in vitro</i>	277
<u>Tableau 19.</u> Synthèse du ratio PNP/MN sur les fibroblastes embryonnaires de souris (C3H10T1/2) contaminés avec l'UA ou l'UE	285
<u>Tableau 20.</u> Tableau de synthèse des études réalisées sur les lymphocytes de rat (<i>in vivo</i>)	303
<u>Tableau 21.</u> CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation Index)	307
<u>Tableau 22.</u> Tableau de synthèse des résultats obtenus sur les lymphocytes de rats <i>in vivo</i>	309
<u>Tableau 23.</u> Tableau de synthèse des études réalisées sur les lymphocytes humains <i>in vitro</i>	315
<u>Tableau 24.</u> Nombre total moyen spontané des anomalies cytogénétiques observées avec le test de numération des micronoyaux pour chacun des 10 donneurs étudiés	319
<u>Tableau 25.</u> Tableau de synthèse des résultats obtenus sur les lymphocytes humains <i>in vitro</i>	338
<u>Tableau 26.</u> Tableau synthétique de diverses études bibliographiques sur le test CBMN avec marquage centromérique	341
<u>Tableau 27.</u> Synthèse du marquage centromérique sur les lymphocytes humains contaminés avec différents mélanges isotopiques de l'U	346

Tableau 28. Synthèse du marquage centromérique sur les fibroblastes de souris et sur les lymphocytes humains contaminés avec différents mélanges isotopiques de l'U 347

Tableau 29. Synthèse bibliographique de données sur la numération de ponts nucléoplasmiques (PNP) 350

Tableau 30. Bornes des indicateurs utilisables pour définir une toxicité chimique ou une toxicité radiologique de l'U 364

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ATM	Ataxia Relangiectasia Mutated pour Ataxie Télangiectasie Mutée
ATR	Ataxia Telangiectasia mutated Related protein pour protéine apparentée à la protéine Ataxie Télangiectasie Mutée
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BER	Base Excision Repair pour réparation par excision de base
BET	Bromure d'Ethidium
BN-1MN	cellule binucléée avec un micronoyau
BN-MNx	cellule binucléée avec des micronoyaux
BN-PNP(s)	cellule binucléée avec des ponts nucléoplasmiques
BrdU	5-bromodésoxyuridine
BSA	bovine serum albumin pour albumine sérique de bovin
Cd	Cadmium
CBMN	Cytokinesis Block Micronucleus assay pour le test des micronoyaux avec blocage en cytotérièse
CBPI	Cytokinesis-Block Proliferation Index
CDB	cassures double brins
Chk	Check point kinase
CHO	Chinese Hamster Ovary pour ovaire de hamster chinois
CIPR	Commission Internationale de Protection Radiologique
CREST	Micronuclei assay using antikinetochore antibodies
CSB	cassures simple brins
Ct	Cycle seuil
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DMSO	dimethylsulfoxyde
DO	densité optique
EBR	Effet Biologique Relatif
ECVAM	European Center for the Validation of Alternative Methods
EDTA	acide éthylène-diamine-tétracétique
EROs	espèces réactives de l'oxygènes
eV	électronvolt
FISH	Fluorescent In Situ Hybridisation pour Hybridation fluorescente in situ
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
Hg	Mercure
Gy	Gray

Liste des abréviations

γ-H2AX	forme phosphorylée de l'histone H2AX
HUMN	Human MicroNucleus
ICP-MS	<i>Inductive Coupled Plasma - Mass Spectroscopy</i> (plasma à couplage inductif associé à un spectromètre de masse)
IP	Iodure de Propidium
IRSN	Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
KPA	Kinetic phosphorescence analysis
LRTOX	Laboratoire de Radiotoxicologie expérimentale
LEDI	Laboratoire d'Évaluation de la Dose Interne
MMR	Mismatch Repair
MN	micronoyau
Mono-MNx	cellule mononucléée avec des micronoyaux
MRN	complexe Mre11/Rad50/Nbs1
NER	Nucleotide Excision Repair (réparation par excision de nucléotides)
NHEJ	non-homologous end joining
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i> (OCDE : organisation pour la coopération et le développement économique)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTM	Olive tail moment
Pb	Plomb
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PARP	poly-(ADP ribose) polymérase
RH	Recombinaison homologue
RI	Rayonnements ionisants
RT-PCR	Reverse transcription - polymerase chain reaction
Sv	Sievert
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis pour le test des comètes
SFTG	Société Française de Toxicologie Génétique
TEL	transfert d'énergie linéique
TGF-β1	Tumoral growth factor β1 pour facteur de croissance tumoral β1
TM	Tail moment
U	Uranium
ua	unité arbitraire
UA	Uranium Appauvri
UE	Uranium Enrichi
UV	Ultra Violet
WHO	<i>World Health Organization</i> (OMS : organisation mondiale pour la santé)

INTRODUCTION

L'uranium (U), métal lourd naturellement radioactif (émetteur de rayonnements α), est utilisé dans l'industrie nucléaire, l'armement militaire et pour des applications civiles spécifiques. L'U représente une source de contamination potentielle pour les travailleurs au cours des différentes étapes du cycle du combustible; où différentes compositions isotopiques d'U sont présentes (uranium naturel, appauvri et enrichi). L'uranium est classé comme appauvri (UA) ou enrichi (UE) en fonction du pourcentage en ^{235}U présent dans le mélange isotopique considéré. La toxicité de l'U résulte de la combinaison de ses propriétés chimiques, en tant que métal lourd, et de ses propriétés radiologiques en tant qu'émetteur de rayonnements ionisants (α).

En raison de la double toxicité de l'U, l'évaluation des risques cancérigènes et, plus généralement, l'évaluation des risques sur la santé est complexe. Dans le cas particulier des travailleurs manipulant l'U, la limite réglementaire d'exposition prend en compte la toxicité radiologique de l'U caractérisée par l'émission de rayonnements ionisants, alors que peu d'attention est accordée à sa toxicité chimique liée à sa qualité de métal lourd. Un travailleur, exposé de façon répétée à l'U durant sa carrière, peut donc avoir un bilan dosimétrique en deçà de la limite réglementaire d'exposition présentant un risque pour sa santé, mais rien ne lui garantit une absence de risque lié à un effet chimiotoxique de l'U. Des marqueurs des effets biologiques de la contamination interne par l'U pourraient être utiles afin de définir la proportion d'effets toxiques dus aux propriétés radiologiques ou aux propriétés chimiques de l'U. Bien que les biomarqueurs d'exposition permettent d'estimer un risque moyen pour la santé d'un individu ayant subi une contamination interne, ils ne prennent pas en compte la variabilité inter-individuelle de réponse de l'organisme aux toxiques. Ainsi, certains individus seront plus sensibles et d'autres plus résistants que la population moyenne à l'apparition des effets toxiques de l'U. Ce sont les biomarqueurs d'effets qui vont en rendre compte. Le but des biomarqueurs d'effets est d'estimer les dysfonctionnements physiologiques des organes (avec marqueurs plasmatiques ou urinaires) causés par l'incorporation de radionucléide. Le niveau d'atteinte de la molécule d'ADN par l'U pourrait, lui, être quantifié sur les lymphocytes circulants de personnes exposées à l'aide de marqueurs de génotoxicité. En effet, les marqueurs des effets biologiques d'une contamination interne par l'U, tels que les marqueurs de génotoxicité, pourraient être efficaces pour préciser les proportions d'effets toxiques dues soit aux propriétés radiologiques, soit aux propriétés chimiques de l'U.

C'est dans cette étude que se place le sujet de thèse dont l'objectif est d'évaluer le profil génotoxique de l'U (clastogène / aneugène) en fonction de l'enrichissement en ^{235}U dans le but de définir des marqueurs biologiques (génotoxiques) permettant de discriminer les effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'U. Actuellement, de nombreuses études s'intéressent à la détermination de marqueurs biologiques lors d'irradiations externes, alors que peu de données existent lors de contamination interne. Les analyses cytogénétiques des chromosomes dicentriques et des translocations sont les techniques de référence en dosimétrie biologique lors d'irradiation externe. Cependant l'utilisation de ces techniques, pour des études de biosurveillance ou de groupes relativement importants de travailleurs exposés aux radiations, est difficile car elle demande beaucoup de temps et nécessite un personnel hautement qualifié. Nous avons par conséquent recherché des techniques différentes, assez facilement réalisables, qui nous permettent de définir des marqueurs biologiques de l'U discriminant ses effets chimiotoxiques et radiotoxiques. L'identification de marqueurs biologiques qui discriminent pour un composé uranifère donné la toxicité chimique et la toxicité radiologique, évitera la sous-estimation des effets sur la santé de mélanges isotopiques ayant une faible activité spécifique et donc un faible impact en termes de doses tels que l'UA en ^{235}U .

Le présent manuscrit s'articule en cinq chapitres : état de l'art sur l'U, stratégie de recherche, matériels et méthodes, résultats/discussion et enfin une discussion générale avec les perspectives de ce travail.

Dans le chapitre bibliographique, un « état de l'art » concernant l'U est développé. Son histoire, sa présence dans l'environnement, ses propriétés physico-chimiques ainsi que ses diverses utilisations par l'Homme (militaires, civiles et nucléaires) sont ainsi successivement abordées. Une seconde partie est dédiée à l'exposition interne par l'U. Les différents modes de contamination interne à l'U, sa biocinétique, son devenir dans l'organisme, sa toxicité à l'échelle des différents tissus et organes, ainsi que la protection et la surveillance médicale des travailleurs sont ainsi successivement traités. Une troisième partie est consacrée à la génotoxicité de l'U. Dans cette partie, les diverses lésions primaires de l'ADN induites par l'U sont étudiées ainsi que les conséquences biologiques de ses diverses lésions (telles que les arrêts du cycle cellulaire, les réparations des lésions de l'ADN, l'instabilité génomique, la mort cellulaire, etc.). Enfin une dernière partie bibliographique est consacrée aux différentes approches utilisées en génotoxicologie. Les diverses pistes de recherche de biomarqueurs mises en œuvre lors de

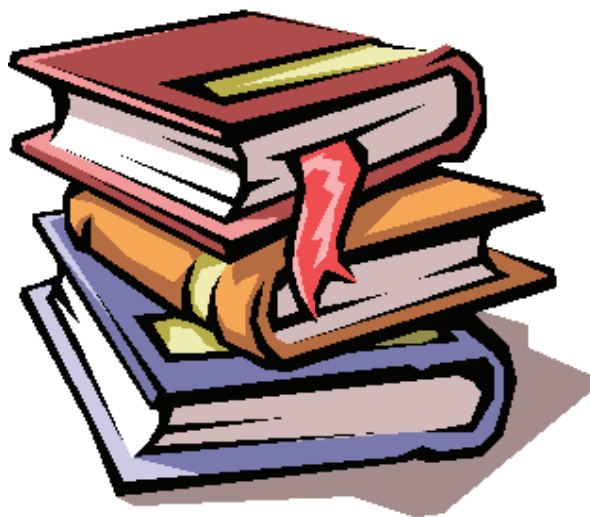
notre étude seront ainsi détaillées en décrivant leurs applications dans le domaine général de la génotoxicologie ainsi que ce qui est actuellement connu pour l'U.

Après avoir fait la synthèse des connaissances nécessaires au travail effectué au cours de cette thèse, nous détaillerons la stratégie expérimentale mise en place pour définir des marqueurs biologiques de contamination interne par l'U. Le matériel et les méthodes utilisés au cours de nos travaux seront ensuite détaillés.

Le chapitre "Résultats" et "Discussion" est ensuite exposé. Ce dernier est divisé en trois parties décrivant et discutant les divers résultats obtenus séparément pour chacun des trois types cellulaires étudiés (fibroblastes embryonnaires de souris, lymphocytes de rat et lymphocytes humains).

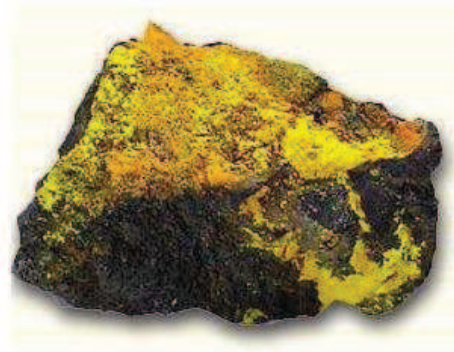
Enfin le dernier chapitre consacré au bilan de ces travaux ouvre une discussion/conclusion générale sur l'ensemble des résultats ainsi que la présentation des perspectives d'études sur lesquelles ces travaux seraient susceptibles de déboucher.

ETAT DE L'ART SUR L'URANIUM



Partie A.

L'uranium



L'uranium (U) est aujourd'hui au cœur de nombreux développements scientifiques et technologiques réalisés dans le cadre de l'utilisation civile de l'énergie nucléaire de fission, mais aussi des débats sur le nucléaire présent ou futur et sur son utilisation à des fins militaires. Il n'est donc pas surprenant que l'U ait donné, et donne encore, matière à de nombreuses recherches.

Au cours de ce premier chapitre, plusieurs points seront abordés. Tout d'abord seront développées les dates clé liées à l'histoire de l'U, qui est un radioélément naturellement présent dans l'environnement. Les propriétés physico-chimiques de l'U seront ensuite exposées. Enfin les diverses utilisations de l'U par l'Homme (militaires, civiles et nucléaires) seront détaillées.

I. L'uranium : un radioélément naturellement présent dans l'environnement

I.1 La découverte de l'uranium

L'U est mis en évidence en 1789 par le chimiste prussien Martin Heinrich Klaproth qui examine un morceau de roche qu'on lui a apporté de Saint Joachchimsthal. Cette roche est de la pechblende (UO_2), un minerai d'U. Klaproth donna le nom d'« urane » ou « uranite » au composé qu'il venait d'identifier, en référence à la découverte de la planète Uranus faite par William Herschel 8 ans plus tôt (1781). Ce n'est qu'en 1841 que le chimiste français Eugène-Melchior Péligot établit que l'urane était composé de deux atomes d'oxygène et d'un atome de métal qu'il isola et nomma uranium. Il estima alors la masse volumique de l'U à 19 g/cm^3 .

Tout d'abord utilisé pour la coloration du verre et des porcelaines, l'industrie de l'U connu par la suite un essor considérable. Les travaux menés par Henri Becquerel sur le comportement et les propriétés phosphorescentes de certains métaux, dont les sels d'U, marquèrent le passage à l'ère de la science atomique. Henri Becquerel découvrit en effet en 1896 que les sels d'U étaient capables de produire un rayonnement aussi pénétrant que les rayons X et susceptible d'impressionner une plaque photographique : la radioactivité est née. Le grand progrès dans l'ère atomique fut cependant déclenché par les physiciens français Pierre et Marie Curie. Cette dernière, dont le sujet de thèse reposait sur la mesure précise des rayonnements émis par l'U, confirma tout d'abord la découverte de Becquerel, puis constata que certains minerais émettaient un rayonnement beaucoup plus intense que celui qui pouvait en être déduit à partir de leur teneur en U. A ce stade de recherche, la radioactivité apparaissait comme une propriété atomique.

Puis, vint la découverte en 1934 de la radioactivité artificielle par Irène et Frédéric Joliot-Curie, ce qui conduisit à l'accomplissement d'un immense pas en avant vers l'utilisation et le contrôle de l'énergie nucléaire. En 1938, les physiciens allemands Otto Hahn et Fritz Strassmann commencèrent à percevoir les possibilités de l'énergie nucléaire et analysèrent les propriétés de fission de certains noyaux d'U. Les recherches les plus importantes sur cet élément débutèrent alors.

L'U devient alors l'un des éléments les plus importants pour toute l'activité humaine, avec les développements de ses applications militaires tout d'abord (destruction de Hiroshima par une bombe atomique constituée de ^{235}U), puis ensuite, après la Seconde Guerre mondiale, et civiles avec la production d'énergie électrique. Ce sont des applications qui ont été le "moteur" du progrès dans les connaissances des propriétés physiques (propriétés nucléaires en particulier) et chimiques de cet élément.

1.2 L'uranium dans l'environnement

1.2.1 Les familles radioactives naturelles

Lors de la création de l'Univers, des nucléides stables et instables se sont formés. Depuis, les radionucléides de courte ou moyenne période radioactive ont peu à peu disparu, laissant place à des éléments stables. Ceux de très longue période radioactive, c'est-à-dire proche ou supérieure au milliard d'années, ont pu par contre traverser les 4,5 milliards d'années qui nous séparent de la naissance de notre planète.

La Terre contient une vingtaine de radionucléides primordiaux. La plupart, comme le potassium 40 ou le rubidium 87, se désintègrent directement en un élément stable. Trois d'entre eux, l'uranium 235 (^{235}U avec une période de 704 millions d'années), le thorium 232 (^{232}Th avec une période de 14 milliards d'années) et l'uranium 238 (^{238}U avec une période de 4,5 milliards d'années), conduisent par décroissances radioactives successives à une dizaine de radionucléides puis à un isotope stable du plomb (cf. Figure 1 A, 1 B et 1 C). Ils forment les 3 grandes familles radioactives naturelles, constituées du précurseur et de ses produits de filiation.

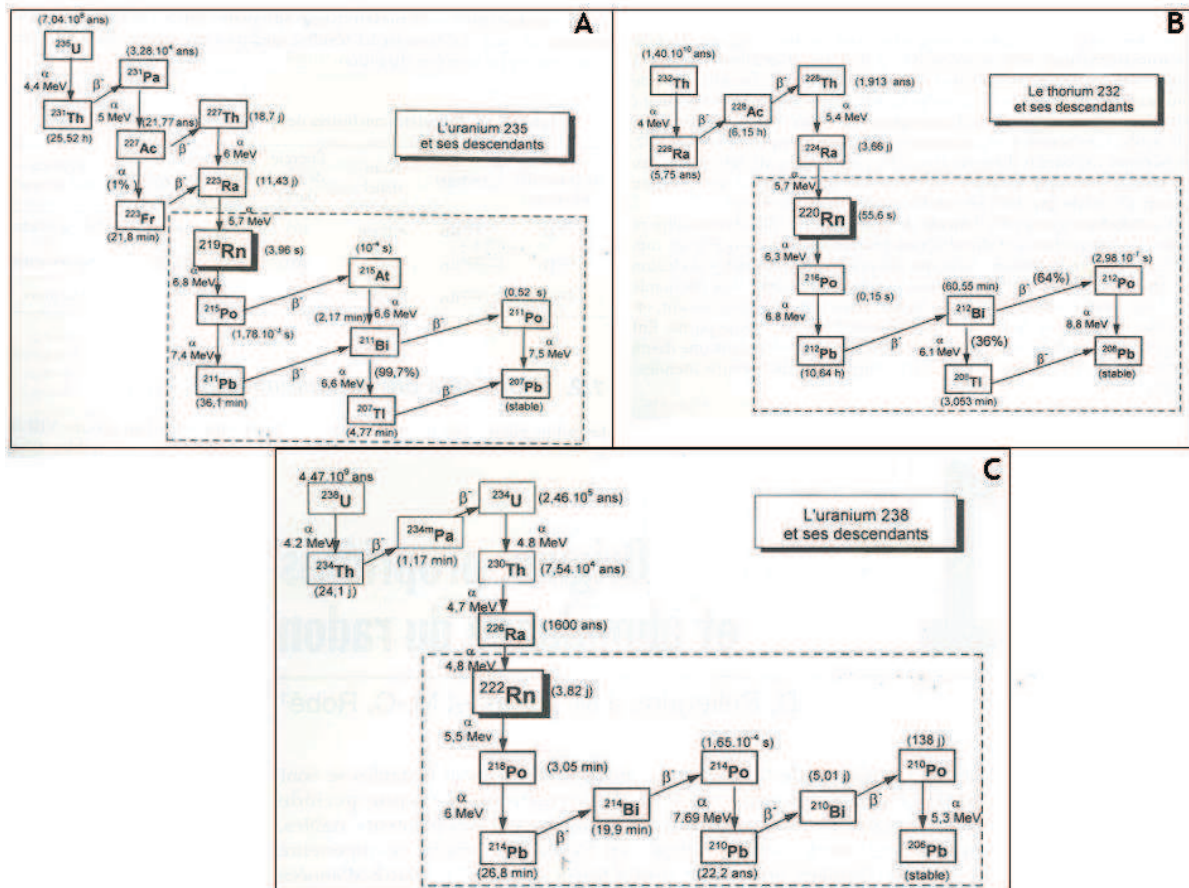
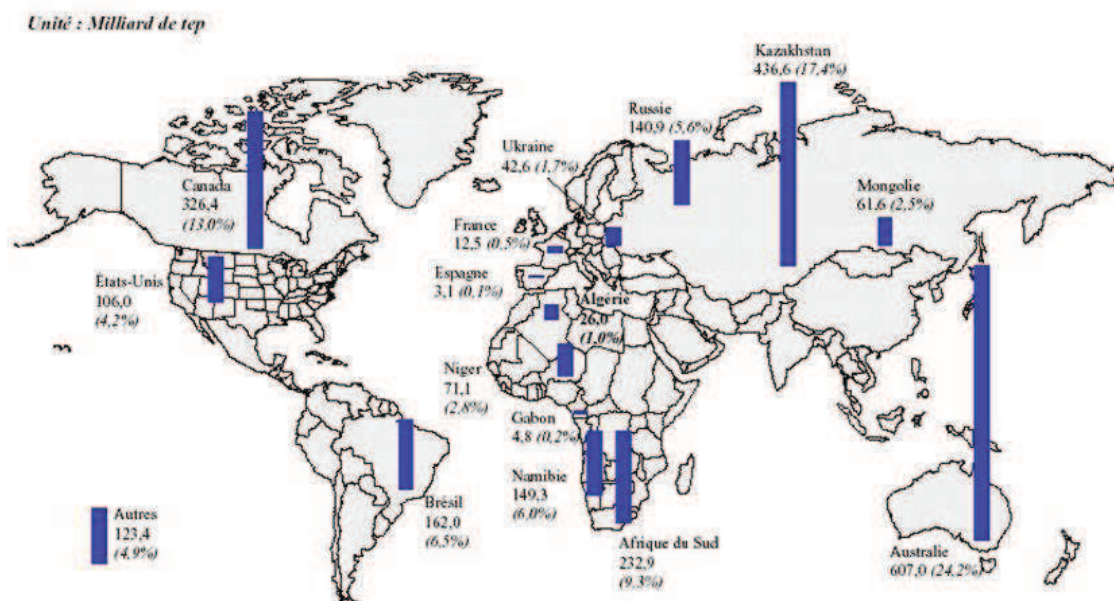


Figure 1. Famille radioactive naturelle de l'uranium 235 (A), du Thorium 232 (B) et de l'uranium 238 (C)

1.2.2 Carte d'identité de l'uranium

L'U est un radioélément présent dans l'environnement depuis l'origine de la terre. Il est présent en particulier dans les sols, les eaux, chez les végétaux et chez les êtres vivants. Il y a en moyenne 1 à 2 mg d'U par kg de sol, de l'ordre de quelques ng.l⁻¹ à quelques µg.l⁻¹ d'U dans les eaux de surface et en moyenne 0,4 µg.L⁻¹ dans les eaux de boisson (WHO, 2004). La concentration d'U peut cependant être plus importante dans des zones où les puits de forage ont été creusés dans des roches uranifères comme en Finlande, où certains puits privés contiennent en moyenne 28 µg.L⁻¹ d'U (Kurttio *et al.*, 2002 et 2005) et au Canada, où certains puits contiennent jusqu'à 700 µg.L⁻¹ (WHO, 2004). L'être humain contient dans son organisme environ une vingtaine de mg d'U Naturel (UN).

Le minerai qui contient l'UN est exploité à travers le monde depuis les mines situées principalement au Canada, en Australie et notamment les mines d'Arlit au Niger, exploitées par AREVA qui ont fourni depuis les années 1970 l'essentiel de l'U Français (cf. Figure 2).



Total monde : 2 506,2 milliers de tonnes (hors Chili et Chine)

(*) ressources raisonnablement assurées récupérables à moins de 80\$ kg U

Source : Observatoire de l'énergie d'après CEA/DSE et AIE/OCDE

Figure 2. Réserves mondiales prouvées d'uranium à la surface du globe (1999)

A l'état pur, l'U est un métal gris blanc et dur, très dense (sa masse volumique est de 19,05 g/cm³). Il existe 14 isotopes de l'U allant de l'²²⁷U à l'²⁴⁰U, tous radioactifs. Parmi ceux-ci, les plus couramment rencontrés dans l'industrie ou la recherche sont ²³²U, ²³³U, ²³⁴U, ²³⁵U, ²³⁶U et ²³⁷U. L'origine de leur énergie provient de leurs désintégrations radioactives spontanées d'une part et du caractère fissile (²³⁵U ou ²³³U) ou fertile (²³⁸U) de certains de ces isotopes d'autre part. L'UN est principalement constitué de trois isotopes : ²³⁸U, ²³⁵U et ²³⁴U, tous émetteurs α (cf. [Tableau 1](#)).

Tableau 1. Caractéristiques des différents isotopes de l'Uranium Naturel

ISOTOPE	²³⁴ U	²³⁵ U	²³⁸ U
Période radioactive (années)	2,5.10 ⁵	7,1.10 ⁸	4,5.10 ⁹
Masse atomique (g)	234,04	235,04	238,05
Pourcentage en masse (g)	0,006	0,714	99,28
Pourcentage radioactivité	48,9	2,25	48,9
Type de rayonnement	Alpha	Alpha/Gamma	Alpha
Energie déposée	4,8 Mev	4,4 Mev	4,2 Mev
Activité spécifique (Bq.g ⁻¹)	2,30.10 ⁸	7,11.10 ⁴	1,24.10 ⁴

L'U est principalement un émetteur de particules alpha (α), mais il émet également un rayonnement bêta (β) du fait de ses descendants radioactifs.

1.2.3 Les réactions de fission naturelle de l'uranium : exemple du réacteur naturel d'Oklo au Gabon

Le réacteur nucléaire naturel d'Oklo, près de la ville de Franceville dans la province de Haut-Ogooué au Gabon, constitue un ensemble de réacteurs nucléaires naturels, c'est-à-dire que des réactions de fission nucléaire en chaîne auto-entretenu y ont eu lieu sans intervention humaine. Cependant, ces réacteurs nucléaires naturels restent de très faible puissance, comparativement aux réacteurs nucléaires actuels fabriqués par l'Homme.

C'est le seul exemple connu de réacteur nucléaire naturel sur la Terre (cf. Figure 3).



Figure 3. Gisement d'uranium d'Oklo au Gabon

1.2.3.a La découverte

Tout a commencé en Juin 1972, lors d'une analyse de routine, par l'observation d'une très légère anomalie isotopique de l'U dans des échantillons d'oxyde d'U (UO_2) provenant du Gabon et devant être enrichis au centre de Pierrelatte.

Il avait été trouvé une teneur de 0,7171 % pour l'isotope ^{235}U alors que sa teneur normale aujourd'hui est de 0,7202 %. La différence est faible mais significative. Des contrôles indiquèrent qu'il n'y avait pas eu d'erreur de mesure. En remontant la piste de ce minerai anormal on arriva à la mine d'Oklo et plus précisément à l'extrémité Nord de celle-ci. On trouvera même un prélèvement sur une carotte provenant d'un forage où la teneur était aussi faible que 0,440 %. Plusieurs hypothèses sont envisagées

pour expliquer cette faible teneur en ^{235}U , mais la découverte de trace de produits de fission accrédita la thèse d'un réacteur nucléaire spontané.

Seize sites y ont été découverts avec des traces de réactions de fission datant de près de 2 milliards d'années ; cependant tous les réacteurs du site sont aujourd'hui éteints.

I.2.3.b Fonctionnement des réacteurs nucléaires spontanés

Un réacteur nucléaire naturel est un dépôt d'U où les analyses montrent des symptômes de réaction de fission nucléaire en chaîne auto-entretenu. Il se forme lorsqu'un dépôt de minerai riche en U est inondé par de l'eau : l'hydrogène de l'eau agit comme modérateur de neutrons et démarre une réaction en chaîne de fission nucléaire (cf. Figure 4). Au fur et à mesure que la réaction s'intensifie, l'eau s'évapore et s'échappe, ce qui ralentit la réaction, empêchant un emballement du réacteur. Après la baisse de la température, l'eau afflue de nouveau et la réaction ré-augmente.

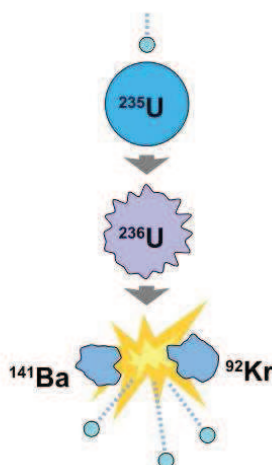


Figure 4. Une des multitudes fissions nucléaires de l'uranium 235 induite par la capture d'un neutron

I.2.4 La dispersion de l'uranium dans l'environnement liée aux activités humaines

Sous l'action des processus d'érosion et autres mécanismes géologiques de formation des sols, l'U présent dans les roches est naturellement transféré dans les sols qui en sont issus. Leur lessivage par les eaux de pluie conduit alors naturellement à une dissémination de l'U dans toutes les composantes de l'environnement (Colle *et al.*, 2001).

A cette redistribution naturelle de l'U dans l'environnement viennent s'ajouter des perturbations anthropogéniques à l'origine d'une dispersion de l'U dans les différents compartiments environnementaux (aquatique, terrestre et aérien). Ainsi, on dénombre quatre types d'activités industrielles ayant un impact majeur sur le cycle de l'U dans l'environnement :

(1) **les activités minières et industrielles liées au cycle du combustible nucléaire** (cf. [Figure 5](#)). En effet, c'est dans ces installations que l'U appauvri (UA) et l'U enrichi (UE) sont produits et donc manipulés à grande échelle. Une faille dans le système de récupération ou de stockage des déchets nucléaires peut conduire à des fuites de matériel radioactif dans l'environnement. En effet, l'incident survenu en juillet 2008 sur le site nucléaire français du Tricastin illustre ce risque. Le débordement d'une cuve contenant des effluents uranifères dans un bac de rétention fissuré a laissé échapper 76 kilogrammes d'U (naturel) dans les sols et les eaux, contaminant ainsi certaines sources d'eau potable. Quelle que soit l'origine de la contamination, le risque principal consiste en l'infiltration des sols et des eaux profondes et de surface. L'ampleur de ce phénomène dépend de multiples facteurs, comme la forme chimique de l'U, sa solubilité dans l'eau ou encore du type de sol. Néanmoins, si une contamination environnementale est avérée, elle conduit à l'exposition à l'U des êtres vivants.

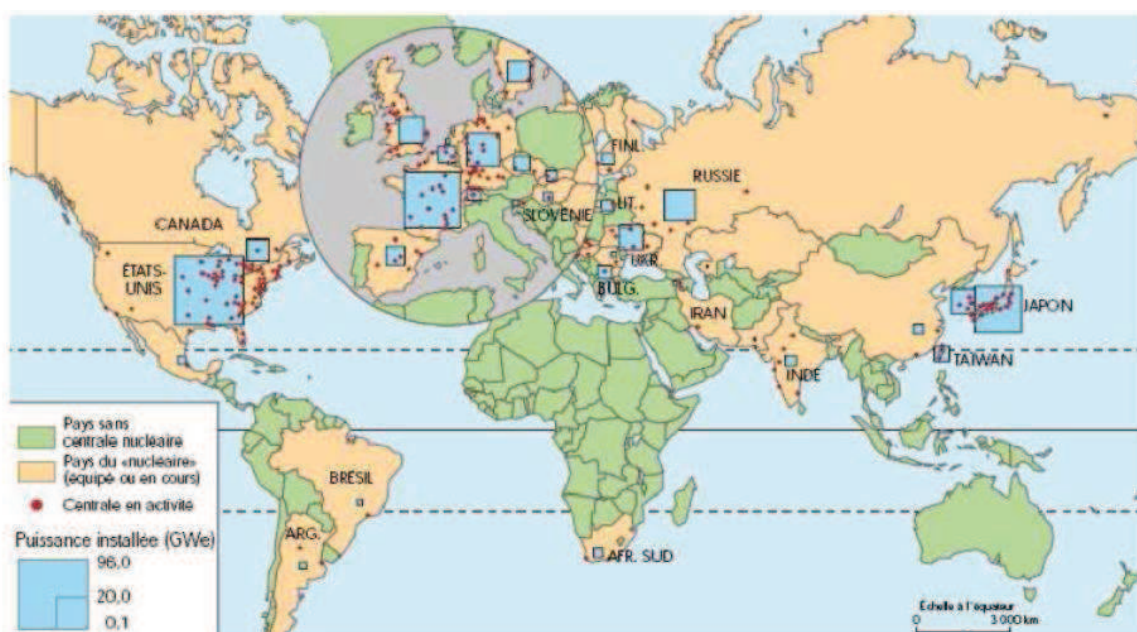



Figure 5. Répartition des centrales nucléaires en France et dans le monde (d'après Brunet R, Centrales nucléaires et uranium dans le monde, Mappemonde, 2000)

(2) **l'utilisation militaire d'UA** qui peut conduire à un enrichissement des sites bombardés en fines particules d' UO_2 déposées à proximité des lieux d'explosion. Les principales régions concernées par ce mode de dispersion sont l'Irak, le Koweït, la Bosnie-Herzégovine et le Kosovo (cf. [Figure 6](#)). Une mission du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) dans les Balkans a mesuré la présence d'UA jusqu'à une centaine de mètres autour du point d'impact d'obus perforants (UNEP 2003) et a également relevé de faibles niveaux de contamination du sol et de certaines eaux de boisson en ex-Yougoslavie (UNEP 2002 ; UNEP 2003).



Figure 6. Carte des cibles d'armes à l'uranium appauvri au Kosovo lors du conflit en ex-Yougoslavie en 1999 (d'après NATO, Balkan unit - UNEP, Geneva, 2000)

 Cible d'un tir de missile à l'UA

(3) l'utilisation du charbon qui contient des quantités non négligeables de radionucléides naturels (radium, thorium, uranium, potassium) et dont la combustion conduit à leur libération dans l'atmosphère.

(4) l'utilisation en agriculture d'importantes quantités de phosphates naturels (pouvant présenter des teneurs en U telles que leur radioactivité peut atteindre jusqu'à 1 500 Bq/kg) pour la fertilisation des cultures et pour l'élaboration de compléments alimentaires pour le bétail.

II. Les propriétés physico-chimiques de l'uranium

II.1 Les principales propriétés chimiques de l'uranium

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 d'éléments nommés actinides qui comprend quinze membres, de l'actinium ($Z = 89$) au lawrencium ($Z = 103$). Chaque atome d'U

possède 92 protons et entre 135 et 148 neutrons. L'U n'existe pas dans la nature à l'état de métal chimiquement pur, ni en alliage.

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

L'U présente la configuration électronique externe suivante : $5s^2 5p^6 5d^{10} 5f^3 6s^2 6p^6 6d^1 7s^2$. Les six électrons les plus externes des niveaux 5f, 6d et 7s forment le système des électrons de valence de l'U. Cet atome est donc capable d'adopter quatre états de valence associés aux formes ioniques suivantes : U^{3+} (+III), U^{4+} (+IV), UO_2^+ (+V) et UO_2^{2+} (+VI) (Ribera *et al.*, 1996). Néanmoins, les formes largement majoritaires dans l'environnement sont celles caractérisées par un degré d'oxydation (+IV) ou (+VI). En solution aqueuse, l'état d'oxydation le plus courant est donc (+VI) si les conditions sont oxydantes, l'U étant alors majoritairement sous la forme d'ion uranyle UO_2^{2+} qui, en présence des ligands organiques ou inorganiques, forme des complexes relativement stables. En conditions réductrices, l'état d'oxydation le plus courant est (+IV), la solubilité de l'U sous cette forme étant plus faible (Colle *et al.*, 2001). Les composés sous forme U(V) et la plupart des composés U(IV) sont insolubles.

Chimiquement, l'U a un comportement similaire à celui des autres éléments du groupe (VI) du tableau périodique, et ressemble au chrome et au tungstène (Irwin *et al.*, 1997). L'U élémentaire est une substance très réactive, capable de former des composés avec la plupart des éléments de la classification périodique (Ervanne, 2004). C'est pourquoi il n'existe pas à l'état natif dans la nature, c'est-à-dire à l'état de métal, chimiquement pur ou en alliage. En effet, en raison de sa forte électropositivité, c'est un élément qui se caractérise par une affinité marquée pour l'oxygène. Il ne se rencontre donc que dans des composés oxygénés (Madic et Genet, 2001).

En milieu biologique, des études de spéciation ont démontré que l'U est principalement lié aux carbonates, aux phosphates (Jones *et al.*, 2002) et aux grosses protéines (Chevari et Likhner, 1968). Le

complexe U (Kurttio *et al.*, 2005) de faibles poids moléculaires, $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$, pourrait être impliqué dans l'accumulation et la toxicité de ce métal au niveau cellulaire (Carrière *et al.*, 2004).

II.2 Les principales propriétés physiques de l'uranium

Les quatorze isotopes de l'U identifiés à ce jour sont tous radioactifs, ce qui signifie que ces noyaux atomiques instables se désintègrent spontanément en dégageant de l'énergie sous forme de particules (α , β) et/ou de rayonnements (γ , X) (cf. Figure 7).

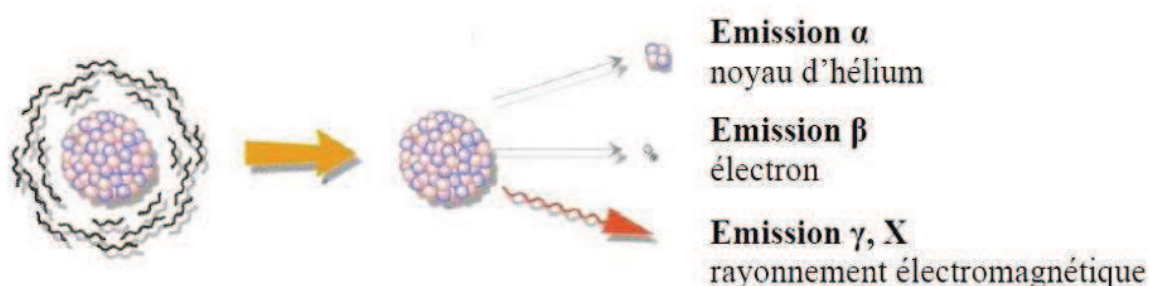


Figure 7. La radioactivité : désintégration d'un noyau instable s'accompagnant de l'émission de rayonnements et/ou de particules (Delacroix *et al.*, 2006)

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

II.2.1 L'uranium naturel

L'UN se présente sous la forme d'un mélange de trois isotopes : ^{234}U , ^{235}U et ^{238}U (représentant respectivement 0,005 %, 0,720 % et 99,274 % de la masse totale). De ces trois isotopes, seuls ^{235}U et ^{238}U sont primordiaux (c'est à dire qu'ils existent depuis l'origine de la Terre, $4,5 \cdot 10^9$ années). L'isotope ^{234}U est quant à lui un produit de la décroissance de ^{238}U (Madic et Genet, 2001).

Leurs périodes radioactives (temps nécessaire à la radioactivité pour décroître de moitié) sont, quant à elles, de $2,44 \cdot 10^5$, $7,10 \cdot 10^8$ et $4,5 \cdot 10^9$ années (respectivement pour ^{234}U , ^{235}U et ^{238}U). Or, plus la période radioactive d'un isotope est longue moins son activité radiologique est importante. Ceci explique le fait qu'environ 49,5 % de la radioactivité de l'UN soit associés à ^{234}U . En effet, malgré sa faible concentration dans l'UN (0,005 %), ^{234}U présentant une très forte activité spécifique ($2,3 \cdot 10^8 \text{Bq} \cdot \text{g}^{-1}$)

contribue à l'impact dosimétrique de l'UN dans des proportions comparables à celles de l' ^{238}U (qui, malgré sa forte abondance dans l'UN, ne contribue qu'à hauteur de 48,2 % de sa radioactivité totale). Les 2,2 % restants sont liés à la décroissance radioactive de l' ^{235}U (Bleise *et al.*, 2003). Les trois isotopes, instables, se désintègrent principalement par émission de rayonnements α (noyau d'hélium ^4_2He). Bombardés par des neutrons, les noyaux d'uranium ^{234}U , ^{235}U et ^{238}U peuvent participer à des réactions de fission (cassures du noyau) ou de capture de neutrons (*cf.* Figure 8). Seul le noyau d' ^{235}U peut être le siège de la réaction de fission. La fission dégage de l'énergie (énergie nucléaire) qui est finalement transformée en chaleur. L'isotope ^{235}U participe aussi à une réaction de fission spontanée en chaîne pour des quantités de matière supérieures à une valeur seuil, appelée masse critique. L'U, métal lourd radioactif, participe à la radioexposition de l'Homme.

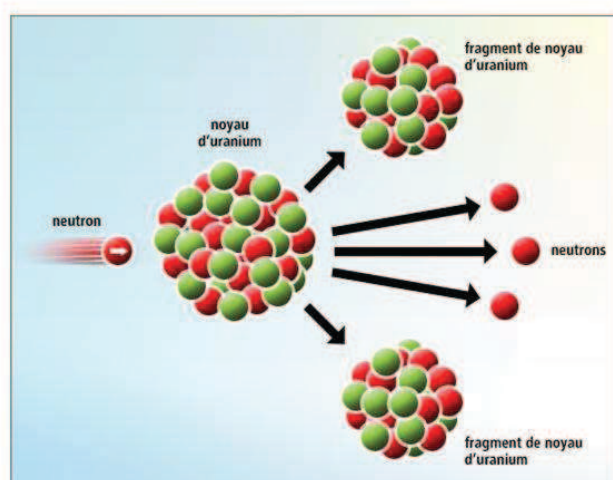


Figure 8. Principe de la fission

En captant un neutron, l'atome d'U alors instable va se scinder et libérer une très grande quantité d'énergie ainsi que 2 à 3 neutrons qui vont à leurs tours fissionner d'autres atomes d'U, c'est le principe de la fission nucléaire. L'énergie libérée par cette réaction est celle exploitée dans les centrales nucléaires. Cependant seul l'isotope 235 de l'U est fissile et l'UN n'en possède que 0,7 %. Ainsi, avant d'être utilisé comme combustible, l'UN devra être enrichi en isotope 235 et ce processus s'inscrit dans une suite de transformation de l'U mises en œuvre dans la partie amont du Cycle du combustible nucléaire.

II.2.2 Particularités de l' ^{235}U : la fission nucléaire, ses applications et l'uranium enrichi en ^{235}U

L'isotope ^{235}U est le seul des trois isotopes composant l'UN à présenter la particularité d'être susceptible de subir la fission nucléaire, c'est pourquoi on le qualifie de fissile. Les noyaux des deux autres isotopes de l'UN (^{234}U et ^{238}U) sont beaucoup plus stables et ne peuvent pas subir la fission. Par contre, le noyau de ^{238}U est capable de capturer un neutron. Dans ce cas, il se transmute en un noyau de plutonium, de masse atomique 239. Le ^{239}Pu est une matière fissile susceptible de produire de l'énergie, comme le ^{235}U (Rouyer, 2001). Dans la réaction de fission (sous l'impact d'un neutron), le noyau de ^{235}U se

scinde en deux noyaux plus petits appelés produits de fission. La réaction de fission s'accompagne d'un dégagement important d'énergie ainsi que de la libération de deux ou trois neutrons (Equation 1).



Les deux produits de fission sont éjectés avec une grande vitesse (8 000 km/s), ils sont ralentis par des chocs successifs avec les atomes avoisinants, et s'arrêtent après un très petit parcours (quelques dizaines de micromètres). Leur énergie est alors dissipée en chaleur. Les neutrons libérés peuvent quant à eux provoquer à leur tour la fission d'autres noyaux de ${}^{235}\text{U}$ et la création de nouvelles quantités d'énergie, et la libération d'autres neutrons... et ainsi de suite. C'est ainsi qu'on peut obtenir une réaction en chaîne.

Les deux applications principales de la fission sont les réacteurs nucléaires producteurs d'électricité et les armes nucléaires (bombe atomique). En effet, c'est sur cette réaction en chaîne que repose la production d'électricité par les réacteurs nucléaires. L'énergie dissipée sous forme de chaleur lors de la réaction en chaîne est récupérée et transformée en électricité par des turbines à vapeur (Viala, 2001). Afin de libérer régulièrement de l'énergie et éviter un emballement du réacteur, la réaction en chaîne est contrôlée en stabilisant le nombre de fissions simultanées par capture d'un certain nombre de neutrons excédentaires.

L'UE se différencie de l'UN par une composition isotopique différente et notamment une teneur en ${}^{235}\text{U}$ nettement plus forte, de l'ordre de 4 % à 20 % au lieu de 0,7 % pour l'UN (cf. Tableau 2). L'UE est utilisé dans les réacteurs nucléaires pour entretenir la réaction en chaîne.

II.2.3 L'uranium appauvri

L'UA est un sous-produit de l'industrie nucléaire qui peut avoir deux origines, soit les usines d'enrichissement en ${}^{235}\text{U}$ de l'UN pour la fabrication du combustible des réacteurs nucléaires, soit le retraitement de combustibles irradiés (WHO, 2001). L'UA possède les mêmes caractéristiques chimiques que l'UN et l'UE ; il est cependant moins radioactif (60 % moins radioactif que l'UN par exemple). Il se différencie de l'UN par une composition isotopique différente, et notamment par une teneur plus faible en ${}^{235}\text{U}$, de l'ordre de 0,2 à 0,3 % au lieu de 0,7 % pour l'UN (cf. Tableau 2).

Tableau 2. Composition isotopique en masse et en activité de l'UN, de l'UA à 0,2 % en ^{235}U et de l'UE à 12 % en ^{235}U

Isotope de l'Uranium	Composition isotopique en masse (%)			Activité spécifique (Bq/g)		
	^{238}U	^{235}U	^{234}U	^{238}U	^{235}U	^{234}U
U Naturel (UN)	99,274	0,720	0,0055	12 400	580	12 474
U Appauvri 0,2 % en ^{235}U (UA)	99,797	0,202	0,0008	12 400	158	1 843
U Enrichi 12 % en ^{235}U (UE)	87	12	0,12	10800	8550	276000

Notons que l'UA est également appauvri en ^{234}U d'un facteur 7 par rapport à l'UN (Bleise et al., 2003). Compte tenu de cet appauvrissement en ^{234}U , l'activité totale et l'activité α de l'UA sont respectivement 1,3 fois et 1,7 fois moins importantes que celles de l'UN (cf. Tableau 3).

Tableau 3. Activités spécifiques de l'UN et de l'UA

	Activité spécifique totale (Bq/g)	Activité spécifique α (Bq/g)
UN avec ses descendants	$50,4 \cdot 10^3$	$25,2 \cdot 10^3$
UA avec ses descendants	$39,3 \cdot 10^3$	$14,4 \cdot 10^3$

III. Les utilisations de l'uranium par l'Homme

III.1 Les utilisations militaires

III.1.1 Bombe atomique

La bombe atomique, communément appelée bombe à fission ou bombe nucléaire, est basée sur le principe de la fission nucléaire et utilise des éléments fissiles comme l' ^{235}U . Les bombes à fission furent les premières armes nucléaires à être développées et les seules à avoir été utilisées contre des populations humaines : au cours de la Seconde Guerre mondiale, ce seront en effet deux bombes atomiques, baptisées respectivement *Little Boy* et *Fat Man*, qui seront utilisées par l'armée américaine pour les bombardements des villes d'Hiroshima et Nagasaki.

A priori ces armes n'existent plus dans l'arsenal des nations technologiquement les plus avancées qui leur préfèrent les engins à fusion plus puissant et/ou moins encombrant.

III.1.2 Obus perforants, blindages...

L'UA est utilisé par les militaires pour ses propriétés mécaniques et chimiques, pas pour ses propriétés radioactives. De plus, ce métal est bon marché (il est un résidu de l'enrichissement de l'U destiné aux centrales nucléaires ou à l'armement nucléaire) et il est lourd (1,7 fois plus dense que le plomb). Les militaires l'utilisent pour faire des blindages et comme revêtement des obus anti-char (cf. [Figure 9](#)) car il possède d'excellents pouvoirs de pénétration des blindages. L'U, quelle que soit sa composition isotopique, est très actif vis-à-vis de l'oxygène. Exposé à l'air, il se recouvre d'une couche d'oxyde. Lorsqu'il est en copeaux, il s'enflamme. Les obus anti-char à l'U sont dits « cinétiques » : leur pouvoir de pénétration ne repose pas sur l'explosion. La masse élevée de l'U est un de leurs avantages, l'autre étant leur capacité à brûler, élevant la température suffisamment pour pénétrer les blindages. Une fois que le blindage du char a été percé, l'obus se désagrège en petits fragments formant des éclats qui détruisent les systèmes de guidage et de communication, ainsi que les membres de l'équipage.

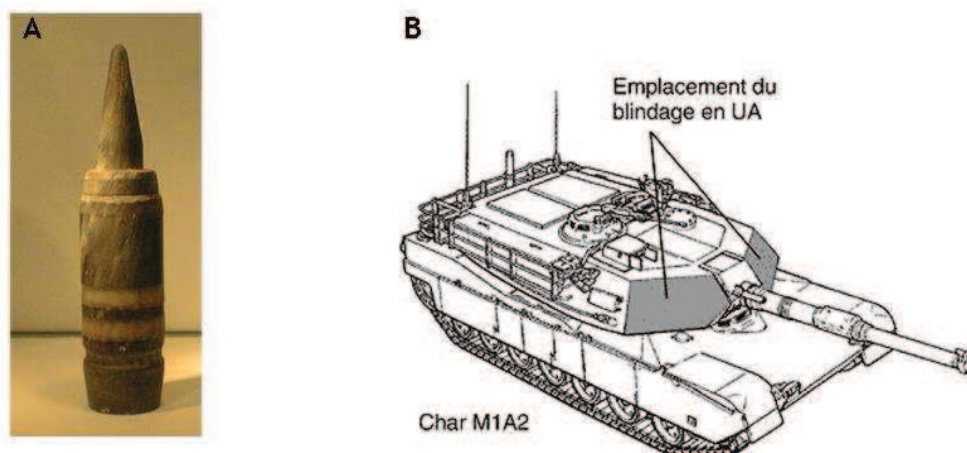


Figure 9. Photographie d'un obus (A) et esquisse d'un char de combat principal américain Abrams M1A2HA montrant l'emplacement du blindage de protection en UA (B)

III.2 Les utilisations non militaires

L'U a des propriétés mécaniques très intéressantes (notamment en terme de résistance), une densité élevée (par exemple pour l'UN : $19,05 \text{ g.cm}^{-3}$), une forte pyrophoricité (capacité à s'enflammer quand il est sous forme de poudre) et son prix est très compétitif par rapport aux autres métaux du même type (tungstène, osmium). Sur le plan industriel, il entre dans la fabrication d'ailes et de gouvernails

d'avions, de quilles de voiliers (cf. [Figure 10](#)), de protections contre les effets biologiques des rayons X et dans celle de collimateurs pour les appareils d'irradiation médicale.

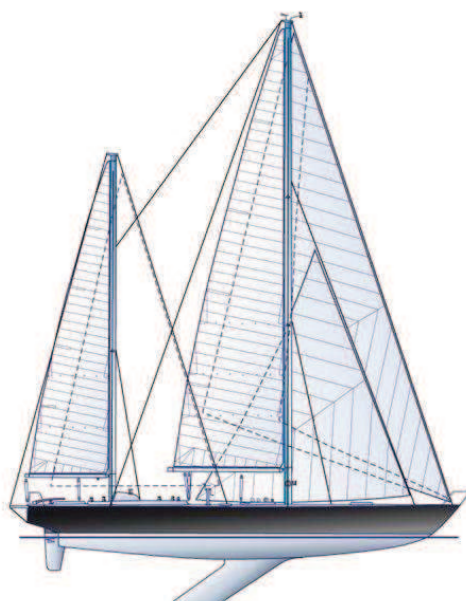


Figure 10. Photographie d'un voilier avec une quille en UA (*Pen Duick VI* (1973) : ketch de 22,25 mètres en aluminium, conçu par l'architecte André Mauric, déplaçant 32 tonnes et équipé d'un lest de quille en uranium appauvri)

Un accident d'avion a eu lieu à Amsterdam en Octobre 1992, l'UA était utilisé comme un contrepoids, et a donc a été libéré dans l'environnement ([Uijt de Haag et al., 2000](#)). Les utilisations militaires et civiles de l'U ont des répercussions sur l'environnement ainsi que sur la santé humaine ([Cantaluppi et Degetto, 2000](#)).

III.3 Le cycle du combustible nucléaire

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

La France est dotée d'un parc de 58 réacteurs nucléaires répartis sur 19 sites (cf. [Figure 11](#)) représentant, selon les chiffres de fin 2007, 76,9 % de la production totale d'électricité du pays ([CEA, 2008](#)).

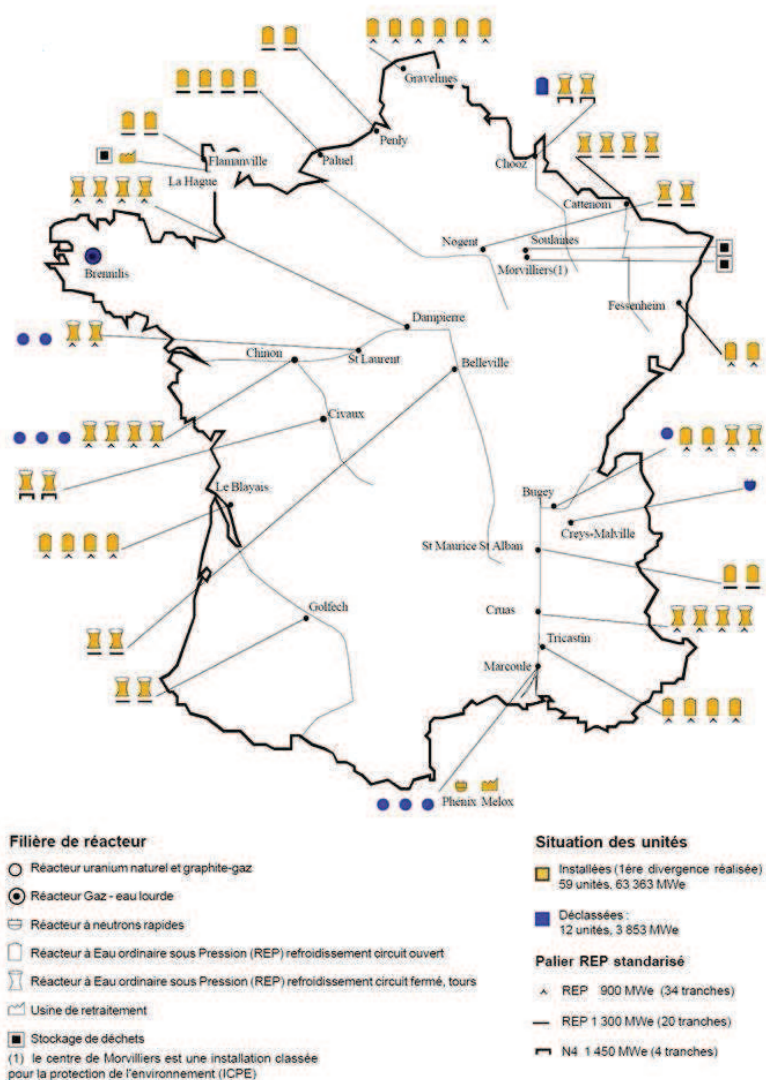


Figure 11. Carte des sites nucléaires industriels français (*Source : Observatoire de l'Energie*)

Le principe d'un réacteur nucléaire est de récupérer l'énergie libérée par la fission nucléaire sous forme de chaleur pour la transformer en électricité. Les principaux atomes fissiles sont l²³³U, ²³⁵U, ²³⁹Pu et ²⁴¹Pu. Seul l²³⁵U se trouve à l'état naturel. D'un point de vue économique, il est donc préférentiellement utilisé comme combustible dans les centrales nucléaires. Le combustible nucléaire après son utilisation dans le réacteur peut être retraité pour extraire les matières énergétiques recyclables. C'est pourquoi on parle de cycle du combustible nucléaire. Ce cycle met en jeu des formes chimiques variées ainsi que diverses compositions isotopiques d'U que l'on retrouve au cours des différentes étapes de ce cycle (EDP Sciences, 2001) (cf. Figure 12).

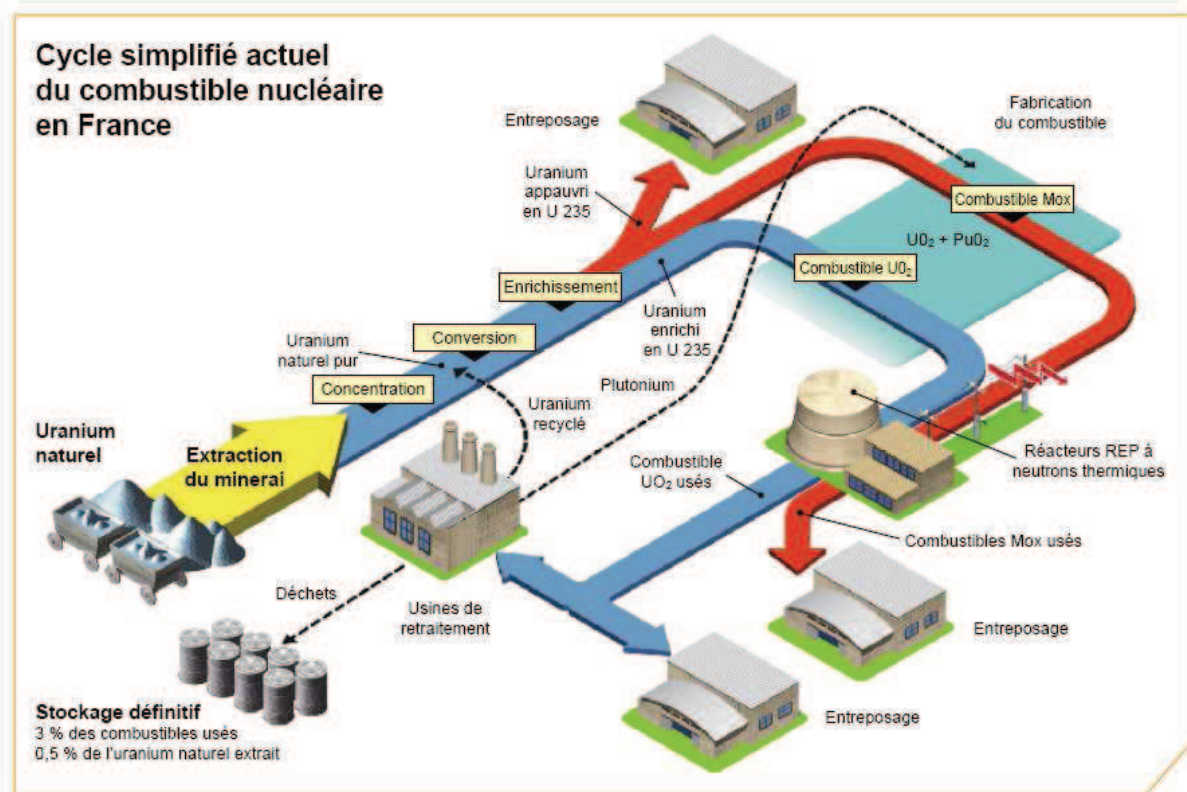


Figure 12. Le cycle du combustible nucléaire (site du CEA, 2004)

III.3.1 L'extraction du minerai et la production du « yellow cake »

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

La teneur du minerai en U est en général assez faible (1 à 3 % de la roche extraite). Il est donc indispensable de concentrer l'U de ces minerais, ce qui se fait le plus souvent sur place. Les roches sont d'abord concassées et finement broyées et l'U est extrait par diverses opérations chimiques (le plus souvent extraction par une solution d'acide sulfurique dilué). Le concentré fabriqué a l'aspect d'une pâte jaune appelée "yellow cake" (cf. Figure 13). Il contient environ 75 % de UO₂. Le "yellow cake" est alors dirigé vers les usines de raffinage et de conversion.

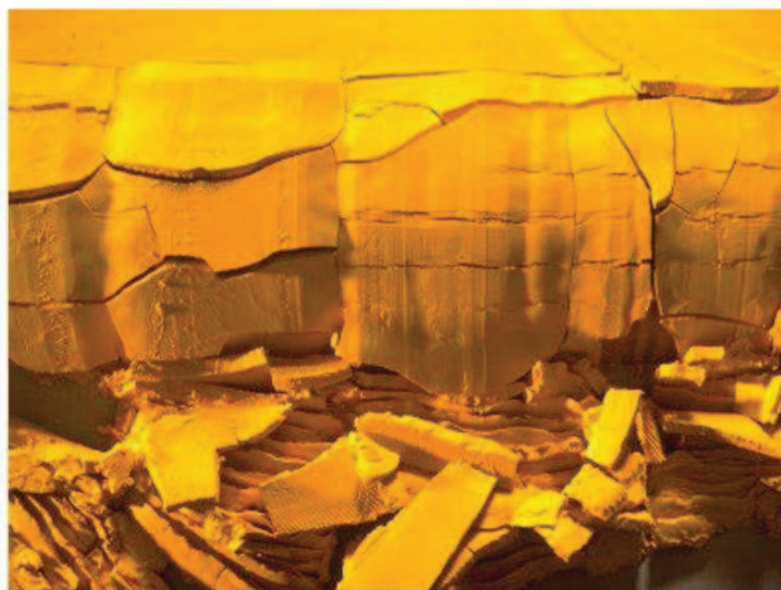


Figure 13. Le yellow cake (Source: AREVA)

III.3.2 La conversion en UF₆

Le "yellow cake" est purifié et transformé en UF₆ (hexafluorure d'U : composé nécessaire pour l'étape suivante). Plusieurs étapes sont nécessaires pour ces opérations de conversion. Le "yellow cake" est transformé successivement en nitrate d'uranyle, en uranate d'ammonium puis en oxyde d'U, UO₃ puis UO₂. L'oxyde d'U, très pur, est ensuite converti en tétrafluorure d'U (UF₄). Enfin, la combustion de l'UF₄ en présence de fluor conduit à la formation d'hexafluorure d'U (UF₆).

III.3.3 L'enrichissement en ²³⁵U

Pour le fonctionnement de la majorité des réacteurs, le combustible doit contenir une proportion d'²³⁵U se situant entre 3 % et 5 % (cas des réacteurs à eau sous pression : REP) car seul cet isotope peut subir la fission nucléaire qui libère de l'énergie. L'opération consistant à augmenter la proportion d'²³⁵U dans la masse d'UN est appelée enrichissement. Il est possible de différencier les isotopes de l'U grâce à leur légère différence de masse, l'²³⁵U est plus léger que l'²³⁸U. C'est pourquoi l'enrichissement de l'U est basé actuellement sur la différence de mobilité due à cette faible différence de masse. Il existe différentes techniques d'enrichissement : l'ultracentrifugation, la diffusion gazeuse et l'enrichissement par laser. Un UF₆ enrichi en isotope ²³⁵U est obtenu. De l'U très enrichi sous forme métallique peut également être produit pour des applications militaires.

III.3.4 La conversion en UO_2 enrichi et la fabrication du combustible

Après l'enrichissement, l' UF_6 enrichi est converti par plusieurs étapes en UO_2 enrichi sous la forme d'une poudre noire compactée en petits cylindres appelés "pastilles". Chaque pastille (7 grammes) peut libérer autant d'énergie qu'une tonne de charbon. Les pastilles sont enfilées dans de longs tubes métalliques bouchés de manière étanche pour constituer les "crayons" de combustible (cf. Figure 14). Pour une centrale, plus de 40 000 crayons sont préparés pour être rassemblés en "fagots" de section carrée, appelés assemblages de combustible. Le chargement d'un réacteur nucléaire de 900 mégawatts nécessite 157 assemblages contenant en tout 11 millions de pastilles.

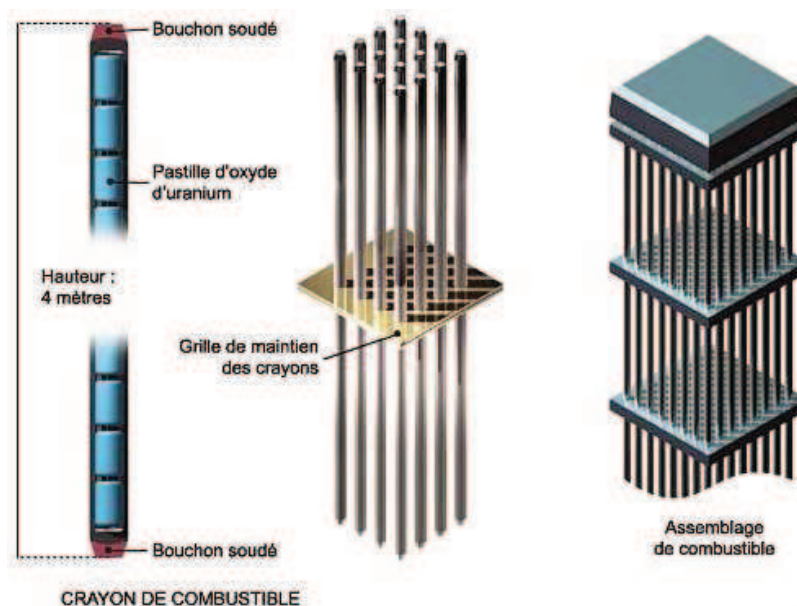


Figure 14. Préparation des assemblages de combustibles

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

III.3.5 Le retraitement et le stockage

Au fil du temps, le combustible va subir certaines transformations qui le rendent moins performant : il y a une consommation progressive d' ^{235}U qui entraîne l'apparition de produits de fission. Au bout d'un certain temps, le combustible doit donc être retiré du réacteur. Après son utilisation, le combustible usé est stocké dans une piscine de refroidissement près du réacteur pendant trois ans pour laisser diminuer son activité, l'eau protégeant des rayonnements. Cette étape sert également à refroidir le combustible usé car les atomes radioactifs qui le constituent dégagent beaucoup de chaleur lors de leur désintégration. Le combustible usé est ensuite transporté dans des usines de retraitement.

Le retraitement consiste (cf. Figure 15) :

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

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

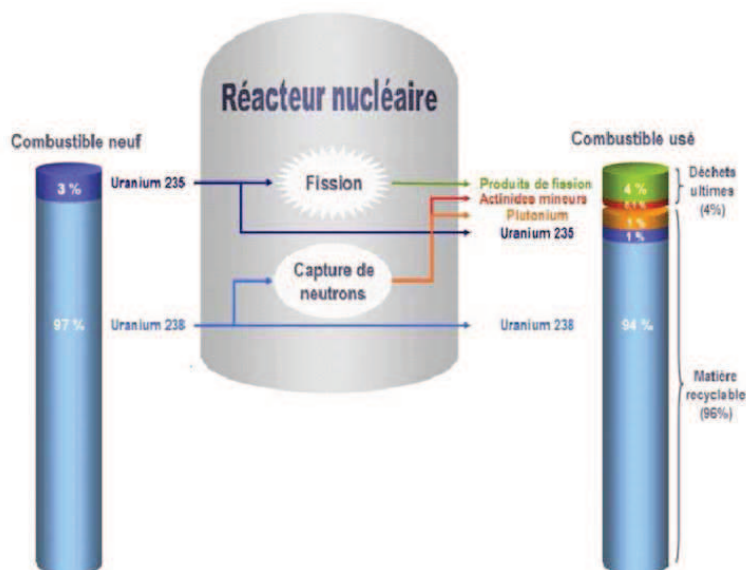


Figure 15. Le devenir du combustible

L'U et le Pu, qui représentent 97 % de l'ensemble, sont ensuite séparés. L'U récupéré sous forme de nitrate d'uranyle est encore légèrement plus riche que l'UN (environ 1% d'²³⁵U). Il pourra être à nouveau enrichi à plus de 3 % et suivre une voie analogue à celle d'un combustible ordinaire. Le plutonium possède un important potentiel énergétique et est utilisé pour fabriquer du combustible MOX (Mélange d'Oxydes). Le MOX est un combustible mixte, mélange d'oxydes d'UA et de plutonium, dont la fabrication s'apparente à celle des combustibles à oxyde d'U. Le combustible MOX est déjà utilisé en France dans certains réacteurs à eau sous pression (REP).

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

activité (10 % du volume total) sont coulés dans du bitume ou du verre et entreposés en surface en attendant une autre solution. Notons qu'en fonction des pays, le combustible usé est soit retraité par la filière précédemment décrite, ce qui est le cas de la France, soit directement traité comme un déchet à stocker définitivement.

De l'extraction du minerai jusqu'au retraitement du combustible nucléaire, l'U subit donc de nombreuses transformations chimiques et peut se trouver en solution, sous forme de poudre ou d'aérosol plus ou moins solubles ou encore sous forme gazeuse. Le **Tableau 4** rend compte de la diversité chimique des principaux composés d'U rencontrés dans le cycle du combustible nucléaire.

Tableau 4. Les principaux composés de l'uranium rencontrés dans le cycle du combustible nucléaire (d'après [Ansoborlo et al., 2002](#))

Composés d'uranium	Forme chimique
Oxydes	U ₃ O ₈ , UO ₂ , UO ₃ , UO ₄ Oxydes mixtes (U _m + UO ₂ + U ₃ O ₈) MOX : (U,Pu)O ₂
Halogénures	UF ₆ , UF ₄ , UO ₂ F ₂ , UO ₂ Cl ₂ , UCl ₄
Divers	U ₂ O ₇ (NH ₄) ₂ UO ₂ (NO ₃) ₂ Pechblende, uraninite, schoepite... (minerais) U _{métal} Alliages, hydrures

Les différentes étapes du cycle du combustible nécessitent la manipulation de différents composés et isotopes de l'U. La production d'UE entraîne la production d'UA contenant moins d'²³⁵U (0,2 à 0,3 %) ainsi que moins d'²³⁴U. L'UA peut aussi être issu de la filière de retraitement et, dans ce cas, composé d'isotopes non naturels de l'U en particulier l'²³⁶U et l'²³²U. L'UA possède les mêmes caractéristiques chimiques que l'UN, il est cependant moins radioactif (environ 60 % moins radioactif).

IV. L'uranium - Synthèse

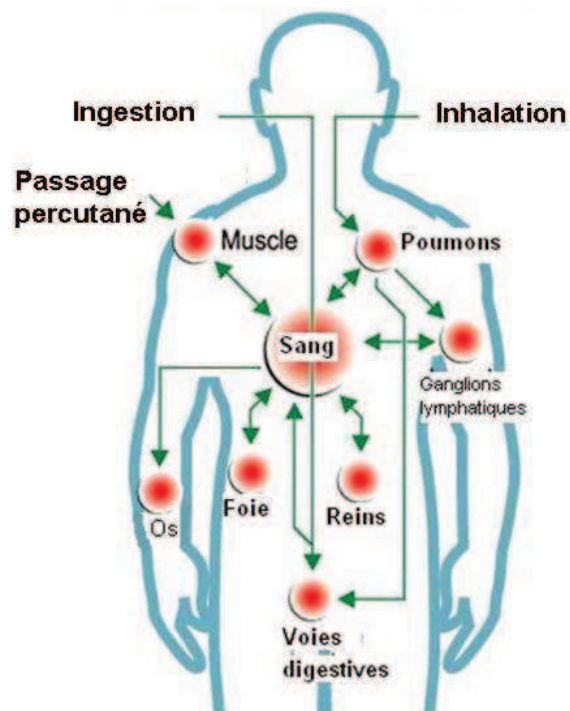
L'U est un métal lourd naturellement radioactif (émetteur de rayonnements α). Il est naturellement présent dans l'environnement mais il n'existe pas dans la nature à l'état de métal chimiquement pur, ni en alliage. L'U possède plusieurs isotopes (²²⁷U à ²⁴⁰U) tous radioactifs.

L'U est utilisé dans l'industrie nucléaire, dans l'armement militaire et lors d'applications civiles spécifiques. Ses propriétés physiques et chimiques en ont fait un candidat de choix pour le combustible des réacteurs nucléaires. Un réacteur nucléaire récupère l'énergie libérée par la fission nucléaire sous forme de chaleur pour la transformer en électricité. L' ^{235}U , fissile, se trouve à l'état naturel. Le principe du cycle du combustible est donc, à partir d'un minerai d'UN, d'obtenir un UE en ^{235}U afin de produire le combustible nucléaire. L'U est classé comme appauvri ou enrichi en fonction du pourcentage en ^{235}U présent dans le mélange isotopique considéré. Après son utilisation, le combustible usé est retraité. Les étapes de retraitement créent des isotopes artificiels de l'U.

Les différentes étapes du cycle du combustible nécessitent donc la manipulation de différents composés et isotopes de l'U, créant un risque d'exposition des travailleurs.

Partie B.

Exposition interne à l'uranium



L'U est un radionucléide d'origine tellurique, présent sur Terre depuis son origine. Ubiquitaire, il peut donc être retrouvé aussi bien dans le sol, l'air, l'eau que l'ensemble de la chaîne alimentaire en raison de ce dépôt naturel. Pour un adulte de 70 kg, l'ingestion quotidienne moyenne d'U serait de 1 à 3 µg, les 2/3 provenant des aliments, le reste étant principalement apporté par l'eau de boisson (Hamilton, 1970 et 1972 ; Fisenne *et al.*, 1987). Pour la population, la contamination est essentiellement chronique et elle a le plus fréquemment lieu par ingestion répétée de radioéléments (WHO 2001 ; Laroche *et al.*, 2003).

Depuis le 20^{ème} siècle, les activités humaines ont considérablement augmenté le nombre de sources d'exposition à l'U, tant pour les travailleurs que pour le grand public. En dehors des activités industrielles liées au cycle du combustible nucléaire qui exposent une population bien identifiée, les émissions des industries de retraitement (métallurgie, décontamination, transformation, etc.) participent aussi à l'augmentation de l'exposition (ATSDR, 1999 ; Cantaluppi et Degetto, 2000). De plus, lors des derniers conflits internationaux (Golfe, Balkans, Afghanistan, Kosovo ...), l'usage croissant d'obus perforants, à tête constituée d'UA, a également augmenté le taux de dissémination de cet élément dans l'environnement (Cantaluppi et Degetto, 2000 ; Priest, 2001). L'utilisation de l'U dans les armes présente également un réel danger pour les militaires, ainsi que pour les populations vivant à proximité des zones de conflits. La radioactivité rajoutée par les activités industrielles est généralement ponctuelle et localisée (Calmet *et al.*, 2003).

Dans l'industrie du nucléaire, la contamination interne peut se produire au niveau des différentes étapes du cycle du combustible de façon chronique par incorporation répétée de radioéléments sur une durée plus ou moins longue, ou de façon aiguë suite à une incorporation ponctuelle (incident). En effet, la technologie n'étant pas toujours réalisée en enceinte de confinement, il n'y a pas de barrière absolue entre les composés et le personnel.

Dans ce contexte, ce chapitre s'attachera à présenter les risques liés à la manipulation de l'U dans l'industrie du nucléaire en détaillant dans un premier temps les différents modes de contamination. Pour évaluer la toxicité de l'U, il est nécessaire de connaître sa biocinétique, c'est-à-dire son comportement dans l'organisme : absorption, distribution, accumulation dans les organes de rétention et élimination. Par conséquent, dans un deuxième temps le devenir de l'U dans l'organisme ainsi que sa toxicité à l'échelle des différents tissus et organes atteints seront développés. Les risques sanitaires liés à une exposition interne à l'U seront ensuite traités. Enfin, les moyens mis en œuvre dans l'industrie nucléaire pour

protéger le personnel (protection des travailleurs et surveillance médicale) des contaminations et prendre en charge les victimes contaminées par de l'U seront exposés.

I. Les risques liés à l'emploi de l'uranium dans l'industrie du nucléaire

I.1 Les voies d'atteinte de l'homme : distinction entre exposition externe et contamination

De façon générale, l'exposition de l'homme aux radionucléides peut avoir lieu de deux façons. Lorsque les radionucléides demeurent à l'extérieur de l'organisme, ils provoquent une **exposition externe** par irradiation. Cette irradiation ne peut avoir lieu que si les rayonnements émis par les radionucléides sont suffisamment pénétrants, c'est-à-dire s'ils ne sont pas facilement arrêtés par une barrière telle que l'air ou des écrans physiques avant d'atteindre l'homme (cf. Figure 16). Ce sont principalement les rayonnements X, γ , neutroniques, et, dans une moindre mesure, les rayonnements β qui sont responsables de l'exposition externe (Métivier *et al.*, 2001).

Lorsque les radionucléides sont transférés dans l'organisme, on parle d'**exposition interne** ou **contamination interne**. Contrairement à l'exposition externe, tous les rayonnements peuvent contribuer à l'exposition interne.

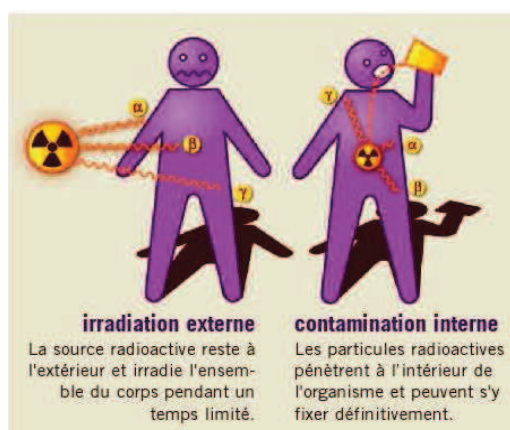


Figure 16. Irradiation externe et contamination interne

Les isotopes de l'U rencontrés dans le cycle du combustible nucléaire émettent principalement des rayonnements α au cours de leur désintégration. Ces rayonnements α sont très peu pénétrants : quelques centimètres d'air, une feuille de papier ou les couches superficielles de la peau suffisent à les arrêter (cf. Figure 17). Le risque d'une exposition externe est par conséquent extrêmement faible. Cependant, ces rayonnements peu pénétrants cèdent toute leur énergie sur un faible parcours (quelques

dizaines de micromètres dans un tissu biologique), ce qui les rend capables d'ioniser les atomes de la matière qu'ils traversent et d'induire localement des dégâts cellulaires plus importants que ceux causés, par exemple, par le rayonnement γ (Métivier *et al.*, 2001). Ainsi les rayonnements α sont qualifiés de fortement ionisants.

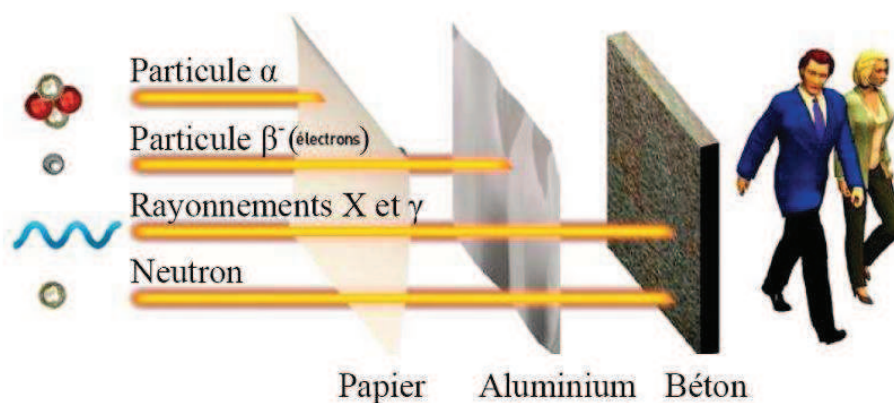


Figure 17. Le pouvoir de pénétration des rayonnements émis lors de la désintégration des radionucléides (CEA2)

C'est pour des raisons de faible pénétrabilité et de forte capacité ionisante des rayonnements α issus de la désintégration de l'U que le risque principal lié à la manipulation de ce radioélément est celui d'une **contamination interne**. Par conséquent, seuls ces modes de contamination seront décrits par la suite.

1.2 Les modes de contamination interne à l'uranium

Malgré son omniprésence dans l'environnement, l'U est considéré comme un élément non essentiel car n'ayant aucune fonction métabolique ou physiologique connue (WHO, 2004). Comme précisé précédemment, l'U étant principalement un émetteur α , le risque majeur pour la population est la **contamination interne**. En effet, les rayonnements α parcourent environ 40 μm dans l'eau ou les tissus biologiques mais présentent une forte énergie (4 à 5 MeV). Une exposition prolongée dans le temps et/ou à forte dose peut avoir des conséquences pour l'Homme. Au cours de la manipulation de l'U dans les industries du nucléaire, une exposition interne constitue le risque majeur encouru par les travailleurs. Les voies de pénétration de l'U donnant lieu à une contamination interne sont : la voie respiratoire par inhalation d'aérosols, la voie digestive par ingestion, la voie transcutanée par blessure ou passage percutané et la voie oculaire par projection de liquide. L'inhalation et la blessure sont les voies de contamination accidentelles les plus fréquentes chez les travailleurs du cycle du combustible nucléaire. Les autres voies de contamination répondent à des conditions particulières et moins répandues, pour

lesquelles les données sont rares (WHO, 2004). En revanche, le risque majeur de contamination pour le public est lié à l'apport alimentaire.

1.2.1 Contamination par inhalation

L'inhalation est de loin, la voie la plus fréquente de contamination des travailleurs par l'U. En raison des systèmes de protection individuelle des travailleurs, la contamination est le plus souvent chronique (répétée) sur plusieurs années et avec de petites quantités à chaque fois. Les expositions sont donc en général accidentelles (ATSDR, 1999). L'inhalation d'aérosols conduit à un dépôt de particules au niveau des poumons. Selon le diamètre de ces particules, le dépôt est plus au moins profond dans le tractus pulmonaire. L'élimination des particules inhalées se fait soit par dissolution vers le compartiment sanguin, selon la taille et la solubilité des particules inhalées, soit par clairance *via* les macrophages alvéolaires, la remontée muco-ciliaire suivie de l'élimination des particules vers le tractus gastro-intestinal et vers les nodules lymphatiques pulmonaires via les canaux lymphatiques (Métivier *et al.*, 2001). En dehors de la taille des particules inhalées, la solubilité des particules est un second paramètre très important à prendre en compte. En fonction de leur solubilité, les particules sont classées en trois catégories d'élimination : F (fast), M (moderate) et S (slow). Ainsi, un composé d'U soluble sera plus ou moins rapidement éliminé vers le compartiment sanguin alors qu'un composé insoluble pourra stagner sur son site de dépôt plusieurs années et, de ce fait, délivrer des doses radioactives pouvant induire un effet radiotoxique. On peut donc en déduire que la solubilité conditionne la toxicité de l'U, les formes solubles induisant plutôt une toxicité systémique et les formes insolubles favorisant une toxicité localisée au niveau du lieu de dépôt (notamment l'appareil pulmonaire).

Pour le phénomène de clairance, il est directement lié à la profondeur à laquelle se sont déposées les particules. Par conséquent, le temps d'élimination des particules, présentes au niveau des bronchioles, sera beaucoup plus important que celui nécessaire à l'élimination des particules situées au niveau du compartiment extrathoracique du pharynx, du larynx et de la bouche (de 8 heures à 23 jours, et de l'ordre de 10 minutes, respectivement). De nombreuses données ont été émises par la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) et décrivent tous les taux de clairance selon le compartiment où se situent les particules d'U (CIPR 66, 1994).

La Figure 18 présente le modèle de biocinétique de l'U après inhalation chez l'homme adulte proposé par la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR).

Le modèle humain des voies respiratoires (CIPR, 1994) est divisé en quatre régions distinctes (cf. **Figure 18**) : la région extra-thoracique (ET), la région bronchiale (BB), la région bronchiolaire (bb) et la région alvéolo-interstitielle (AI). Chacune contenant plusieurs compartiments.

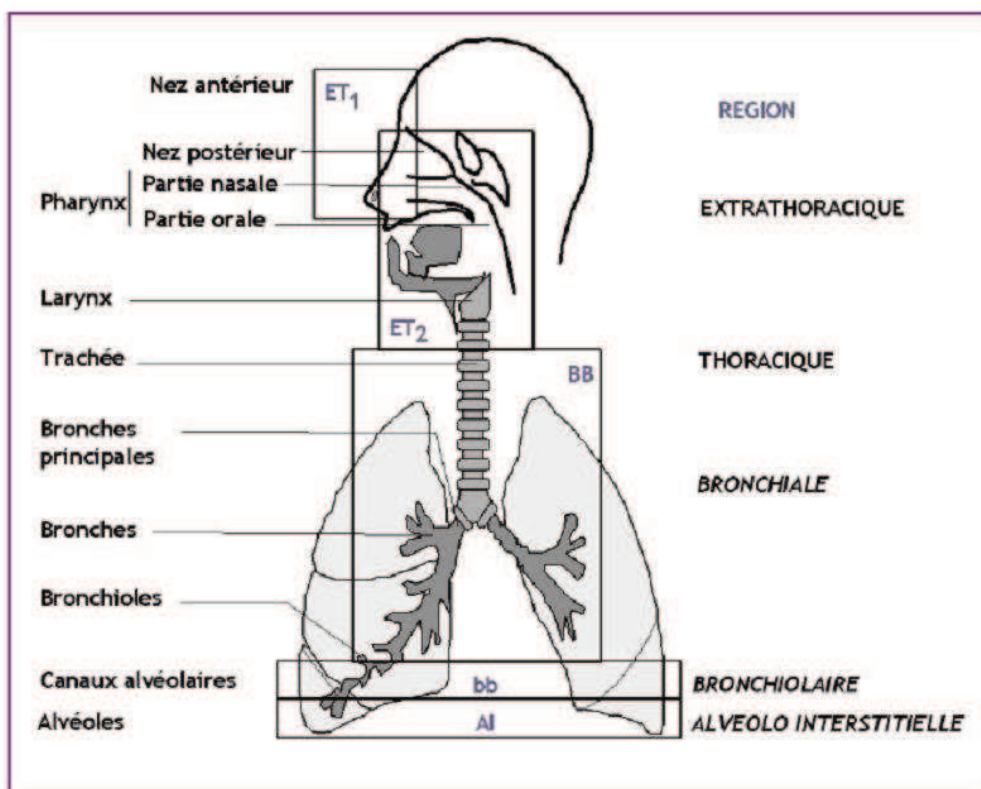


Figure 18. Le modèle biocinétique d'inhalation par l'uranium

1.2.2 Contamination par passage percutanée (blessure ou dépôt)

Il a été établi que de nombreux composés chimiques sont connus pour passer à travers la barrière cutanée. Vu son importante surface d'exposition, la peau peut être une voie majeure de pénétration dans l'organisme (Bartek, 1972). L'absorption cutanée est définie comme étant le transfert d'une substance à travers la peau depuis le milieu extérieur jusqu'au sang. La contamination par voie cutanée peut avoir lieu suite à une contusion, une brûlure chimique (Bérard *et al.*, 1994), une brûlure thermique, une piqûre (Bailey *et al.*, 2003), une plaie (Piechowski *et al.*, 2003 ; Blanchin *et al.*, 2004), une excoriation (Petitot *et al.*, 2004, 2007a et 2007b) ou encore un dépôt de radionucléides sur la peau non lésée. Les zones corporelles principalement concernées par cette voie d'entrée des radioéléments dans l'organisme sont les mains, la tête et les membres supérieurs et inférieurs.

Les travaux dédiés à l'étude de l'absorption cutanée de l'U à travers la peau intacte ont tendance à montrer que la peau constitue une bonne barrière contre l'entrée de l'U dans l'organisme. Ils soulignent cependant le fait que les accidents de contamination par l'U sur une peau intacte ne doivent pas être

négligés car, s'ils ne sont pas pris en charge, ils peuvent conduire à une exposition interne non négligeable des individus. En effet, il a été constaté dans les études de [De Rey et ses collaborateurs](#) ([De Rey et al., 1983](#)) et de [Lopez et ses collaborateurs](#) ([Lopez et al., 2000](#)) que, lorsque la peau intacte est mise en contact durant plusieurs heures avec de l'U, le passage de ce radioélément à travers la peau devient suffisamment important pour induire une toxicité pouvant entraîner des déficiences rénales allant jusqu'à la mort des rats contaminés. Ces mêmes travaux ont mis en évidence une atrophie de l'épiderme induite par la contamination. Une exposition chronique (pendant 30 jours chez le rat) avec de l'UN entraîne une diminution significative de l'épaisseur de la peau et une augmentation de sa perméabilité, perméabilité que la peau n'a pas pu retrouver après 60 jours de non exposition ([Ubios et al., 1997](#)). [Lopez et ses collaborateurs](#) ([Lopez et al., 2000](#)) ont également montré *in vivo* chez le rat que le rinçage de la peau intacte contaminée par de l'U à l'aide d'une eau savonneuse dans les 15 minutes suivant la contamination permet d'éviter la mort des rats mais n'empêche pas l'apparition d'une toxicité rénale. Il est donc nécessaire de traiter dans l'urgence les contaminations de la peau intacte par l'U et, pour cela, de nouveaux systèmes de décontamination plus efficaces que le simple lavage par de l'eau savonneuse doivent être développés. Il apparaît donc que, même si le passage de l'U à travers la peau intacte est faible et lent, l'incorporation de ce radioélément peut être suffisamment importante en cas de contact prolongé ou répété entre l'U et la surface cutanée pour conduire à l'apparition d'effets toxiques.

La structure de la peau semble donc être sévèrement altérée par une exposition chronique. Les résultats obtenus au sein du laboratoire, *in vitro* chez le rat et le porc, révèlent qu'une blessure superficielle, entraînant un retrait de la couche cornée, accroît fortement la diffusion transcutanée du nitrate d'uranyle ([Petitot et al., 2004, 2007a et 2007b](#)). En effet, en absence de couche cornée ou en cas de blessure permettant à la contamination de franchir cette barrière, la diffusion de l'U est plus importante et plus rapide que dans le cas de la contamination d'une peau intacte ([Petitot et al., 2004 et 2007a et 2007b](#)). Il apparaît donc qu'en cas de contamination suite à une blessure superficielle, pouvant à priori paraître sans gravité, la rapidité du passage de l'U dans la circulation sanguine (moins de 30 minutes) nécessite une prise en charge rapide et adaptée. Après une application unique pendant 24 heures chez le rat d' ^{233}U , 4% de l'activité déposée est retrouvée dans le derme par autoradiographie. Par microscopie électronique, il a été montré une concentration de l'U dans les follicules pileux et les glandes sudoripares et sébacées ([Tymen et al., 2000](#)). Une telle accumulation peut entraîner une dose non négligeable à la couche basale de l'épiderme, tissu cutané à risque selon la CIPR.

Ce n'est que récemment qu'un modèle de biocinétique des radionucléides dans les blessures contaminées (cf. [Figure 19](#)) a été proposé par le National Council on Radiation Protection and Measurements aux Etats-Unis (NCRP), en collaboration avec la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) ([NCRP, 2007](#)). Le nombre de données concernant les contaminations cutanées chez l'homme étant réduit, ce modèle a été établi d'après des données expérimentales obtenues sur des modèles animaux.

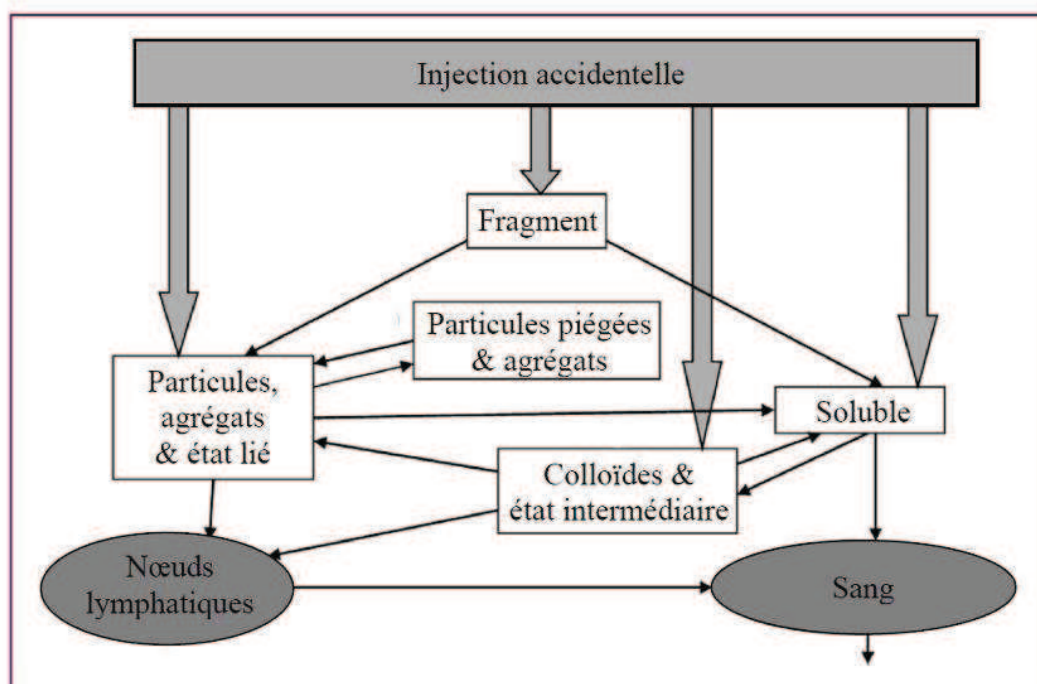


Figure 19. Le modèle biocinétique de plaie contaminée par des radionucléides ([NCRP, 2007](#))

1.2.3 Contamination par ingestion

L'ingestion est la voie principale d'exposition de la population générale, travailleurs compris, principalement en raison des traces d'U présentes dans les aliments et l'eau potable. L'eau potable étant le vecteur le plus sérieux au regard de la toxicité. En cas de contamination par voie orale, l'U est moins toxique qu'après incorporation par inhalation ou blessure. Ceci est lié à son facteur d'absorption gastro-intestinal relativement faible. Il est en moyenne de 1 à 3 % de l'apport initial, selon la solubilité du composé et l'espèce considérée ([Wrenn et al., 1985](#) ; [Leggett, 1989](#) ; [Karpas et al., 1998](#)). La CIPR a adopté un taux de transfert au niveau du tube digestif vers le sang de 2 % pour un composé soluble et de 0,2 % pour un composé peu soluble ([CIPR-69, 1995](#)). Il s'agit cependant de valeurs moyennes sachant que le taux d'absorption intestinale est directement influencé par les caractéristiques des sels d'U, leurs solubilités, la quantité absorbée et la consommation conjointe d'aliments ([Cothorn et al., 1983b](#); [La](#)

Touche *et al.*, 1987). En effet, de la spéciation des espèces uranifères présentes dans le bol alimentaire, dépendront la biodisponibilité, le taux de transfert et donc la toxicité des composés (Denison, 2004).

La Figure 20 présente le modèle de biocinétique de l'U après ingestion chez l'homme adulte proposé par la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) (CIPR-100, 2006).

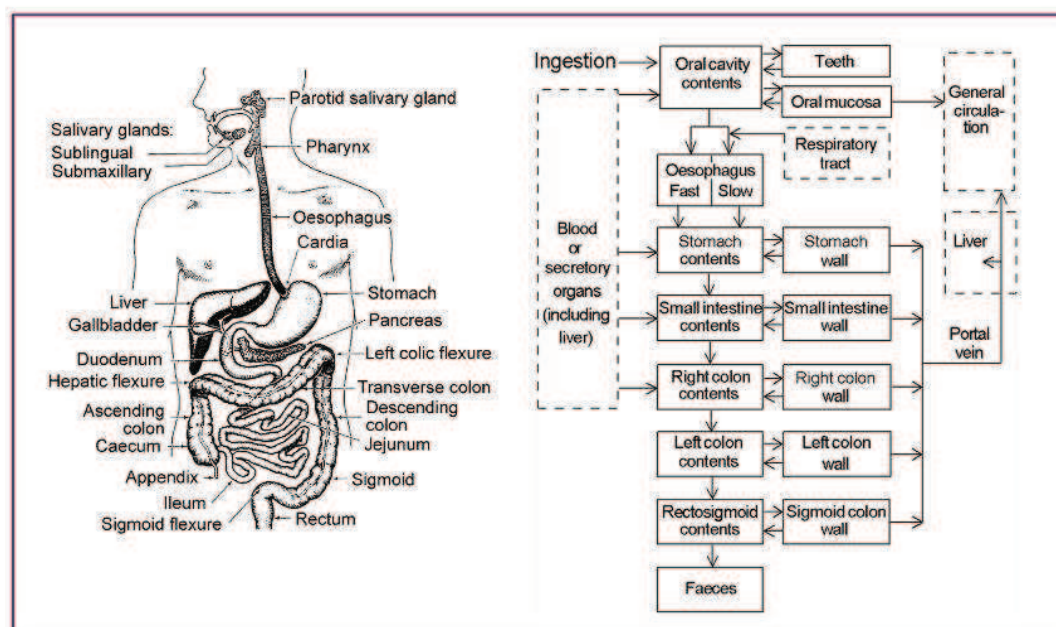


Figure 20. Le modèle biocinétique d'ingestion par l'uranium (CIPR-100, 2006)

II. Voies d'entrée, distribution, rétention et élimination de l'uranium chez l'Homme

Ce paragraphe s'attachera à présenter les données sur le devenir de l'U dans l'organisme. Les données relatives à l'entrée, au transport, à la distribution tissulaire de l'U dans les organismes ainsi qu'à son excrétion seront ainsi successivement abordées.

L'absorption, la distribution, la rétention ou l'élimination de l'U dans l'organisme sont conditionnées par différents paramètres. Ces derniers peuvent influencer sur le comportement toxique de l'U au sein des organismes. Les différents paramètres pouvant influencer sur le comportement *in vivo* de l'U, de même que sur sa toxicité seront donc développés.

II.1 Voies d'entrée de l'uranium dans l'organisme

Quel que soit le mode de contamination (inhalation, voie cutanée ou ingestion), le premier facteur qui détermine la distribution de l'U dans les tissus est la solubilité (Hengé-Napoli *et al.*, 2001). En effet, la forme physico-chimique de l'U a une influence sur la cinétique avec laquelle il atteint ses organes cibles.

Ainsi, un complexe aisément dissociable, pénétrant dans l'organisme, comme par exemple le nitrate d'uranyle, libère des ions UO_2^{2+} et diffuse très rapidement dans le plasma et les liquides extracellulaires pour ensuite se retrouver distribué dans l'ensemble de l'organisme. A l'inverse, un composé très peu soluble, tel que UO_2 par exemple, pénétrant par les mêmes voies passe très lentement dans le compartiment sanguin. La toxicité de l'U est conditionnée par sa solubilité. Les formes solubles induisent plutôt une toxicité systémique et s'accumulent principalement dans les poumons entraînant des effets toxiques tels que fibroses et cancers. En revanche, les formes insolubles favorisent une toxicité localisée au niveau du lieu de dépôt ; ils s'accumulent principalement dans les reins, où ils sont néphrotoxiques, et dans le squelette.

Les composés d'U sont ainsi classés selon trois catégories de solubilité (cf. [Tableau 5](#)) : « F » (Fast), « M » (Moderate) et « S » (Slow) (CIPR-66 1994 ; [Le Guen et al., 1998](#)).

Tableau 5. Classement de la transférabilité des principaux composés de l'U rencontrés dans l'industrie électronucléaire (CIPR-66, 1994 ; [Le Guen et al., 1998](#))

Composés de type F	Composés de type M	Composés de type S
UF_6 , UO_2F_2 , $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ $\text{UO}_7(\text{NH}_4)_2$ sulfates et carbonates d'uranyle	UO_3 UF_4 UCl_4	UO_2 , U_3O_8 autres oxydes d'uranium uranium métal

« F » (composé soluble ; diffusion rapide) : période biologique d'absorption de 10 minutes
 « M » (composé moyennement soluble ; diffusion moyennement rapide) : périodes biologiques d'absorption de 10 minutes (10 %) et de 140 jours (90 %)
 « S » (composé peu soluble ; diffusion lente) : périodes biologiques d'absorption de 10 minutes (0,1 %) et de 7 000 jours (99,9 %)

II.2 Distribution de l'uranium

Quel que soit le mode de contamination (inhalation, voie cutanée ou ingestion), l'U solubilisé plus ou moins rapidement pénètre dans le flux sanguin sous la forme d'ions uranyle UO_2^{2+} qui constitue la forme chimique la plus stable en solution ([Madic et Genet, 2001](#)). Après translocation et passage dans la circulation sanguine, l'U hydrosoluble va en grande majorité se complexer avec des ligands présents dans la circulation sanguine. En effet, les ions uranyle présents dans le plasma suite à une contamination sont associés pour environ 50 % à des ligands de faible poids moléculaire (ions citrates, ions carbonates) et les 50 % restants sont principalement associés à des protéines plasmatiques (albumine, transferrine) et secondairement à des protéines présentes à la surface des globules rouges (lipoprotéines) ([Dounce, 1949](#) ; [Chevari et al., 1968](#) ; [Durbin et Wrenn, 1976](#) ; [Durbin, 1984](#) ; [Galle, 1997](#)). La stabilité des complexes

formés entre l'U et les ions carbonates ($\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ et $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$) conduit à une augmentation de la solubilité de l'U dans le sang (Durakovic, 1999).

L'U est ensuite rapidement éliminé du compartiment sanguin (Wrenn *et al.*, 1994). En effet, vingt-quatre heures après une injection intraveineuse d'U hexavalent (VI), 99,9 % de l'U ont disparu du sang. Selon Durbin et Wrenn (1976), 40 à 60 % de l'U sont éliminés dans les urines. La quantité restante se dépose dans les deux principaux tissus cibles que sont les reins (20 à 30 %) et les os (15 à 30 %), mais aussi dans des concentrations négligeables dans d'autres organes (La Touche *et al.*, 1987 ; Kurttio *et al.*, 2005). La filtration de l'U par les reins au niveau du glomérule conduit à un appauvrissement du plasma en ce dernier, puis une fraction de l'U (VI) revient dans la circulation à partir des fluides extracellulaires. La partie liée aux protéines est sans cesse convertie au profit de la forme ultrafiltrable jusqu'à élimination de ce métal de la circulation sanguine. La rétention rénale de l'U varie en fonction inverse de l'excrétion urinaire et l'actinide déposé dans le tissu rénal s'élimine rapidement (Wrenn *et al.*, 1994). Par exemple, après une injection intraveineuse de 0,52 mg U/Kg de nitrate d'uranyle, la quantité d'U présente dans le parenchyme rénal, qui est de 40 % au terme du premier jour, n'est plus que de 7 % au vingtième jour (Cooper *et al.*, 1982).

La Figure 21 présente le modèle de biocinétique systémique de l'U chez l'homme adulte proposé par la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) (CIPR-69, 1995). Ce modèle, qui est basé sur de nombreuses données expérimentales, tient compte du recyclage de l'U entre la circulation sanguine et les organes de rétention.

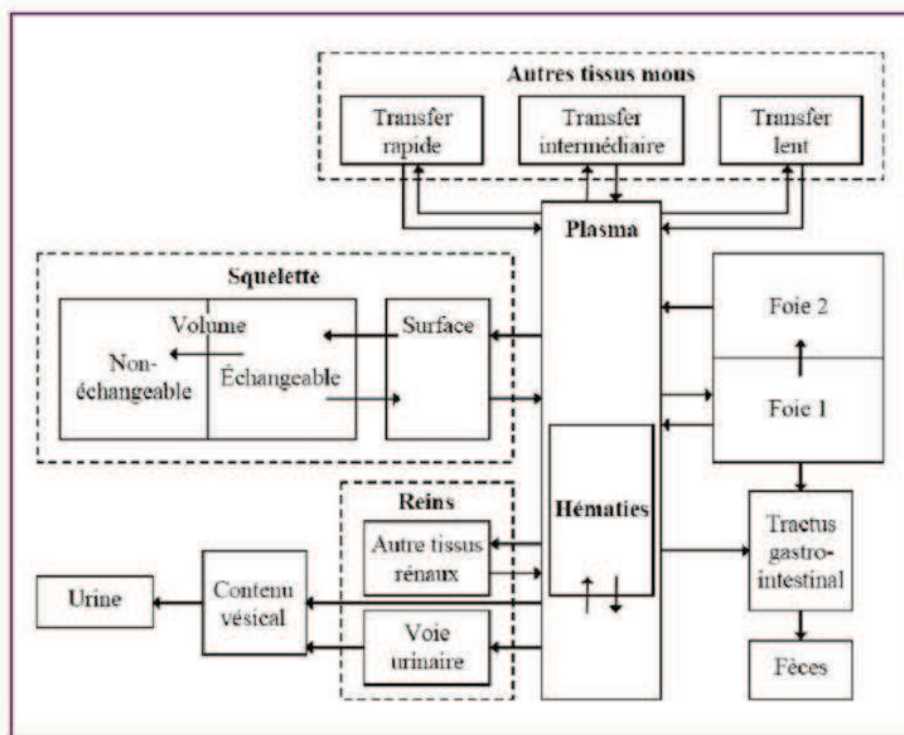


Figure 21. Le modèle biocinétique systémique de l'uranium chez l'homme adulte (CIPR-69, 1995)

II.3 Rétention dans les organes

En considérant les données de la littérature, les os et les reins sont considérés comme les principaux sites de l'accumulation et de l'action toxique de l'U (Kathren et Moore, 1986 ; La Touche *et al.*, 1987 ; Kurttio *et al.*, 2002 et 2005). Cependant, des atteintes au niveau du système reproducteur (Domingo *et al.*, 2001), du système nerveux (Pellmar *et al.*, 1999b ; McDiarmid *et al.*, 2000 ; Lestaevel *et al.*, 2005), du système rénal (Leggett, 1989), du système pulmonaire (Leach *et al.*, 1973) mais aussi au niveau du système hépatique (Hengé-Napoli *et al.*, 2001) ont été montrées ces dernières années.

Cette répartition de l'U est également observée à l'état naturel, c'est à dire sans qu'il n'y ait eu d'épisode contaminant chez un individu. Ainsi, un organisme humain adulte contient en moyenne 40 à 90 µg d'U pondéral à raison de 66 % dans le squelette, 16 % dans le foie, 8 % dans les reins et 10 % dans les autres tissus mous (WHO, 2001).

II.3.1 L'uranium et les os

Chez les mammifères, le squelette représente l'organe majeur de fixation à long terme de l'U (Wrenn *et al.*, 1985 ; Leggett, 1994 ; Hengé-Napoli *et al.*, 2001). La répartition de cet élément n'est pas uniforme dans tout le squelette. Le comportement de l'U dans le squelette est relativement similaire à celui des alcalino-terreux (tels que le calcium ou le magnésium). L'élimination de l'U stocké dans l'os est

relativement lente. En effet, en 5 jours, la moitié de l'U présent à la surface osseuse retourne au plasma et l'autre moitié est internalisée dans le volume osseux suite aux phénomènes de croissance et de remodelage osseux. La période d'élimination de l'U contenu dans ce volume osseux est de 30 jours : 75 % de la quantité éliminée retournent à la surface osseuse (d'où une partie de l'U est à nouveau relarguée dans le plasma sanguin et une autre transférée dans le volume osseux) et 25 % sont fixés dans une zone osseuse non échangeable (CIPR-69 1995 ; Métivier *et al.*, 2001). L'élimination de l'U fixé dans cette zone osseuse non échangeable vers le plasma dépend alors de la vitesse du remodelage osseux qui elle-même est âge-dépendante. Une fraction résiduelle de l'U reste piégée dans l'os pendant plusieurs dizaines d'années (Wrenn *et al.*, 1985).

II.3.2 L'uranium et les reins

Chez les mammifères et en particulier chez l'Homme, le rein est l'un des sites principaux d'accumulation de l'U et constitue la cible majeure des effets chimiotoxiques de ce radionucléide (Wrenn *et al.*, 1985 ; Leggett, 1989 ; WHO, 2001 ; Squibb *et al.*, 2005). En effet, l'U, comme les autres métaux lourds (cadmium, plomb, mercure ...), est néphrotoxique. Le mécanisme d'accumulation de l'U chez les mammifères implique une ultrafiltration, au travers du glomérule, des complexes formés dans le compartiment sanguin entre l'U et des composés de faible poids moléculaire (hydrogénocarbonates ou citrates). Ces complexes sont ensuite dissociés au contact de l'environnement acide régnant dans la lumière des tubules proximaux. La majorité de l'U va alors être excrétée dans les urines. Le reste, 20 à 30 % de la quantité initiale dans le sang, va quant à lui se lier aux cellules épithéliales de la bordure en brosse des tubules proximaux et s'y fixer à long terme (Dounce, 1949). Le temps moyen de rétention rénale est inférieur à celui de l'os, mais l'exposition du rein à l'U est continue. On estime en moyenne que 8 à 15 % de la charge corporelle en U se situe dans le rein (ATSDR, 1999 ; Craft *et al.*, 2004).

II.3.3 L'uranium et le foie

La rétention de l'U au niveau du foie est beaucoup plus faible que dans le squelette ou les reins. De nombreuses études ont démontré l'accumulation d'U dans le foie de rats après ingestion chronique de nitrate d'uranyle (Gilman *et al.*, 1998b; Paquet *et al.*, 2006), suite à l'implantation de pastilles d'U (Pellmar *et al.*, 1999a), après injection de citrate d'uranyle (Bulman *et al.*, 1980), mais également après inhalation chronique de poussière de minerai uranifère chez le Hamster Syrien (Cross *et al.*, 1981), ou encore chez le poisson après exposition via l'alimentation (Cooley *et al.*, 2000) ou via l'eau environnante (Barillet *et al.*, 2007). Par exemple, la quantité d'U retenue dans le foie après un épisode de

contamination est comprise entre 1 et 2 %, dont une grande partie est éliminée dans les premières semaines, et environ 0,1 % est retenu à plus long terme (Hengé-Napoli *et al.*, 2001). Mais cet organe particulier de l'appareil digestif a néanmoins fait l'objet d'attentions plus importantes vis-à-vis de la toxicité de l'U, notamment du fait de ses capacités de détoxification mises à contribution lors de contaminations par des xénobiotiques.

II.3.4 L'uranium et les poumons

Le poumon est le principal site de rétention de l'U en cas d'inhalation. Chez les mammifères, ce sont les composés insolubles qui posent le plus problème au niveau des poumons. En effet, ces composés vont être caractérisés par un temps de résidence notablement plus important au niveau du tissu pulmonaire que les composés solubles qui vont quant à eux être transloqués très rapidement dans le compartiment sanguin. Dans ce cas, le poumon pourrait être non seulement confronté à la toxicité chimique et particulaire, mais aussi à la toxicité radiologique qui pourrait devenir non négligeable à long terme. Cette persistance de l'U au contact des poumons et ganglions lymphatiques va alors pouvoir être à l'origine d'effets toxiques (Leach *et al.*, 1973).

II.3.5 L'uranium et le système nerveux

Chez les mammifères, il existe une barrière anatomique qui filtre et contrôle le passage des substances sanguines et les empêche de passer librement du sang vers le liquide céphalo-rachidien. Cette barrière (dite hémato-encéphalique) isole ainsi le système nerveux central du reste de l'organisme et lui permet d'avoir un milieu spécifique, différent du milieu intérieur du reste de l'organisme. La localisation histologique exacte de la barrière n'est pas connue avec précision, mais un consensus semble se former pour la situer au niveau de l'endothélium vasculaire. Des jonctions serrées entre les cellules endothéliales empêcheraient tout transfert de molécules entre les cellules, obligeant celles-ci à utiliser les canaux et les pompes disponibles sur la cellule.

Or, chez des rats ayant reçu des implants sous-cutanés d'UA (destinés à simuler une blessure), il a été montré que l'U peut franchir cette barrière hémato-méningée (Lemercier *et al.*, 2003). Il a de surcroît été montré que l'U était capable de s'accumuler de façon hétérogène dans le cerveau et le cervelet (Pellmar *et al.*, 1999b ; Lestaevel *et al.*, 2005). En effet, récemment Tournier et ses collaborateurs (2009) ont démontré que l'UA s'accumule clairement selon un gradient de concentration antéro-postérieur après inhalation unique ou répétée.

II.3.6 L'uranium et le système reproducteur

Tout comme pour le cas du cerveau, dans le testicule, on considère que les cellules proches de la lumière du tubule séminifère sont protégées des agressions toxiques, chimiques ou radioactives par la barrière hémato-testiculaire (BHT). Cependant, des études récentes chez les rongeurs suggèrent un franchissement possible de la BHT par certains radionucléides grâce à la voie physiologique fer-transferrine (Calmet *et al.*, 2003). Ces derniers pourraient alors se lier aux cellules germinales méiotiques et post-méiotiques. Les conclusions de ces études sont corroborées par les travaux de Pellmar *et al.* (1999a) selon lesquels des taux significatifs d'U ont été retrouvés dans les testicules de rats implantés avec des fragments d'UA. Des récepteurs à la transferrine étant exprimés par les cellules germinales de l'épithélium séminifère, un mécanisme analogue peut être envisagé chez l'Homme, expliquant la présence d'U dans le sperme de militaires blessés par des fragments d'U (McDiarmid *et al.*, 2000).

II.4 Élimination de l'uranium

Le rein constitue l'organe principal d'excrétion de l'U. En effet, quelles que soient la voie d'entrée et la forme chimique, 60 à 80 % de la charge systémique sont éliminés en 2 à 6 jours. La majeure partie de la quantité d'U restant dans le sang est éliminée avec une période de 30 à 350 jours (Durbin, 1984 ; Hengé-Napoli *et al.*, 2001). L'excrétion fécale de l'U présent dans le sang est négligeable puisque seulement 0,5 à 2 % sont éliminés via les selles (Hengé-Napoli *et al.*, 2001).

L'excrétion par voie fécale devient prépondérante en cas d'ingestion et d'inhalation de composés insolubles d'U. En effet, les composés insolubles ingérés ne sont pas réabsorbés par la circulation systémique au niveau du tractus gastro-intestinal et sont donc excrétés directement par la voie fécale. Concernant l'inhalation de composés insolubles d'U, une fraction substantielle des particules inhalées qui est éliminée par expiration est avalée, transférée dans le système digestif et excrétée dans les fèces (Gerber *et al.*, 1992 ; Galle, 1997).

Après son passage dans la circulation sanguine, l'U fait donc l'objet de recyclages entre le sang et les organes fixateurs.

III. Les risques sanitaires liés à une exposition interne à l'uranium

L'U présente une double toxicité : une **toxicité chimique** due à sa nature de métal lourd et une **toxicité radiologique** de par sa nature de radioélément (Galle, 1997).

La radiotoxicité se définit comme la toxicité due aux rayonnements ionisants émis par les radionucléides incorporés, sachant que les rayonnements α émis par l'U sont les plus ionisants. Tous les isotopes de l'U étant radioactifs, cet élément est considéré comme un composé potentiellement radiotoxique. La toxicité radiologique varie en fonction du degré d'enrichissement en ^{235}U (Laroche *et al.*, 2003 ; Kathren *et al.* 2008a).

En revanche, la toxicité chimique de l'U est indépendante de l'isotopie et de l'enrichissement en ^{235}U (WHO, 2001) ; elle est uniquement fonction de la quantité d'U incorporée qui est elle-même fonction de la voie d'entrée et de la solubilité de ce métal (Laroche *et al.* 2003, Kathren *et al.* 2008a et 2008b).

III.1 Le risque radiologique : radiotoxicité de l'uranium

La toxicité radiologique de l'U est due aux rayonnements ionisants issus de la décroissance physique des isotopes de l'U, ainsi que de leurs descendants. L'activité spécifique est un des paramètres qui permet d'estimer l'importance de la radiotoxicité d'un radioélément. Or, il est connu que l'activité spécifique de l'UA est faible : moins d'une particule α est émise chaque minute par μg d'UA. Il est par conséquent généralement considéré qu'en présence d'UN, et surtout en présence d'UA, l'effet radiologique est négligeable par rapport à l'effet chimique (Wrenn *et al.*, 1985 et 1987 ; Leggett, 1989). Ainsi, lors d'une contamination par de l'UN ou de l'UA, la toxicité principale de l'U est liée à sa nature chimique. C'est pourquoi l'élément important à prendre en compte est alors la quantité pondérale. Cependant, lors d'une contamination par des isotopes de l'U dont l'activité spécifique est importante (^{234}U : $2,31 \cdot 10^8$ Bq/g ; ^{233}U : $3,57 \cdot 10^8$ Bq/g), la toxicité radiologique devient significative et est par conséquent à prendre en considération. L'évaluation du risque lié à une telle contamination nécessite alors de prendre en compte l'activité en Bq en plus de la masse.

De plus, même pour des composés avec une activité spécifique faible, une toxicité radiologique peut apparaître en particulier au niveau des tissus fixant l'U pendant de longues périodes (Craft *et al.*, 2004). La distribution hétérogène de l'U dans l'organisme conduit en effet à une irradiation non uniforme ciblant certains organes. Des radiolésions peuvent ainsi apparaître au niveau de ces organes et tissus susceptibles de le stocker pendant de longues périodes. L'importance de ces lésions ainsi que leurs

conséquences telles que l'induction d'effets stochastiques (cancers ou des effets héréditaires radio-induits) dépendront alors du niveau de radiosensibilité de l'organe ou du tissu touché. Ce risque radiotoxique sera essentiellement osseux si l'U est absorbé sous une forme soluble ; il se situera au niveau des poumons et des ganglions lymphatiques lorsqu'il sera inhalé sous la forme de particules insolubles (Leach *et al.*, 1973 ; Durbin et Wrenn, 1976).

La suite de cette partie sera consacrée à l'étude de la toxicité radiologique de l'U à l'échelle des différentes cibles biologiques et organes atteints lors d'épisode de contamination.

III.1.1 Interaction des rayonnements avec les milieux biologiques

Les rayonnements ionisants sont définis comme ayant une énergie cinétique suffisante (au moins 4,3 eV, correspondant à l'énergie d'ionisation du potassium) pour arracher des électrons à la matière. Les rayonnements γ , X, β , α , etc. entrent dans cette catégorie. Ils vont produire des ionisations et des excitations des atomes constituant le milieu traversé. Le nombre et la distribution spatiale des événements produits vont conditionner les effets biologiques. Deux paramètres à l'échelle macroscopique décrivent ces interactions : la dose et le transfert d'énergie linéique (TEL). La dose est définie comme la quantité d'énergie absorbée par unité de masse du milieu et est exprimée en Gray (Gy). Le TEL est défini comme la quantité d'énergie libérée par unité de longueur, il s'exprime en $\text{keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$. C'est une caractéristique de chaque rayonnement inversement proportionnelle à leur pouvoir de pénétration au sein de la matière vivante. Pour une même énergie, plus le TEL est élevé, plus la trace est courte et ionisante par unité de longueur.

Les rayons fortement pénétrant ne dispersent que peu d'énergie au cours de leur trajet dans la matière, ils sont dits à faible TEL. Il s'agit des rayons X et γ . Le rayonnement γ du cobalt-60 a un TEL d'environ $0,5 \text{ keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$.

A l'opposé, plus un rayonnement cédera de l'énergie au milieu traversé, donc aura un TEL plus fort, moins il pénétrera en profondeur dans le tissu. Les ions lourds, les rayonnements α et certains rayonnements β sont de ce type. Une particule α de 5 MeV a par exemple un parcours de 4 cm dans l'air et $40 \mu\text{m}$ dans l'eau ou les tissus vivants.

Le mode d'action des particules lourdes à l'échelle microscopique est très différent de celui des radiations à ionisation diffuse. Les particules lourdes (α , β) ont une trajectoire pratiquement rectiligne, caractérisée par une forte densité d'ionisation localisée sur cette trajectoire en relation avec un TEL élevé. Les rayonnements à fort TEL produisent des ionisations moins dispersées et en plus grande densité

(Goodhead, 1989 et 1994; Prise *et al.*, 1994 ; Holley et Chatterjee, 1996). En revanche, les rayonnements photoniques X et γ sont déviés à chaque collision et peuvent, si leur énergie est suffisante, mettre en mouvement des électrons qui entrent en interaction avec de nombreuses molécules au sein de la cible. De ce fait, les ionisations et excitations sont diffusées de façon homogène dans toute la cible (cf. Figure 22).

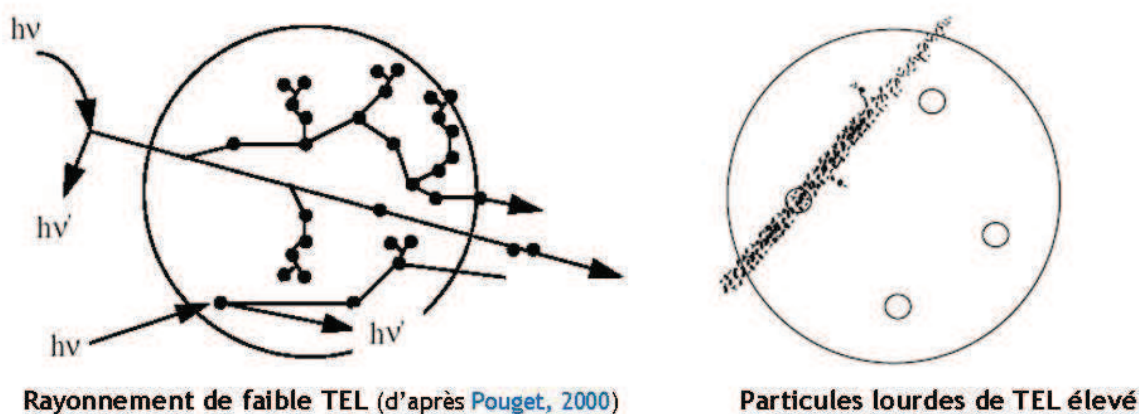


Figure 22. Représentation schématique des ionisations générées sur la trajectoire des différents rayonnements dans une cible biologique

La fréquence des cassures simple brin est estimée à de 1000 et 500 / cellule / Gy pour les rayonnements ionisants de bas TEL et de haut TEL, respectivement. De plus, les rayonnements ionisants de haut TEL induisent plus de cassures double brin que les rayonnements ionisants de bas TEL (Goodhead, 1994). Il faut aussi noter que les rayonnements ionisants de haut TEL sont connus pour induire des « sites à lésions multiples localisées » (en anglais *Locally Multiple damage site : MDS*) (Mustonen *et al.*, 1999 ; Goodhead, 1999 ; Blakely et Kronenberg, 1998).

III.1.2 Les effets radiotoxiques sur les tissus

III.1.2.a Radiotoxicité pulmonaire

Le poumon est le principal site de rétention de l'U en cas d'inhalation. Les poumons et les ganglions lymphatiques bronchiques sont les organes de stockage des composés d'U peu transférables (Métivier *et al.*, 2001). Ce sont principalement les travailleurs du cycle du combustible qui peuvent être inquiétés par le risque d'inhalation. Lors d'inhalation, les composés d'U insolubles persistent dans le système respiratoire et peuvent être responsables d'une irradiation locale et interne des poumons (Leach *et al.*, 1973). Dans les poumons, l'action radiotoxique de l'U serait avant tout cancérigène : la formation de fibroses pulmonaires et la transformation néoplasique sont les deux effets les plus connus à long terme (Leach *et al.*, 1973). Par ailleurs, l'apparition de tumeurs pulmonaires primaires malignes et bénignes a été mise en évidence sur des rats soumis à des inhalations quotidiennes d'UN (à raison de plus de 4

heures/jour, 5 jours par semaine pendant 65 semaines) (Mitchel *et al.*, 1999). Aucune différence dans la durée d'apparition des tumeurs n'a été constatée, cependant, la fréquence d'apparition des tumeurs malignes est apparue proportionnelle au débit de dose reçue.

Chez l'Homme, différentes études épidémiologiques se sont intéressées à diverses cohortes d'individus exposés à l'U : des mineurs, des victimes d'Hiroshima et Nagasaki, mais aussi des vétérans de la guerre du Golfe ou des Balkans (Kathren et Moore, 1986 ; Kathren *et al.*, 1989 ; ATSDR, 1999 ; Ritz *et al.*, 2000 ; McDiarmid, 2001 ; Tirmarche *et al.*, 2004). Cependant, dans le cas concret d'exposition du travailleur, la présence concomitante d'U et de radon (gaz radioactif et radiotoxique, issu de la chaîne de décroissance de l'U) rend difficile l'identification d'un lien de causalité unique dans la survenue de cancer, lors d'exposition à l'U (Roscoe, 1997 ; Hornung *et al.*, 1998 ; Tirmarche *et al.*, 2004).

III.1.2.b Radiotoxicité osseuse

Le tissu osseux est l'organe majeur de fixation à long terme (Ballou *et al.*, 1986 ; Leggett, 1994 ; Morrow *et al.*, 1972). En effet, 15 à 30 % de la quantité initiale dans le sang se retrouve dans les os au niveau desquels l'U peut exercer un effet radiologique.

La présence d'émetteurs α tels que les isotopes de l'U au sein du tissu osseux peut engendrer des complications graves telles que l'apparition de radionécroses de l'os (phénomène qui correspond à la rupture d'un équilibre entre la matrice et les cellules osseuses, conduisant à une perte de substance ou à la mort cellulaire). De même, l'augmentation significative de l'induction de tumeurs osseuses (Wrenn *et al.*, 1985 et 1987 ; Bosshard *et al.*, 1992 ; Ribera *et al.*, 1996) ainsi que des atteintes de la moelle osseuse peuvent survenir. Pour exemple, chez l'Homme, une dose seuil au-delà de laquelle l'incidence des tumeurs osseuses serait significativement accrue a été fixée à 0,8 Gy (appartenant au domaine des fortes doses).

III.1.2.c Radiotoxicité rénale

Le rein est l'organe principal d'excrétion de l'U, une majorité de l'U du sang est excrétée dans les urines, le reste (20 à 30 % de la quantité initiale dans le sang) se fixe sur les cellules tubulaires rénales, au niveau cortical et au niveau de la région juxtamédullaire. La rétention rénale de l'U varie en fonction inverse de l'excrétion urinaire. Le rein est considéré comme peu radiosensible mais constitue l'organe le plus touché par l'effet chimiotoxique de l'U (Diamond *et al.*, 1989 ; Leggett, 1989 ; Taulan, 2004).

L'U, comme les autres métaux lourds (Cd, Pb, Hg...), est néphrotoxique, même à faible dose d'U ingérée (28 $\mu\text{g U.L}^{-1}$ dans l'eau de boisson) (Kurttio *et al.*, 2002). La CIPR a adopté une concentration

maximale admissible en U dans les reins chez l'Homme de $3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de rein. L'inhalation d'un U insoluble a principalement des effets au niveau pulmonaire, en revanche l'inhalation d'un composé soluble exerce sa toxicité essentiellement au niveau rénal (Maynard *et al.*, 1949). Lorsque l'atteinte n'est pas trop importante et que l'exposition cesse, le rein se régénérant naturellement, la fonction rénale peut recouvrer son état initial. Toutefois, sur un plan histologique, certaines zones fibrosées persistent, indiquant un renouvellement imparfait de l'épithélium (Wrenn *et al.*, 1985 ; Leggett, 1989).

III.1.2.d Radiotoxicité neurologique

Les études sur le système nerveux sont rares et il a fallu attendre les derniers conflits (Golfe, Kosovo, Balkans, ...) et l'exposition de soldats à l'U appauvri au cours des combats pour susciter un regain d'intérêt. Dans certaines conditions d'expositions chroniques, l'U peut atteindre le système nerveux central de rats (Gilman *et al.*, 1998 a, b, c ; Pellmar *et al.*, 1999b). De nouvelles informations relatives au comportement de l'U vis-à-vis du système nerveux sont apportées dans le travail de Houpert et ses collaborateurs (Houpert *et al.*, 2005).

Après exposition chronique à de l'U enrichi ou appauvri (ingestion eau de boisson contaminée), les effets sur le comportement ainsi que sur le cycle sommeil-éveil ont été étudiés. Les rats exposés pendant six semaines à de l'UE (4 % en ^{235}U par eau de boisson) ont accumulé deux fois plus d'U dans des zones cérébrales telles que l'hippocampe, l'hypothalamus et les glandes surrénales comparé aux individus exposés à de l'UA. Cette accumulation semble en outre être corrélée avec une augmentation de la durée du sommeil paradoxal, une réduction des capacités relatives à la mémorisation de l'environnement spatial ainsi qu'une anxiété accrue. En effet, les trois sites d'accumulation précédemment mentionnés sont connus pour être impliqués dans les processus comportementaux répertoriés comme étant affectés. Ainsi, cette étude souligne que l'hippocampe est impliqué dans la mémoire de l'environnement spatial, de plus l'axe "hypothalamus - hypophyse - glandes surrénales" intervient dans la gestion du cycle sommeil-éveil ainsi que dans les comportements anxieux. L'exposition à de l'UA, dans des conditions comparables, n'a pas induit d'effets comparables à ceux-ci, suggérant que l'activité radiologique est à leur origine. Les mécanismes par lesquels l'U induit de tels effets restent encore à élucider.

III.1.2.e Radiotoxicité et reproduction

Les lésions causées par l'irradiation des organes de la reproduction peuvent entraîner deux types d'effets : la mort cellulaire, avec une diminution transitoire ou définitive de la fertilité, ou des mutations

dans les cellules germinales pouvant être transmises lors de la fécondation et se manifester en tant que désordre héréditaire chez les descendants de l'individu exposé.

Une toxicité de l'U sur le développement et la reproduction a été observée après ingestion ou injection (Arfsten *et al.*, 2001 ; Domingo, 2001) principalement chez la souris : diminution de la fertilité, toxicité fœtale et embryonnaire, baisses significatives du poids des fœtus (Bosque *et al.*, 1993). L'induction d'aberrations chromosomiques dans les cellules germinales a été observée chez des souris mâles exposées par injection de fluorure d'uranyle contenant de l'UE, au niveau des testicules (Hu et Zhu, 1990).

Même si le risque d'effets héréditaires radio-induits n'est pas au premier plan des risques des rayonnements et si les niveaux de contamination par des actinides rendent très improbable l'observation d'effets sur la fertilité, certaines questions relatives aux conséquences sur la reproduction restent en suspens.

III.1.2.f Radiotoxicité sur les autres organes

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

Une relation dose-réponse a été observée pour des cancers des voies aérodigestives supérieures chez des travailleurs du nucléaire exposés de manière chronique à des radionucléides, principalement l'U et les produits de fission (Ritz *et al.*, 2000). Une augmentation de mortalité, chez les mineurs d'U, a pu être observée pour des cancers tels que les cancers de l'estomac, du rectum ... (Hornung *et al.*, 1995 ; Laurier *et al.*, 2001). Divers types de cancers sont augmentés après exposition à de faibles doses de radiations ionisantes (Cardis *et al.*, 2005). Un excès de mélanome et de cancer du sein a été relevé chez des travailleur(e)s du nucléaire (Telle-Lamberton *et al.*, 2004). Néanmoins, ces résultats ne sont pas associés à la radiotoxicité de l'U mais à celle du radon présent dans l'environnement professionnel de ces individus.

III.2 Le risque chimique : chimiotoxicité de l'uranium

L'action chimique de tous les isotopes et mélanges isotopiques de l'U est identique et indépendante de l'activité spécifique. Ainsi la toxicité chimique de l'UN, UA et UE est identique. Du fait de ses caractéristiques chimiques de métal lourd, en termes de toxicologie, l'U doit être considéré comme

les autres éléments de cette catégorie. Les métaux lourds (Cd, Pb, Hg...) peuvent induire un grand nombre de manifestations toxiques au niveau de nombreux organes tels que le rein, le foie, l'intestin, les os, le système reproducteur, le système nerveux etc.

Cette partie sera dédiée à l'étude de la chimiotoxicité de l'U au niveau des différents tissus biologiques et organes atteints lors d'épisodes de contamination.

III.2.1 Interaction de l'uranium avec les tissus biologiques

III.2.1.a Interaction de l'uranium avec le noyau cellulaire

Des études ont démontré la capacité de l'U à se fixer aux acides nucléiques. Cette propriété a été exploitée très tôt pour réaliser des marquages spécifiques de structures contenant des acides nucléiques. L'utilisation d'acétate d'uranyle aqueux en microscopie électronique a permis d'obtenir des marquages beaucoup plus fins de structures contenant des acides nucléiques (Huxley et Zubay, 1961). Cela révèle aussi la capacité qu'a l'atome d'U à se fixer aux acides nucléiques et donc à l'ADN.

D'autres études ont montré que l'U est capable d'atteindre et d'interagir avec le noyau cellulaire pour finalement se lier à l'ADN (Mollegaard *et al.*, 1994). En effet, les ions métalliques sont très importants pour faciliter le repliement des acides nucléiques comme on peut l'observer par exemple lors de la jonction de l'ADN pour adopter une conformation en X pendant le mécanisme de recombinaison. Les auteurs ont montré que les ions uranyles, comme d'autres ions métalliques, possèdent un site de liaison de haute affinité localisé au centre de cette jonction de l'ADN.

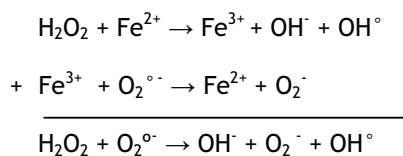
Enfin, toujours en relation avec l'interaction au noyau cellulaire, Hartsock et ses collaborateurs (2007) mettent en évidence la capacité qu'a l'U à inhiber directement la fonction des protéines se liant à l'ADN. Les dysrégulations des protéines de transcription et de réparations de l'ADN contenant des conformations en doigt de zinc, ont été proposées comme étant un des mécanismes potentiels des effets toxiques de l'U.

III.2.1.b L'uranium et le stress oxydant

Très tôt Taqui Khan et Martell (1969) ont décrit la capacité de l'U à induire la formation de radicaux hydroxyles en présence de peroxyde d'hydrogène. Les résultats de cette étude ont ensuite été corroborés par les travaux d'Hamilton et ses collaborateurs (1997). Récemment, le schéma réactionnel de ce phénomène a été décrit, basé sur un mécanisme d'oxydoréduction de type Fenton.

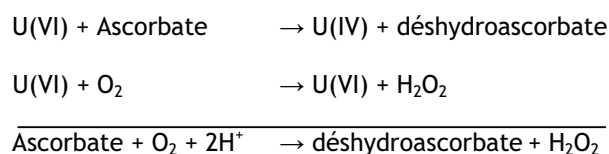
En effet, tout comme certains métaux de transition (notamment Fe^{2+} et Cu^{2+}), l'U serait susceptible d'induire une réduction du peroxyde d'hydrogène intracellulaire, induisant ainsi la formation

d'un ion hydroxyde (OH⁻) mais également d'un radical hydroxyle (Miller *et al.*, 2002a). Cette réaction d'oxydoréduction est alors tout à fait similaire à la réaction de Fenton qui, dans le cas du fer, se décompose ainsi :



Dans le cas de l'U, Yazzie *et al.* (2003) suggèrent que la première des deux réactions initiées serait la suivante : $\frac{1}{2} \text{U(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \frac{1}{2} \text{U(VI)} + \text{HO}^\circ + \text{HO}$.

La seconde étape (de réduction du métal) assurerait ensuite le passage de la forme U(VI) en U(IV) sous l'action d'agents réducteurs tel que l'ascorbate. Ce mécanisme, décrit par différents auteurs (Miller *et al.*, 2002a ; Yazzie *et al.*, 2003), serait défini par le schéma réactionnel suivant :



Dans ce schéma réactionnel, l'ascorbate (c'est-à-dire la vitamine C) et le dihydrogène servent de catalyseurs à la réaction faisant passer alternativement l'U de la forme U(VI) à U(IV) puis U(IV) à U(VI) selon un cycle libérant du peroxyde d'hydrogène dans le milieu. Pourahmad *et al.* (2006) proposent le même mécanisme de réduction de l'U (VI) en U (IV) par le biais d'autres agents cellulaires, notamment le système d'oxydoréduction formé par l'isoforme 2E1 du cytochrome P450 (CYP2E1), sa réductase (la NADPH dépendante cytochrome P450 réductase) et une molécule clé du système antioxydante cellulaire : le glutathion sous sa forme réduite (GSH) (Pourahmad *et al.*, 2006).

Il s'établirait donc un cycle d'oxydoréduction de l'U, successivement présent sous les formes U(VI) et U(IV), à l'origine de la libération dans le milieu intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène ou le radical hydroxyle. Cette surproduction d'espèces réactives de l'oxygène pourrait donc être à l'origine d'un stress oxydatif cellulaire dont pourraient résulter des réactions d'oxydation, d'hydroxylation, de désamination, de réduction, de rupture de chaînes carbonées, de polymérisation, etc. dont les macromolécules telles que les protéines, les phospholipides membranaires et les acides nucléiques sont les cibles principales (Ribera *et al.*, 1996).

III.2.1.c Interaction de l'uranium avec les protéines

Outre les dommages oxydatifs potentiellement subis par les protéines, l'U peut interagir directement sur les protéines. En effet, l'U a été décrit comme étant capable de se fixer *in vitro* à différentes protéines du sérum sanguin (telles que la transferrine, la céruloplasmine ou encore l'hémopexine) (Vidaud *et al.*, 2005) ainsi qu'aux lipoprotéines du sérum sanguin. L'ion uranyle UO_2^{2+} , est également capable de diminuer l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique et de l'ATP (Nechay *et al.*, 1980 ; McQueney et Markham, 1995) ainsi que dans la signalisation cellulaire (Nathanson et Bloom, 1976). De plus, la modification de l'activité enzymatique de certains cytochromes P450, au niveau pulmonaire mais aussi hépatique, a également été observée suite à l'inhalation de dioxyde d'U (Pasanen *et al.*, 1995).

III.2.2 Les effets chimiotoxiques sur les tissus

III.2.2.a L'uranium et les poumons

Après inhalation, les particules d'U s'accumulent dans les poumons et les ganglions lymphatiques (Leach *et al.*, 1970 et 1973 ; Morrow *et al.*, 1966), surtout s'il s'agit d'un U insoluble. L'effet de la solubilité du composé inhalé sur sa toxicité a été montré pour d'autres métaux. Par exemple, chez le rat, une exposition chronique par inhalation d'oxyde de nickel, insoluble, augmente l'incidence de cancer du poumon contrairement à une exposition à du sulfate de nickel, soluble (Dunnick *et al.*, 1995). Un autre paramètre, qui peut influencer la toxicité d'un composé inhalé, est le « type » d'exposition. Les conséquences d'une inhalation aiguë ou chronique pourraient être différentes. En effet, une étude montre, qu'après une exposition chronique par inhalation à UO_2 , la clairance pulmonaire est différente de celle observée après une exposition aiguë avec la même concentration de particules (Morrow *et al.*, 1966). La réaction de l'organisme à une exposition pourrait donc dépendre du type d'exposition.

Plus précisément, chez l'homme, après inhalation et dépôt de particules d'U au niveau du poumon, celles-ci atteignent principalement deux cibles cellulaires : les macrophages et les cellules épithéliales (Schins et Borm, 1999 ; Monleau *et al.*, 2006b). Les cellules épithéliales peuvent interagir directement avec les particules déposées et ceci peut entraîner des dommages réversibles ou irréversibles de l'épithélium (Schins et Borm, 1999). Les macrophages sont impliqués dans l'épuration des particules d'U et dans leur rétention dans le compartiment alvéolaire (Tasat et De Rey, 1987). Les particules d'U sont phagocytées par les macrophages, suivies d'une accumulation importante au sein des lysosomes (Berry *et al.*, 1997 ; Morris *et al.*, 1989) à l'origine de la formation de cristaux de phosphate et d'U (Hengé-Napoli *et al.*, 1996, Hengé-Napoli *et al.*, 1998). La présence de ces cristaux pourra ensuite induire des

effets délétères pour les cellules qui les contiennent, à l'origine de nécrose. Concernant l'épithélium, des phénomènes d'inflammation pourront être déclenchés par la présence d'U, pouvant induire des fibroses (phénomènes de cicatrisation anormale liés à une augmentation de la prolifération des fibroblastes et à une production excessive de composants de la matrice extracellulaire), des nécroses (ATSDR, 1999), de même qu'une prolifération cellulaire anormale (carcinomes, adénomes) (Leach *et al.*, 1970 et 1973 ; Mitchel *et al.*, 1999).

Des études épidémiologiques ont été conduites sur des individus exposés spécifiquement à des substances. Pour avoir des données sur des populations exposées plus particulièrement à l'U, elles s'effectuent donc plutôt sur des cohortes de travailleurs de l'industrie nucléaire : mineurs d'U et travailleurs du cycle du combustible (Tirmarache *et al.*, 2004). Les études internationales sur les mineurs d'U 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 radio-exposition due au radon (Archer *et al.*, 1998 ; Baysson *et al.*, 2004 ; Hornung, 2001). Dans le cas des études sur les travailleurs exposés à l'U du cycle du combustible, les résultats montrent une mortalité par cancer relativement hétérogène. La plupart des cohortes suivies sont exposées à des radiations externes, peu de travaux suivent des travailleurs exposés par contamination interne ; de plus, les différents types d'exposition sont souvent concomitants. Certaines recherches sur des travailleurs exposés à l'U, prenant en compte la contamination interne, observent des excès de cancers du poumon (Checkoway *et al.*, 1988 ; Ritz, 1999). Une étude spécifie que la contamination des travailleurs provient de l'inhalation de composés uranifères et montre une augmentation de la mortalité par cancers du larynx, par des maladies respiratoires et par pneumonies (Dupree *et al.*, 1987). Mais dans la plupart des études épidémiologiques, aucun effet aggravant n'est trouvé par rapport à la population non exposée : le contraire est même observé et est appelé « l'effet du travailleur sain » (healthy worker effect) (McGeoghegan et Binks, 2000 ; Rogel *et al.*, 2005 ; Tirmarache *et al.*, 2004 ; Tokarskaya *et al.*, 1997).

III.2.2.b L'uranium et les reins

Le rein, organe de stockage à court terme de l'U (Le Guen *et al.*, 1998), est généralement reconnu comme étant le siège de la toxicité chimique de l'U (Diamond *et al.*, 1989 ; Leggett, 1989 ; Taulan, 2004). En effet, l'intense réabsorption qui a lieu au niveau des cellules tubulaires proximales du rein conduit à une accumulation d'U au niveau de ces cellules. Si la concentration en U y est massive, il provoque des lésions membranaires qui entraînent la mort des cellules concernées, des changements morphologiques des structures rénales et des anomalies fonctionnelles du rein, notamment au niveau des phénomènes de

réabsorption (Diamond *et al.*, 1989 ; Hengé-Napoli *et al.*, 2001 ; Bailey *et al.*, 2002 ; Banday *et al.*, 2008 ; Zhu *et al.*, 2009). A plus faible concentration, l'U provoque la modification du métabolisme des cellules. Dans ce cas, les conséquences ne se situent plus au niveau de la structure et de la fonction du rein mais au niveau du fonctionnement de ces cellules (Bailey *et al.*, 2002). La sévérité et la réversibilité des lésions dépendent non seulement de la concentration en U dans les reins, mais également du temps d'exposition (Souidi *et al.*, 2009). De nombreuses études sur des mammifères ont montré que les effets chimiotoxiques de l'U sur les reins sont très variables d'une espèce à l'autre et qu'ils peuvent aller jusqu'à la mort des sujets. Cependant, l'homme semble moins sensible à la toxicité de l'U que les autres mammifères étudiés (Kathren *et al.*, 2008a).

La Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) a recommandé une concentration maximale admissible en U de $3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de rein, valeur au-delà de laquelle se manifestent des effets néphrotoxiques (CIPR-2, 1959). Cependant, cette valeur qui a été déterminée par conversion d'une valeur limite d'exposition aux rayonnements ne reflète pas réellement la toxicité chimique de l'U et elle est aujourd'hui très discutée. En effet, des effets néphrotoxiques de l'U chez le rat ont été constatés à des concentrations en U dans les reins bien inférieures (de l'ordre de $1,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Diamond *et al.*, 1989 ; Bailey *et al.*, 2002).

III.2.2.c L'uranium et les os

Très peu d'études ont évalué les effets de l'U sur le tissu osseux alors qu'il en est le principal site d'accumulation à long terme (Leggett, 1994 ; Morrow *et al.*, 1982 ; Pellmar *et al.*, 1999a).

In vitro, il a été montré que l'U est capable d'induire une transformation néoplasique d'ostéoblastes, cellules jouant un rôle important dans la résorption de l'os (Miller *et al.*, 2001).

In vivo, des contaminations aiguës par injection de nitrate d'uranyle (Guglielmotti *et al.*, 1984 ; Ubios *et al.*, 1991) ou chroniques (Diaz Sylvester *et al.*, 2002 ; Ubios *et al.*, 1991), par injection de nitrate d'uranyle ou implantation sous-cutanée de poudre de UO_2 , induisent une diminution du taux de formation de l'os et une augmentation du taux de résorption chez des rats. Ces données suggèrent que l'U pourrait contribuer à l'ostéoporose.

Chez l'homme, une augmentation du turnover de l'os, particulièrement une augmentation de la résorption de l'os, a été associée à l'exposition à de l'UN via l'eau de boisson (Kurttio *et al.*, 2005).

III.2.2.d L'uranium et le système nerveux

Des études menées sur les effets de l'U sur le système nerveux ont été entreprises très tôt. Il est désormais admis qu'il existe un transfert de l'U à travers la barrière hémato-encéphalique (Lemerrier *et al.*, 2003), en revanche le mécanisme mis en place n'est à ce jour pas encore bien défini. En effet, une accumulation d'U dans le cerveau a été mise en évidence suite à de nombreuses modalités d'exposition : injection intra péritonéale (Barber, 2005), ingestion via l'eau de boisson (Bussy *et al.*, 2006 ; Houpert *et al.*, 2007), inhalation répétée ou unique (Monleau *et al.*, 2005 ; Tournier *et al.*, 2009) ou encore après implantation intramusculaire (Fitsanakis *et al.*, 2006 ; Pellmar *et al.*, 1999). Quelle que soit la voie d'exposition, la quantité d'U retenue dans le cerveau est faible (Houpert *et al.*, 2007 ; Pellmar *et al.*, 1999b). D'une manière générale, la répartition de l'U dans les différentes structures cérébrales est assez hétérogène et varie selon la voie d'exposition. Après ingestion ou injection, on relève un taux d'U plus élevé dans le striatum (implique dans la coordination motrice) et l'hippocampe (implique dans la mémoire) que dans les autres structures (Barber *et al.*, 2005 ; Houpert *et al.*, 2007). En revanche, après inhalation unique (Tournier *et al.*, 2009) ou répétée, l'UA s'accumule clairement selon un gradient de concentration antéropostérieur. De plus, cette dernière étude a démontré l'existence d'un passage direct de l'U des cavités nasales vers le cerveau s'ajoutant au transfert depuis la circulation sanguine (Tournier *et al.*, 2009).

Chez l'Homme, la majeure partie des études ont été menées sur des individus exposés de façon chronique à l'U. C'est notamment le cas de personnes travaillant dans le secteur de l'industrie nucléaire (mineurs par exemple). Ces études ont notamment permis de montrer l'existence de perturbations comportementales telles que des états de dépression ou d'agitation (Howland, 1948) ou l'incidence accrue de tumeurs ou de cancers du cerveau et du système nerveux central (ATSDR, 1999). Une autre "population à risque" qui a été largement sollicitée lors d'études des effets neurotoxiques de l'U a été constituée par les soldats exposés aux poussières ou aux éclats générés par l'explosion d'armes constituées d'UA. Ces études, notamment portées sur les effets neuropsychiatriques, ont démontré une relation statistiquement significative entre un taux d'U élevé dans l'excrétion urinaire et une diminution des performances vis à vis de tests informatisés (McDiarmid *et al.*, 2000). Cependant cette relation n'est pas restée significative sur une période d'étude plus longue (McDiarmid *et al.*, 2004 ; McDiarmid *et al.*, 2006).

III.2.2.e L'uranium et le système reproducteur

La question des effets possibles d'une contamination par l'U sur la fonction de reproduction a fait l'objet d'un grand intérêt ces dernières années. De nombreuses publications sont ainsi apparues dans la

littérature relative à la toxicité de l'U vis-à-vis des mammifères. Pour référence, nous pouvons ainsi citer les travaux de synthèse de [Domingo \(2001\)](#) et [Arfsten et ses collaborateurs \(2001\)](#).

Concernant les effets toxiques liés à cette présence d'U au niveau des systèmes reproducteurs, des altérations des cellules de Leydig (cellules de soutien dans les testicules) ont été rapportées chez des souris mâles contaminées en U par le biais de leur eau de boisson ([Llobet et al., 1991](#)). De même, des études menées chez des rats mâles exposés à l'U par le biais d'implants sous-cutanés ([Arfsten et al., 2005 et 2006](#)) ont montré des effets sur le succès reproducteur et certains paramètres relatifs à la qualité du sperme (concentration et mobilité). De plus, des taux significatifs d'U ont été retrouvés dans les testicules de rats implantés avec des fragments d'UA ([Pellmar et al., 1999a](#)).

En conséquence de ces atteintes des systèmes reproducteurs, les paramètres de la reproduction (fécondité, fertilité) peuvent être affectés. Ainsi, une baisse du nombre de portées et du nombre de nouveau-nés par portée ont été rapportés dès 1949 suite à l'ingestion chronique de nitrate d'uranyle par différentes espèces animales ([Maynard et al., 1953](#)). D'autres études ont permis de compléter ces observations, démontrant notamment une diminution de la fertilité ainsi qu'une toxicité fœtale et embryonnaire chez la souris ([Bosque et al., 1993](#)). Par ailleurs, une étude menée chez des rats contaminés à l'UA a démontré que ce dernier n'a pas d'influence sur l'intensité d'ovulation. En revanche, l'UA affecterait la qualité des ovocytes ([Feugier et al., 2008](#)). In vitro, [Arnault et ses collaborateurs](#) constatent également une altération de la maturation des ovocytes de la souris 72 heures après l'ajout d'1 mM d'acétate uranyle dans le milieu ([Arnault et al., 2008](#)).

Chez le personnel féminin du nucléaire, une augmentation de fausses couches a été observée sans relation possible avec le niveau de contamination par l'U ([Doyle et al., 2000](#)).

III.2.2.f L'uranium et effets sur le développement

Les effets sur la descendance d'animaux exposés à de l'UA ont été étudiés sur des femelles gestantes dans lesquelles des fragments d'UA avaient été implantés. Pour une exposition pendant toute la durée de la gestation (20 jours), il a ainsi été montré que l'UA peut franchir la barrière placentaire et affecter le développement d'embryons chez le rat ([Pellmar et al., 1999](#)). De plus, un retard dans le développement d'embryons de souris mis en culture en présence d'U préalablement à leur implantation a pu être mis en évidence par [Kundt et ses collaborateurs \(2000\)](#).

Des effets tératogènes ont également été observés au niveau de la descendance de rats femelles contaminées par ingestion pendant la durée de la gestation ([Domingo et al., 1989a](#)). Pour la plus forte dose testée, une mortalité embryonnaire a été observée. En deçà de cette dose, la toxicité fœtale s'est

traduite par une diminution du poids et de la taille du fœtus associée à des malformations et des perturbations dans les différents stades de développement. Dans une seconde étude, ces mêmes auteurs ont évalué l'effet d'un gavage de femelles gestantes sur les dernières étapes du développement fœtal, la parturition, la lactation et la viabilité postnatale (Domingo *et al.*, 1989b). La viabilité des nouveau-nés (baisse de la taille des portées, de la viabilité et de lactation) a été affectée. La même équipe a évalué les effets sur la survie postnatale chez la souris après contamination chronique via l'eau de boisson jusqu'au sevrage des portées (Paternain *et al.*, 1989). Pour les doses élevées, le nombre de fœtus vivants, la croissance et le développement des nouveau-nés ainsi que leur survie ont été affectés.

III.2.2.g L'uranium et le compartiment sanguin

Comme mentionné précédemment (Partie B. Paragraphe I.2), quelle que soit la porte d'entrée empruntée par l'U lors d'épisodes de contamination, celui-ci va être véhiculé au travers de l'organisme par le sang.

Peu d'études ont porté sur l'évaluation des effets de l'U sur le compartiment sanguin. Néanmoins, il a notamment été observé, chez des rats exposés par inhalation à des composés uranifères, une diminution du nombre de cellules sanguines ainsi que de la charge en hémoglobine (Dygert, 1949). De même, des perturbations de paramètres hématologiques ont été observés sur des bovins élevés dans des lieux contaminés en UA à la suite de combats dans les Balkans (Jelka *et al.*, 2005).

Chez l'Homme, des effets génotoxiques ont été observés sur les cellules du sang. Une augmentation de la fréquence des micronoyaux a ainsi récemment été rapportée dans les lymphocytes du sang de personnes vivant dans des zones de Bosnie-Herzégovine contaminées par l'UA (Kronic *et al.*, 2005). Néanmoins, les particularités de ces populations rendent l'extrapolation des résultats à d'autres populations difficiles. Chez les mineurs d'U, aucune relation entre le risque de leucémies et une exposition prolongée dans les mines n'a pu être démontrée. Pourtant des études montrent un lien entre une exposition à l'U ou au radon et l'augmentation des aberrations chromosomiques dans les cellules du sang (Brandom *et al.*, 1972 ; Martin *et al.*, 1991 ; Meszaros *et al.*, 2004 ; Popp *et al.*, 2000). Des dommages de l'ADN et des aberrations chromosomiques sont trouvés dans les cellules sanguines de travailleurs exposés à des composés uranifères et, de manière chronique, à de faibles doses de radiations ionisantes (Garaj-Vrhovac et Kopjar, 2003 ; Prabhavathi *et al.*, 2000 ; Touil *et al.*, 2002). La disparition de l'U du compartiment sanguin est le résultat combiné du passage vers les liquides extracellulaires, de la filtration au niveau du glomérule rénal et du dépôt dans le squelette. L'U solubilisé dans le sang est ensuite excrété très rapidement par les urines (40 à 60 % en 24 heures) et fixé sur les organes cibles.

III.2.2.h L'uranium et les perturbations métaboliques

Des études menées sur des rats ont également mis en évidence que plusieurs voies métaboliques majeures de l'organisme étaient des cibles de l'U après des ingestions chroniques étalées sur plusieurs mois.

Ainsi, le métabolisme du fer est modifié par l'U (Donnadieu-Claraz *et al.*, 2007 ; Berradi *et al.*, 2008). Les modifications du métabolisme du fer semblent provenir initialement des effets néphrotoxiques de l'U. Une étude expérimentale récente a mis en évidence que les reins des animaux contaminés par l'UA ont des lésions glomérulaires et interstitielles plus fréquentes et plus étendues. Cela conduit à une augmentation d'agrégats de fer et à des modifications au niveau tissulaire de plusieurs molécules impliquées dans le métabolisme de ce métal, telles que la céruloplasmine, enzyme antioxydante, et un transporteur apical du fer, la DMT1 (*Divalent Metal Transporter*). Ces modifications, notées au niveau tissulaire, sont associées à une légère anémie d'origine rénale caractérisée par une diminution du nombre de globules rouges et du taux sanguin d'hémoglobine et l'hématocrite. Cet effet de l'U est en accord avec les diminutions du taux d'hémoglobine et de l'hématocrite mesurés chez les vétérans de la guerre du golf (Squibb *et McDiarmid*, 2006).

Par ailleurs, plusieurs études récemment publiées montrent des modifications induites par l'U sur le métabolisme de la vitamine D (Tissandié *et al.*, 2006 et 2007), des xénobiotiques (Gueguen *et al.*, 2006, 2007), des hormones stéroïdiennes (Grignard *et al.*, 2008) et du cholestérol (Racine *et al.*, 2009). Ces métabolismes possèdent comme points commun l'implication de cytochromes P450 qui interviennent dans les voies de synthèses et catabolisme (Souidi *et al.*, 2005). Une analyse de ces publications permet maintenant de considérer les cytochromes P450 et les récepteurs nucléaires régulant ces enzymes comme des cibles privilégiées de l'U. Néanmoins, à l'heure actuelle, ces études réalisées sur rats adultes, à dose relativement forte (40 mg·L⁻¹), n'ont mis en évidence que des variations des taux tissulaires et sanguins des paramètres cités ci-dessus seulement, sans induire de réel effet pathologique.

IV. La protection contre les risques sanitaires liés à une exposition interne à l'uranium

IV.1 La radioprotection

La sécurité nucléaire fait appel à plusieurs disciplines telles que la sûreté nucléaire, la radioprotection, la protection physique contre les actes de malveillance, la sécurité civile en cas

d'accident et la gestion des transports de matières dangereuses (dont les matières radioactives), ainsi qu'à tout ce qui a trait à l'hygiène et à la sécurité du travail. Du fait du risque radiologique existant sur les installations nucléaires, il convient de prendre des dispositions visant d'une part à prévenir les accidents et en limiter les conséquences - c'est le domaine de la sûreté nucléaire - et d'autre part à mesurer et limiter les doses reçues par les travailleurs et la population - c'est le domaine de la **radioprotection**. La radioprotection vise à protéger l'homme de l'ensemble des dangers que l'exposition aux rayonnements ionisants ou à une contamination par des produits radioactifs est susceptible d'entraîner. Elle concerne donc la protection de la santé des travailleurs et du public, que ce soit en situation normale ou accidentelle. Depuis 1928, la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) rassemble des médecins, des physiciens, des biologistes ..., de tous pays. C'est une organisation internationale non gouvernementale autonome. A partir de données scientifiques, elle émet des recommandations en matière de radioprotection, souvent reprises par les réglementations propres à chaque État. Les principes fondamentaux des recommandations de la CIPR sont : la justification des pratiques utilisant les rayonnements ionisants, l'optimisation de la radioprotection et la limitation des expositions individuelles. L'Union Européenne a repris les avis de la CIPR dans ses propres normes ou directives. Celles-ci ont été transposées dans la réglementation française relative à la protection contre les rayonnements ionisants. En France, les normes légales de radioprotection prescrivent des limites de dose, hors radioactivité naturelle et applications médicales et correspondent à un risque supposé acceptable.

Elles comprennent (décrets n°2003-296 et n°2001-215) ([CIPR Publication 60, 1990](#)) :

→ une limite de dose efficace de 1 mSv/an pour le public et de 6 mSv/an (personnel de catégorie B) ou 20 mSv/an (personnel de catégorie A) pour les personnes directement affectées aux travaux sous rayonnements ionisants (industrie nucléaire, radiologie médicale). La dose efficace est une grandeur mesurant l'impact sur les tissus biologiques d'une exposition à un rayonnement ionisant. Elle se définit comme la dose absorbée corrigée d'un facteur sans dimension prenant en compte la dangerosité relative du rayonnement considéré et la sensibilité du tissu irradié (unité légale : le sievert, Sv).

→ des limites de dose équivalente à l'organe de 150 mSv pour le cristallin et 500 mSv pour la peau (1 cm²) et les mains en ce qui concerne les travailleurs exposés, et de 15 mSv pour le cristallin, 50 mSv pour la peau et les mains chez les personnes du public.

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

→ une formation adaptée sur la nature des risques et les précautions à prendre,

- ➔ des moyens de radioprotection collective ou individuelle adaptés au risque et au poste de travail,
- ➔ des limites pour l'exposition professionnelle,
- ➔ un suivi et un contrôle dosimétrique,
- ➔ une surveillance médicale.

IV.2 La protection contre le risque chimique

L'importance relative des deux toxicités chimiques et radiologiques de l'U dépend de l'enrichissement en isotope 235, de la solubilité des composés et du mode d'incorporation (Laroche *et al.*, 2003, Kathren *et al.*, 2008a et 2008b). La toxicité chimique est prépondérante pour des types d'U dont l'activité spécifique est faible tel que l'UA et l'UN (c'est-à-dire avec un faible degré d'enrichissement). Pour un rejet impliquant de l'UN ou de l'UA, la toxicité chimique est donc particulièrement à prendre en compte. Des valeurs guides ont été éditées pour intégrer cette toxicité. Les valeurs réglementaires des substances chimiques sont généralement tirées des valeurs toxicologiques de références (VTR) ou de valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP) proposés par divers organismes dont l'ATSDR, l'EPA et l'OEHHA américain, le RIVM néerlandais, l'AFSSET français et l'OMS. Ces valeurs réglementaires visent à prévenir l'apparition d'effets nocifs consécutifs à la toxicité chimique des éléments.

Il n'existe pas, contrairement à ce que l'on peut trouver dans d'autres pays, de VLEP indicative ou contraignante française pour les expositions à l'U. Cet élément est réglementé au regard de sa toxicité radiologique et les expositions à l'U ne doivent pas entraîner de dépassement de doses radiologiques maximales, définies par la directive Euratom 96/29 du 13 mai 1996. Actuellement, le CIRC (Agence Internationale de Recherche sur le Cancer ou en anglais « International Agency for Research on Cancer : IARC ») n'inscrit pas l'U en tant que tel et ses composés comme des cancérrogènes. Toutefois, les radionucléides émetteurs de particules α sont eux classés comme agents cancérrogènes pour l'Homme (IARC, 2001). En conséquence, l'évaluation des risques cancérrogènes liés à l'exposition à l'U est uniquement basée sur le calcul des doses d'irradiation (CIPR, 1997a, 1997b et 2007).

La toxicité chimique de l'élément n'est pas ignorée pour autant et, lorsque cela est pertinent, les analyses de risque sont effectuées par comparaison de niveaux d'expositions aux valeurs guides de l'OMS. Par exemple, en cas d'ingestion d'U, l'OMS a retenu une valeur guide de $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ qui garantit principalement le respect des seuils de toxicité chimique (WHO, 2006). Cette valeur est actuellement basée sur une suspicion de danger, et est dérivée à partir de résultats d'une seule étude, effectuée chez le rat (Gilman *et al.*, 1998c).

V. La surveillance médicale des personnes exposées à un risque d'exposition interne à l'uranium

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

→ ils doivent assurer la surveillance du personnel exposé que ce soit de façon chronique en l'absence de confinement ou de façon accidentelle dans les installations confinées.

→ ils doivent pouvoir évaluer l'incorporation en cas d'exposition avérée ou suspectée.

La dosimétrie des travailleurs exposés au risque de contamination interne (CIPR, 1997a et 1997b) repose sur la mise en place de différentes surveillances : surveillance du poste de travail (aussi appelée surveillance collective) et surveillance toxicologique (aussi appelée surveillance individuelle).

V.1 La surveillance du poste de travail (surveillance collective)

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

Différentes études de poste ont montré, par exemple, des concentrations moyennes dans divers ateliers du cycle du combustible de 0,1 à 3 Bq.m^{-3} (Chazel et Ansoborlo, 1999 ; Chazel *et al.*, 1997 et 1999 ; Chazel et Turlonias, 2004). Ces valeurs peuvent, bien sûr, être plus élevées lors d'un dysfonctionnement. Ces mêmes études ont également permis de classer certains composés uranifères décrits comme insolubles par la CIPR dans un autre type de solubilité du fait de leur surface spécifique et de leur composition (Chazel *et al.*, 2000). Ceci a des implications importantes dans la surveillance médicale.

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

V.2 La surveillance toxicologique (surveillance individuelle)

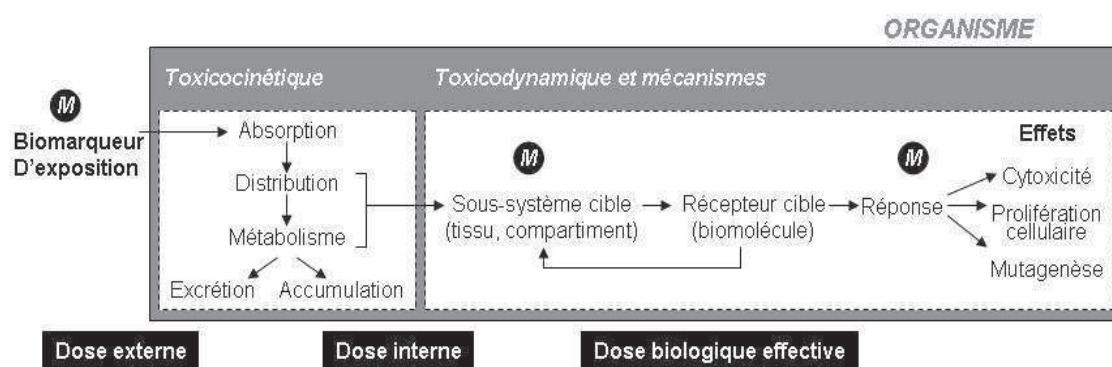
La surveillance toxicologique individuelle est basée sur les mesures effectuées lors des examens médicaux. Les travailleurs sont classés en deux catégories en fonction de leur fiche de poste et de nuisances (décret n° 2003-296) :

→ **Catégorie A** : le travailleur est susceptible de recevoir une dose efficace supérieure à 6 mSv/an mais cette dose efficace doit être inférieure à 20 mSv/an.

→ **Catégorie B** : le travailleur est susceptible de recevoir une dose efficace entre 1 mSv/an (dose pour le public) et 6 mSv/an.

Les travailleurs classés en catégorie A ou B bénéficient d'un examen médical au moins une fois par an. Les visites peuvent être plus fréquentes lors de manipulations à risque et un travailleur peut demander des analyses à tout moment. Ainsi, la visite chez le médecin du travail permet de contrôler la présence d'une contamination interne. Elle s'effectue de manière systématique après incident.

Les analyses toxicologiques mises en place au niveau industriel chez des individus potentiellement exposés à des toxiques sont de plus en plus utilisées pour suivre les expositions d'origine environnementale. Le suivi toxicologique doit permettre d'une part de quantifier l'exposition au métal à l'aide de **biomarqueurs d'exposition** et, d'autre part, d'estimer le risque pour la santé de l'individu exposé à l'aide de **biomarqueurs d'effets** (cf. [Figure 23](#)). Les biomarqueurs d'effets les plus couramment utilisés sont des marqueurs biochimiques dont les variations de concentration dans le sang ou les urines vont être le signe de l'atteinte spécifique d'un tissu. Le niveau d'atteinte de la molécule d'ADN par l'U pourrait, lui, être quantifié sur les lymphocytes du sang circulant à l'aide de **marqueurs de génotoxicité**.



Ⓜ Biomarqueurs moléculaires d'exposition ou d'atteinte à l'organe ou au compartiment.

Figure 23. Présentation générale des biomarqueurs (d'après E. Quémeneur/CEA)

V.2.1 Biomarqueurs d'exposition

Le suivi de la contamination interne par l'U est réalisé en routine par un dosage du composé lui-même dans les excréta et/ou le sang. La quantité de métal circulant ou excrété indique l'ampleur de la contamination. Dans le cas de l'U, la surveillance des personnes exposées doit prendre en compte la toxicité chimique du métal mais également sa toxicité radiologique (émetteur de particules α).

Le suivi radiotoxicologique des travailleurs est aujourd'hui fondé essentiellement sur des dosages des différents isotopes de l'U dans les urines et/ou les fèces en fonction de l'espèce chimique de l'U à l'origine de la contamination et de sa voie de pénétration dans l'organisme (Gwiazda *et al.*, 2004 ; McDiarmid *et al.*, 2001). Ces dosages sont réalisés généralement en fin de journée ou en fin de semaine. Les résultats obtenus permettent, à l'aide de modèles mathématiques élaborés par la Commission International de Protection Radiologique (CIPR ou ICRP en anglais), de calculer le niveau d'incorporation de ce toxique et une valeur d'équivalent de dose engagée. Dans certains cas de contamination interne accidentelle avec un uranium enrichi en isotope 235, une mesure de la radioactivité émise par l'organisme, et donc de son contenu en U, peut être effectuée à l'aide de techniques d'anthroporadiométrie. Ces examens reposent sur l'analyse des rayonnements X et gamma émis par l'²³⁵U retenu au niveau pulmonaire et la quantification de l'activité correspondante. Les systèmes actuels permettent des limites de détection en UA de l'ordre de 100 à 200 Bq dans les poumons. Cette technique est d'autant moins efficace que la contamination est ancienne et que les composés sont solubles.

Il existe trois méthodes d'analyse de l'U dans les excréta :

La mesure pondérale

Elle donne la concentration massique en U total dans les urines et est exprimée en microgrammes par litre. Elle permet d'obtenir une réponse rapide (quelques heures) sur le niveau de contamination mais ne renseigne pas sur la composition isotopique. Il y a deux techniques principales de mesure pondérale : le KPA (Kinetic Phosphorescence Analyser) et la fluorimétrie. Ces deux techniques permettent d'atteindre des limites de détection respectivement de 0,01 et 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en U total.

La mesure d'activité

Elle permet de déterminer l'activité volumique de l'U et est exprimée en becquerels par litre, pour chaque isotope détecté. Cette analyse nécessite une purification chimique puis une mesure par spectrométrie alpha et permet d'obtenir une isotopie. Sa mise en œuvre est plus lourde et plus longue (5 jours). Les limites de détection sont de l'ordre de 1 Bq.L^{-1} pour chaque isotope.

La spectrométrie de masse par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)

Cette troisième technique conjugue les deux analyses précédentes et est utilisable après une dilution de l'urine. Elle permet d'atteindre des limites de détection 10 fois plus inférieures à celle obtenues par la spectrométrie alpha et est extrêmement rapide (de 10 minutes à 1 jour selon la sensibilité recherchée). C'est certainement la technique la plus utilisée. En effet, elle permet à la fois d'obtenir une mesure pondérale et une isotopie. La limite théorique de détection est de $1,07 \cdot 10^{-4} \mu\text{g.L}^{-1}$.

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

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

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

Bien que les biomarqueurs d'exposition permettent d'estimer un risque moyen pour la santé d'un individu ayant été exposé, ils ne prennent pas en compte la variabilité inter-individuelle de réponse de l'organisme aux toxiques. Ainsi, certains individus seront plus sensibles et d'autres plus résistants que la population moyenne à l'apparition des effets toxiques des radionucléides. Ce sont les biomarqueurs d'effets qui vont en rendre compte.

V.2.2 Biomarqueurs d'effets

Ces biomarqueurs servent à évaluer un changement biologique ou biochimique dans les cellules ou les tissus cibles résultant de l'action d'un toxique, ce changement constituant une étape dans le processus pathologique menant à la maladie. Ce type de biomarqueurs vise à identifier les effets néfastes pour la santé.

La médecine moderne, afin de diagnostiquer des dysfonctionnements physiologiques ou des maladies, fait de plus en plus appel à l'analyse de paramètres biologiques du malade. Ces paramètres constituent des indicateurs de l'état du patient et sont appelés marqueurs biologique ou biomarqueurs. La biochimie clinique connaît depuis des années un développement considérable et c'est ainsi que son utilisation sort du cadre de l'homme malade pour s'intéresser à des études de l'impact des contaminations environnementales sur l'Homme. Ainsi, lors d'une contamination interne par des radionucléides, on doit pouvoir dans un minimum de temps diagnostiquer les dommages subis par la personne contaminée afin de mettre en œuvre une thérapeutique adaptée. Il convient donc de rechercher dans le sang et les urines, des biomarqueurs de l'atteinte des organes après exposition interne. Parmi ces biomarqueurs figurent les biomarqueurs classiques, utilisés en clinique humaine. En effet, la biologie de diagnostic est disponible dans tous les laboratoires pour effectuer les bilans de santé les plus fréquents : gaz sanguin, ionogramme sanguin et urinaire, glycémie, calcémie, créatininémie, enzymes hépatiques, numération, formule sanguine, hémostase. Des études ont rapporté qu'une exposition aiguë à l'U se caractérise par des anomalies fonctionnelles telles que la polyurie, la protéinurie et l'élévation sanguine de la créatinine et de l'urée (Domingo *et al.*, 1987 ; Diamond *et al.*, 1989), ces anomalies sont associées entre autres, à une atteinte de la fonction et de l'intégrité des reins. Ainsi, ces analyses biologiques classiques apportent une information déterminante pour le diagnostic d'une toxicité induite par les radionucléides.

V.3 Prise en charge du personnel en cas de contamination par l'uranium

Quel que soit le degré de radio-contamination, l'urgence médico-chirurgicale prime : les gestes vitaux doivent toujours être mis en œuvre d'emblée. Cependant, les contaminations des blessés sont à traiter si possible au stade précoce où les traitements ont alors leur maximum d'efficacité (ASN 2008). Pour toute personne suspectée de contamination, un traitement d'urgence doit être mis en œuvre (ASN 2008). Après déshabillage codifié de la victime visant à limiter la dispersion des radionucléides présents sur ses habits (cf. Figure 24) et une décontamination générale (douche, lavages non agressifs), la personne est conduite au service médical où un traitement lui sera administré dès lors que le ou les radionucléides contaminants potentiels auront été identifiés. Le bénéfice apporté par le traitement devra toujours être mesuré par rapport aux effets néfastes qui peuvent y être associés.

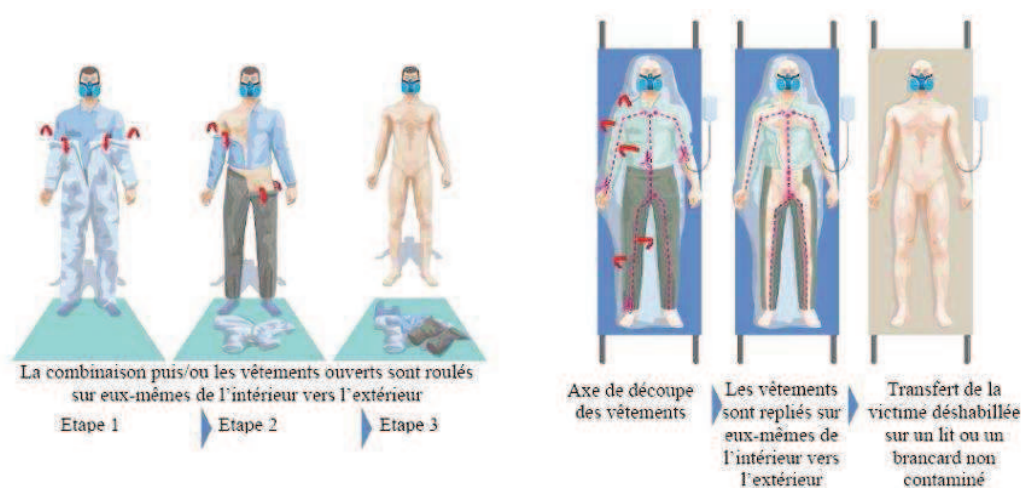


Figure 24. Procédure de déshabillage d'une victime valide (à gauche) et invalide (à droite) (ASN 2008)

Les deux principales méthodes de traitement des personnes contaminées visent soit à réduire le déplacement des radionucléides à partir du site d'entrée, soit à accélérer leur élimination de l'organisme par les voies naturelles (Bhattacharyya *et al.*, 1995). Les procédures utilisées pour limiter le transfert des radionucléides à partir du site d'entrée dans la circulation sanguine sont majoritairement non spécifiques, c'est-à-dire applicables à tout radionucléide et tout composé radioactif. Ces procédures non spécifiques comprennent :

- en cas d'ingestion : le lavage d'estomac, l'administration de laxatifs nettoyant l'appareil gastro-intestinal et l'administration d'antiacides ou d'adsorbants,
- en cas de contamination par voie cutanée : le lavage de la plaie et l'excision chirurgicale permettant d'évacuer les substances radioactives de la blessure,
- en cas de contamination par inhalation : le lavage pulmonaire.

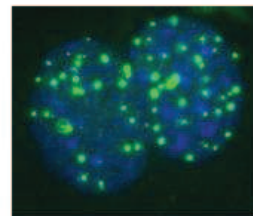
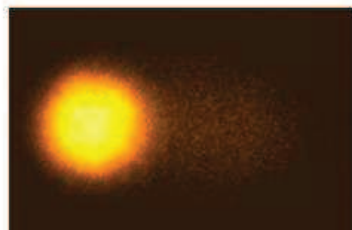
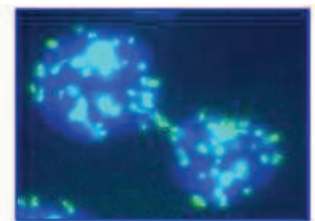
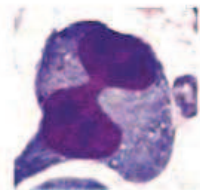
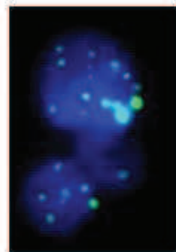
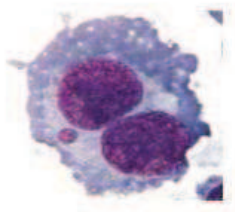
Une fois la substance radioactive diffusée dans le sang, des traitements visant à empêcher son dépôt dans les tissus et à accélérer son excrétion doivent rapidement être administrés. Ces traitements dits de décorporation sont eux plus spécifiques aux radionucléides incorporés et sont basés sur la formation de complexes entre le ligand administré et les radionucléides incorporés qui sont alors excrétés par les voies naturelles. Cependant, il n'existe pas à ce jour de traitement véritablement efficace pour accélérer l'excrétion de l'U suite à une contamination accidentelle. Les recherches toujours en cours visent à concevoir et synthétiser de nouveaux ligands susceptibles de complexer *in vivo* l'U qui est présent dans les milieux biologiques essentiellement sous forme d'ion uranyle UO_2^{2+} . Ces ligands doivent répondre à un certain nombre de critères : non toxicité, spécificité pour le métal, sélectivité par rapport aux cations biologiques (Ca^{2+} , K^+ ...), stabilité du complexe formé aux pH physiologiques autour de 7,4 dans le sang et compris entre 4,5 et 6 dans les urines, pour ne pas perturber les processus naturels vitaux.

VI. L'exposition interne à l'uranium - Synthèse

Les isotopes de l'U rencontrés dans le cycle du combustible nucléaire émettent principalement des rayonnements α au cours de leur désintégration. L'exposition interne à l'U est par conséquent un risque majeur pour les travailleurs de l'industrie du nucléaire ; elle peut se produire accidentellement après inhalation, ingestion ou passage percutané (peau intacte ou blessée). La toxicité de l'U résulte de la combinaison de ses propriétés chimiques, en tant que métal lourd, et de ses propriétés radiologiques en tant qu'émetteur de rayonnements ionisants (α). En considérant les données de la littérature, les os et les reins sont considérés comme les principaux sites de l'accumulation et de l'action toxique de l'U. Cependant, des atteintes au niveau du système reproducteur, du système nerveux, du système rénal, du système pulmonaire mais aussi au niveau du système hépatique ont été montrées ces dernières années. Ces effets biologiques de l'U ont été attribués soit à ses propriétés chimiques (métal lourd) soit à ses propriétés radiologiques (émetteur de rayonnements α). Le risque d'exposition interne à l'U nécessite la mise en place d'un système de surveillance qui est le domaine de la Radioprotection. La Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) émet des recommandations en matière de radioprotection. La radioprotection des travailleurs exposés à l'U est basée sur la mise en place de différentes surveillances : celle du poste de travail (surveillance collective) et celle de la surveillance toxicologique (surveillance individuelle). Le suivi toxicologique doit permettre d'une part de quantifier l'exposition au métal à l'aide de biomarqueurs d'exposition et, d'autre part, d'estimer le risque pour la santé de l'individu exposé à l'aide de biomarqueurs d'effets.

Partie C.

Génotoxicité de l'uranium



La génotoxicité peut être définie comme la capacité d'induire des effets toxiques sur un système génétique. Ce terme aurait été utilisé pour la première fois par Hermann Druckrey à une conférence internationale sur les cancérigènes environnementaux : « Pour décrire la résultante d'une interaction chimique avec le matériel génétique, le terme de génotoxicité est proposé comme l'expression générale des effets toxiques, létaux et héréditaires du matériel génétique dans les cellules germinales ou somatiques » (Schins, 2002).

Cette partie du manuscrit sera dédiée à l'étude de la génotoxicité de l'U. La première partie sera tout d'abord consacrée aux généralités sur les effets génotoxiques. Ensuite, la chimiotoxicité et la radiotoxicité de l'U seront étudiées en décrivant les diverses lésions primaires de l'ADN (cassures simple et double brin, bases modifiées...). Enfin, utilisant ces différents éléments de toxicologie comme des clés de lecture permettant une meilleure interprétation des mécanismes mis en jeu, nous décrirons les conséquences biologiques des diverses lésions de l'ADN induites par l'U (arrêt du cycle cellulaire, réparation des lésions de l'ADN, instabilité génomique, la mort cellulaire, son potentiel effet carcinogène et les effets de voisinage induits par les rayonnements ionisants).

I. Les effets génotoxiques : généralités

I.1 Lésions de la molécule d'ADN

L'ADN est une macromolécule biologique à laquelle sont attribuées les structures primaire, secondaire et tertiaire. Il apparaît que la séquence en nucléotides (structure primaire), la configuration et la situation des nucléotides au sein de la double hélice (structure secondaire) et l'état sous lequel se trouve la molécule d'ADN (en cours de réplication ou de transcription, sous forme de chromatine ou de chromosome : structure tertiaire) jouent un rôle considérable dans la survenue des lésions puis des mutations éventuelles. En effet, l'accessibilité des sites nucléophiles de l'ADN aux attaques électrophiles des agents génotoxiques n'est pas la même et la mise en œuvre des systèmes de réparation de l'ADN varie considérablement d'une situation à l'autre.

L'ADN est soumis à de multiples attaques inévitables, de la part du milieu intracellulaire et de l'environnement, qui provoquent la formation de plusieurs milliers de lésions par jour et par cellule (bases modifiées, sites abasiques, cassures de chaînes, pontage ADN-protéines...). L'exposition à des agents génotoxiques (agents chimiques et/ou physiques) est susceptible d'initier toute une cascade d'événements toxiques au niveau moléculaire notamment (Shugart *et al.*, 1992). Cette perspective revêt

un caractère particulièrement critique pour l'ADN, compte tenu du rôle clé de cette macromolécule dans l'expression et dans la transmission du patrimoine génétique d'un individu. Ainsi, la mesure qualitative et quantitative des modifications induites sur l'ADN par un toxique devrait permettre de rendre compte de la présence de substances génotoxiques ainsi que des effets induits par ces dernières.

Il existe une très grande variété des degrés d'altération de l'ADN. Il est en effet classique de distinguer les lésions primaires à l'ADN, les mutations géniques, chromosomiques (effets clastogènes) et génomiques (effets aneugènes) (cf. Figure 25).

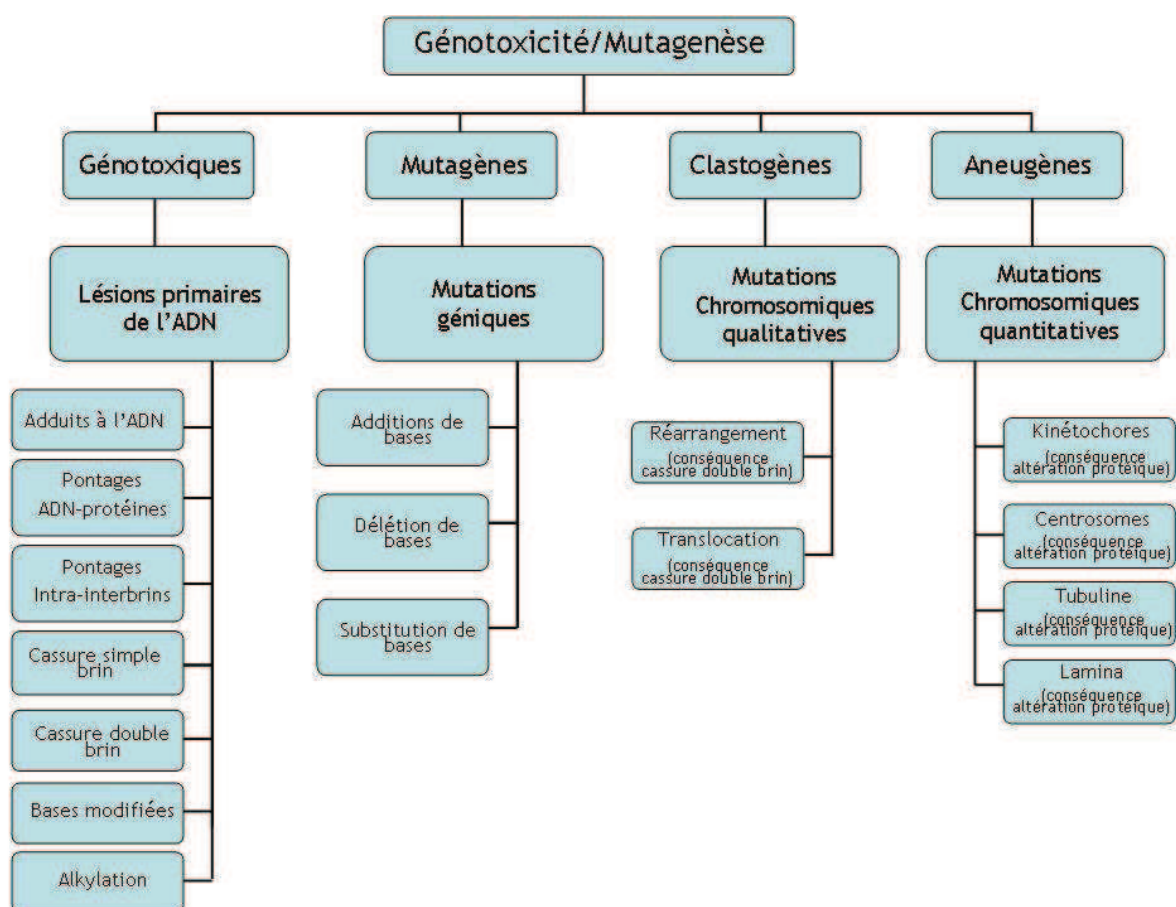


Figure 25. Diversité des altérations de l'ADN (d'après Orsière *et al.*, 2005)

Les lésions primaires à l'ADN représentent le premier stade consécutif à l'action d'un agent génotoxique. L'ADN est chimiquement modifié : on observe tantôt des ruptures de liaisons covalentes qui, lorsqu'elles se situent sur le désoxyribose, conduisent à des cassures de brins, tantôt l'établissement de liaisons covalentes conduisant à des adduits, à des alkylations de bases, à des pontages ADN-ADN intra- ou inter-brin par exemple. La survie de la cellule est assurée dans la majorité des cas par l'action des mécanismes de réparation de l'ADN qui éliminent les lésions avant qu'elles ne soient engagées dans des processus vitaux comme la réplication ou la transcription. Ils assurent le maintien de la molécule d'ADN et

en conséquence la stabilité de l'information génétique. Lorsque la réparation est absente ou incomplète (réparation fautive), et selon la nature des lésions, la cellule va mourir ou bien muter. On distingue les mutations concernant une à quelques paires de bases, qualifiées de mutations géniques, et les mutations chromosomiques de structure concernant le plus souvent des dizaines de kilobases. La dernière classe de mutations concerne les modifications chromosomiques de nombre. On parle également de mutations génomiques, et il est intéressant de noter que ces anomalies chromosomiques de nombre ne sont le plus souvent pas consécutives à des interactions moléculaires au niveau de l'ADN. Des mutations dans des gènes qui gouvernent le cycle cellulaire vont conférer aux cellules la propriété de proliférer de manière incontrôlée et finalement aboutir au cancer (cf. Figure 26).

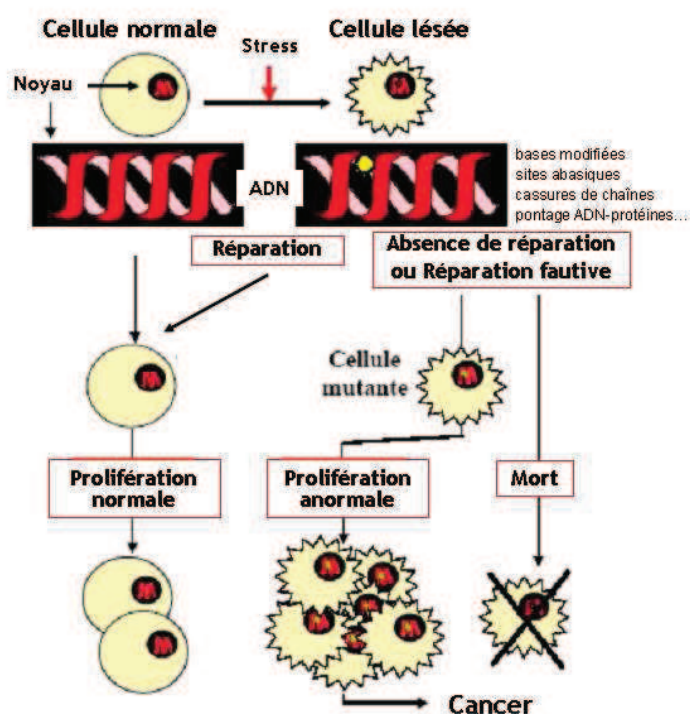


Figure 26. Divers devenir d'une cellule exposée à un toxique

1.2 Les autres cibles cellulaires

Les agents génotoxiques peuvent exercer leur action délétère par interaction directe avec l'ADN, mais également de manière très indirecte (Mateuca *et al.*, 2006). Les agents génotoxiques indirects induisent principalement des mutations chromosomiques de nombre en agissant, non pas avec l'ADN, mais avec les structures cellulaires impliquées dans la disjonction, la ségrégation et la migration des chromatides au cours de la division cellulaire, telles que, notamment, le fuseau mitotique des cellules en division (cf. Figure 27). Les agents génotoxiques induisant des défauts dans la réparation des chromosomes

au cours de la mitose, et de ce fait une aneuploïdie (type de mutation qui implique un changement dans le nombre de chromosomes par rapport au complément diploïde naturel, c'est-à-dire un ou plusieurs chromosomes en plus ou en moins) dans chaque cellule fille, sont des agents aneugènes (Aardema *et al.*, 1998).

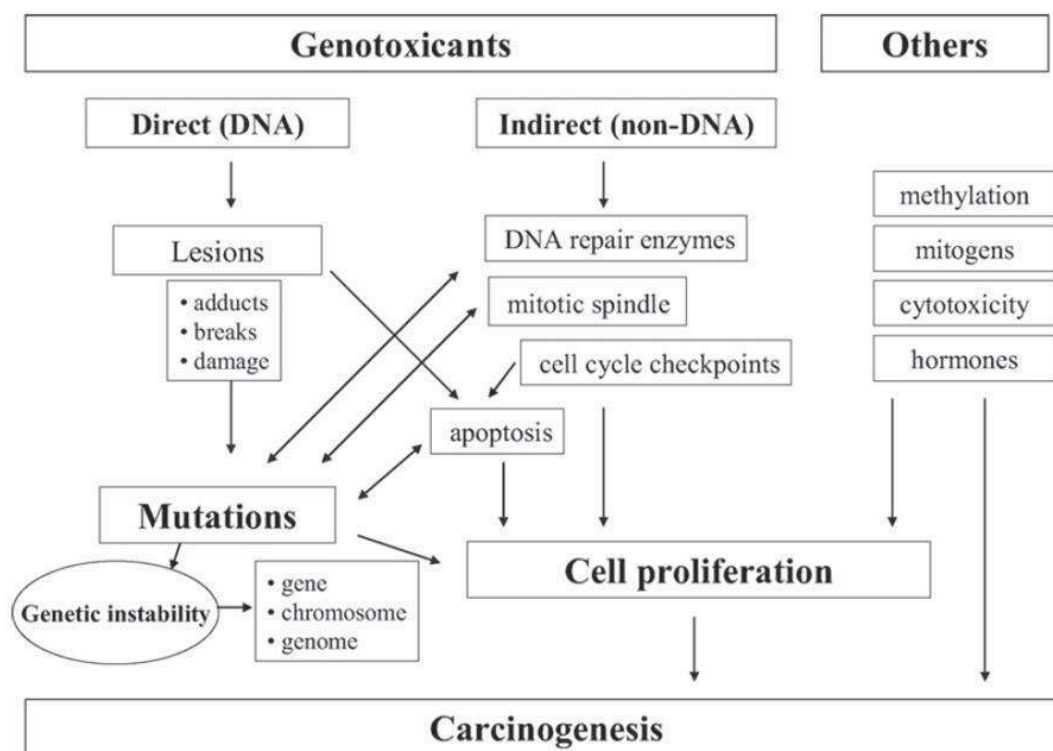


Figure 27. Les diverses cibles des agents génotoxiques (d'après Mateuca *et al.*, 2006)

Les agents génotoxiques peuvent exercer leur action délétère par interaction directe avec l'ADN, mais également de manière très indirecte, en se liant à des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité du génome (par exemple tubulines, enzymes de réparation de l'ADN, les protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, etc.). Les composés non génotoxiques sont également capables d'induire le cancer en augmentant le taux de prolifération cellulaire (mitogènes, par exemple), en changeant le statut de méthylation de l'ADN ou en déclenchant une cytotoxicité. La prolifération cellulaire peut être un effet principal de l'agent cancérigène ou un effet secondaire suite à la toxicité cellulaire. L'apoptose peut être induite par plusieurs types de substances génotoxiques. L'élimination excessive des cellules par apoptose peut induire la prolifération cellulaire compensatrice pour rétablir l'homéostasie. La cancérogenèse est donc le résultat de l'équilibre entre les mutations, les changements épigénétiques, la prolifération cellulaire et la mort cellulaire.

Les agents génotoxiques peuvent atteindre tous les composants cellulaires. Il peut s'agir, par exemple, des molécules impliquées dans l'attachement et la séparation des chromatides (condensation des chromosomes, kinétochores), des centromères, des éléments participant au contrôle du cycle cellulaire (cyclines, kinase dépendantes des cyclines, p53), des molécules de l'appareil mitotique (tubuline, centrioles, protéines motrices des microtubules ou MAPs) ou encore des structures indirectement impliquées dans le cycle cellulaire (telles que les membranes cellulaires ou nucléaires) (Kirsch-Volders *et al.*, 2002 et 2003). Les dommages créés par les agents génotoxiques sur la membrane plasmique (structure hautement organisée et dynamique et particulièrement sur les lipides au travers de

la peroxydation) peuvent entraîner une mort cellulaire par nécrose, en raison de la perte des fonctions de barrière et d'échange assurées par cette membrane.

Par exemple, les rayonnements ionisants ont comme cible directe l'ADN induisant des cassures simple et double brin. Les effets indirects des rayonnements ionisants sur l'ADN se produisent lorsqu'un photon interagit avec une molécule d'eau menant à l'hydrolyse et la production de radicaux libres.

Des produits chimiques tel que le nocodazole (défaut au niveau de la tubuline) induisent une mauvaise ségrégation des chromatides / chromosomes en interférant avec le fonctionnement du fuseau mitotique et méiotique.

Les métaux forment une classe particulièrement complexe de mutagènes car ils ont de multiples cibles cellulaires. En effet, les métaux interagissent de différentes manières avec la machinerie cellulaire : par compétition avec les autres métaux, par liaison à l'ADN, à des acides aminés spécifiques (par exemple histidine) ou à des sites spécifiques (groupement thiol) (cf. Figure 28).

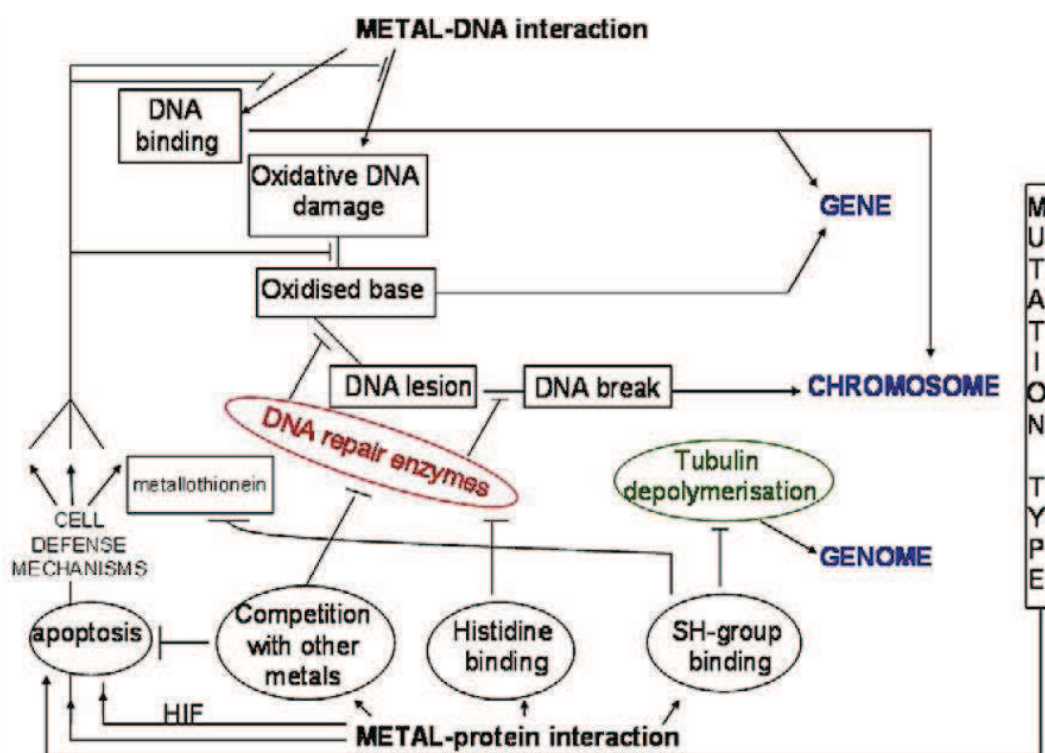


Figure 28. Mécanismes d'action des métaux (d'après Mateuca *et al.*, 2006)

Les effets génotoxiques d'un métal donné sont de ce fait fonction de son affinité relative pour ces différents sites de liaisons. Le profil génotoxique spécifique de chaque métal sera donc un mélange de lésions par interaction directe de l'ADN ou indirecte avec les molécules de l'appareil mitotique ou les systèmes de réparation de l'ADN et d'induction d'apoptose (Mateuca *et al.*, 2006).

II. Les lésions primaires de l'ADN induites par l'uranium

Après exposition à l'U (ou aux rayonnements α), diverses lésions primaires de l'ADN sont observées telles que : des modifications des bases (puriques et pyrimidiques), des cassures simple ou double brin, des pontages ADN-protéines et aussi ADN-ADN (cf. Figure 29) (Ribera *et al.*, 1996). L'impact biologique dépend de la fréquence, de la nature, et surtout de la capacité des lésions à être réparées par les systèmes enzymatiques de réparation de l'ADN.

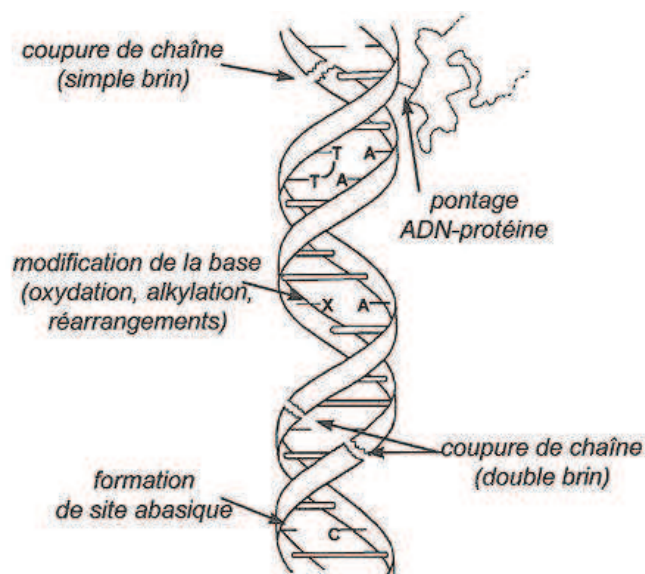


Figure 29. Lésions de l'ADN (www-dsv.cea.fr)

II.1 Les cassures simple brin (CSB)

L'induction de CSBs se fait soit par ionisation directe (dépôt direct d'énergie), soit de façon indirecte (radiolyse de l'eau). Les CSBs sont principalement dues à la rupture des liaisons phosphate-sucre à la suite d'un arrachement d'un atome d'hydrogène du sucre par le radical OH^\bullet (Tubiana *et al.*, 1986 ; Von Sonntag, 1987). Ces lésions sont relativement vite réparées (en moins d'1 h) et ont peu d'impact en matière de létalité cellulaire. Elles peuvent également résulter de défaut de réparation par excision/resynthèse.

II.1.1 La contribution des effets chimiques de l'uranium

Yazzie et ses collaborateurs (2003) ont démontré que le cation d'uranyle est susceptible de provoquer des cassures simple brin de l'ADN. De même, des cassures d'ADN, mesurées par le test des comètes, ont également été mises en évidence *in vitro* dans des cellules d'ovaires de hamsters chinois exposées à de l'UA sous forme d'acétate d'uranyle (Stearns *et al.*, 2005). Le test des comètes réalisé sur des cellules

broncho-alvéolaires de rat contaminés par inhalation d' UO_2 et UO_4 révèle aussi une augmentation significative des dommages à l'ADN sous la forme de cassures simple et double brin (Monleau *et al.*, 2006a et 2006b). Plus récemment, ces résultats ont été confirmés par Thiébault et ses collaborateurs (2007). L'exposition *in vitro* de cellules proximales rénales de rat (NRK-52^F) à des concentrations sub-létales et létales entraîne une élévation significative des cassures simples et double brin et/ou sites labiles alcalins qui dépendent de la concentration en U. De plus, Barillet et ses collaborateurs (2005) ont démontré avec le test des comètes en conditions alcaline une augmentation significative des dommages de l'ADN dans les érythrocytes de poisson zèbre exposés à différentes concentrations d'U (100 et 500 $\mu\text{g U.L}^{-1}$) pendant 20 jours.

Il faut noter que les travaux répertoriés dans le risque chimique (tout au long du manuscrit) correspondent à des études réalisées avec de l'UA ou de l'UN qui ont un effet chimique prépondérant par rapport à l'effet radiologique compte tenu de leur faible activité spécifique. A ce jour, très peu d'études se sont intéressées à la discrimination des effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'U.

II.1.2 La contribution des effets radiologiques de l'uranium

Du fait de leur diversité et de leurs dynamiques de réparation différentes, il n'est pas aisé de faire un décompte précis des lésions de l'ADN induites par les rayonnements ionisants. En effet, celles qui persistent sont, par définition, celles qui sont mal ou non réparées dans les cellules survivantes. Des estimations ont cependant été proposées et celles de Goodhead (1993) sont les plus généralement acceptées (*cf.* Tableau 6). Ces données, même si elles ne concernent pas directement l'effet des radiations α permettent de relativiser l'effet d'une exposition à 1 Gy de radiations par rapport aux lésions générées au cours de 24 h d'activité cellulaire normale.

Tableau 6. Types de lésions spontanées observées en 24 heures ou induites après une irradiation de 1 Gy par des radiations à faible transfert d'énergie linéique (radiations γ) (d'après Calmet *et al.*, 2003)

	Naturelle sans irradiation en 24 heures	Ajoutées par 1 Gy de radiations γ	Ratio 1Gy / naturelles
Cassure simple brin (CSB)	20 000 à 40 000	1 000	0,03
Cassure double brin (CDB)	8	40	5
Lésions de bases	20 000	2000	0,1
Autres lésions	5 000	200	0,04
Total	~ 50 000	3240	0,05

Le nombre de cassures simple brin est estimé à environ 1000 par cellule de mammifère et par Gy pour un rayonnement de faible TEL (Goodhead, 1994 ; Ahnström *et al.*, 1980). La formation de CSBs est importante pour un rayonnement de faible TEL et augmente avec la dose d'irradiation (la relation dose-effet est linéaire). Le taux de CSB est moindre avec des TEL plus élevés (500 CSBs / cellule / Gy). Les CSB sont vite réparées, dans l'heure qui suit l'exposition aux rayonnements, et elles auraient peu d'impact en matière de létalité des cellules.

II.2 Les cassures double brin (CDB)

Les CDBs font sans doute partie d'une catégorie de lésions parmi les plus délétères. Elles se produisent à la suite de rupture des deux chaînes en des sites assez proches l'un de l'autre. L'induction de CDBs se fait soit par ionisation directe (dépôt direct d'énergie), soit de façon indirecte (radiolyse de l'eau). Deux mécanismes sont avancés pour expliquer leur formation. Le premier suppose l'action d'un radical °OH sur le 2-désoxyribose (Siddiqui et Bothe, 1987) avec transfert du radical sur le deuxième brin. Le deuxième suppose que plusieurs radicaux °OH agissent sur la molécule d'ADN en des sites proches (Ward, 1985 ; Calmet *et al.*, 2003).

II.2.1 La contribution des effets chimiques de l'uranium

Une augmentation significative des dommages à l'ADN sous la forme de cassures simples et double brin (Monleau *et al.*, 2006a et 2006b) a été révélée par le test des comètes réalisé sur des cellules broncho-alvéolaires de rat contaminés par inhalation d'UO₂ et d'UO₄. Ces résultats ont été confirmés, plus récemment, par Thiébault et ses collaborateurs (Thiebault *et al.*, 2007). En effet, l'exposition *in vitro* de cellules proximales rénales de rat (NRK-52^E) à des concentrations sub-létales et létales entraîne une élévation significative des cassures simples et double brin et/ou sites labiles alcalins qui dépendent de la concentration en U. Le test des comètes en conditions alcalines ne permet pas de discriminer les dommages de type site labile alcalin, cassure simple ou cassure double brin. Pour ces raisons, Thiébault et ses collaborateurs (2007) ont également réalisé des immunomarquages de l'histone γ-H2Ax. En effet, lorsqu'une cassure double brin de l'ADN se forme, les histones H2AX situées à proximité de la lésion sont massivement phosphorylées de façon spécifique sur leur sérine 139. Le nombre de foyers γ-H2Ax formés, visualisés par immunofluorescence, est proportionnel au nombre de cassures double brin présentes au niveau du noyau cellulaire. Il apparaît alors que le marquage augmente avec les concentrations en U (Thiebault *et al.*, 2007), par conséquent le nombre de CDBs augmente avec les concentrations en U.

II.2.2 La contribution des effets radiologiques de l'uranium

Le nombre de CDBs est estimé entre 40 et 100 dans une cellule de mammifère par Gy de rayonnement de faible TEL (Goodhead, 1994). La réparation des CDBs qui peut être relativement longue, intervient comme un critère important dans la radiosensibilité cellulaire (Radford, 1986 ; Frankenberg-Schwager et Frankenberg, 1990 ; Iliakis, 1991 ; Ross *et al.*, 1995). L'efficacité de leur formation augmente avec l'augmentation du TEL. Il est généralement admis que la caractéristique des radiations ionisantes est d'entraîner des cassures double brin (dont la survenue naturelle est rare). Or, même si elles sont toujours très minoritaires, ces lésions sont mal réparées chez les cellules somatiques (comparativement aux autres qui permettent une réparation complète). Ces cassures double brin laissent donc une trace. Les radiations ionisantes vont donc être plus particulièrement à l'origine de cassures double brin persistantes dont les conséquences cellulaires vont généralement prendre la forme d'aberrations chromosomiques.

L'induction initiale de CDBs pour une dose donnée lors d'une irradiation par des particules α , est très proche de celle obtenue pour des rayonnements de faible TEL X ou γ conduisant à un Effet Biologique Relatif (EBR) proche de 1 (pour revue Brenner *et al.*, 1992 ; Prise *et al.*, 1998). Cependant, cet EBR est largement supérieur à 1 et augmente avec le TEL de la particule lorsqu'il est calculé à partir des données de survie cellulaire obtenues à l'aide de tests de clonogénicité (Prise, 1994). Ainsi, une CDB induite par des rayons X a une probabilité 4 à 5 fois plus faible de produire une lésion létale que des particules α ayant un TEL de 100 keV/ μm (Prise, 1994) (*cf.* Figure 30). Une hypothèse permettant d'expliquer l'apparente différence de létalité des cassures double brin induites par différents types de radiations s'appuie sur le fait que ces radiations produisent des lésions plus ou moins complexes. En effet, les radiations à TEL élevé (comme les rayonnements α), ont la caractéristique d'induire un nombre élevé de « sites à lésions multiples localisées » (LMDS) qui sont faiblement réparables (Mustonen *et al.*, 1999 ; Goodhead, 1999 ; Blakely et Kronenberg, 1998). De plus, ces LMDS sont plus nombreux et plus complexes après exposition aux radiations à TEL élevé qu'après exposition aux radiations à TEL faible. Comme les CDBs sont les lésions de l'ADN les moins réparables, il a été avancé que ces lésions étaient induites en plus grand nombre par les radiations à TEL élevé et participaient ainsi à la formation des lésions multiples.

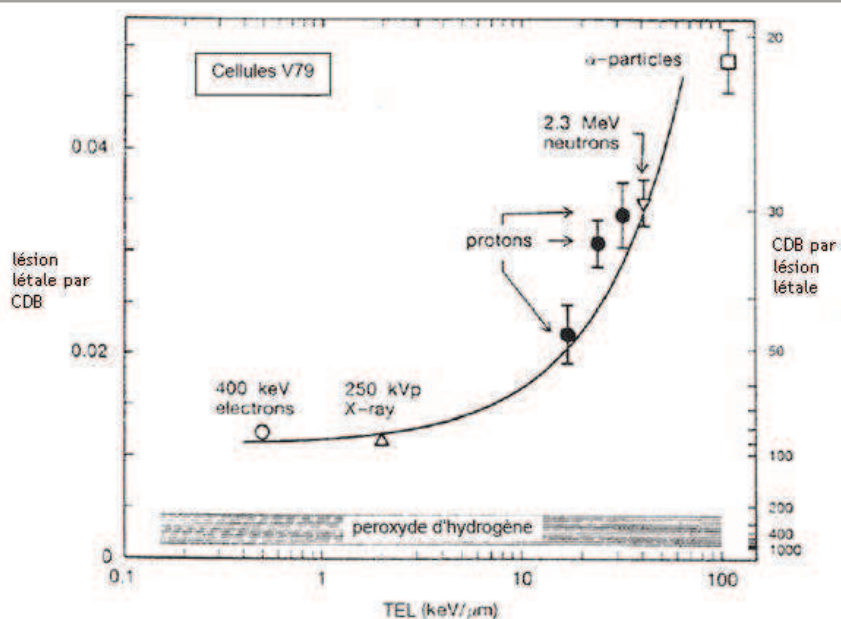


Figure 30. Relation entre lésions létales par cassure double brin (CDB) (axe de gauche) ou cassures double brin par lésion létale (axe de droite) et TEL dans les cellules V79 irradiées avec plusieurs types de rayonnements et un agent radiomimétique, le peroxyde d'hydrogène (d'après Fox *et al.*, 1992).

II.3 Les bases modifiées

Les modifications de bases résultent principalement de l'attaque des radicaux hydroxyles sur le cycle aromatique mais sont également produites par ionisation directe. Les radicaux OH^\bullet sont très électrophiles, leur attaque s'effectue donc préférentiellement en position 5 du cycle de la thymine et de la cytosine. Les bases puriques peuvent subir quant à elles l'addition de radicaux OH^\bullet en position 4 ou 8 (Blakely *et al.*, 1990 ; Kawanishi *et al.*, 2001). Le schéma réactionnel de l'oxydation des bases azotées est le même quelque soit la base considérée. Les bases pyrimidiques sont généralement plus radiosensibles que les bases puriques. On distingue les bases pyrimidiques et les bases puriques modifiées. Il est intéressant de noter que la guanine possède le potentiel d'oxydation le plus bas des bases azotées. Elle est donc la plus sensible aux réactions d'ionisation. La Figure 31 présente l'oxydation de la guanine.

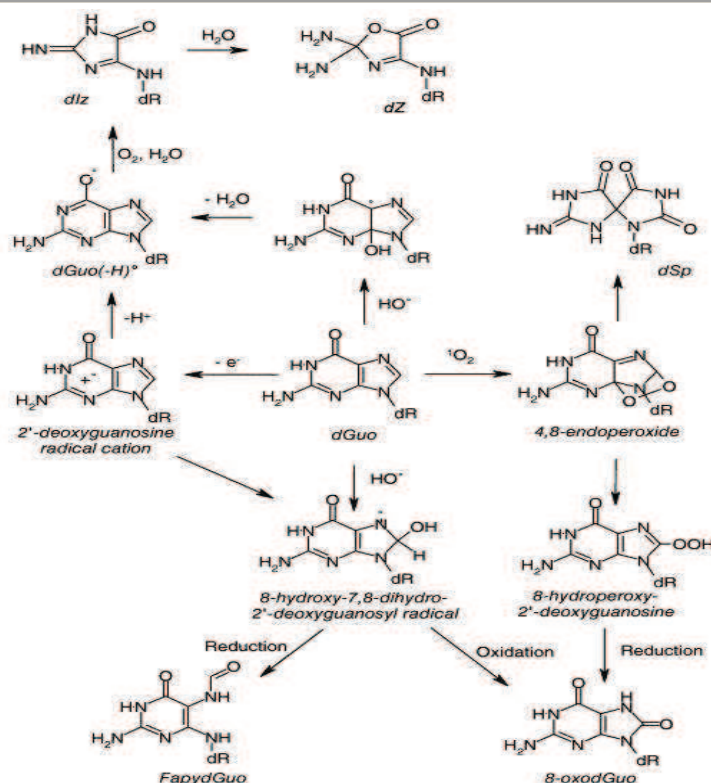


Figure 31. Schéma d'oxydation de la guanine (Cadet *et al.*, 2003)

II.3.1 La contribution des effets chimiques de l'uranium

Miller *et al.* (2002a) ont démontré que l'UA peut induire une altération de l'ADN par la formation de thymine glycol et de 8-hydroxy-désoxyguanosine (spécifiques d'un stress oxydatif).

II.3.2 La contribution des effets radiologiques de l'uranium

Le nombre de bases modifiées radio-induites est estimée à environ 2000 par cellule eucaryote par Gy de rayonnement de faible TEL.

II.4 Les pontages ADN-protéines

Des pontages intra-chaîne ou inter-chaînes ou entre l'ADN et les protéines environnantes peuvent aussi se former sous l'effet d'agent chimique ou des rayonnements ionisants. Dans ce cas, le radical °OH peut être impliqué (Oleinick *et al.*, 1987).

II.4.1 La contribution des effets chimiques de l'uranium

Ces pontages peuvent se former lorsque deux radicaux sont générés à la fois sur l'ADN et au niveau des acides aminés constitutifs des protéines proches de l'ADN. Des travaux (non spécifiques à l'U)

ont ainsi mis en évidence la formation de pontage entre la tyrosine et la thymine mais aussi entre d'autres acides aminés et la thymine ou la cytosine (Pouget, 2000).

II.4.2 La contribution des effets radiologiques de l'uranium

Des pontages intra-chaîne ou inter-chaînes ou entre l'ADN et les protéines environnantes peuvent aussi se former sous l'effet du rayonnement ionisant. Dans ce cas, le radical hydroxyle peut être impliqué. Le nombre des pontages radio-induits entre ADN et protéines est d'environ 30 par cellule par Gy de rayonnement de faible TEL. Ils peuvent se former (en absence d'oxygène) lorsque deux radicaux sont générés à la fois sur l'ADN et au niveau des acides aminés constitutifs des protéines proches de l'ADN. Des travaux ont mis en évidence la formation de pontage entre la tyrosine et la thymine (Dizdaroglu et Gajewski, 1989 ; Nackerdien *et al.*, 1991) mais aussi entre d'autres acides aminés et la thymine ou la cytosine (Dizdaroglu et Gajewski, 1989 ; Nackerdien *et al.*, 1991).

En dehors de toute irradiation, des lésions spontanées de l'ADN ont lieu : des cassures simple et double brin (5000 par heure), des pertes de bases (1250 par heure). Des modifications de bases (2000 à 1000 par jour) se produisent également. Toutefois, aucune mutation n'apparaît pour autant car la plupart des dommages est réparée. L'atteinte de l'ADN peut toutefois avoir de graves conséquences somatiques ou héréditaires en altérant la synthèse de protéines fondamentales au fonctionnement de la cellule.

III. Les conséquences cellulaires des lésions de l'ADN induites par l'uranium

Les effets cellulaires de l'U, qu'il soit naturel, appauvri ou enrichi, ont été étudiés en majorité à l'aide de différents modèles cellulaires *in vitro*.

Lorsque les altérations de l'ADN peuvent être réparées, l'effet biologique se limite alors à l'échelle moléculaire et la cellule reste intacte. Lorsque la cellule ne peut pas réparer son ADN lésé ou que des réparations fautive surviennent, les modifications de l'ADN peuvent être à l'origine d'arrêts prolongés dans le cycle cellulaire, d'inhibition de la transcription et de la répllication de l'ADN, de problèmes de ségrégation des chromosomes. Ces perturbations peuvent être à l'origine d'apparition d'évènements génétiques anormaux tels que des mutations géniques irréversibles et héréditaires ou des

instabilités génomiques. A leur tour, ces dommages pourront être à l'origine d'effets tératogènes (si ces altérations concernent des cellules germinales ou si elles surviennent lors du développement embryonnaire) mais aussi de cancers (dans le cas d'atteintes de cellules somatiques) ou peuvent encore induire la mort cellulaire.

La toxicité de l'U dépend des quantités et des formes physico-chimiques au moment de l'incorporation, ainsi que de la durée d'exposition (Métivier *et al.*, 2001). Comme précisé précédemment, l'U présente deux types de toxicité : radiologique et chimique. La prépondérance de l'une ou de l'autre, dépend des isotopes de l'U et de l'organe considéré. Lorsque l'activité spécifique du composé uranifère est faible, comme pour l'UN ou l'UA, la toxicité chimique est prépondérante. Lorsque l'activité spécifique est plus importante, comme dans le cas de l'UE, le risque radiotoxique sera plus important.

III.1 Les points de contrôle du cycle cellulaire

Pour permettre la plus grande fidélité de la transmission du matériel génétique d'une cellule mère à ses cellules filles, des mécanismes de surveillance de l'intégrité du génome ont été mis en place au cours de l'évolution. Il existe ainsi des points de contrôle au cours du cycle cellulaire qui permettent de détecter la présence d'éventuels dommages de l'ADN. Le cycle cellulaire comprend quatre phases : phase G1, phase S, phase G2 et phase M (cf. Figure 32). Les phases G1, S et G2 constituent l'interphase.

- Pendant la phase G1, la cellule contrôle son environnement et sa propre taille, puis le moment venu, fait un choix décisif l'amenant à la réplication de son ADN et à l'achèvement du cycle cellulaire. La durée de la phase G1 est extrêmement variable ; elle peut être très prolongée, voire occuper toute la durée de vie de la cellule, et est alors désignée par G0.

- La phase S est la phase de réplication de l'ADN nucléaire.

- La phase G2 permet à la cellule de s'assurer que la réplication de son ADN est bien complète avant de s'engager dans la mitose.

- La phase M est la phase de mitose au cours de laquelle la cellule se divise.

Les phases S et M sont séparées par des phases d'intervalle G1 et G2, pendant lesquelles les cellules synthétisent les protéines nécessaires à leur fonctionnement. Les cellules qui ne se divisent plus sortent du cycle cellulaire pour entrer dans une phase dite de sénescence (G0). Les points de contrôle interviennent en phases G1, S, et G2. Si les dommages sont trop importants, la cellule cesse de se diviser, et reste en phase G0 ou se suicide par apoptose, la mort cellulaire programmée. Si les dommages ne sont pas trop nombreux, les points de contrôle vont induire une pause dans le cycle cellulaire, l'activation de

la réparation de l'ADN, le maintien de l'arrêt du cycle cellulaire le temps de la réparation, puis la ré-initiation du cycle cellulaire (Bartek *et al.*, 2001).

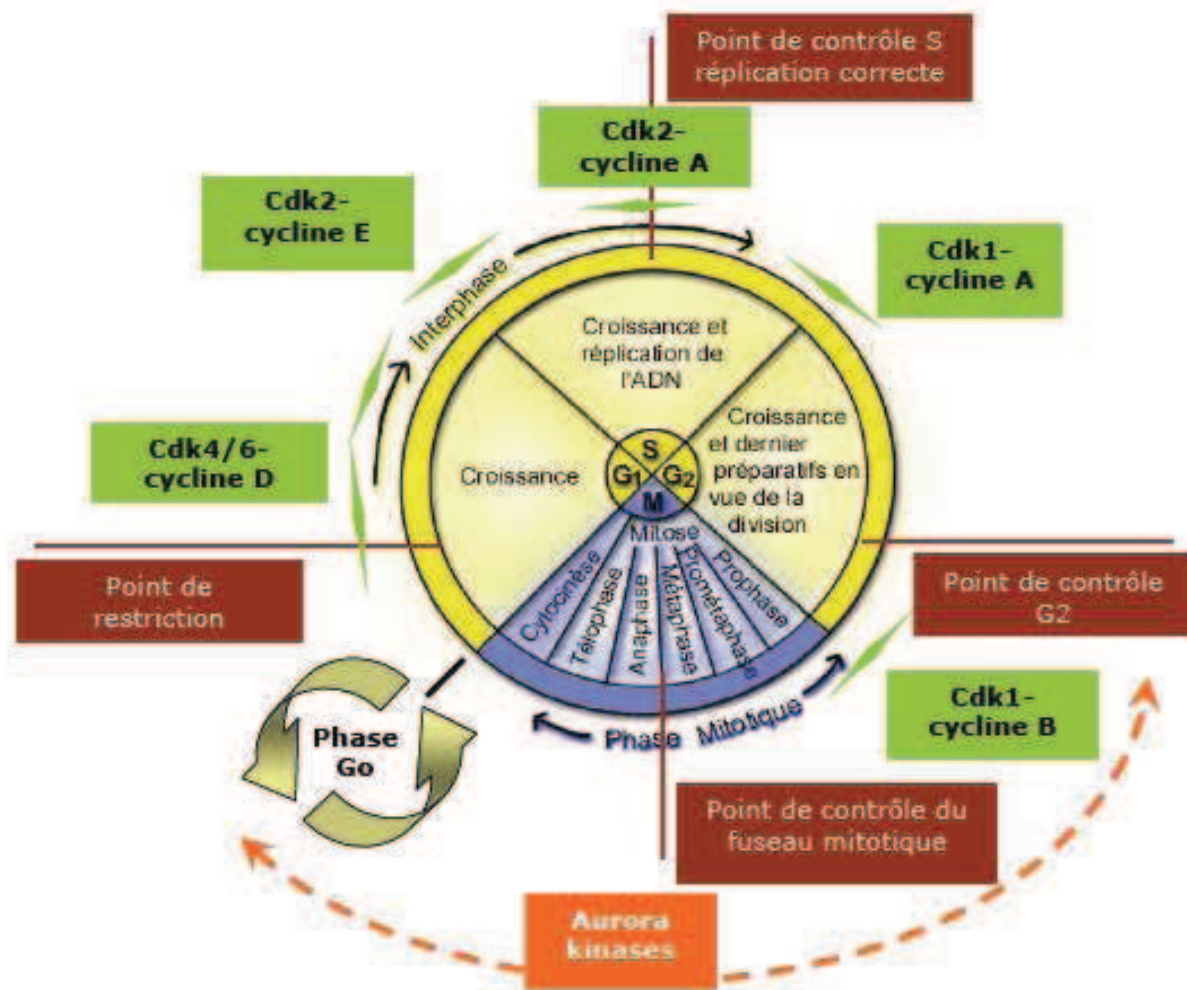


Figure 32. Le cycle cellulaire et les points de contrôle

L'interphase en jaune regroupe les 3 phases G1, S et G2 au cours desquelles la cellule croît et duplique son ADN. La mitose en bleu comporte 5 phases : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. La cytokinèse (ou cytotérièse) conduit à la division « physique » des deux cellules filles. Plusieurs points de contrôle, à différentes étapes du cycle cellulaire, permettent à la cellule mère de vérifier l'intégrité du patrimoine génétique et sa répartition équitable entre les deux cellules filles. Différentes kinases mitotiques qui interviennent dans la régulation du cycle cellulaire sont indiquées.

Modifié d'après : <http://www.ustboniface.mb.ca/cusb/abernier/Biologie/Cellule/Images/etapedemitose.jpg>

Les points de contrôle ont été définis comme une succession de signaux cellulaires transmis par quatre groupes de protéines : les senseurs des dommages de l'ADN, les médiateurs, les transducteurs puis les effecteurs (Niida et Nakanishi, 2006) (cf. Figure 33).

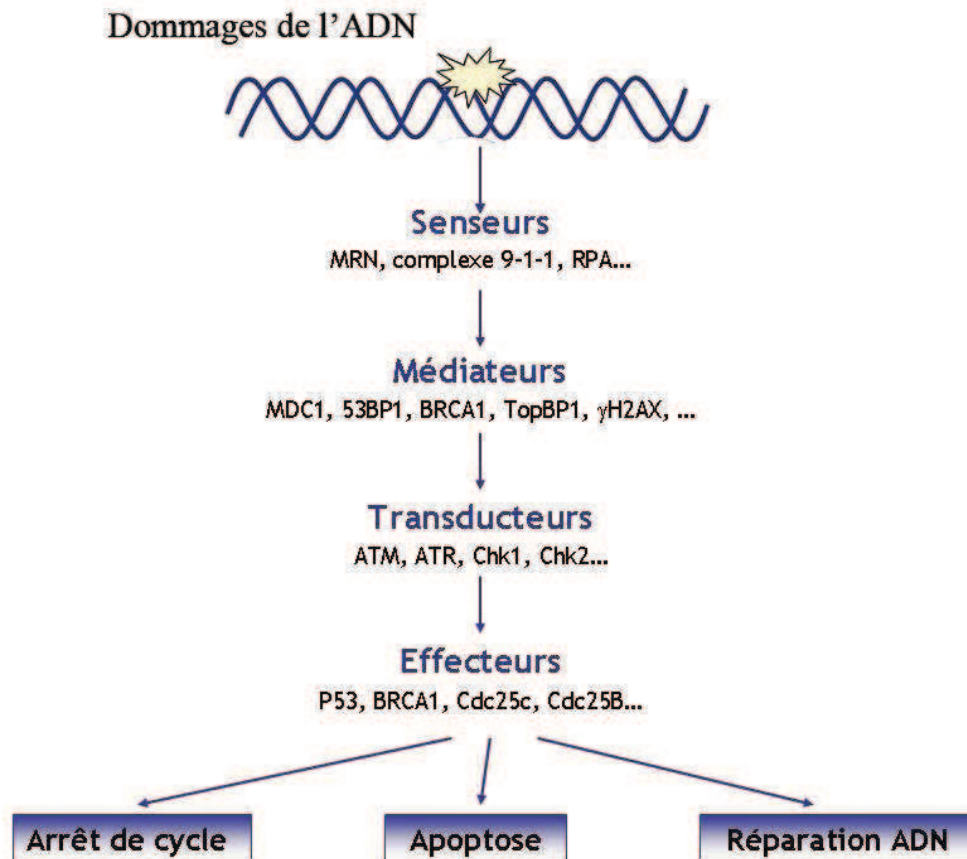


Figure 33. Organisation générale de l'activation des points de contrôle et de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (d'après Zhou *et al.*, 2000)

La réponse aux dommages commence par la détection de la lésion par des senseurs. Ces senseurs permettent de recruter rapidement les kinases ATM ou ATR qui sont responsables de la phosphorylation de H2AX et donc de la formation de foyers, consécutifs au recrutement de nombreux médiateurs. L'amplification de signal qui en résulte permet l'activation des transducteurs, principalement des kinases qui, à leur tour, activent ou inhibent les effecteurs de la réponse cellulaire. Leur action définit la nature de cette réponse : arrêt du cycle, réparation et/ou apoptose.

III.1.1 Les senseurs du dommage à l'ADN

Au niveau moléculaire, une lésion de l'ADN entraîne le recrutement, au niveau du dommage, du complexe 9-1-1 comportant les facteurs Rad9, Rad1 et Hus1. Ce recrutement va être régulé par le complexe Rad17 formé par le facteur Rad17 ainsi que par quatre sous-unités du facteur de réplication C (RFC). L'attachement du complexe 9-1-1 sur la chromatine va alors favoriser les phosphorylations réalisées par ATM (*Ataxia Telangiectesia Mutated*) et ATR (*Ataxia Telangiectesia and Rad3-related*) qui sont des protéines majeures dans la cascade de signalisation du dommage comme le montre la Figure 34.

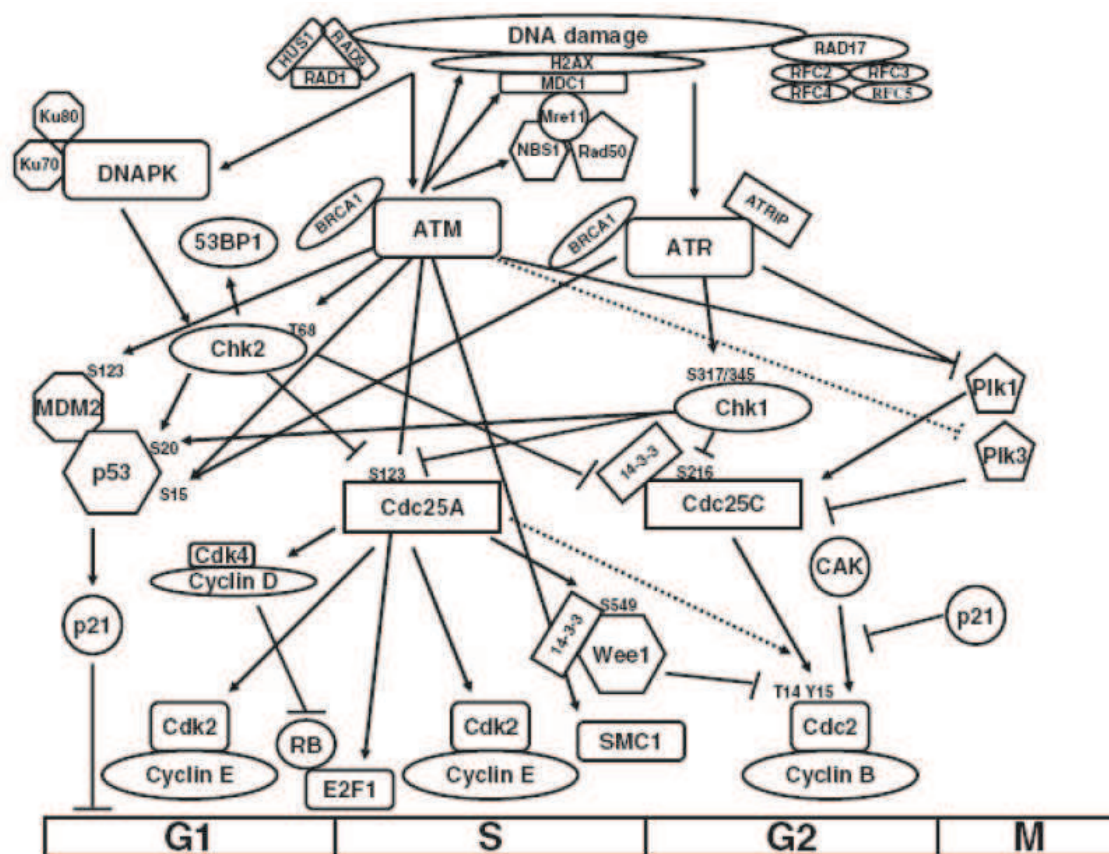


Figure 34. Organisation moléculaire des checkpoints de dommage à l'ADN au cours du cycle cellulaire (d'après Niida and Nakanishi, 2006)

III.1.2 Les médiateurs du dommage à l'ADN

Le domaine BRCT (*BRCA1 C-Terminus repeat*) permettant l'interaction protéine-phosphoprotéine est présent chez les quatre protéines permettant la médiation du signal de dommage à l'ADN chez les mammifères. Ces protéines sont la 53BP1 (*p53 Binding Protein 1*), la TopBP1 (*Topoisomerase binding protein 1*), la BRCA1 (*Breast cancer 1*) et la MDC1 (*Mediator of DNA Damage Checkpoint 1*) qui forme un pont moléculaire entre le facteur Nbs1 du complexe MRN (complexe formé par Mre11/Rad50/Nbs1 intervenant lors de la recombinaison homologue) et l'histone γ -H2AX. Le recrutement de ces médiateurs dépend justement de la phosphorylation de H2AX par ATM qui permet un marquage de la chromatine sur quelques mégadaltons autour de la cassure double brin de l'ADN.

III.1.3 Les transducteurs du dommage à l'ADN

Une fois le signal de dommage à l'ADN initié par les senseurs, il va être très rapidement transmis à ATM et ATR qui vont phosphoryler un certain nombre de substrats (cf. Figure 35). ATM est une protéine de 350 kDa qui, lorsqu'il y a cassure double brin et donc changement de la structure ordonnée de la chromatine, va subir un changement conformationnel permettant son autophosphorylation

intermoléculaire en S1981. Cette réaction de phosphorylation, ainsi que l'intervention du complexe MRN pour recruter ATM aux sites de dommages, vont réguler l'activité de la protéine. Une fois activée, ATM peut phosphoryler BRCA1, NBS1, Chk2, p53 et ATM elle-même. La mutation d'ATM engendre une maladie rare autosomale récessive appelée *Ataxia Telangiectesia*. ATR, protéine de 303 kDa, doit son nom à son homologie de séquence nucléotidique avec ATM et SpRad3. ATR forme un complexe stable avec ATRIP qui serait recruté aux sites de dommage à l'ADN grâce à la liaison entre ATRIP et RPA, protéine se fixant à l'ADN simple brin. De plus, ATR, actif au niveau des sites de réplication, peut phosphoryler et activer Chk1. ATR est donc une kinase multifonctionnelle régulant différents événements de la phase S à la phase M du cycle cellulaire. La mutation d'ATR entraîne une perte d'activité et mène à une maladie humaine autosomale récessive nommée le *Syndrome de Seckel*.

ATM et ATR sont en relation directe avec Chk1 et Chk2 qui ont également un rôle essentiel dans les *checkpoints* de dommage à l'ADN. Pour être activée, Chk1 subit une phosphorylation en S317 et S345 qui se voit inhibée en absence d'ATR, en absence de Hus1 et lorsque la quantité de Rad17 diminue. Chk1 phosphoryle Cdc25-A, Cdc25-B et Cdc25-C ce qui engendre une diminution de leur activité phosphatase et donc une interférence de l'interaction entre Cdc25 et le complexe Cycline-Cdk. Chk2, quant à elle, est activée par phosphorylation de T68 par ATM en réponse à un dommage à l'ADN et phosphoryle à son tour Cdc25-A, Cdc25-C, BRCA1 et p53. Cette phosphorylation est réalisée lors de l'apoptose dépendante de p53 mais elle ne l'est pas lors de l'arrêt du cycle en G2/M dû à un dommage à l'ADN. Les protéines kinases Chk1 et Chk2 seraient responsables des arrêts de cycles respectivement en G2 et G1 (Zhou *et al.*, 2000).

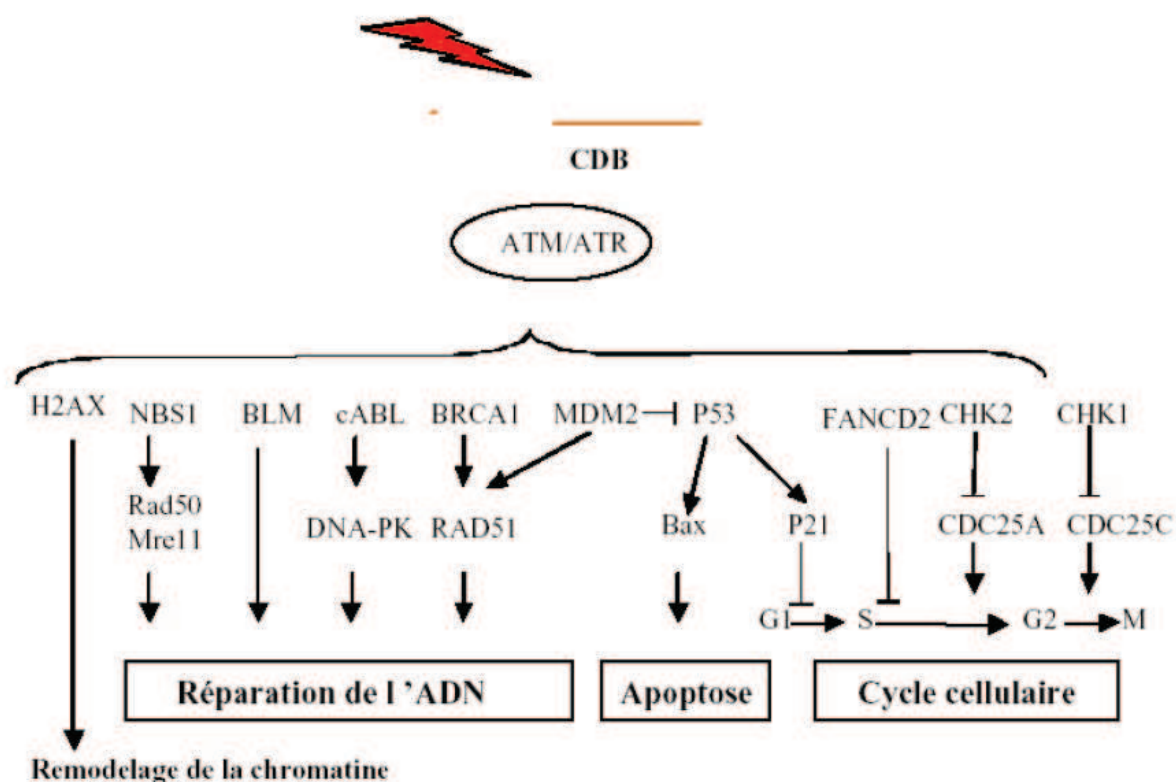


Figure 35. Signalisation des cassures double brin via les protéines ATM et ATR (tiré de Maurisse, 2003)

III.1.4 Les effecteurs du dommage à l'ADN

La protéine p53 a un rôle central dans la prise de décision d'une cellule la conduisant soit à l'arrêt du cycle cellulaire soit à l'apoptose. Cette protéine agissant comme facteur de transcription joue un rôle essentiel dans la réponse aux rayonnements ionisants (pour revue : Amundson *et al.*, 1998). Sa quantité et son activité transcriptionnelle sont régulées par des modifications post-traductionnelles. Dans les cellules normales, p53 se retrouve en quantité peu abondante grâce à l'intervention de Mdm2 qui permet d'une part son ubiquitylation et sa dégradation par le protéasome et d'autre part son export nucléaire. Quand il y a dommage à l'ADN, ATM et ATR phosphorylent p53 inhibant ainsi l'interaction Mdm2/p53 et permettant par la même occasion la stabilisation de p53 et l'arrêt du cycle cellulaire en G1. Les phosphatases Cdc25 et plus particulièrement Cdc25a sont quant à elles les effecteurs principaux du *checkpoint* G2/M. En effet, leur phosphorylation par Chk1 diminue leur activité phosphatase et entraîne l'arrêt en mitose. D'autre part, P53 pourrait interagir directement avec l'ADN endommagé (Jayaraman et Prives, 1995)

La place centrale d'ATM dans la réponse cellulaire liée aux dommages de l'ADN est mise en évidence par l'existence de la pathologie *Ataxia telangiectasia* dans laquelle le gène ATM (*ataxia telangiectasia* mutated) est muté. Cette pathologie présente des symptômes graves associant troubles

neurodégénératifs, dysfonctions immunitaires, radiosensibilité et prédisposition au cancer (McKinnon, 2004).

III.2 Les arrêts de cycle

Les arrêts de cycle constituent une possibilité de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Ces arrêts de cycle sont d'une importance majeure dans le sens où ils évitent à une cellule comportant de nombreux dommages de l'ADN de poursuivre son cycle cellulaire, et de fixer ainsi les lésions sous forme de mutations. Les arrêts de cycle permettent de limiter l'instabilité de l'information génétique à l'origine de pathologies telles que le cancer. Une étude menée *in vitro* sur des cellules d'ovaires de hamsters chinois a ainsi permis de montrer que le nitrate d'uranyle peut induire une baisse de la viabilité cellulaire et un ralentissement du cycle cellulaire (Lin *et al.*, 1993).

L'exposition aux rayonnements ionisants des cellules conduit à un arrêt en phase G2 dans toutes les lignées (d'environ une heure par Gy), à un arrêt en phase S ou à un arrêt en G1 dans les lignées exprimant une protéine p53 normale (pour revue : Favaudon, 2000). Ces arrêts au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire proviennent de l'activation de signaux cellulaires provoquée par la reconnaissance des dommages radio-induits de l'ADN. Ils permettent la mise en œuvre des mécanismes de réparation pour éviter les erreurs de réplication (transition G1-S) et les aberrations chromosomiques pendant la mitose (transition G2-M).

Arrêts en phase G1 ou G2 du cycle cellulaire

Après irradiation, un blocage peut se produire en fin de phase G1 pour éviter la réplication de l'ADN endommagé ou en fin de phase G2 pour éviter la ségrégation des chromosomes altérés (cf. Figure 36).

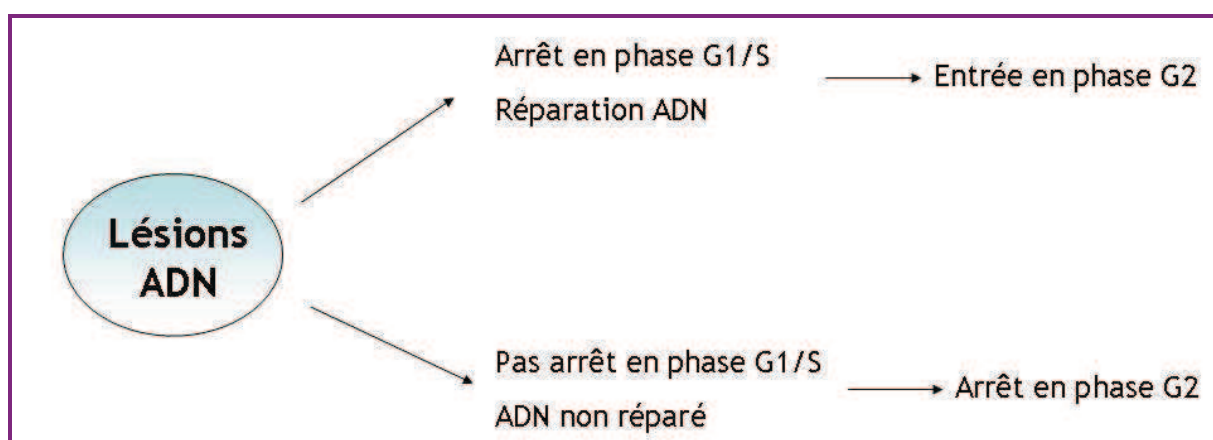


Figure 36. Arrêt du cycle cellulaire en réponse aux lésions de l'ADN

L'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 dépend du statut de P53. En effet, des cellules déficientes en p53 n'ont pas montré de blocage en G1 et la transfection de p53 a restauré l'arrêt (Kastan *et al.*, 1991; Kuerbitz *et al.*, 1992). p53 entraîne la transcription de p21WAF1 qui inhibe l'activité des cyclines kinases dépendantes (Xiong *et al.*, 1993). Ainsi, par exemple, Rb, protéine cible du complexe cycline D/Cdk 4, n'est pas phosphorylée or sa phosphorylation est nécessaire à l'activation des facteurs de transcription E2F qui régulent l'expression des gènes de la phase S (Black et Azizkhan-Clifford, 1999). Les histones sont également des cibles de phosphorylation pour les complexes cycline/Cdk et l'inhibition par p21WAF1 de ces complexes inhibe aussi cette phosphorylation participant probablement au blocage de l'entrée en phase S (el-Deiry *et al.*, 1994). D'autre part, p21WAF1 se lie à PCNA après irradiation (Savio *et al.*, 1996) conduisant à la diminution de son activité, or PCNA intervient dans la réplication de l'ADN. En revanche, cette diminution d'activité de PCNA n'inhiberait pas complètement son action dans le système de réparation de l'ADN par excision de base et resynthèse (Li *et al.*, 1994).

Les arrêts en phases G1 et G2 ne sont pas complètement indépendants puisque l'arrêt en phase G2 est prolongé en cas d'absence d'arrêt en G1 (Pellegata *et al.*, 1996). P53 jouerait un rôle indirect sur ce blocage. D'autres études ont montré une implication directe de p53 dans le blocage en G2 (Agarwal *et al.*, 1995). Ce blocage proviendrait de l'inhibition de l'expression de la cycline B1 (Innocente *et al.*, 1999) et de Cdc 2 (Azzam *et al.*, 1997) de manière p53-dépendante. Or, le complexe cycline B1/Cdc 2 promoteur de mitose est impliqué dans le blocage en phase G2 après lésion de l'ADN (pour revue Piwnica-Worms, 1999). Une autre étude a montré que ce complexe est séquestré par la protéine 14.3.3 σ , induite par p53, dans des cellules épithéliales irradiées, empêchant sa migration vers le noyau et donc bloquant l'entrée en mitose (Chan *et al.*, 1999). Ce complexe est aussi régulé par Chk1, Wee1 et Cdc25C (pour revue, Teyssier *et al.*, 1999).

Une étude menée *in vitro* sur des cellules d'ovaires de hamsters chinois a ainsi permis de montrer que le nitrate d'uranyle peut induire un tel ralentissement (Lin *et al.*, 1993).

III.3 La réparation des lésions de l'ADN

Afin de circonscrire les dommages induits au niveau du patrimoine génétique, c'est à dire l'ADN, et d'assurer la survie de l'espèce, les cellules de chaque organisme ont dû s'armer de systèmes de réparation efficaces. Il existe de nombreux mécanismes de réparation des lésions de l'ADN résultant de la diversité des dommages pouvant altérer la structure de l'ADN. Une fois le cycle cellulaire stoppé, les mécanismes impliqués dans la réparation des lésions de l'ADN entrent en jeu (Hartwell et Weinert, 1989).

Les mécanismes de réparation peuvent alors permettre de conserver l'intégrité du génome malgré les agressions quotidiennes subies par l'ADN.

III.3.1 Mécanismes de réparation des lésions touchant un brin de l'ADN

III.3.1.a La réparation par excision de nucléotides (NER)

Le mécanisme de réparation par excision de nucléotides (NER) est le moins spécifique des mécanismes de réparation de l'ADN car il est capable de réparer un très grand nombre de lésions sans apparentes similitudes structurales. La caractéristique commune des lésions réparées par la NER semble être plutôt une importante taille qui génère une distorsion structurale de la double hélice d'ADN. C'est le cas de la formation des adduits par des xénobiotiques de grande taille comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Cela concerne les lésions induites par les rayons ultraviolets, les rayons ionisants, les mutagènes, les carcinogènes chimiques et certaines substances thérapeutiques (Friedberg *et al.*, 1995 ; Sarasin *et al.*, 1997 ; Averbeck, 2000). Le mécanisme de la NER est complexe et implique une quarantaine de gènes. La déficience pour l'un ou l'autre de ces gènes entraîne la survenue de pathologies, regroupées sous le nom de *Xeroderma pigmentosum* (XP), le syndrome de Cockayne et la trichothiodystrophie. Avant l'identification des protéines impliquées dans la NER, les différents types de pathologies XP furent classifiés de XPA à XPD, ce qui permit ensuite de nommer les protéines impliquées lors de leur découverte (Cleaver, 2005).

Parmi tous les systèmes de réparation, l'excision de nucléotide, illustré en Figure 37, est le plus polyvalent en termes de reconnaissance des lésions. Cette réparation peut se faire par deux voies, se recouvrant partiellement : la réparation couplée à la transcription (Transcription-Coupled Repair ou TCR) et la réparation globale du génome (Global Genome Repair ou GGR), chacune possédant des protéines spécifiques de reconnaissance du dommage. Dans le cas de la GGR, on retrouve les protéines XPC, HR23B, XPA, RPA et RPE, reconnaissant une distorsion de la molécule d'ADN. Dans la TCR, ce sont les protéines CSA et CSB qui reconnaissent la lésion. Suivent des étapes d'excision de la lésion par différents enzymes et complexes enzymatiques, et enfin une synthèse réparatrice de l'ADN.

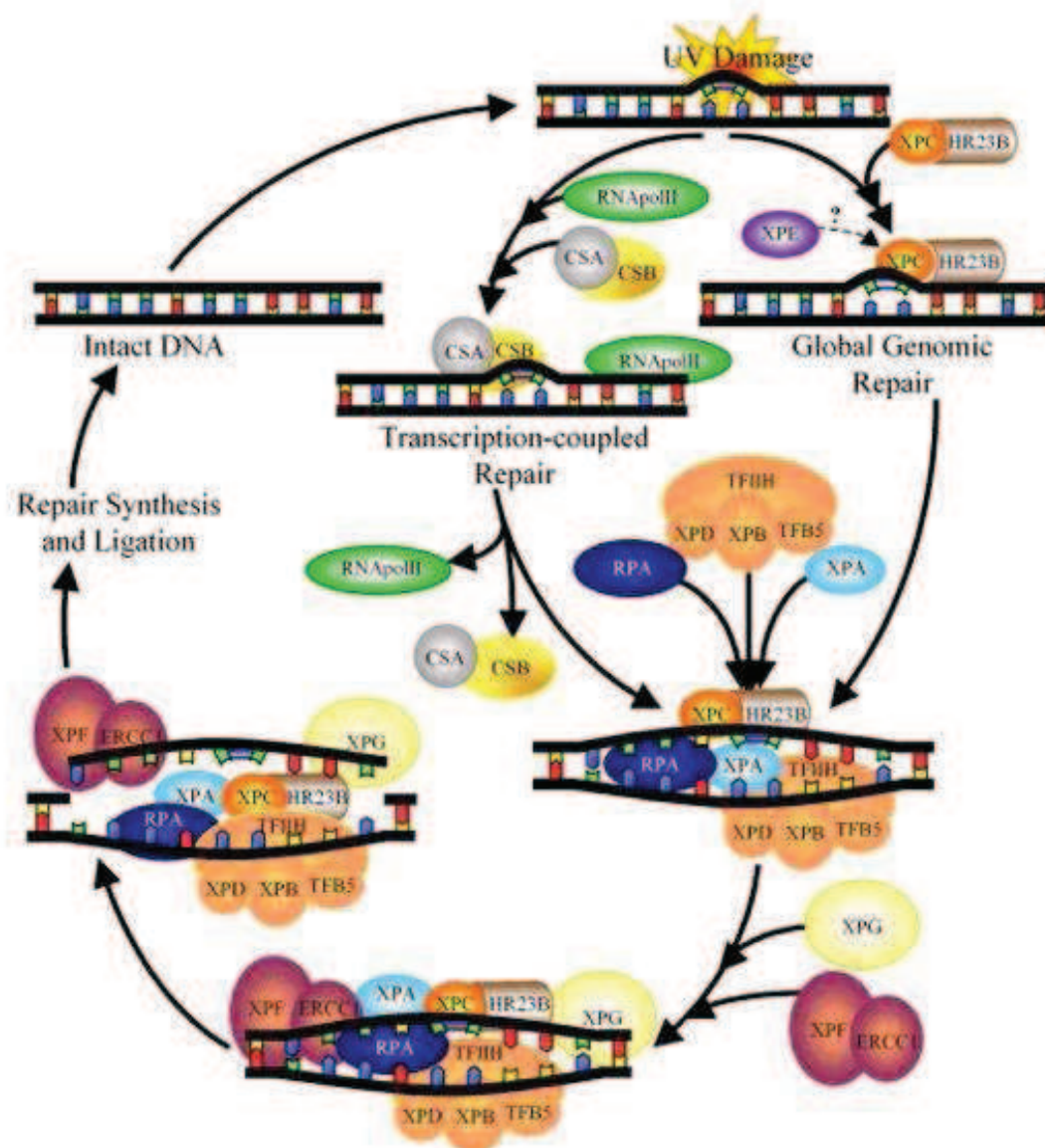


Figure 37. Réparation par excision de nucléotides (Nucleotide Excision Repair ou NER)

Source : http://ccr.coriell.org/sections/collections/nigms/ner_pathway.aspx?PgId=256

III.3.2.b La Réparation par Excision de Bases (BER)

La BER concerne les lésions de faible taille qui incluent principalement les modifications de bases, et les pertes spontanées ou induites de bases générant des sites abasiques.

A l'inverse de la NER, aucune pathologie n'a été mise en évidence chez l'homme du fait d'un dysfonctionnement de la BER. Son mécanisme a été principalement élucidé par des études sur *Escherichia coli*, et il se trouve que la BER est un des mécanismes présentant le plus de similitude entre la bactérie et l'homme.

Généralement, les bases modifiées de l'ADN sont excisées à l'aide d'ADN glycosylases spécialisées (Figure 38, étape I, à gauche), comme hNth et hOgg1, qui produisent des sites abasique (AP). Il existe huit ADN glycosylases qui se caractérisent, chez l'homme, par diverses activités et spécificités de substrat. Normalement, il s'agit d'enzymes de petite taille qui n'ont pas besoin de cofacteurs pour exercer leur activité. Elles sont en permanence présentes dans le noyau cellulaire et ne sont pas induites par des lésions génotoxiques de l'ADN. Par exemple, la 8-oxoguanine ADN glycosylase hOgg1 (homologue de la protéine Fpg de *E. coli*) excise, entre autres, la 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) de l'ADN. Les sites AP formés sont des substrats pour les AP endonucléases (étape II). Elles incisent le brin d'ADN en 3' et 5' du site abasique. Une phosphodiesterase enlève les parties sucre-phosphate restantes.

Dans le cas des cassures simple brin, la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP) détecte les cassures simple brin (étape I, à droite). La protéine XRCC1 détecte aussi des cassures indépendamment de la PARP (étape I, à droite). La PARP jouerait un rôle d'initiation et de régulation de la réparation par sa liaison rapide mais intermittente aux cassures simple brin. La protéine XRCC1 pourrait jouer un rôle de régulation négative de l'activité PARP en se liant préférentiellement à la forme oligo (ADPribosylée) de la PARP lorsque celle-ci est fixée aux cassures simple brin. La polynucléotide kinase (PNK) serait aussi importante pour la réparation des cassures simple brin (étape III).

Ensuite, la voie impliquant l'enlèvement de un ou deux nucléotides est appelée « *short patch repair* » et donne de petites brèches ; c'est la voie principale chez les mammifères. Celle impliquant plusieurs nucléotides est appelée « *long patch repair* » et donne de plus grandes brèches simple brin dans l'ADN.

Lors de la voie « *short patch repair* », l'ADN polymérase β remplit la brèche avec un à deux nucléotides en utilisant le brin complémentaire non endommagé comme matrice (étapes IV et V). L'ADN polymérase β est inductible par les dommages de l'ADN. Le complexe ADN ligase III/ XRCC1 effectue la jonction des brins d'ADN (étape VI). Le fait que XRCC1 interagit également avec Pol β et l'ADN ligase III suggère qu'elle pourrait agir comme coordinateur de l'excision de bases et de la réparation des cassures simple brin.

Lors de la voie « *long patch repair* », les ADN polymérases δ et δ/ϵ associées aux facteurs protéiques PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (étape VII) et l'endonucléase FEN1 (étape VIII) remplissent la brèche avec cinq à six nucléotides en utilisant le brin complémentaire non endommagé comme matrice. L'ADN ligase I effectue la jonction des brins d'ADN (étape IX).

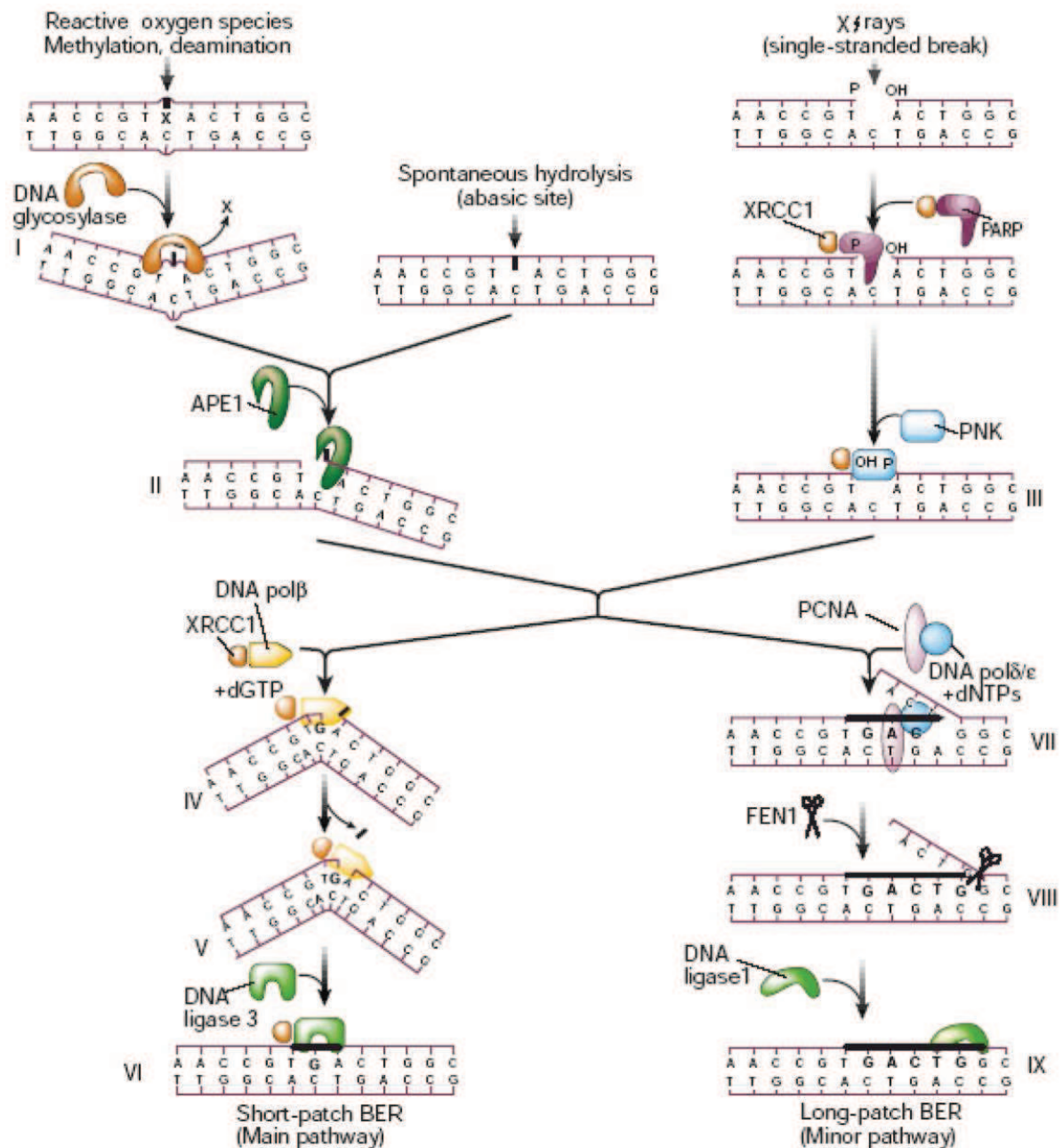


Figure 38. Mécanismes d'excision de bases (BER, *Base-Excision Repair*) (Hoeijmakers, 2001)

III.3.2 Mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN

La réparation des cassures double brin (CDBs) de l'ADN est essentiel chez les eucaryotes puisqu'il apparaît être le dommage le plus critique pour une cellule : il suffit d'une CDB non réparée pour induire l'apoptose (Van Gent *et al.*, 2001). Les CDBs peuvent être exogènes, c'est-à-dire causées par exemples par des radiations ionisantes, mais elles peuvent aussi être endogènes durant la méiose. On estime à 10 à 100 CDB endogènes par noyau et par jour (Burma *et al.*, 2006). Il existe deux mécanismes de réparation des cassures de l'ADN. Le premier mécanisme est la recombinaison homologue (HR) qui permet la

réparation des cassures simple et double brin dans les cellules germinales. Le deuxième mécanisme est la réparation non-homologue (NHEJ) des cassures double brin (cf. [Figure 39](#)) dans les cellules somatiques.

III.3.2.a [La réparation par Recombinaison Homologue \(HR\)](#)

Les dommages très sévères impliquant les deux brins de l'ADN, tels que les cassures double brin radio-induites ou les pontages inter-brins peuvent être réparés par un processus de recombinaison génétique entre deux molécules homologues d'ADN. Ce mécanisme se déroule donc pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire ([Takata et al., 1998](#)). Il a été montré ([Sonoda et al., 2001](#)) que les DSB réalisées pendant la réplication de l'ADN, lorsque la chromatine est plus lâche et permet aux chromatides sœurs d'être proches, étaient plutôt réparées par recombinaison homologue.

Le modèle actuel pour la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue implique la formation d'un hétéroduplex suite au couplage du brin endommagé à une région double brin homologue et intacte de l'ADN. Une resynthèse de l'ADN sur cette matrice intacte reconstitue le brin endommagé. La séparation des produits de la réaction nécessite l'action d'enzymes qui effectuent la jonction des brins d'ADN nouvellement synthétisés. Ce processus comporte l'action de plusieurs protéines du groupe d'épistasie RAD52.

D'abord, les cassures double brin sont reconnues par le complexe protéinique RAD50/MRE11/NBS1, appelé complexe MRN, qui se fixe à deux terminaisons de brins opposés situées de part et d'autre de la cassure double brin pour exciser quelques nucléotides (cf. [Figure 39, étape I](#)). Puis, la protéine RAD52 se lie aux deux autres terminaisons 3' des brins opposés situées de part et d'autre de la cassure double brin afin de les protéger contre la digestion par les endonucléases cellulaires. En présence de la protéine RAD51 et d'autres protéines comme RAD54, XRCC2, XRCC3, les deux brins portant RAD52 se couplent aux deux brins intacts (duplex) d'une chromatide sœur ou d'un chromosome homologue, en formant un hétéroduplex ([étape II](#)). Les brins intacts servent de matrice pour les prolonger par une synthèse d'ADN réparatrice grâce à une ADN polymérase ([étape II](#)). Enfin, les deux brins se séparent ensuite du duplex homologue (résolution de jonctions de Holliday). Leur jonction et leur ligation aux terminaisons des brins façonnés sont assurées par l'ADN ligase I sans perte d'information génétique ([étape IV](#)).

Ce mécanisme de recombinaison homologue implique bien d'autres molécules et interactions. La protéine ATM, une protéine kinase de la famille des phosphoinositidyle 3-kinases, et la tyrosine kinase c-Abl interviennent dans ce processus. La protéine RAD51 est phosphorylée par l'ensemble ATM/c-Abl, ce qui active l'interaction entre RAD51 et RAD52. Ces protéines participent donc à la régulation de la recombinaison homologue. En réponse aux radiations ionisantes, la protéine ATM phosphoryle la protéine

BRCA1 qui stimule la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue en coopération avec les protéines BRCA2 et RAD51. La protéine BRCA1 est également impliquée dans la réparation des bases oxydées de l'ADN (thymine glycol) radioinduites et leur élimination sélective dans les brins activement transcrits.

III.3.2.b La Réparation par Recombinaison Non-Homologue (NHEJ)

La réparation par religation non homologue des cassures double brin ne nécessite pas d'homologie avec un autre duplex de l'ADN et n'utilise pas, ou très peu, de paires de bases homologues entre les extrémités de l'ADN cassé (cf. [Figure 39](#)). Ce mécanisme intervient donc à toutes les phases du cycle cellulaire. Il a notamment un rôle essentiel dans la recombinaison V(D)J permettant la diversité des immunoglobulines. La réparation par recombinaison non-homologue est préférentiellement utilisée par les cellules de mammifères (donc chez l'Homme) pour réparer la majorité des cassures double brin exogènes. [Liang et ses collaborateurs \(1998\)](#) ont notamment montré que plus de 60% des DSB exogènes dans les cellules ES de souris étaient réparées par NHEJ. Ceci s'expliquerait par le fait que les DSB exogènes, notamment causées par les radiations ionisantes, touchent la chromatine bien compacte. Dans ce cas, la recherche de séquence homologue semble difficile ce qui favorise NHEJ par rapport à HR.

Lors d'une cassure double brin, deux hétérodimères de deux protéines KU (KU70 et KU80) se fixent aux extrémités des brins d'ADN cassés ([étape V](#)) et se complexent aux sous-unités catalytiques de la protéine kinase ADN dépendante (DNA-PKcs) ([étape VI](#)). La plupart des cassures double brin ne sont pas des coupures franches mais comportent des terminaisons simple brin modifiées qui doivent être coupées. Ainsi, le complexe de protéines MRE11/RAD50/NBS1, ayant une activité endo et/ou exonucléasique, intervient également dans ce processus, avant la religation. La voie de régulation ATM/p53 induit l'expression de la protéine KU70. La protéine histone H2AX serait également rapidement phosphorylée en réponse à des cassures doubles brins afin de former des zones de réparation.

Enfin, les brèches sont probablement comblées par une ADN polymérase, qui n'est pas encore spécifiée. Puis, après alignement des brins, ceux-ci sont reliés par l'ADN ligase IV en présence de la protéine XRCC4 (X-ray cross complementing 4) ([étape VII](#)) ([Critchlow et al., 1997](#) ; [Grawunder et al., 1998](#)). Quand la protéine XRCC4 est absente, les cellules sont incapables d'effectuer correctement la recombinaison V(D)J et elles deviennent hypersensibles aux radiations ionisantes dans toutes les phases du cycle cellulaire sauf la phase S.

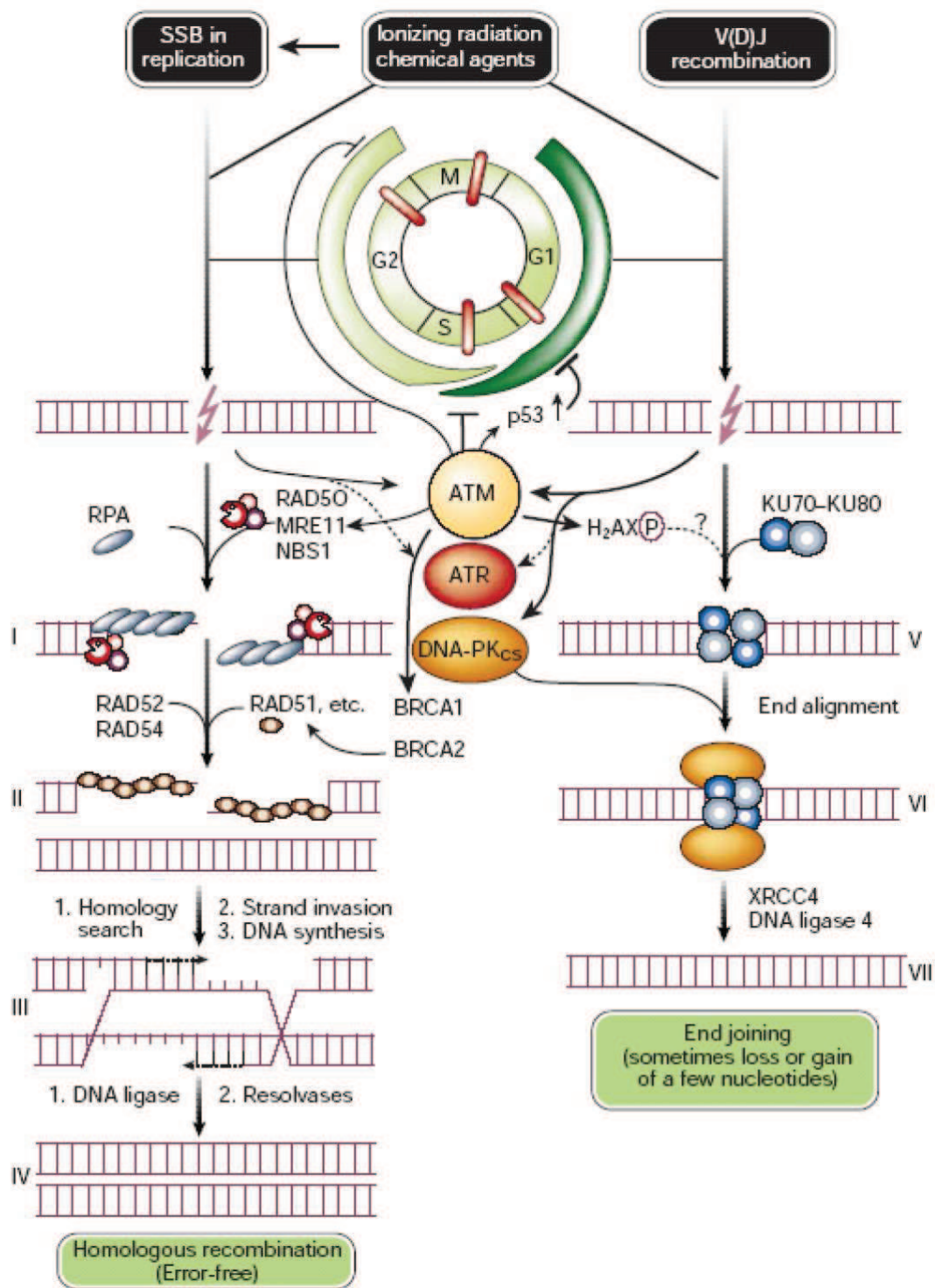


Figure 39. Mécanismes de recombinaison homologue (*homologous recombination*) et de religation non homologue (*end joining*) (Hoeijmakers, 2001)

III.4 L'instabilité génomique induite par l'uranium

III.4.1 Instabilité génomique : généralités

Une autre conséquence de l'exposition cellulaire aux toxiques est l'installation d'une instabilité génomique, qui accélère l'accumulation de mutations qui s'ajoutent à celles induites initialement. L'instabilité génomique apparaît dans certaines cellules plusieurs divisions cellulaires après irradiation et est caractérisée par des phénotypes et des clones instables dans la descendance des cellules irradiées avec de multiples aberrations chromosomiques (cf. Figure 40), des changements de ploïdie, des formations de micronoyaux, des mutations géniques, des amplifications, des altérations de séquences mini et microsatellites (courtes répétitions en tandem), une efficacité de clonage réduite et surtout des altérations dans la maintenance des chromosomes (longueur de télomérase, activité télomérase) (Pampfer *et al.*, 1989 ; Lorimore *et al.*, 1998 ; Little, 2002 ; Reliene *et al.*, 2003). Dans l'immense majorité des cas, cette instabilité génétique apparaît comme le prélude de la mort cellulaire. Le fait que dans le cas d'une instabilité génomique radio-induite les mécanismes de maintien de l'intégrité des chromosomes soit altérée suggère que ce phénomène pourrait jouer un rôle important dans la cancérogenèse radio-induite, les tumeurs radio-induites présentant fréquemment des modifications chromosomiques multiples. Certaines expériences le suggèrent comme par exemple le fait que l'instabilité dans des cellules souches de moelle osseuse de souris entraîne des mutations non spécifiques retrouvées dans les leucémies radio-induites (MacDonald *et al.*, 2001). Cependant d'autres expériences ne sont pas en faveur de cette hypothèse et l'instabilité génomique ne semble pas impliquée, chez la souris, dans l'initiation des cellules leucémiques (Bouffler *et al.*, 2001). Toutefois, la relation de cause à effet entre l'instabilité génomique radio-induite et la cancérogenèse radio-induite n'est pas réellement démontrée.

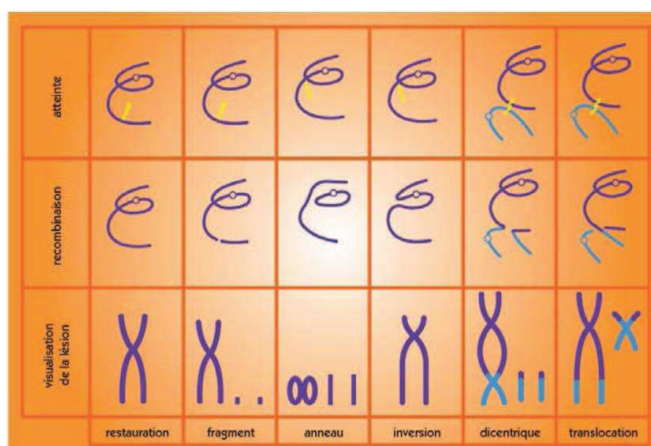


Figure 40. Nature et formation des aberrations chromosomiques. Selon la position et le nombre de lésions de l'ADN et en fonction de la qualité de la réparation ou de la recombinaison du chromosome sur lui-même ou avec un autre, soit des chromosomes normaux, soit différents types d'aberrations chromosomiques seront observés (Moustacchi *et al.*, 2000).

III.4.2 Instabilité génomique induite par l'uranium

III.4.2.a La contribution des effets chimiques de l'uranium

Coen *et al.* (2001) ont démontré que les métaux lourds tels que le cadmium ou le nickel peuvent induire une instabilité génomique. Dans le cas de l'U, de nombreuses études démontrent que ce dernier induit diverses aberrations chromosomiques survenant à la suite d'épisodes de contamination.

In vitro, des effets génotoxiques (cf. Tableau 7) de l'U ont été observés sur différents modèles cellulaires. Lin *et al.* (1993) ont montré la capacité du nitrate d'uranyle à induire une instabilité génomique par le biais d'une augmentation du nombre de micronoyaux, d'aberrations chromosomiques et d'échanges de chromatides sœurs, utilisant comme modèle cellulaire une lignée de cellules d'ovaires de hamsters chinois. Les auteurs ont attribué les dommages cytogénétiques directement à l'action chimique du métal, plutôt qu'à l'émission des particules alpha. En effet, aux concentrations utilisées, la radioactivité n'est pas détectable par un compteur proportionnel à ionisation de gaz ou par comptage en scintillation. Miller *et al.* (2003) ont réalisé une étude dans le but d'évaluer les capacités de l'UA à induire une instabilité génomique au niveau de la descendance d'ostéoblastes humains exposés à ce radionucléide. Cette étude a ainsi permis de démontrer que les cellules issues de la descendance de cellules exposées à de l'UA présentent une fréquence d'apparition de micronoyaux jusqu'à 2,5 fois plus élevée que des cellules témoins. Dans une autre étude des mêmes auteurs, l'examen génotoxique d'une lignée cellulaire d'ostéoblastes humains exposée *in vitro* à de l'UA a permis de détecter la présence de micronoyaux, d'échanges de chromatides sœurs ainsi que de cassures de brins d'ADN (Miller *et al.*, 2002b). Yazzie *et al.* (2003) ont montré que le cation uranyle induit des cassures des brins d'ADN en présence d'ascorbate, et suggèrent que les aberrations chromosomiques (observées dans les précédents rapports) pourraient être au moins en partie dues à des origines non radiologiques. Des cassures d'ADN, mesurées par le test des comètes, ont été mises en évidence dans des cellules d'ovaires de hamsters chinois exposés à de l'uranium appauvri sous forme d'acétate d'uranyle ; les auteurs montrent aussi la capacité de l'U à former des adduits avec l'ADN et à induire des mutations (Stearns *et al.*, 2005).

Sur des modèles *in vivo*, Hao et ses collaborateurs (Hao *et al.*, 2009) ont récemment démontré qu'une exposition chronique orale à l'UA induit une instabilité génomique. En effet, l'UA induit une augmentation du taux de micronoyaux dans les cellules de la moelle osseuse.

Dans les études sur l'Homme, des effets génotoxiques ont été observés principalement sur les cellules du sang. Martin et ses collaborateurs (1991) ont étudié différents paramètres cytogénétiques (altération de la symétrie des chromosomes et échanges de chromatides sœurs) sur des cultures

lymphocytaires issues de mineurs exposés à l'U. La fréquence d'apparition de ces deux paramètres de cytogénotoxicité dans les lymphocytes des mineurs exposés à l'U s'est révélée significativement plus importante que pour des lymphocytes issus d'un groupe témoin. Les facteurs confondants que sont l'exposition externe aux radiations émises par le radon ainsi que la consommation de tabac des individus impliqués dans l'étude ont pu être écartés lors de l'interprétation de ces résultats, attribuant ainsi ces effets à la toxicité chimique de l'U. L'augmentation du taux d'échange de chromatides sœurs a également été observée chez des vétérans de la guerre du Golfe (McDiarmid *et al.*, 2004) ainsi que chez des personnes travaillant le minerai d'U (Prabhavathi *et al.*, 1995). Ces derniers auteurs ont réitéré leur étude en investiguant un nombre plus important d'aberrations chromosomiques. Les résultats de ce travail montrent que le niveau moyen d'aberrations (cassures, translocations, fragments, asymétrie, polyploïdie) a été augmenté à la suite de l'exposition à l'U (Prabhavathi *et al.*, 2000). Par ailleurs, une augmentation significative de la fréquence des micronoyaux a récemment été rapportée dans les lymphocytes du sang de personnes vivant dans des zones contaminées à l'UA (suite des conflits ayant eu lieu dans les Balkans) comparativement à des personnes vivant dans des zones voisines non contaminées de Bosnie et Herzégovine (Ibrulj *et al.*, 2004 ; Krunić *et al.*, 2005). Enfin, une augmentation non significative de la fréquence des mutations géniques dans une cohorte de vétérans de la Guerre du Golfe a également été rapportée (McDiarmid *et al.*, 2006 ; Squibb *et al.*, 2006).

Il faut cependant noter que la sensibilité du test des MNx aux faibles doses est limitée par une variabilité inter-individuelle de la fréquence spontanée de MNx. La sensibilité du test de numération des MNx aux rayonnements pourrait être renforcée par la numération des MNx avec (MN centromère-positif: BN-MNC+) ou sans (MN centromère-négatif: BN-MNC-) marquage centromérique (Norppa *et al.*, 1993), et pourrait permettre la différenciation entre les effets aneugènes et clastogènes (Kirsch-Volders *et al.*, 1997). Une étude sur les travailleurs du nucléaire, comparativement à un groupe témoin de même âge, a montré une augmentation systématique de la fréquence des MNx avec l'âge des donneurs qui est quasi entièrement attribuable à une augmentation des BN-MNC+, et reflète une perte chromosomique avec l'âge (Thierens *et al.*, 2000). Une autre étude sur les mineurs d'U a évalué les effets à long terme d'une exposition à l'U en analysant le marquage centromérique des MNx (Kryscio *et al.*, 2001). Dans cette étude, aucune différence significative dans la fréquence de MNx entre les 2 groupes étudiés n'a été observée (personnes témoins non exposées et mineurs d'U). Cependant, la fréquence de MN centromère-positif est plus importante dans la population témoin que la population de mineurs exposés. Par conséquent, la fréquence de MNx provenant de fragments acentriques est plus importante dans la population exposée à

l'U. Ces résultats indiquent donc la présence d'une instabilité génomique dans les lymphocytes de mineurs d'U.

III.4.2.b La contribution des effets radiologiques de l'uranium

Miller et ses collègues (2002b) se sont intéressés à la génotoxicité de l'U dans le but de caractériser la contribution relative des propriétés chimiques et radiologiques de l'U. Pour cela, l'apparition de dommages chromosomiques tels que les chromosomes dicentriques ont été mesurées. En effet, les chromosomes dicentriques sont des indicateurs spécifiques des radiations, du fait de leur faible fréquence spontanée dans la population normale. Les résultats de cette étude montrent *in vitro* sur une lignée d'ostéoblastes humains (HOS), une augmentation de la fréquence des chromosomes dicentriques après exposition au chlorure d'uranyle appauvri mais pas après exposition à d'autres métaux lourds comme le nickel et le tungstène, suggérant ainsi un effet des radiations dans la toxicité de l'UA *in vitro* (Miller *et al.*, 2002b).

Sur des modèles *in vivo*, des effets génotoxiques ont été observés dans des cellules germinales de souris mâles exposées à de l'UE (18,9 % en ^{235}U) (Hu et Zhu, 1990). Dans cette étude, la radioactivité du composé utilisé semble pouvoir être mise en cause.

Différentes études menées chez des cohortes de personnes travaillant dans des mines d'U ont aussi fait l'objet d'investigations relatives à l'apparition d'aberrations chromosomiques (Meszaros *et al.*, 2004). Cependant, les résultats obtenus ont été liés à l'exposition aux émissions radioactives du radon et non à un quelconque effet radiotoxique de l'U. Par exemple, une étude menée sur des mineurs namibiens a permis de détecter de nombreuses anomalies chromosomiques au niveau de cellules sanguines. Cependant, aucune mention n'est faite quant à la possibilité d'une exposition au radon ni même d'une atteinte chimiotoxique de l'U (Zaire *et al.*, 1997).

Des études montrent un lien entre une exposition à l'U ou au radon et l'augmentation des aberrations chromosomiques dans les cellules du sang (Brandom *et al.*, 1972 ; Martin *et al.*, 1991 ; Meszaros *et al.*, 2004 ; Popp *et al.*, 2000).

Ces effets génotoxiques vont pouvoir influencer sur le devenir des cellules (apoptose, nécrose, cancérisation) et notamment être à l'origine d'anomalies héréditaires (*cf.* Figure 41). Tous les événements indiqués n'ont pas la même probabilité de se produire. En effet, la survie cellulaire (par exemple) est le cas le plus fréquent après réparation de l'ADN.

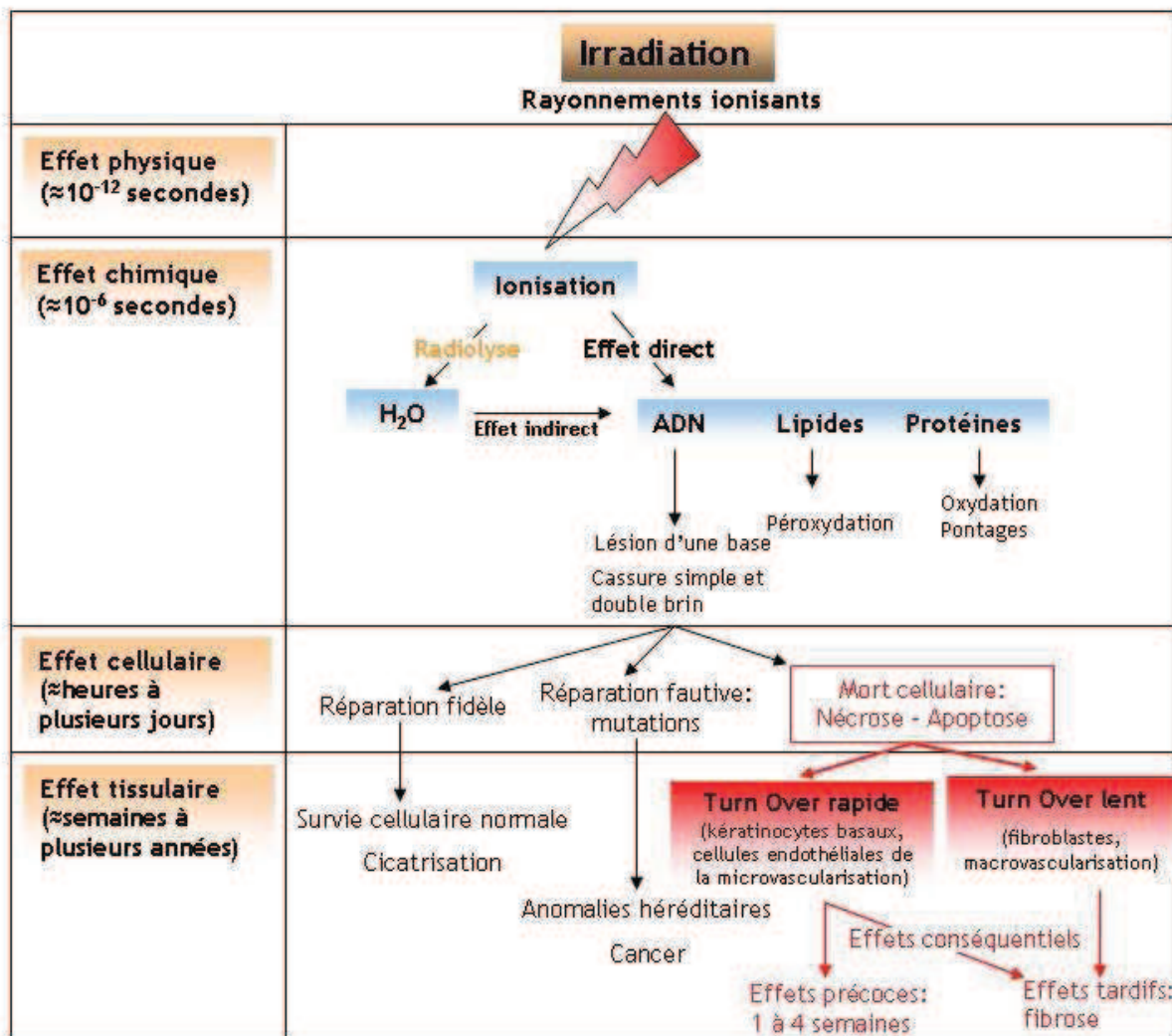


Figure 41. Chronologie des effets biologiques déclenchés par l'exposition aux RI. Évolutions possibles au niveau cellulaire en fonction du temps

Tableau 7. Synthèse des effets génotoxiques de l'U *in vitro* et *in vivo*

Composé utilisé	Type d'étude	Type cellulaire	Effets génotoxiques	Référence
Nitrate d'uranyle	<i>In vitro</i>	Cellules d'ovaires de hamsters chinois	Augmentation du nombre de MNx, d'aberrations chromosomiques et d'échanges de chromatides sœurs	Lin <i>et al.</i> , 1993
Uranium appauvri (chlorure d'uranyle appauvri)	<i>In vitro</i>	Lignée d'ostéoblastes humains (HOS)	Augmentation de la fréquence des MNx, échanges de chromatides sœurs, des cassures de brins d'ADN et des chromosomes dicentriques Altération ADN avec formation de thymine glycol et de 8-hydroxy-déoxyguanosine	Miller <i>et al.</i> , 2001, 2002a, 2002b et 2003
Acétate d'uranyle	<i>In vitro</i>	Plasmide	Augmentation des cassures de brins d'ADN	Yazzie <i>et al.</i> , 2003
Acétate d'uranyle appauvri	<i>In vitro</i>	Cellules d'ovaires de hamsters chinois	Augmentation des cassures de brins d'ADN, formation d'adduits avec l'ADN et induction de mutations	Stearns <i>et al.</i> , 2005
Dioxyde d'uranium (UO ₂) et Tétraoxyde d'uranium (UO ₄) = uranium appauvri	<i>In vivo</i>	Cellules broncho-alvéolaires de rat	Augmentation des dommages de l'ADN	Monleau <i>et al.</i> , 2006a et 2006b
Uranium appauvri	<i>In vitro</i>	Cellules proximales rénales de rat ((NRK-52 ^E))	Augmentation des dommages de l'ADN (CSB, CDB et sites labiles alcalins) Augmentation des cassures double brin	Thiébault <i>et al.</i> , 2007
Nitrate d'uranyle	<i>In vivo</i>	Erythrocytes de poisson zèbre	Augmentation des dommages de l'ADN	Barillet <i>et al.</i> , 2005
Uranium appauvri	<i>In vivo</i>	Cellules de la moelle osseuse de rat	Augmentation fréquence de MNx	Hao <i>et al.</i> , 2009
Fluorure d'uranyle enrichi	<i>In vivo</i>	Cellules germinales de souris mâles	Augmentation des aberrations chromosomiques	Hu et Zhu, 1990

Uranium	<i>In vivo</i> . Vétérans de la guerre du Golfe	Cellules du sang	Augmentation du taux d'échange de chromatides sœurs	McDiarmid <i>et al.</i> , 1995
Uranium	<i>In vivo</i> . Exposition de mineurs	Cellules du sang	Augmentation du taux d'échange de chromatides sœurs	Prabhavathi <i>et al.</i> , 1995 et 2000
Uranium	<i>In vivo</i> . Personnes vivant dans des zones contaminées à l'uranium appauvri (des conflits dans les Balkans)	Cellules du sang (lymphocytes)	Augmentation significative de la fréquence des MNx	Krunic <i>et al.</i> , 2005
Uranium	<i>In vivo</i> . Personnes travaillant dans des mines d'uranium	Cellules du sang (lymphocytes)	Augmentation des aberrations chromosomiques	Krunic <i>et al.</i> , 2005
Uranium appauvri	<i>In vivo</i> . Personnes vivant dans des zones contaminées à l'uranium appauvri (Bosnie et Herzégovine)	Cellules du sang (lymphocytes)	Augmentation significative de la fréquence des MNx	Ibrulj <i>et al.</i> , 2004
Radon	<i>In vivo</i> . Mineurs	Cellules du sang	Augmentation des aberrations chromosomiques	Brandom <i>et al.</i> , 1972
Uranium	<i>In vivo</i> . Exposition de mineurs	Cellules du sang (lymphocytes)	Augmentation des MNx centromère-négatifs (MNx avec fragments acentriques)	Kryscio <i>et al.</i> , 2001
Uranium	<i>In vivo</i> . Personnes professionnellement exposées à l'U	Cellules du sang	Augmentation des aberrations chromosomiques, échanges de chromatides sœurs et des chromosomes dicentriques	Martin <i>et al.</i> , 1991
Uranium	<i>In vivo</i> . mineurs	Cellules du sang	Augmentation des aberrations chromosomiques	Meszaros <i>et al.</i> , 2004
Uranium et radon	<i>In vivo</i> . Mineurs allemands	Cellules du sang	Augmentation des aberrations chromosomiques	Popp <i>et al.</i> , 2000

III.5 La mort cellulaire induite par l'uranium

Les organismes multicellulaires ont souvent besoin de se débarrasser de cellules qui sont en excès ou potentiellement dangereuses comme des cellules ayant subi des dommages de l'ADN. Ils utilisent dans ce but, un programme moléculaire dédié à cette tâche : la mort cellulaire. La mort cellulaire peut impliquer deux mécanismes : la nécrose (ou mort accidentelle) et l'apoptose (ou mort programmée).

Tout d'abord, la nécrose est une mort accidentelle qui survient lorsque la toxicité d'un produit est trop importante et endommage tous les compartiments cellulaires. Dans ce cas, la cellule gonfle puis éclate en déversant son contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire, ce qui génère des lésions tissulaires associées à une réponse inflammatoire importante. Chez les mammifères, il a été montré que les nécroses tissulaires (de même que les phénomènes inflammatoires) sont liées au stress oxydant (Kehrer, 1993).

Le deuxième type de mort cellulaire correspond à l'apoptose (ou mort cellulaire programmée) que nous avons présentée ci-dessus en tant qu'une des réponses cellulaires aux dommages de l'ADN. L'apoptose est ainsi une mort volontaire ou programmée de la cellule. D'un point de vue mécanistique, la cellule se fragmente en corps apoptotiques contenant le matériel cytoplasmique et nucléaire et délimités par une membrane plasmique. Ces corps apoptotiques sont ensuite éliminés par les macrophages environnants, sans qu'il n'y ait de réaction inflammatoire.

L'U a des effets cytotoxiques. Les différentes études, utilisant de multiples conditions expérimentales, suggèrent une différence de sensibilité vis-à-vis de l'U entre les types cellulaires. La concentration induisant 50 % de mortalité cellulaire (CL50) est ainsi de l'ordre de 100 à 250 μM pour les macrophages (Lizon et Fritsch, 1999 ; Kalinich *et al.*, 2002) et de 750 à 900 μM pour les cellules épithéliales rénales (Mirto *et al.*, 1999a et 1999b). Les particules d'U ont un effet sur la viabilité des macrophages et cette mortalité se ferait en partie par apoptose (Kalinich *et al.*, 2002 ; Lizon et Fritsch, 1999 ; Tasat et De Rey, 1987). Tasat et Kalinich suggèrent que la mortalité cellulaire dépendrait de la quantité d'U ayant pénétré dans le compartiment intracellulaire (Tasat et De Rey, 1987 ; Kalinich *et al.*, 2002).

III.6 Les effets de voisinage des radiations ionisantes

Au cours de la dernière décennie, la preuve de l'existence de deux phénomènes cellulaires qui remettent en question les paradigmes classiques concernant l'induction d'effets biologiques par les

rayonnements ionisants est apparue. Selon ces paradigmes, (i) les dommages à l'ADN se produiraient pendant (ou très peu de temps après) l'irradiation des noyaux des cellules visées et (ii) la probabilité d'apparition de ces dommages se limiterait à une (voire deux) génération(s) de cellules (Grosovsky, 1999).

Or, quelques éléments probants remettent en cause les effets classiques résultant des dommages ciblés à l'ADN. Ces effets, dits "non-ciblés", s'expriment sous la forme d'importantes modifications génétiques survenant dans des cellules n'ayant pas été elles-mêmes exposées aux rayonnements ionisants (Belyakov *et al.*, 2001). Il existe ainsi deux types d'effets "non-ciblés" : **des effets de proximité** (ou "*effets bystander*") et **une instabilité génomique** transmissible dans les cellules (pouvant survenir chez les descendants des cellules irradiées originellement, après plusieurs générations de réplication). La caractéristique principale des effets "non-ciblés" est leur survenue particulière à de faibles doses.

III.6.1 Effet de voisinage (« *effet bystander* »)

L'effet de voisinage mérite que l'on y prête attention car il remet en cause le dogme de la radiobiologie selon lequel l'induction d'effets retardés (cancers, anomalies dans la descendance) est le produit de l'action directe des radiations sur l'ADN contenu dans le noyau de la cellule. De fait, des anomalies moléculaires et cellulaires (caractéristiques de l'action des radiations) s'expriment dans des cellules non atteintes par des radiations mais simplement présentes au voisinage d'une ou plusieurs cellule irradiée (parfois même par une seule particule alpha) (Nagasawa *et Little*, 1992 et 1999 ; Hickman *et al.*, 1994 ; Prise *et al.*, 1998b). En effet, l'effet de voisinage induit par les rayonnements est un phénomène par lequel les dommages cellulaires (échanges de chromatides sœurs, aberrations chromosomiques, apoptose, micronucléation, transformation, mutation, expression de gènes...) sont exprimés dans des cellules voisines non irradiées à proximité d'une cellule ou de cellules irradiées (*cf.* Figure 42). De façon surprenante, ce phénomène ne semble pas s'exprimer avec des doses fortes mais uniquement dans le domaine des faibles doses (celles qui concernent la radioprotection).

L'effet de voisinage a pour origine l'envoi par les cellules irradiées de signaux potentiellement génotoxiques vers les cellules voisines. Le mécanisme de l'effet de voisinage n'est pas encore bien maîtrisé. Cependant, il y a des preuves que l'effet de voisinage peut avoir au moins deux voies différentes pour le transfert des dommages des cellules irradiées aux cellules voisines non irradiées : par des facteurs émis dans le milieu extracellulaire ou par les jonctions de cellule à cellule ("*gap junctions*"). Pour réaliser ces démonstrations, le choix au départ d'une irradiation par des particules alpha n'est pas anodin. En effet, ces particules lourdes ont un parcours rectiligne sur une distance fonction de leur énergie, de

l'ordre de quelques dizaines de micromètres dans les milieux biologiques, ce qui permet d'irradier spécifiquement les cellules une à une sans toucher directement leurs voisines.

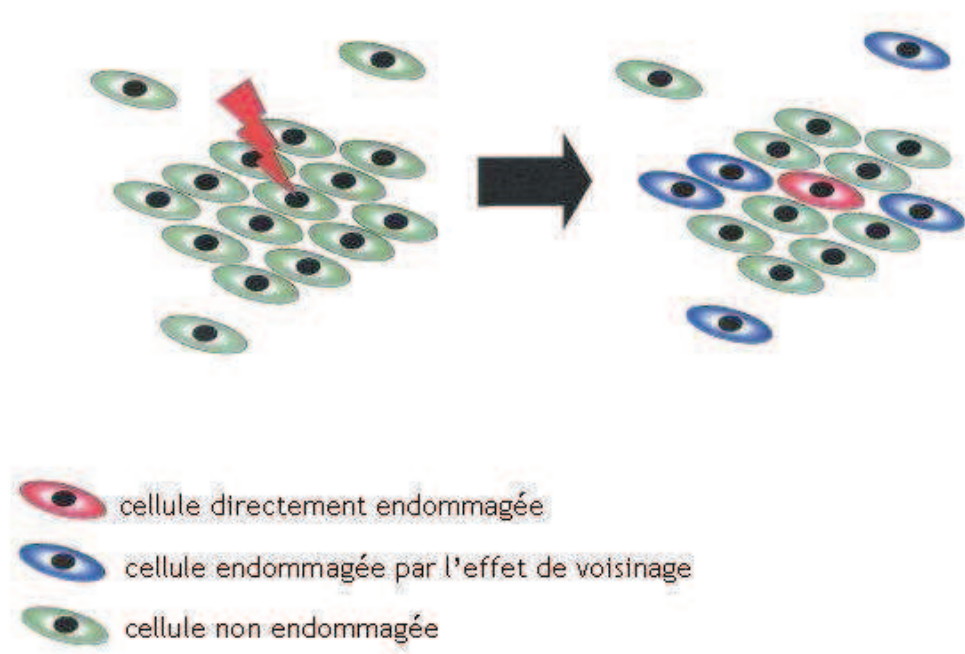


Figure 42. Schéma de l'effet de voisinage (« *effet bystander* »)

III.6.1.a Sécrétion de facteurs dans le milieu de culture

Le premier mécanisme de l'effet de voisinage repose sur la médiation de l'effet par la sécrétion de facteurs dans le milieu de culture (Mothersill et Seymour, 1997 ; Cummins *et al.*, 1999). Une série d'études (Lehnert et Goodwin, 1997a ; Lehnert *et al.*, 1997b ; Narayanan *et al.*, 1997) suggèrent un mécanisme alternatif dans lequel les cellules irradiées sécrètent des cytokines ou d'autres facteurs qui agissent pour augmenter les taux intracellulaires de formes réactives de l'oxygène dans les cellules non irradiées. Lehnert et ses collègues ont démontré que le milieu de culture issu de cellules irradiées avec de bas flux de particules α peut induire une augmentation des échanges de chromatides sœurs lorsqu'il est utilisé pour incuber des cellules non irradiées. Par ailleurs, Prise et ses collaborateurs (Prise *et al.*, 1998b) ont observé que l'irradiation d'un seul fibroblaste par cinq particules alpha issues d'un microfaisceau induit une augmentation significative du nombre de micronoyaux dans les cellules voisines. Plusieurs autres équipes (Nagasawa *et al.*, 1992; Lehnert *et al.*, 1997a et 1997b) ont démontré que les particules α peuvent induire à des doses autour de 1 cGy des dommages de l'ADN visualisés par le biais de l'augmentation du nombre d'échanges de chromatides sœurs, en l'absence d'impacts nucléaires directs ou même d'impacts cellulaires. Cet effet a été associé à une génération de formes réactives de l'oxygène dans le milieu de culture et à une induction d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) intracellulaire, en particulier des

anions superoxyde ou du peroxyde d'hydrogène (Narayanan *et al.*, 1997). Ils pourraient donc jouer un rôle important dans le transfert des dommages. L'augmentation des échanges de chromatides sœurs et la production d'EROs peuvent toutes deux être induites dans des cellules humaines normales non irradiées via l'action de facteur(s) transmissible(s) inhibé(s) par la super-oxyde-dismutase présent(s) dans les milieux irradiés par des particules α et dans le surnageant de cellules irradiées par des particules α (Clutton *et al.*, 1996 ; Lehnert *et al.*, 1997a et 1997b; Narayanan *et al.*, 1997). Ces études donnent un rôle important aux EROs en tant qu'intermédiaires de certains effets des particules α , et elles démontrent bien que les réponses biologiques aux particules α peuvent être induites indirectement dans des cellules non irradiées, c'est-à-dire en tant que maintien de l'effet de voisinage, dans la même mesure que ce qui est trouvé dans les cellules irradiées par des particules α (Lehnert *et al.*, 1997a et 1997b; Narayanan *et al.*, 1997).

Wu et ses collaborateurs ont réalisé, sur le système cellulaire A_L hybride homme / hamster, des irradiations α localisées au cytoplasme des cellules. Ils ont démontré que de telles irradiations sont mutagènes et peu cytotoxiques. Les principales classes de mutations induites sont semblables à celles ayant une origine spontanée et radicalement différentes de celles qui résultent d'une irradiation nucléaire. De plus, des expériences utilisant des pièges à radicaux et des inhibiteurs intracellulaires du glutathion indiquent que le pouvoir mutagène de l'irradiation cytoplasmique dépend de la génération d'espèces oxygénées réactives (Wu *et al.*, 1999). Les irradiations cytoplasmiques par des particules α génèrent des espèces réactives de l'oxygène à l'origine des effets de voisinage intracellulaires. Ces effets vont se traduire sous la forme de lésions nucléaires qui engendrent une instabilité génomique (mutations et micronoyaux) et chromosomique (échanges de chromatides sœurs).

III.6.1.b Les canaux de jonction intercellulaires (gap junctions)

Plus récemment, un deuxième mécanisme de l'effet de voisinage a été mis en évidence. Il fait intervenir les canaux de jonction intercellulaires (Azzam *et al.*, 1998 ; Bishayee *et al.*, 2001), au travers desquels peuvent passer des radicaux libres susceptibles de jouer un rôle dans l'effet de voisinage (Bishayee *et al.*, 2001). Ce mécanisme est à l'origine d'un effet de voisinage dans l'environnement immédiat des cellules irradiées qui décroît quand la dose augmente (Brenner *et al.*, 2001). Azzam *et al.* (1998) ont démontré que l'effet de voisinage dépend de la communication intercellulaire dans des cultures confluentes de fibroblastes diploïdes humains exposés à des flux bas d'irradiation alpha (Azzam *et al.*, 1998). Ils ont aussi démontré que l'exposition de fibroblastes humains à de faibles doses de particules α , provoque de façon inattendue une forte augmentation de la protéine p53 et de sa cible, la protéine

p21Waf1, et une régulation négative de la cycline B1, de CDC2 (cycle de division cellulaire 2) et de hRAD51 dans des populations cellulaires au sein desquels seulement un faible pourcentage de cellules ont subi un impact nucléaire. Ils ont également suggéré que les cellules directement touchées par une particule α sont capables de générer un blocage en G1 des cellules environnantes non irradiées (Azzam *et al.*, 2000). De plus, ils ont établi que les excès d'induction des protéines p53 et p21Waf1 impliquent des communications cellule-cellule directes étant donné que la disruption des jonctions gap élimine cet effet (Azzam *et al.*, 2001). Hickman et ses collègues (1994) ont démontré qu'une voie à médiation p53 pouvait être activée dans l'effet de voisinage (Hickman *et al.*, 1994). En effet, ils ont rapporté que les particules alpha induisent des accumulations de la protéine suppresseur de tumeur p53 dans un pourcentage d'une population de cellules épithéliales pulmonaires de rat plus élevé que le pourcentage calculé de cellules ayant subi un impact nucléaire direct. De telles augmentations de p53 dans des cellules dont le noyau n'a pas été irradié, ont apporté les premières preuves de l'existence de mécanismes extranucléaires d'induction de dommages de l'ADN sous forme de cassures de brin (Nelson *et al.*, 1994).

Iyer et ses collaborateurs (2000) ont au contraire observé, pour des fibroblastes pulmonaires humains normaux, que le transfert du surnageant de cellules irradiées par des particules α sur des cellules non irradiées, provoque des diminutions significatives des niveaux basaux de p53 et p21Waf1 chez ces dernières, et pas une augmentation. Ces différences sont probablement liées au fait qu'Azzam et ses collaborateurs (1998) ont travaillé sur des cellules confluentes arrêtées à 90% en G0/G1 et Iyer et ses collaborateurs (2000) sur des cellules en phase de croissance exponentielle. Ces derniers ont également trouvé que ces diminutions de p53 et p21Waf1 étaient accompagnées d'augmentations des quantités de protéines PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen* ou antigène nucléaire de prolifération cellulaire) et CDC2. Ils ont également identifié TGF- β 1 (*Tumoral growth factor β 1* ou facteur de croissance tumoral β 1) comme étant l'intermédiaire induisant à la fois la réponse collatérale d'augmentation d'EOR intracellulaire associée à une irradiation α (Narayanan *et al.*, 1997 ; Iyer *et al.*, 2000) et aussi un nouvel effet collatéral se traduisant par une diminution de p53 et p21Waf1 (Iyer *et al.*, 2000).

Deux mécanismes différents semblent réguler les effets de voisinage intercellulaires des irradiations α selon que les cellules sont confluentes ou qu'elles sont en phase de croissance exponentielle et ne forment pas un tapis de cellules confluentes. Ainsi, quand les cellules sont confluentes, seules les jonctions gap, et donc les communications intercellulaires directes, semblent être responsables des effets de voisinage, aucun facteur soluble tel que les EROs ne semblant intervenir (Zhou *et al.*, 2000). De plus l'augmentation de p53 et p21Waf1 et la régulation négative de plusieurs protéines impliquées dans la

progression du cycle cellulaire, indiquerait une orientation des cellules vers un état de sénescence. En revanche, les effets de voisinage observés pour des cellules subissant une irradiation alpha lorsqu'elles sont non confluentes, auraient pour intermédiaire des facteurs solubles tels que les EROs ou le TGF qui induisent alors, dans ces conditions, une prolifération cellulaire, compatible avec la diminution observée de p53 et p21Waf1 et l'augmentation de PCNA et CDC2.

Les conséquences du « signal bystander » sur les cellules « spectatrices » sont également multiples (apoptose, induction d'une instabilité génétique, mort différée, mutations qui sont dans 90 % des cas des mutations ponctuelles et rarement des délétions ce qui suggère qu'elles sont provoquées par les espèces actives de l'oxygène) et elles dépendent de nombreux facteurs encore mal identifiés. [Mothersill et ses collègues \(2001\)](#) ont émis l'hypothèse que l'effet de voisinage pourrait induire dans les cellules voisines de la cellule irradiée, une réaction d'adaptation semblable à celle induite par une pré-irradiation (*cf. Partie III.7.2*). Ces effets sur les cellules voisines non irradiées peuvent être ainsi, selon le contexte, protecteurs ou nocifs, ils ne sont pas proportionnels à la dose mais paraissent, au contraire, diminuer avec elle ([Coates et al., 2004](#) ; [Mothersill et al., 2004](#)).

III.6.2 Réponse adaptative aux radiations ionisantes

La réponse adaptative apparaît lorsque des cellules sont exposées à une dose faible d'irradiation n'induisant pas de dommages détectables (de l'ordre du cGy ou moins) puis quelques heures plus tard traitées par une dose forte (plusieurs Gy); les cellules ont alors une sensibilité réduite aux effets génotoxiques de la dose forte.

Cette réponse radio-adaptative a été décrite pour la première fois en 1984 par [Olivieri et ses collaborateurs \(1984\)](#): la pré-exposition de lymphocytes humains à une faible dose d'irradiation rend les cellules réfractaires à l'effet clastogène induit par la dose forte administrée ultérieurement. L'adaptation résulte en une réduction de 50 % du taux d'aberrations chromatidiques attendu pour la forte dose. Cette réponse radio-adaptative à l'effet clastogène a fait l'objet de nombreuses publications et certaines caractéristiques de ce phénomène sont bien définies ([Sankaranarayanan et al., 1989](#) ; [Cortes et al., 1990](#) ; [Cai et al., 1991](#)). Elle peut être induite *in vitro* dans les cellules de rongeurs, de plantes mais aussi *in vivo* chez la souris ([Cai et al., 1991](#)). Une certaine variabilité de la réponse adaptative existe au sein d'une population d'individus normaux ([Bosi et al., 1989](#)). A dose totale égale, une première irradiation diminue la mortalité des organismes *in vivo* ([Tiku et al., 2004](#)), les lésions de l'ADN ([Le et al., 1998](#)), les lésions chromosomiques ([Olivieri et al., 1984](#)), le nombre de mutations et le taux de transformations néoplasiques

(Cai et al., 1999 ; Feinendegen et al., 1999 ; Sasaki et al., 2002 ; Mitchell et al., 2004) causés par une seconde irradiation effectuée au cours des heures ou des jours suivants. Cet effet protecteur, inductible et transitoire semble exister chez l'homme (Ghiassi-Nejad et al., 2002 ; Thierens et al., 2002), il est le fruit de la stimulation de systèmes de défense et de réparation de l'ADN. A l'échelle cellulaire une augmentation de la létalité peut être observée du fait de l'apoptose et de la mortalité retardée par l'effet de voisinage.

Lorsqu'une faible dose de rayonnement est administrée avant une forte dose, on devrait logiquement avoir un plus grand nombre d'aberrations chromosomiques que si l'on ne donnait que la forte dose. Or, Shadley et Wolff (1987) ont démontré que ce n'était pas le cas. En effet, seulement la moitié des aberrations chromosomiques qui auraient dû être provoquées par une unique forte dose est obtenue (Shadley et Wolff, 1987). Il est essentiel de déterminer les gènes qui sont à l'origine de cette réponse adaptative et, à terme, de savoir si cette réponse adaptative peut modifier le risque inhérent aux faibles doses de rayonnement et, le cas échéant, de quelle manière. L'hypothèse est ici que les faibles doses de rayonnement provoquent une réaction de protection qui réduit le risque des rayonnements par rapport aux effets prévus selon le modèle de la réaction linéaire sans seuil.

III.7 Le potentiel effet carcinogène de l'uranium

Si les lésions de l'ADN ne sont pas éliminées par les systèmes de réparation de l'ADN, ces lésions peuvent engendrer des mutations qui sont transmises aux cellules filles. Ces mutations peuvent, lorsqu'elles affectent les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, participer au processus de genèse des cancers. Stearns et al. (2005) ont montré qu'une exposition *in vitro* de cellules de hamster chinois à l'UA, sous forme d'acétate d'uranyle, pouvait être à l'origine de mutations. Miller et ses collaborateurs (1998b) ont détecté, *in vivo*, la présence de facteurs mutagènes dans les urines et le sérum sanguin de rats contaminés à l'UA par le biais d'implants sous-cutanés. Plus récemment, Miller et al., (2002b) ont étudié l'altération de certains gènes (oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs) de cellules issues d'une lignée cellulaire d'ostéoblastes humains après exposition *in vitro* à de l'UA. Ces travaux ont ainsi permis de montrer que la fréquence de cellules transformées après exposition à l'UA est significativement supérieure à une lignée cellulaire témoin.

Une tumeur provient d'une seule cellule dont la division échappe à tout contrôle. La division cellulaire étant sous le contrôle de gènes, c'est la modification du code génétique (mutation) de ces gènes qui est responsable de l'initiation du processus tumoral. Un cancer peut être initié par activation

d'un oncogène (une translocation spécifique active un oncogène) ou par inactivation d'anti-oncogènes. Il est acquis qu'une lésion produira plus facilement la perte d'une fonction que la création d'une nouvelle. Par conséquent, la majeure partie des lésions induisent plutôt des délétions aboutissant à la perte de fonction d'un gène.

L'UA a montré *in vitro* un pouvoir transformant sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (Yang *et al.*, 2002) et sur une lignée d'ostéoblastes humains (HOS) (Miller *et al.*, 1998b et 2002b). Ces cellules transformées sont notamment caractérisées par l'induction de l'expression d'un oncogène et la réduction de la production d'une protéine « suppresseur » de tumeur (Miller *et al.*, 1998b). De plus, l'inoculation de lignées cellulaires exposées à de l'U à des souris a permis d'observer l'apparition de tumeurs chez ces dernières (Miller *et al.*, 2002b). L'exposition de cellules à de l'UA peut donc induire leur transformation vers un phénotype tumoral. Ces résultats suggèrent que, *in vitro*, l'UA peut être un carcinogène.

Des études utilisant de l'UA administré sous la forme d'implants à des rats, montrent que la concentration d'U est corrélée à l'activation de plusieurs oncogènes dans le rein et le muscle où ils sont à l'origine de l'induction de sarcomes (Hahn *et al.*, 2002).

S'il est difficile de distinguer un cancer radio-induit d'un autre, l'étude de certains gènes semble indiquer que le spectre de mutations induit par les rayonnements ionisants diffère du spectre de mutations spontanées. Peu de données existent à ce sujet et aucune d'entre elles n'a permis de décrire les mécanismes cellulaires impliqués dans les phénomènes de cancérisation radio-induits.

Néanmoins, quelques études *in vitro* mentionnent l'apparition de cancers radio-induits suite à des scénarios d'exposition à l'U (Mitchel *et al.*, 1999 ; Leach *et al.*, 1973). L'apparition de tumeurs pulmonaires primaires malignes et bénignes a été mise en évidence sur des rats soumis à des inhalations quotidiennes d'UN (à raison de plus de 4 heures/jours, 5 jours par semaine pendant 65 semaines) (Mitchel *et al.*, 1999). Aucune différence dans la durée d'apparition des tumeurs n'a été constatée, cependant, la fréquence d'apparition des tumeurs malignes est apparue proportionnelle au débit de dose reçue. Lors d'inhalation, les composés d'U insolubles persistent dans le système respiratoire et peuvent être responsables d'une irradiation locale et interne des poumons (Leach *et al.*, 1973). Dans les poumons, l'action radiotoxique de l'U serait avant tout cancérogène dont les deux effets les plus connus à long terme sont la formation de fibroses pulmonaires et la transformation néoplasique (Leach *et al.*, 1973).

Chez l'Homme, différentes études épidémiologiques se sont intéressées à diverses cohortes d'individus exposés à l'U : des mineurs, des victimes d'Hiroshima et Nagasaki, mais aussi des vétérans de

la guerre du Golfe ou des Balkans (Kathren et Moore, 1986 ; Kathren *et al.*, 1989 ; ATSDR, 1999 ; Ritz *et al.*, 2000 ; Mould *et al.*, 2001 ; McDiarmid, 2001 ; Tirmarche *et al.*, 2004). Cependant, dans la plupart des cas, aucune augmentation de l'incidence de cancers quels qu'ils soient n'a pu être attribuée aux effets radiotoxiques de l'U. En effet, l'augmentation du risque de cancer du poumon chez les mineurs d'U est démontrée (Vacquier *et al.*, 2009), mais elle est liée à l'exposition au radon (un gaz radioactif provenant de la désintégration de l'U) plutôt qu'à l'U lui-même. De plus, de part l'importance de facteurs confondants tels que l'exposition aux émissions α du radon chez les mineurs, l'exposition à des agents chimiques cancérigènes tels que le benzène contenu dans les feux de puits de pétrole en Irak ou la mort prématurée des individus (notamment pour les militaires), aucun lien direct n'a pu être établi entre l'émission de radiations ionisantes issues de la décroissance radioactive de l'U et des phénomènes de cancérisation (Roscoe, 1997 ; Hornung *et al.*, 1998 ; Tirmarche *et al.*, 2004). De même, deux autres études (Kathren et Moore, 1986 ; Kathren *et al.*, 1989) ont montré qu'il n'existe pas de preuve irrévocable quant au fait que la contamination par l'U par inhalation, par ingestion ou par contact puisse induire des cancers chez l'Homme.

IV. Génotoxicité de l'uranium - Synthèse

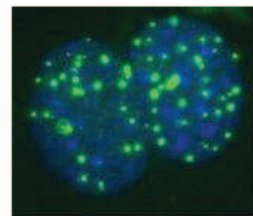
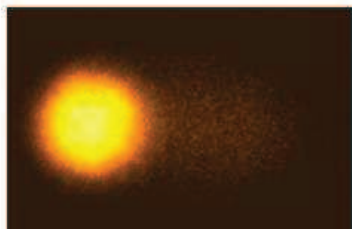
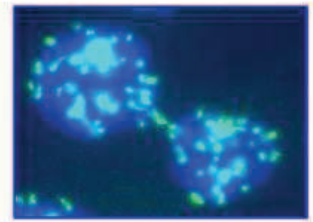
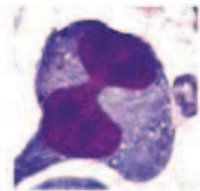
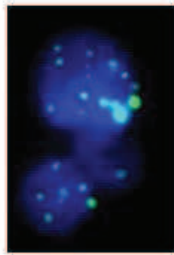
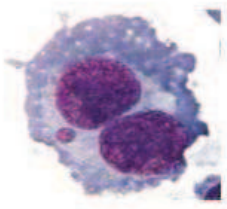
L'U présente deux types de toxicité : radiologique et chimique. La prépondérance de l'une ou de l'autre, dépend des isotopes de l'U et de l'organe considéré. Lorsque l'activité spécifique du composé uranifère est faible, comme pour l'UN ou l'UA, la toxicité chimique est prépondérante. Lorsque l'activité spécifique est plus importante, comme dans le cas de l'UE, le risque radiotoxique sera plus important.

Après exposition à l'U, diverses lésions primaires de l'ADN sont observées telles que : des modifications des bases (puriques et pyrimidiques), des cassures simple ou double brin, des pontages ADN-protéines et aussi ADN-ADN. Des ralentissements ainsi que des arrêts dans le cycle cellulaire ont été observés après contamination par l'U. Une fois le cycle cellulaire stoppé, les mécanismes impliqués dans la réparation des lésions de l'ADN peuvent entrer en jeu. De nombreux mécanismes de réparation des lésions de l'ADN résultant de la diversité des dommages de l'ADN existent ; ils permettent de conserver l'intégrité du génome malgré les agressions permanentes subies par l'ADN. Lorsque les altérations de l'ADN peuvent être réparées, l'effet biologique se limite alors à l'échelle moléculaire et la cellule garde son intégrité. Lorsque la cellule ne peut pas réparer son ADN lésé ou que des réparations fautives surviennent, les modifications de l'ADN peuvent être à l'origine notamment d'une instabilité génomique.

Des études ont démontré que l'U était capable d'induire une instabilité génomique par le biais d'une augmentation du nombre de micronoyaux, d'aberrations chromosomiques, d'échanges de chromatides sœurs, de chromosomes dicentriques ou bien encore de mutations. Les divers effets biologiques observés au niveau cellulaire et moléculaire pourraient être la conséquence d'effets de voisinage (*bystander effect*) et non de l'induction directe des rayonnements α émis par l'U. Des anomalies moléculaires et cellulaires (caractéristiques de l'action des radiations) s'expriment dans des cellules non atteintes par des radiations mais simplement présentes au voisinage d'une ou plusieurs cellule irradiée (parfois même par une seule particule α). De plus, ce phénomène semble s'exprimer principalement avec des faibles doses. Ce phénomène est par conséquent à prendre en considération lors de contamination par l'U. Les effets génotoxiques vont pouvoir influencer le devenir des cellules (apoptose, nécrose, cancérisation). L'U a des effets cytotoxiques. Cependant, une différence de sensibilité vis-à-vis de l'U entre les types cellulaires a été notée. Des études ont démontré l'apparition de cancers radio-induits suite à des scénarios d'exposition à l'U.

Néanmoins, des études épidémiologiques menées depuis plus d'une cinquantaine d'années sur des cohortes de personnes travaillant à l'exploitation de minerais d'U n'ont pas permis de dégager clairement d'effet sur l'incidence de cancers. L'augmentation du risque de cancer du poumon chez les mineurs d'U est avérée, mais elle est liée à l'exposition au radon plutôt qu'à l'U lui-même.

Partie D. Différentes approches en génotoxicologie



Différents niveaux d'altérations du patrimoine génétique ont été identifiés, leurs causes et conséquences sont de plus en plus étudiées et de nombreux tests de génotoxicité ont été établis pour caractériser les propriétés des agents génotoxiques et pour prévenir les conséquences des altérations de l'ADN. Dans des contextes bien spécifiques, des applications de plus en plus nombreuses de ces tests sont mises en œuvre pour définir la nocivité ou l'innocuité des ambiances professionnelles vis-à-vis de l'ADN de cellules prélevées sur des travailleurs exposés ; il s'établit ainsi un transfert de la génotoxicologie à une forme particulière de biosurveillance qui consiste, tantôt à évaluer la mutagénicité au niveau de fluides biologiques, notamment les urines, tantôt à rechercher des lésions primaires de l'ADN, voire des mutations géniques ou chromosomiques en relation avec une exposition professionnelle. Ces démarches de biosurveillance faisant appel à des tests de génotoxicologie sont complexes. En effet, elles nécessitent que soient bien appréciés la signification des biomarqueurs utilisés, les limites interprétatives des analyses et les pré-requis pour que ces outils, a priori employés dans le cadre d'une prévention des effets mutagènes, ne soient détournés à des fins de médecine prédictive, voire sélective.

Cette partie du manuscrit sera consacrée à l'étude des différentes approches en génotoxicologie. Dans un premier temps, des généralités sur les biomarqueurs, permettant d'évaluer différents états d'altération de l'ADN, seront développés. Dans un deuxième temps, les diverses pistes de recherche de biomarqueurs mises en œuvre lors de notre étude seront détaillées. Pour cela, nous présenterons chacune des différentes pistes de recherche du point de vue de leur application dans le domaine général de la génotoxicologie ainsi que ce qui est actuellement connu pour l'U.

I - Les biomarqueurs : Notions et concepts

I.1 Définition et rôle(s) biologique(s)

Différentes définitions ont été données au terme "biomarqueur". Ce terme est généralement utilisé dans un sens très large, incluant quasiment toutes les mesures reflétant une interaction entre un système biologique et un danger potentiel ; ce danger pouvant être chimique, physique, ou biologique (WHO, 1993). La définition ayant été retenue par Lagadic et ses collaborateurs (1997) est la suivante : un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant.

A ce stade, il est important de replacer l'approche des biomarqueurs dans un contexte fonctionnel. En effet, ce que l'on considère comme biomarqueur consiste en une modification d'une structure ou encore en une variation anormale d'une activité biologique. Or, dans des conditions normales, toute structure ou activité biologique joue un rôle dans l'état d'homéostasie d'une cellule, d'un tissu, d'un organisme ou même d'une population. En ce sens, l'analyse de son rôle fonctionnel présente un intérêt important.

Ainsi, selon [Depledge \(1994\)](#), en deçà d'une certaine pression toxique (exposition à des concentrations et/ou des durées importantes), on considère que le métabolisme basal des organismes suffit à assurer le maintien de leur homéostasie. En d'autres termes, le fonctionnement des différentes structures et activités biologiques "tamponne" l'action des polluants sur les individus lorsque celle-ci est relativement limitée. En effet, qu'elles soient spécifiquement impliquées dans la protection de l'organisme vis-à-vis des agressions extérieures ou non, certaines molécules biologiques ont la particularité de réagir à la présence de toxiques dans le milieu. Néanmoins, au-delà d'un certain seuil (en termes de concentration du contaminant ou de temps de contact), les capacités de maintien de l'homéostasie peuvent être dépassées, ceci pouvant finalement mener à la manifestation d'effets néfastes à des niveaux hiérarchiques supérieurs (cf. [Figure 43](#)). Ainsi, lorsque les capacités de compensation ne sont plus suffisantes pour limiter l'action des polluants toxiques, l'état de santé des individus contaminés peut évoluer vers une dégradation, réversible ou non selon le degré d'atteinte toxique.

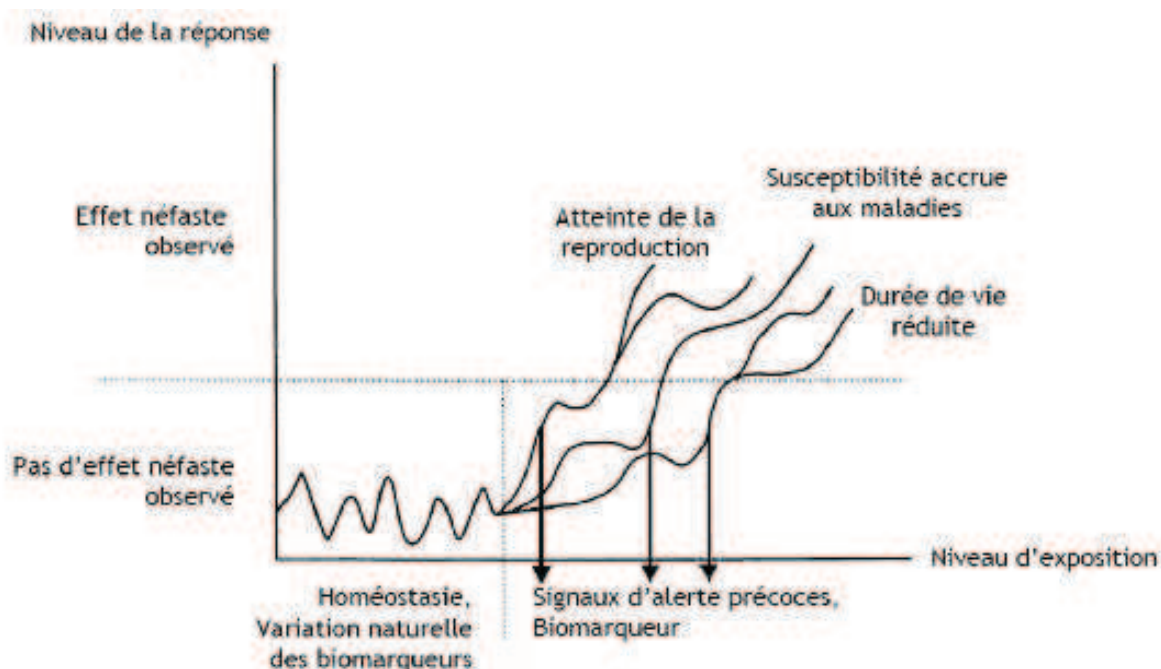


Figure 43. Représentation graphique des niveaux de réponses attendus en fonction du niveau d'exposition à un facteur de stress (d'après [van der Oost et al., 2003](#))

Les biomarqueurs utilisés sont généralement classés en trois catégories :

◆ **Biomarqueurs d'exposition** : par définition, ils permettent d'évaluer (de manière quantitative) la pénétration d'une substance exogène dans l'organisme par le dosage de la substance elle-même ou de ses métabolites dans les fluides biologiques, les tissus et les cellules. Ces biomarqueurs sont utilisés en routine après une exposition à l'U par un dosage du composé lui-même dans les excréta et/ou le sang (cf. Partie B. V.2.1 Biomarqueurs d'exposition).

◆ **Biomarqueurs d'effet** : de manière générale, ils servent à évaluer un changement biologique ou biochimique dans les cellules ou les tissus cibles résultant de l'action d'un toxique, ce changement constituant une étape dans le processus pathologique menant à la maladie. Ce type de biomarqueurs vise à identifier les effets néfastes pour la santé. Des données sur l'exposition à l'U ont été présentées précédemment dans la Partie B. V.2.2 Biomarqueurs d'effets. Ces biomarqueurs peuvent aussi témoigner d'une interaction entre les génotoxiques et le matériel génétique de la cellule. Des tests de génotoxicité permettant de détecter des dommages de l'ADN sont présentés par la suite.

◆ **Biomarqueurs de susceptibilité** : ce sont des biomarqueurs capables de rendre compte des différences interindividuelles (génotypes à risque, genre, âge, etc.) dans la réponse à une exposition à une substance spécifique tel que des agents génotoxiques. Dans la suite du manuscrit, une partie est consacrée à l'influence du polymorphisme génétique sur la fréquence d'apparition de micronoyaux.

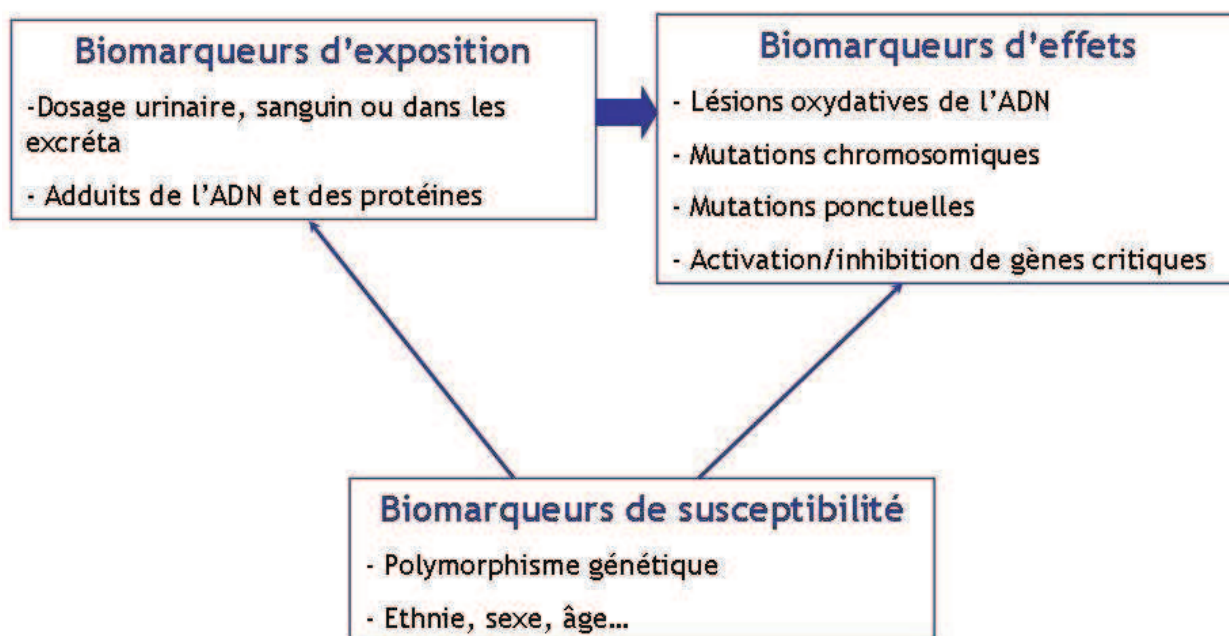


Figure 44. Différents niveaux de biomarqueurs (avec quelques exemples de biomarqueurs, d'après Perera et Weinstein, 2000)

1.2 Qualités requises

Un biomarqueur doit être un indicateur sensible de la biodisponibilité d'un toxique et de réponses biologiques précoces. De manière à évaluer objectivement les qualités des biomarqueurs, quatre critères sont généralement admis (van der Oost *et al.*, 2003):

- La technique analytique permettant de quantifier le biomarqueur doit être efficace (en termes de sensibilité, justesse et précision), d'un coût relativement peu élevé et facile à mettre en œuvre.
- La réponse doit être sensible pour constituer un paramètre d'alarme précoce. Le niveau basal de la variable biologique doit être clairement identifié de manière à distinguer le bruit de fond naturel (variabilité naturelle) du niveau induit par la contamination (signal).
- Les mécanismes impliqués dans la relation entre la réponse du biomarqueur et l'exposition au polluant doivent être connus ou, tout au moins, supposés.
- La signification toxicologique du biomarqueur (c'est-à-dire la relation entre sa réponse et un impact possible sur l'organisme) doit être établie.

1.3 Biomarqueurs de génotoxicité

Différents niveaux d'altérations du patrimoine génétique ont été identifiés, leurs causes et conséquences sont de plus en plus étudiées et de multiples tests de génotoxicité ont été établis pour caractériser les propriétés des agents génotoxiques et pour prévenir les conséquences des altérations de l'ADN.

Dans des contextes bien spécifiques, des applications de plus en plus nombreuses de ces tests sont mises en œuvre pour définir la nocivité ou l'innocuité des ambiances professionnelles vis-à-vis de l'ADN de cellules prélevées sur des travailleurs exposés ; il s'établit ainsi un transfert de la génotoxicologie à une forme particulière de biosurveillance qui consiste, tantôt à évaluer la mutagénicité de fluides biologiques, notamment les urines, tantôt à rechercher des lésions primaires de l'ADN, voire des mutations géniques ou chromosomiques en relation avec une exposition professionnelle. Ces démarches de biosurveillance faisant appel à des tests de génotoxicologie sont complexes. En effet, elles nécessitent que soient bien appréciés la signification des biomarqueurs utilisés, les limites interprétatives des analyses et les pré-requis pour que ces outils, a priori employés dans le cadre d'une prévention des effets mutagènes, ne soient détournés à des fins de médecine prédictive, voire sélective. En outre, l'absence actuelle de signatures moléculaires pour la plupart sinon tous les cancérigènes professionnels limite très sérieusement la

possibilité de clairement définir une relation de causalité entre l'exposition professionnelle et le(s) biomarqueur(s) évalué(s).

▣ Quelques outils pour évaluer les différents états d'altération de l'ADN

La toxicologie génétique est une discipline scientifique ayant essentiellement pour objet l'identification des agents génotoxiques, la détermination des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les phases de bioactivation, d'interaction avec l'ADN, de réparation des lésions primaires, et l'évaluation des conséquences initiales des dites lésions. Compte tenu de la grande diversité des anomalies susceptibles d'être induites au niveau d'un patrimoine génétique, il n'existe pas un mais plusieurs tests de génotoxicité susceptibles de révéler tels ou tels types de lésions ou de mutations. D'une manière générale, il faudra en associer plusieurs pour apprécier sur un type cellulaire quelconque à la fois les intensités des lésions primaires de l'ADN et les mutations géniques et chromosomiques. Tout comme les anomalies de l'ADN, ces tests peuvent également être classés en tests de lésions primaires à l'ADN, en tests de mutations géniques, chromosomiques et génomiques (cf. Figure 45).

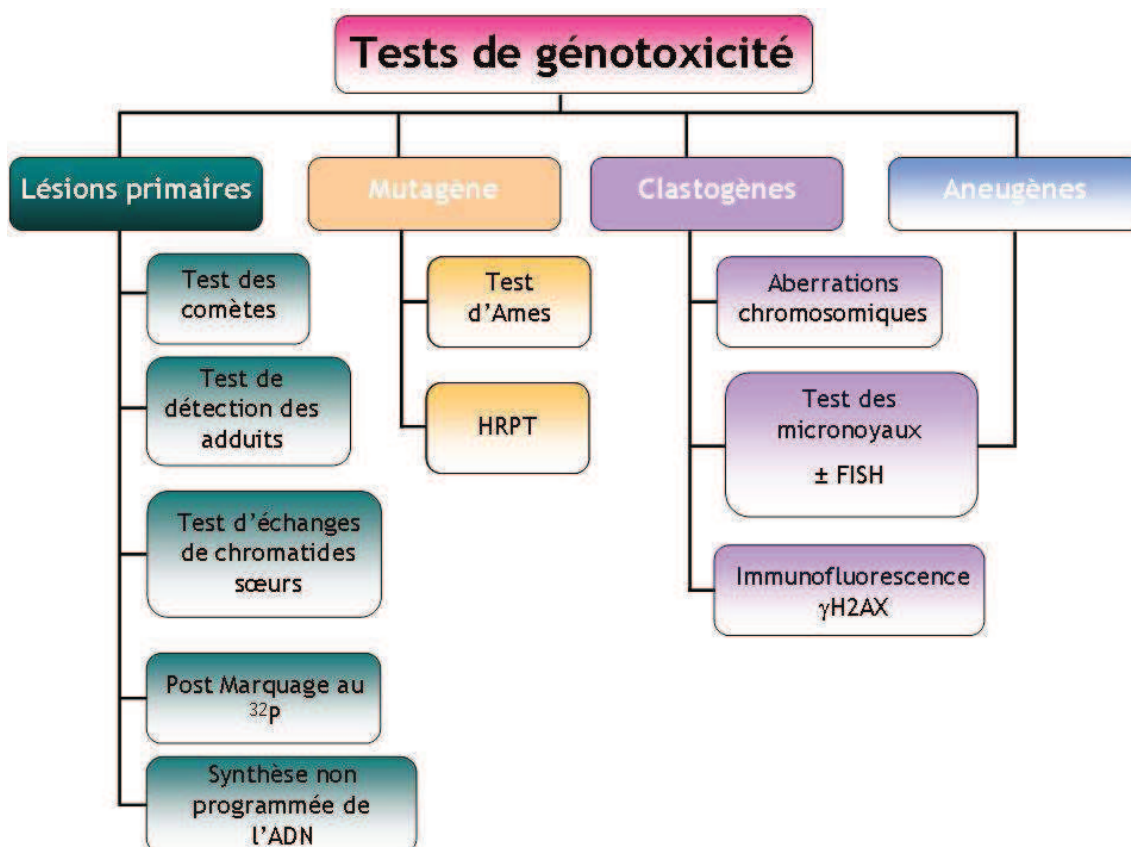


Figure 45. Principaux tests de génotoxicité déclinés en tests mesurant les lésions primaires, les mutations géniques (mutagènes), chromosomiques (clastogènes) et génomiques (aneugènes) (d'après Orsière *et al.*, 2005)

Les principaux tests de génotoxicité fréquemment rencontrés sont le test des comètes, le post marquage, le test d'Ames et le test des micronoyaux. Il s'avère qu'ils sont complémentaires. Le test de comètes quantifie les cassures simples et double brin de l'ADN. Ces dernières sont tantôt directement induites par le génotoxique, tantôt consécutives au stress oxydatif induit par l'agent, tantôt la conséquence de la mise en œuvre de système de réparation de l'ADN. Dans tous les cas, ce sont des lésions primaires à l'ADN qui sont quantifiées. Il en est de même avec les tests mesurant les adduits ainsi qu'avec les tests évaluant l'intensité des réparations de l'ADN. L'évaluation des capacités des agents à induire des mutations géniques est classiquement réalisée au moyen du test d'Ames sur des souches de *Salmonella Typhimurium*. Enfin, le test des micronoyaux permet de détecter les environnements induisant des anomalies chromosomiques de nombre et/ou de structure. L'association des techniques d'hybridation *in situ* fluorescente de sondes centromériques permet de distinguer les anomalies structurales (événement clastogène) des anomalies numériques (événement aneugène).

II. Les biomarqueurs de génotoxicité : intérêt pour la discrimination des effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'uranium

Divers biomarqueurs sont disponibles pour mettre en évidence les effets génotoxiques des agents chimiques ainsi que des rayonnements ionisants, qu'il s'agisse de lésions primaires de l'ADN, susceptibles d'être réversibles sous l'effet des systèmes de réparation, ou de mutations, c'est-à-dire des lésions stables et hérissables du patrimoine génétique (Orsière et De Méo, 2005 ; Orsière *et al.*, 2000).

Au regard de la synthèse bibliographique précédemment établie sur la toxicologie de l'U, certaines pistes d'études peuvent être dégagées. L'objet de cette section sera donc de décrire et de justifier les voies retenues dans le cadre de notre travail. Nous présenterons pour cela chacune des différentes pistes de recherche du point de vue de leur application dans le domaine général de la génotoxicologie et ce qui est actuellement connu pour l'U.

Il existe différents tests permettant de détecter les lésions de l'ADN, qu'elles soient réparables fidèlement ou de façon fautive par les systèmes enzymatiques de réparation. Il s'agit principalement du test des comètes, du test de synthèse non programmée de l'ADN, du test des échanges de chromatides sœurs et de la détection des dommages oxydatifs de l'ADN par différentes techniques.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit se sont intéressés aux lésions primaires de l'ADN via le test des comètes. Ceci permet ainsi de détecter des manifestations précoces de l'altération du matériel génétique, en amont de phénomènes aux conséquences plus lourdes pour le devenir de la cellule tels que les effets clastogènes ou aneugènes. L'U ayant une double toxicité (chimique et radiologique), le test des micronoyaux associé à la technique FISH utilisant des sondes centromériques a aussi été utilisé comme biomarqueur de génotoxicité dans le but de discriminer les mutations chromosomiques de structure des mutations chromosomiques de nombre. Ces travaux ont été complétés par l'étude plus spécifique des cassures double brin, lésions décrites dans la littérature comme étant radio-induites, à l'aide du marquage par immunofluorescence de l'histone γ -H2AX. En effet, parmi les lésions radio-induites, les cassures double brin (CDBs) de l'ADN sont considérées comme étant biologiquement les plus significatives. Mal réparées, ces dernières peuvent conduire à des mutations qui augmentent le risque de cancers et de maladies héréditaires.

II.1 Le test des comètes

II.1.1 Principe du test des comètes et ses applications

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

De manière générale ce test permet de détecter des fragmentations de l'ADN de cellules individualisées. Brièvement, après traitement *ex vivo*, *in vitro* et *in vivo*, les cellules isolées sont mélangées à de l'agarose à faible point de fusion et déposées sur des lames précédemment recouvertes d'un gel d'agarose. Les cellules, emprisonnées dans le gel, sont lysées par un tampon contenant des détergents et une forte concentration en sels. Les lames sont ensuite déposées dans une cuve d'électrophorèse. Après dénaturation ou non de l'ADN, une électrophorèse est réalisée (cf. Figure 46). Ce

test est basé sur la capacité de l'ADN, chargé négativement, de migrer vers l'anode dans le gel d'agarose soumis à un champ électrique.

Les molécules d'ADN intactes vont peu migrer sous l'effet du champ électrique (du fait de leur haut poids moléculaire), et vont donc décrire une sphère compacte. Un ADN endommagé va, quant à lui, présenter des fragments de taille hétérogène et ainsi voir migrer ses fragments les plus courts en dehors de cette sphère (du fait d'une vitesse de migration plus importante), formant ainsi un "halo" d'ADN s'étirant en direction de l'anode. Les cassures au sein de la molécule d'ADN génèrent des fragments dont la distance de migration est inversement proportionnelle à leur taille, les petits fragments migrant plus que les gros. Après la migration, les lames sont neutralisées et fixées. Après coloration, l'ADN d'une cellule intacte apparaît comme une sphère de 25 à 35 µm de diamètre et l'ADN d'une cellule lésée s'étire proportionnellement au nombre de cassures (cf. Figure 46). Les figures obtenues sont alors tout à fait comparables à des comètes.

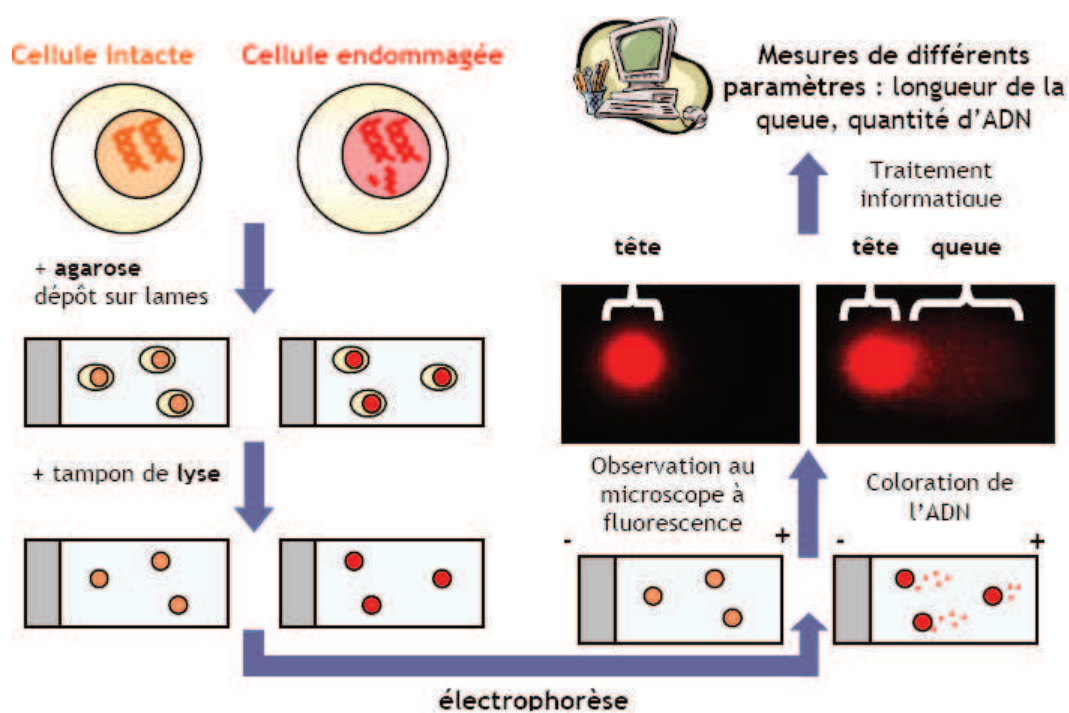


Figure 46. Principe du test des comètes

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

s'effectuer d'une façon semi-quantitative et l'utilisation de système d'analyse d'images autorise une évaluation quantitative. Olive et ses collaborateurs (1991) ont en effet défini un paramètre : le "Tail Moment" (TM). Ce facteur, donné en unité arbitraire, est le produit de la distance entre les barycentres de la tête et de la queue (μm) par le pourcentage d'ADN dans sa partie distale. De plus, l'évaluation de la viabilité est souvent un point essentiel pour interpréter le test des comètes. Des cellules nécrotiques et apoptotiques peuvent par la fragmentation de l'ADN induire de fausses réponses positives. De telles cellules génèrent cependant des comètes atypiques facilement identifiables (cf. Figure 47, (Collins, 2004)).

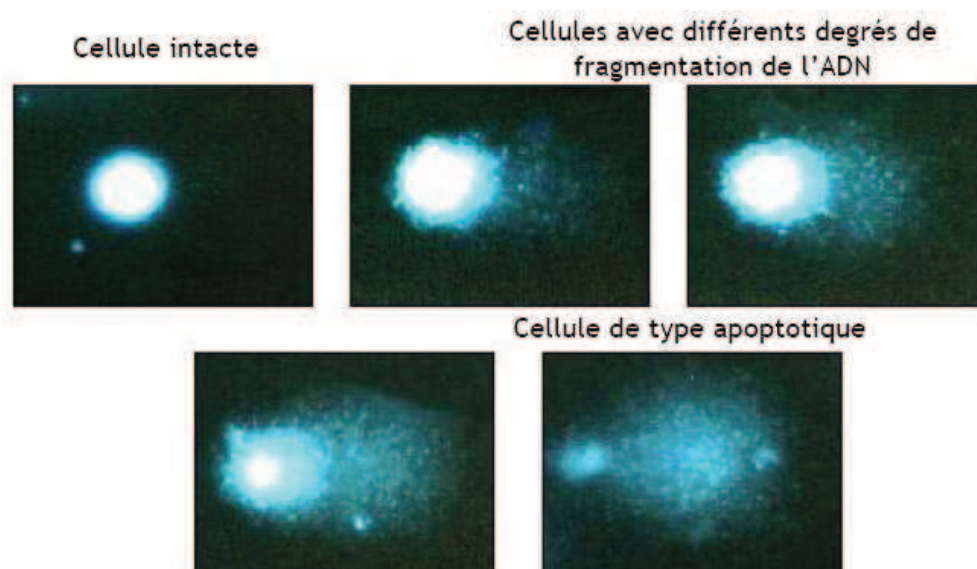


Figure 47. Différents niveaux de fragmentation de l'ADN observables par le test des comètes (Cellule intacte, cellules avec différents degrés de fragmentation de l'ADN et cellule de types apoptotique), (d'après Collins, 2004)

II.1.2 Avantages et inconvénients

L'efficacité du test des comètes a été étudiée par Anderson et ses collaborateurs (1998) sur plus de 212 produits. Ils ont démontré que le test des comètes présentait une sensibilité de détection des agents cancérigènes de 88% (74 sur 84 produits testés), et une spécificité pour la détection des agents non cancérigènes de 64% (7 sur 11 produits testés).

Le test des comètes a de nombreux avantages :

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

Cependant, il faut souligner que la signification biologique d'une comète est parfois difficile à interpréter. Des effets cytotoxiques et apoptotiques peuvent aussi induire des comètes. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer l'ensemble des mécanismes sous-jacents à la formation des comètes. Enfin, l'interprétation des résultats est souvent délicate et aucune méthode statistique n'est universellement acceptée. Généralement, une analyse, portant sur 50 cellules par lame et 2 lames par dose pour un total de 100 cellules, est considérée comme acceptable. Des comparaisons de moyennes arithmétiques, de modes ou de moyennes géométriques par des tests paramétriques ou non avec les contrôles appropriés, ont été utilisées (Duez *et al.*, 2003 ; Wiklund et Agurell, 2003). Une harmonisation semble indispensable pour des comparaisons interlaboratoires.

Le champ d'application du test des comètes s'étend à de nombreux domaines de la toxicologie tels que la toxicologie génétique ou la radiobiologie (Garaj-Vrhovac et Kopjar, 2002 et 2003 ; Olive, 1999 ; Touil *et al.*, 2002). Ce test est de plus en plus préconisé *in vivo* pour confirmer des analyses *in vitro* (Brendler-Schwaab *et al.*, 2005 ; Hartmann *et al.*, 2004).

II.2 L'immunomarquage de l'histone γ -H2AX : une nouvelle technique de détection des CDBs

Parmi les lésions radio-induites, les cassures double brin (CDBs) de l'ADN sont considérées comme étant biologiquement les plus significatives. En effet, mal réparées, elles peuvent conduire à des mutations qui augmentent le risque de cancers et de maladies héréditaires.

En réponse à une cassure double brin de l'ADN, H2AX est phosphorylée sur sa sérine 139 par la kinase ATM ou ATR (Rogakou *et al.*, 1998 ; Burma *et al.*, 2001 ; Brown et Baltimore, 2003). Cette phosphorylation fait partie des événements les plus précoces qui suivent la formation physique des CDBs. Cette phosphorylation permettrait d'attirer et de maintenir les facteurs de réparation et de signalisation au niveau de la lésion double brin. La phosphorylation de la sérine 139 de H2AX (par convention γ -H2AX) par ATM en réponse à des lésions double brin entraîne la condensation de la chromatine sur 5000 paires de bases de part et d'autre de la cassure (*cf.* Figure 48). Ainsi, l'utilisation d'un anticorps spécifique de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γ -H2AX), montre la présence de nombreux foyers (foci) dans le noyau des cellules irradiées (*cf.* Figure 49). Il existe une étroite corrélation entre le nombre de foci γ -H2AX et le nombre de CDBs induites après irradiation (Rogakou *et al.*, 1999 ; Rothkamm et Lobrich 2003). La quantification des foyers γ -H2AX est actuellement largement utilisée pour étudier l'induction des cassures double brin ainsi que leur réparation.

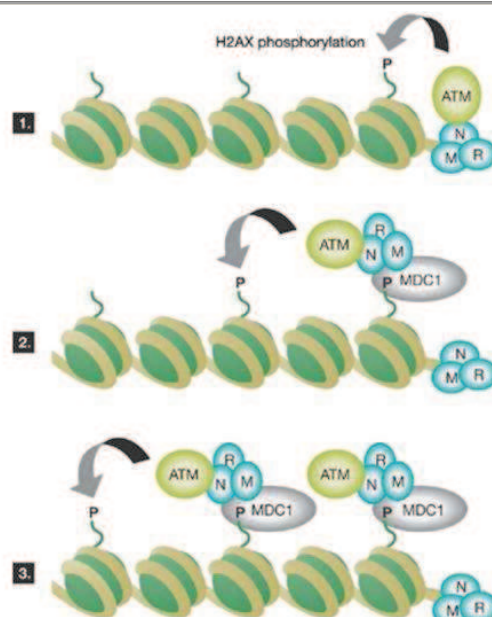


Figure 48. Représentation de la phosphorylation de H2AX par ATM en réponse à une lésion double brin de l'ADN

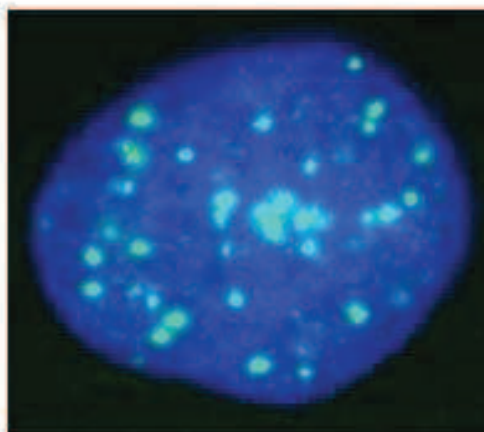


Figure 49. Présence de γ -H2AX en foyers (immunofluorescence dans le noyau de fibroblastes après irradiation et immunomarquage par anticorps anti γ -H2AX couplé à un fluorochrome (FITC)

Récemment, une corrélation directe a été observée entre le nombre de foyers γ -H2AX et le nombre de CDBs produites par la désintégration de l'iode 125 incorporé dans l'ADN de cellules, démontrant que chaque focus représente une cassure et que chaque CDB forme un focus (Sedelnikova *et al.*, 2002). L'immunofluorescence H2AX a révolutionné l'évaluation des CDBs en permettant la mesure de leur nombre *in situ* (dans chaque noyau). Limitée pour la discrimination de foyers trop nombreux produits aux doses élevées, cette technique permet au contraire une étude plus fine à des doses faibles de radiation, de l'ordre du 2,5 cGy (soit 1/40ème de Gy) correspondant environ à 1 CDB par cellule.

La visualisation des CDBs, en employant l'immunofluorescence γ -H2AX, pourrait être une nouvelle approche pour évaluer le risque de faibles doses de rayonnements. L'immunofluorescence γ -H2AX peut être utilisée comme un biomarqueur spécifique et sensible de la présence de CDBs. Cette technique

permet d'estimer de façon quantitative le nombre de cassures double brin dans une cellule (Rogakou *et al.*, 1999).

II.3 Le test des micronoyaux

Le test de numération des micronoyaux sur cellules binucléées (ou en anglais « *Cytokinesis Block Micronucleus assay* » : CBMN) représente un moyen d'évaluer les mutations chromosomiques de structure et de nombre. Le test des micronoyaux (MNx) a été proposé par Countryman et Heddle (1976) pour détecter les dommages génétiques chimio- ou radio-induits. Il s'agit d'un test adapté à la mise en évidence de remaniements génomiques consécutifs à des cassures chromosomiques ou à des altérations des protéines se traduisant par des anomalies chromosomiques quantitatives. Son protocole aisé, son interprétation non ambiguë et son coût modéré expliquent l'utilisation sans cesse croissante de ce test qui, de surcroît, est particulièrement indiqué dans la détermination des événements aneugènes et clastogènes (Sari-Minodier *et al.*, 2002 ; Fenech, 2006a).

II.3.1 Mécanisme de formation des micronoyaux

Les micronoyaux sont de petites entités nucléaires qui peuvent être constituées :

■ de **chromosomes entiers**, perdus au cours de la mitose précédente. Ils représentent alors la conséquence d'une altération des structures cellulaires impliquées dans la disjonction, la ségrégation et la migration des chromosomes. Les divers systèmes protéiques impliqués sont représentés par l'appareil mitotique, constitué de diverses catégories de microtubules gérant l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique puis la migration des chromosomes à l'anaphase, les centrosomes, à partir desquels se structure l'ensemble des microtubules, et les kinétochores (Fenech *et al.*, 2005b). La formation de ces micronoyaux est consécutive à l'action d'**agents aneugènes** (cf. Figure de synthèse : Figure 51).

■ de **fragments chromosomiques acentriques**. Ils représentent alors la conséquence d'une cassure double brin non réparée de la molécule d'ADN, l'extrémité du bras chromosomique cassé n'étant plus rattachable au fuseau mitotique, faute de centromère. Les cassures double brin qui résultent de ces modifications représentent des lésions primaires de l'ADN particulièrement sévères car difficilement réparables. La non réparation d'une cassure double brin peut mener à un réarrangement asymétrique des chromosomes donnant un chromosome dicentrique et un fragment acentrique (Mateuca *et al.*, 2006). Les centromères des chromosomes dicentriques sont tirés aux pôles opposés de la cellule en anaphase formant un pont nucléoplasmique (PNP) entre les deux cellules filles et un fragment acentrique qui formera un MN

(Thomas *et al.*, 2003 ; Fenech, 2005a) Ces MNx et peuvent être directement induits par des agents génotoxiques dits **clastogènes**, les plus connus d'entre eux étant les rayonnements ionisants et les composés chimiques, tels que la bléomycine, considérés comme des agents radiomimétiques. (cf. Figure de synthèse : Figure 51).

Ces deux types de contenu correspondent à des mécanismes de formation fondamentalement différents. En conséquence, les micronoyaux témoignent de la survenue d'événements aneugènes et/ou clastogènes.

La Figure 50 représente schématiquement les mécanismes de formation des micronoyaux après blocage en cytotidérèse. Le dénombrement des cellules micronucléées au sein de la population de cellules binucléées permet de ne quantifier que les anomalies chromosomiques de nombre et/ou de structure qui n'ont pas empêché la cellule de se diviser.

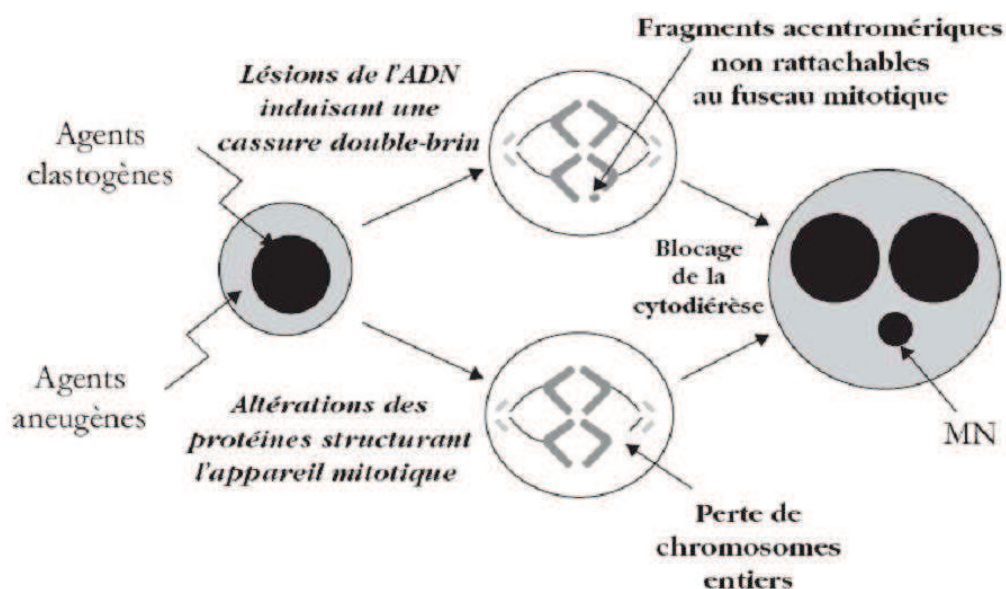


Figure 50. Mécanisme de formation des micronoyaux au cours de la version « *cytokinesis-blocked micronucleus assay* » (d'après Iarmarcovai *et al.*, 2007)

La Figure 51 illustre les différents destins des cellules bloquées en cytotidérèse suite à une exposition à des agents génotoxiques ainsi que les divers mécanismes induisant des MNx avec leurs éventuelles origines. En plus de sa capacité à détecter les MNx (cassures et pertes chromosomiques), le CBMN peut apporter d'autres mesures de génotoxicité et de cytotoxicité. En effet, le test CBMN permet d'observer des chromosomes dicentriques consécutifs à des réarrangements chromosomiques, des bourgeonnements nucléaires (consécutifs à une amplification génique) mais aussi des cellules en train de mourir (apoptose, nécrose).

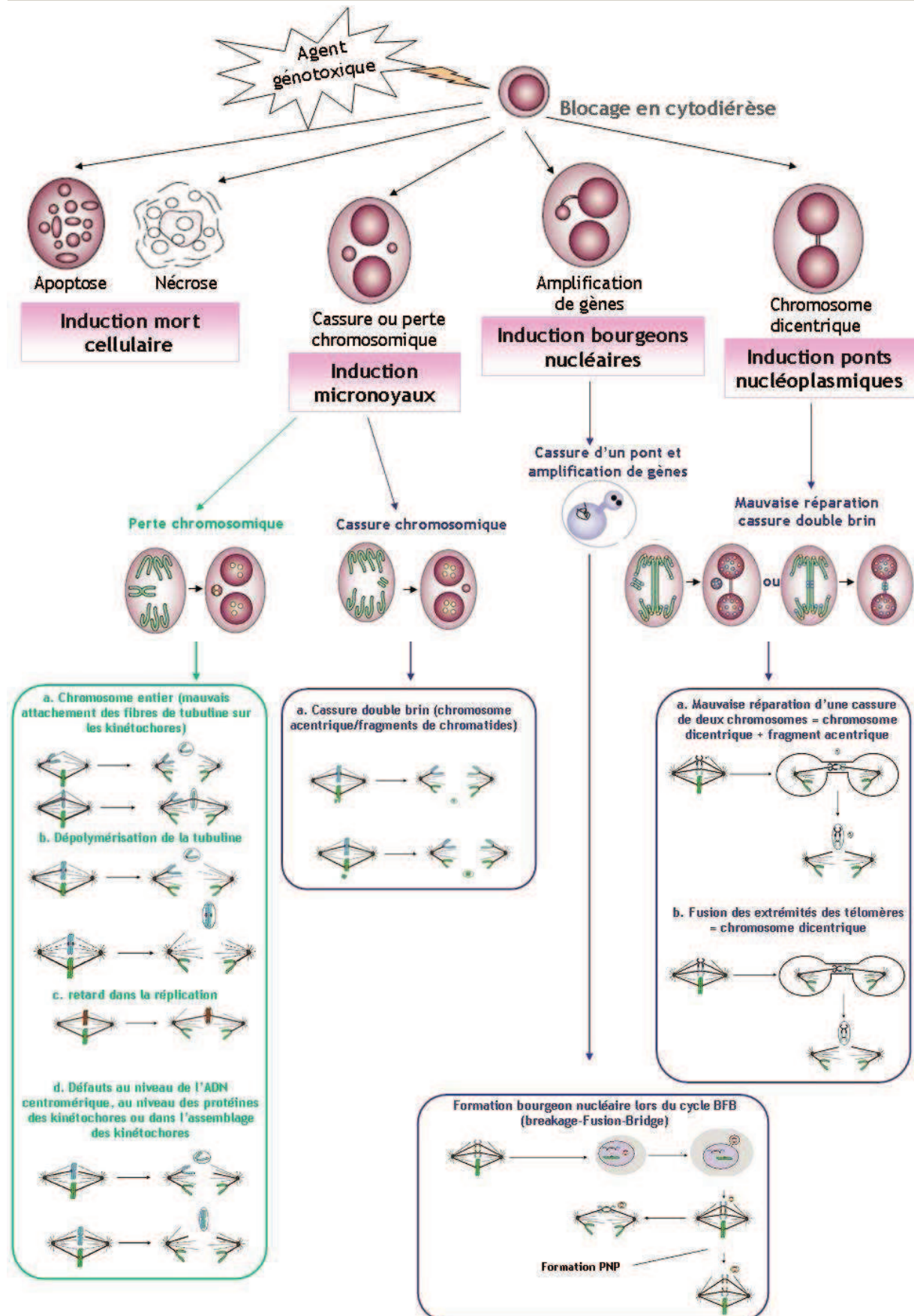


Figure 51. Les différents destins des cellules bloquées en cytotédiérèse suite à une exposition à des agents génotoxiques ainsi que les divers mécanismes induisant des MNx (ainsi que ponts

nucléoplasmiques et bourgeons nucléaires) avec leurs éventuelles origines. L'utilisation du test des micronoyaux avec blocage en cytotélerèse permet de mesurer la fréquence des cassures chromosomiques, perte de chromosome, réarrangement chromosomique, par exemple, des chromosomes dicentrique, l'amplification génique (bourgeons nucléaire), la nécrose et l'apoptose (d'après Fenech, 2000 et 2007). La survenue de MNx dans une cellule traduit des types d'anomalies chromosomiques totalement distincts. En effet, il peut s'agir tantôt d'un fragment acentromérique consécutif à une cassure double brin non réparée de la molécule d'ADN (agent clastogène), tantôt d'un chromosome entier incapable de se soumettre à la ségrégation le conduisant à intégrer un pool de chromosomes dans un noyau fils (agent aneugène). Les dysfonctionnements moléculaires conduisant à des dommages chromosomiques de structure ou de nombre différents.

Les MNx résultant de cassures double brin induisent des fragments de chromosomes (agent clastogène). De plus, la mauvaise réparation d'une CDB peut mener à un réarrangement asymétrique des chromosomes donnant un chromosome dicentrique et un fragment acentrique ou bien en la fusion des extrémités des télomères donnant un chromosome dicentrique (Mateuca *et al.*, 2006). Les micronoyaux peuvent également survenir lorsque l'ADN amplifié est sélectivement localisé en périphérie du noyau et éliminé par bourgeon nucléaire au cours de la phase S via le cycle BFB (Breakage-Fusion-Bridge).

En revanche, les MNx contenant des chromosomes entiers (agent aneugène) peuvent principalement résulter d'un mauvais attachement des fibres de tubuline sur les kinétochores, des défauts au niveau de la dépolymérisation de la tubuline, des retards dans la réplication, des défauts au niveau de l'ADN centromérique, des défauts au niveau des protéines des kinétochores ou bien encore des défauts dans l'assemblage des kinétochores.

En bleu, les dommages plutôt induits par les agents clastogènes et en vert les dommages induits plutôt par les agents aneugènes.

Le devenir des micronoyaux, après leur formation dans des cellules micronucléées, n'est pas encore bien élucidé. Les MNx pourraient avoir diverses destinées post-mitotiques (Mateuca *et al.*, 2006) :

- l'élimination des cellules micronucléées via l'apoptose (Decordier *et al.*, 2002).
- l'expulsion de la cellule (l'ADN des MNx n'est pas prévu pour être fonctionnel ou capable de réaliser la réplication du fait de l'absence des composants cytoplasmiques nécessaires) (Leach et Jackson-Cook, 2004).
- la réincorporation dans le noyau principal (le chromosome réincorporé pourrait être confondu avec ceux du noyau principal et pourrait reprendre une activité biologique normale) (Leach et Jackson-Cook, 2004).
- la conservation dans le cytoplasme des cellules comme entité extranucléaire (il n'est pas encore connu combien de temps une cellule pourrait maintenir le micronoyau ou comment leur ADN pourrait fonctionner) (Leach et Jackson-Cook, 2004).

II.3.2 Principe du test de numération des micronoyaux et son application

Le principe du test des micronoyaux consiste à mettre en évidence des anomalies chromosomiques de nombre et/ou de structure par la détermination et le dénombrement, au sein d'une population cellulaire en interphase, de cellules présentant une ou plusieurs entités nucléaires indépendantes du noyau principal (cf. Figure 52).

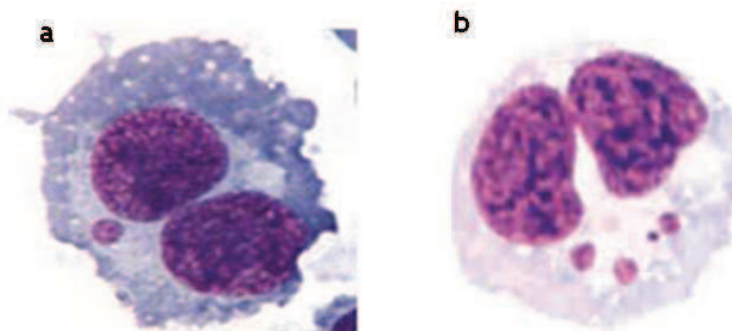


Figure 52. Photographies d'une cellule binucléée avec un micronoyau (a) et d'une cellule binucléée avec trois micronoyaux (b) (d'après Fenech *et al.*, 2003)

Le test des MNx a fait l'objet d'une étude multicentrique pilotée par la Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) validant son aptitude à rendre compte des propriétés aneugènes et/ou clastogènes de divers agents génotoxiques connus (Clare *et al.*, 2006). Ces résultats, associés à bien d'autres travaux conduisent à recommander l'application du test des MNx dans la détermination *in vitro* des capacités de composés à induire des dommages chromosomiques. Le test des MNx a d'ailleurs été validé par l'ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) et son protocole en version finale par les directives de l'OCDE (OCDE, 2007). Le test des MNx a par ailleurs fait l'objet depuis quelques années d'une large étude internationale, intitulée The *Human MicroNucleus (HUMN) Project*. Il a été validé quant à sa capacité à détecter les effets de faibles doses de rayonnements ionisants tant *in vitro* qu'*in vivo*. Ce test appliqué dans des études *in vitro* a pour but de détecter la génotoxicité d'un agent physique ou chimique ; dans ce cadre, l'agent à tester est incorporé au cours de la division cellulaire générant un micronoyau. Appliqué dans des études *in vivo*, Il est employé dans de nombreuses études de biosurveillance, notamment auprès de populations exposées aux rayonnements ionisants au niveau environnemental ou professionnel (Sari-Minodier *et al.*, 2002 et 2007).

Ce test est susceptible d'être mis en œuvre sur toutes les cellules eucaryotes capable d'effectuer une division cellulaire en culture (cellules vésicales, endobuccales, fibroblastes, kératinocytes, etc.). Il est surtout actuellement appliqué aux lymphocytes en culture utilisés comme « cellules modèles » : il consiste alors à dénombrer les MNx présents dans les lymphocytes binucléés obtenus par blocage de la division cytoplasmique par de la cytochalasine B (inhibiteur de la polymérisation des filaments d'actine) après une division nucléaire complète (Fenech et Morley, 1985 ; OCDE, 2007). Cette méthode permet de distinguer les cellules mononucléées, qui ne se sont pas divisées, et les cellules binucléées, qui ont réalisées une division nucléaire complète.

II.3.3 Numération des micronoyaux associée à l'hybridation *in situ* de sondes pancentromériques

Pouvant être induits soit par des agents clastogènes (inducteurs de cassures double brin de l'ADN), soit par des agents aneugènes (inducteurs d'anomalies de la répartition des chromosomes à l'anaphase), les micronoyaux présentent une grande diversité de contenu.

II.3.3.a Discrimination des événements aneugènes et clastogènes

L'association au test des MNx de l'hybridation *in situ* fluorescente utilisant des sondes pancentromériques permet une discrimination entre événements clastogènes et aneugènes. Cette technique d'hybridation est réalisée sur les cellules interphasiques préparées pour le test des MNx.

La réalisation de l'hybridation *in situ* fluorescente de sondes centromériques non spécifiques sur des préparations de cellules micronucléées permet alors de distinguer les MNx acentriques des micronoyaux centriques. L'absence de centromère au sein des MNx est consécutive à des événements clastogènes et la présence de centromère(s) au sein des MNx est consécutive à des événements aneugènes. Pour chaque cellule micronucléée, sont distingués les MNx sans signal d'hybridation fluorescent (MN centromère-négatif, BN-MNC-), contenant donc des fragments chromosomiques acentriques issus d'un événement clastogène, et les MNx présentant un ou plusieurs spots de fluorescence (MN centromère-positifs), contenant donc un (monocentromériques, BN-MNC1+) ou plusieurs (multicentromériques, BN-MNCx+) chromosomes entiers perdus au cours de la mitose précédente à la suite d'un événement aneugène (Kirsch-Volders *et al.*, 2002) (cf. Figure 53).

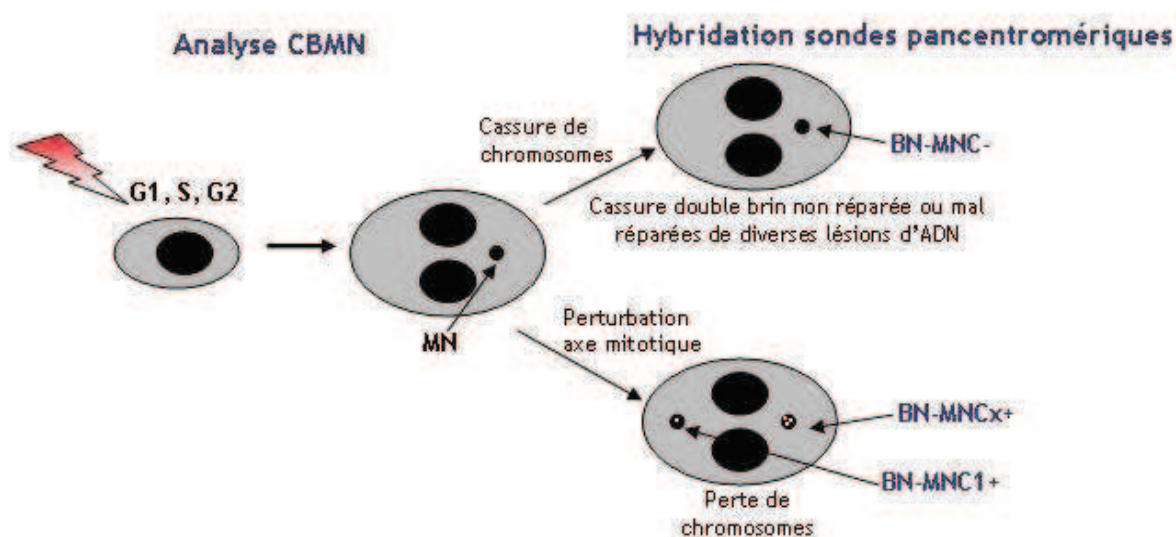


Figure 53. Comment se forment les micronoyaux centromériques ? (d'après Iarmarcovai *et al.*, 2006)

Ainsi, le couplage de l'hybridation *in situ* fluorescente de sondes pancentromériques au test de micronoyaux permet de détecter et de distinguer de façon qualitative et quantitative les événements génotoxiques conduisant à des anomalies chromosomiques.

II.3.3.b Contenu centromérique des micronoyaux

Différentes études se sont intéressées au contenu centromérique des MNx et ont comptabilisé le nombre de signaux centromériques au sein des MNx, mais cela n'a pas fait l'objet d'interprétation bien approfondie.

Il semble que les MNx centromériques soient consécutifs à diverses altérations d'éléments protéiques structurant l'appareil mitotique (cf. Figure 54). Il a été mis en évidence, *in vitro* (caractérisation de la génotoxicité du paclitaxel) (Digue *et al.*, 2002) ou sur une étude de biomonitoring de patients cancéreux (Baciuchka-Palmaro *et al.*, 2002), que la plupart des événements aneugènes impliquaient plusieurs chromosomes par MN, soit BN-MNCx+. À l'inverse, il a été observé que les lymphocytes périphériques des anatomopathologistes professionnellement exposés au formaldéhyde présentaient une augmentation significative de la fréquence des BN-MNC1+ par rapport aux témoins tandis que la fréquence des BN-MNCx+ était inchangée (Orsière *et al.*, 2006). Des défauts de migration chromosomique consécutifs à des anomalies tantôt de l'instabilité dynamique des microtubules, c'est-à-dire de l'équilibre entre polymérisation et dépolymérisation des dimères de tubuline α et β , tantôt des kinétochores, devraient induire des BN-MNC1+ très majoritairement, alors que des anomalies de duplication des centres organisateurs du fuseau mitotique (centrosomes) devraient induire des BN-MNCx+ (Iarmarcovai *et al.*, 2006). Des techniques d'immuno-FISH pourraient permettre de vérifier l'implication d'anomalies du centrosome dans la genèse des BN-MNCx+.

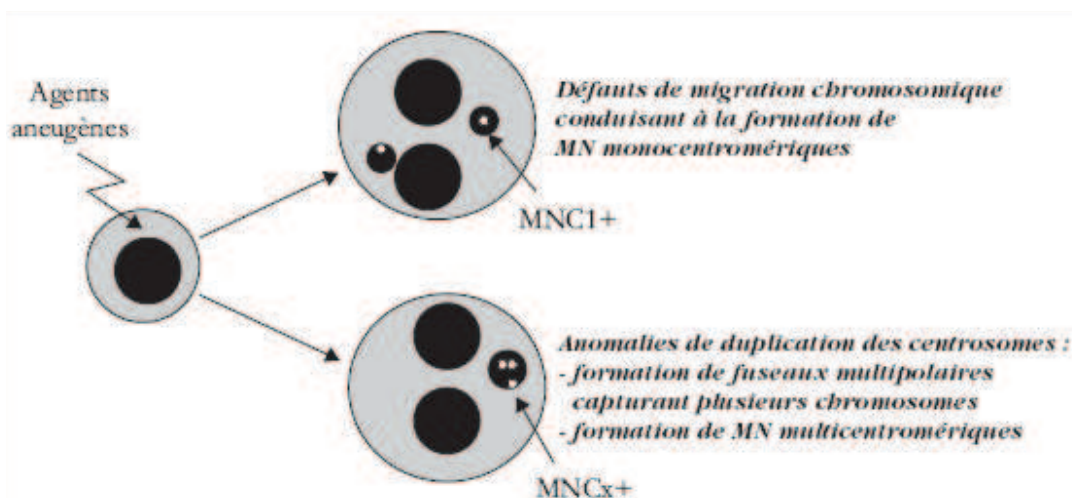


Figure 54. Diversité des micronoyaux centromériques (d'après Iarmarcovai *et al.*, 2007)

■ Micronoyaux monocentromériques

Les MNC1+ résulteraient de défauts de migration chromosomique consécutifs à des anomalies des microtubules ou des kinétochores (cf. Figure 55).

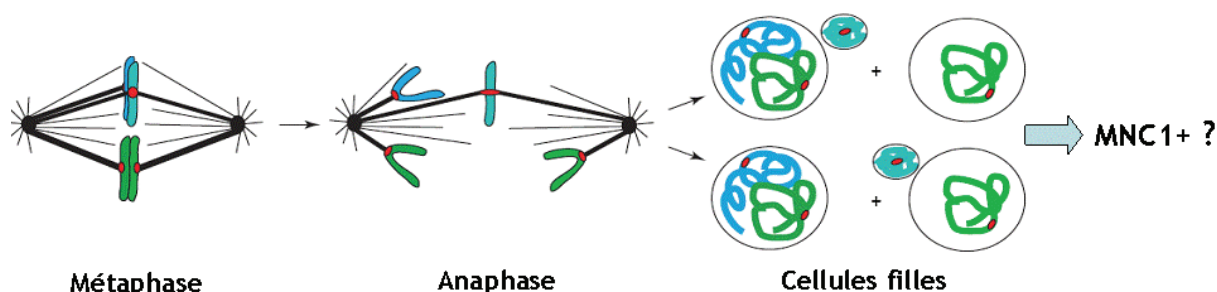


Figure 55. Mécanismes de formation des MNC1+ (d'après Cimini et Degrassi, 2005)

■ Micronoyaux avec deux signaux centromériques

Les MNx avec deux signaux centromériques (MNC2+) pourraient représenter deux chromatides homologues d'un chromosome si la migration est entravée consécutivement à un événement de non-disjonction (Eastmond *et al.*, 1995). Leach et Jackson-Cook (2004) ont montré qu'un micronoyau ayant de deux à quatre copies du même chromosome pourraient résulter du retard d'une ou deux chromatide(s)/chromosome(s) homologue(s) à l'anaphase, aboutissant à leur non ségrégation. L'inclusion d'un chromosome fait de deux chromatides homologues dans un MN pourrait donc avoir pour origine un défaut de centromère. La présence des deux chromatides d'un même chromosome dans un MN est plutôt commune et ne peut que difficilement être rapprochée d'une anomalie de nombre de centrosome. Néanmoins, l'inclusion de deux chromatides non-homologues dans un MN peut être une indication d'amplification centrosomique. Cependant, le FISH avec sondes pancentromériques ne permet pas la distinction entre un MN constitué des deux chromatides homologues et non-homologues.

■ Micronoyaux multicentromériques (avec trois ou plus signaux centromériques)

Dans les cellules cancéreuses aneuploïdes, des anomalies du centrosome sont fréquemment retrouvées (Fukasawa, 2005). Or, le centrosome joue un rôle primordial dans l'organisation, d'une part, du réseau microtubulaire du cytosquelette des cellules en interphase et, d'autre part, du fuseau mitotique des cellules en division. Dans de nombreux cancers (sein, cerveau, prostate...), le centrosome présente des anomalies de nombre, de taille, responsable des mitoses comprenant des fuseaux multipolaires (Nigg, 2002 ; D'Assoro *et al.*, 2002 ; Fletcher et Muschel, 2006). Des anomalies de duplication du centrosome (centrosomes surnuméraires) sont également retrouvés dans les stades les plus

élevés de cancers (D'Assoro *et al.*, 2002). L'acquisition de tels défauts du centrosome pourrait affecter la progression de la tumeur en augmentant la stabilité chromosomique, et donc la probabilité de dérégulation cellulaire et de métastases (Lingle *et al.*, 1998).

Des anomalies de nombre du centrosome peuvent être une réponse cellulaire commune à l'exposition à différents agents génotoxiques ou à d'autres situations de stress (Sato *et al.*, 2004). Holmes et ses collaborateurs (2006) ont mis en évidence que des métaux (comme le vanadium, l'arsenic, le méthylmercure et le chromate de plomb) pouvaient induire une instabilité des chromosomes et des anomalies du centrosome. Toute condition favorisant la surproduction des centrosomes pourrait contribuer directement à un déséquilibre des chromosomes, par l'intermédiaire de la formation de fuseaux multipolaires et de mitoses aberrantes (Saunders *et al.*, 2000). En outre, Saunders et ses collègues ont démontré qu'au cours de mitoses multipolaires, la capacité des pôles à attirer les chromosomes était fortement variable, les pôles surnuméraires n'ayant qu'une influence mineure sur l'alignement métaphasique et sur le nombre de chromosomes capturés (Saunders *et al.*, 2000).

Dès lors, la survenue d'un tel événement pourrait conduire, dans le test des MNx où la cytotérière est bloquée par la cytochalasine B, à des cellules binucléées micronucléées dans lesquelles les MNx contiendraient plusieurs chromosomes entiers (MNCx+) (cf. Figure 56).

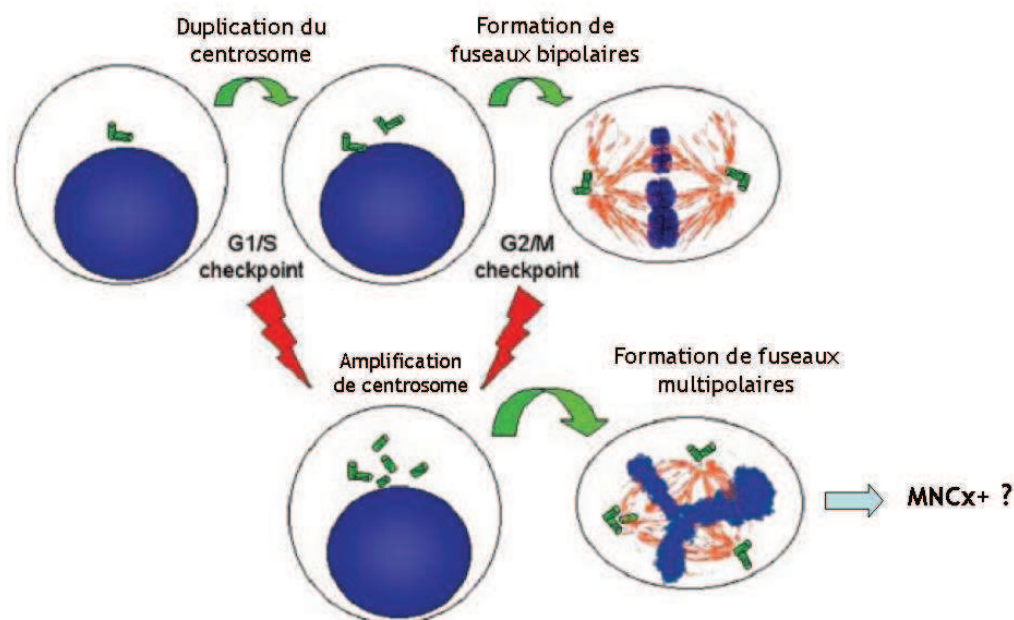


Figure 56. Mécanismes de formation des MNCx+ (d'après D'Assoro *et al.*, 2002)

II.3.4 Mesure d'autres anomalies avec le test des micronoyaux: étude des ponts nucléoplasmiques et des cellules mononucléées avec un MN

Comme mentionné précédemment, l'analyse du test des micronoyaux mesure les fréquences de rupture des chromosomes (BN-MNC-), la perte de chromosome (BN-MNC+), mais également la remise en ordre des chromosomes, par exemple les chromosomes dicentriques (ponts nucléoplasmiques : PNP) ou bien les cellules mononucléées avec des MNx (Elhajouji *et al.*, 1998 ; Rosefort *et al.*, 2004).

II.3.4.a Les ponts nucléoplasmiques

Les PNPs proviennent des chromosomes dicentriques qui sont facilement identifiables. Les PNPs se produisent quand les centromères des chromosomes dicentriques ou des chromatides sont tirés aux pôles opposés de la cellule à l'anaphase. Il est rare d'observer les PNPs du fait de la rapidité du processus ; en effet, les cellules réalisent très rapidement l'anaphase puis la télophase finalisée par la cytotiérèse et donc la rupture du pont quand les cellules filles se séparent. Grâce à l'analyse des MNx avec blocage en cytotiérèse, les cellules binucléées avec des PNPs peuvent s'accumuler du fait du blocage de la cytotiérèse. Dans de très rares cas, plus d'un pont nucléoplasmique peut être observé dans une cellule binucléée. Des photos de cellules binucléées avec un pont nucléoplasmique sont présentées dans la [Figure 57](#).



Figure 57. Photographies de cellules binucléées avec un pont nucléoplasmique (PNP). (a) schéma d'une cellule binucléée avec un PNP, (b) photographie d'une cellule binucléée avec un PNP relativement fin après coloration au Giemsa, (c) photographie d'une cellule binucléée avec un PNP relativement épais après coloration au Giemsa, (d) photographie d'une cellule binucléée avec un PNP après coloration DAPI et marquage pancentromérique.

Umegaki et Fenech (2000) ont suggéré de compter les ponts nucléoplasmique (PNPs) entre les noyaux des cellules binucléées dans le test CBMN. En effet, ils fournissent une mesure de réarrangement chromosomique qui ne peut pas s'évaluer si on s'intéresse uniquement aux cellules binucléées. L'analyse concomitante des ponts nucléoplasmiques (PNP) en déterminant la fréquence de MNx n'alourdit pas le travail et peut fournir des informations concernant le type d'agent mutagène impliqué (clastogène ou aneugène).

La numération des PNPs ne doit pas être sous-estimée parce qu'elle fournit une preuve directe de dommages du génome résultant d'une mauvaise réparation des cassures de l'ADN qui n'est pas possible de déduire en marquant uniquement les MNx dans les cellules binucléées (pouvant provenir de fragments acentrique ou de chromosomes entiers). En outre, la numération des PNPs pourrait être utilisée pour identifier des défauts dans les voies de réparation de l'ADN par recombinaison (cf. Figure 58) ou de caractériser et de différencier les mécanismes génotoxiques de différents agents.

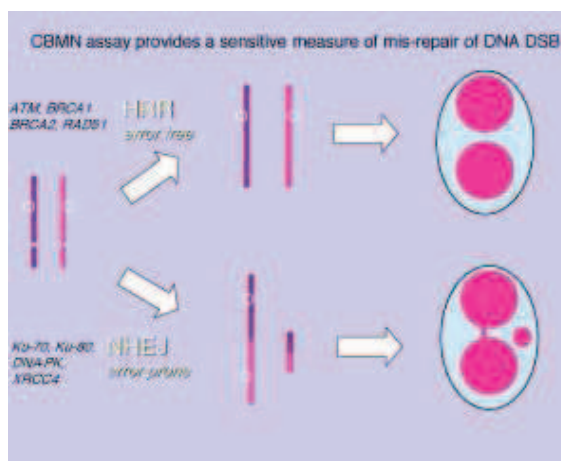


Figure 58. Les défauts des gènes impliqués dans la réparation des gènes par recombinaison homologue (par exemple ATM, BRCA1, BRCA2 et RAD51) pourraient être détectés en utilisant le test CBMN. En effet, dans ces conditions on pourrait s'attendre à ce que la cellule aient recours au mécanisme de réparation par recombinaison non homologue (NHEJ) qui est susceptible d'entraîner une mauvaise réparation des cassures double brin de l'ADN, la formation de chromosomes dicentriques et donc finalement des PNPs détectables dans le test CBMN (d'après Fenech, 2006a).

Les métaux lourds comme le nickel ou le tungstène, considéré comme de faibles agents clastogènes, n'induisent pas de chromosomes dicentriques et donc pas de PNPs (Miller *et al.*, 2002b). En revanche, l'induction de chromosomes dicentriques, et donc de PNPs, par les rayonnements alpha (agent clastogène), est importante et est bien documentée (Greinert *et al.*, 1999 ; Plan *et al.*, 2005 ; Stephan *et al.*, 2005). Plan et ses collaborateurs (2005) ont démontré une augmentation de la fréquence des chromosomes dicentriques en fonction de la dose dans un modèle *in vitro* de fibroblastes humains irradiés par des particules alpha émises par une source de ^{238}Pu . Dans l'ensemble, les chromosomes dicentriques, et donc les PNPs, sont considérés comme des indicateurs spécifiques de l'exposition aux rayonnements ionisants, en raison de leur faible fréquence spontanée dans la population non exposée (Hoffmann et Schmitz-Feuerhake, 1999 ; Miller *et al.*, 2002b).

II.3.4.b Cellules mononucléées avec un MN

Dans le passé, plusieurs tentatives ont été faites pour établir une distinction entre l'action des composés aneugènes et clastogènes. La première approche était basée sur la mesure du diamètre des

micronoyaux (MNx). Les auteurs supposaient que la perte de chromosomes entiers induite par des composés aneugène entraînerait des MNx plus gros que ceux induits par des composés clastogènes, qui ne génèrent que des fragments chromosomiques (Yamamoto et Kikuchi, 1980 ; Wakata et Sasaki, 1987 ; Tinwell et Ashby, 1991 ; Ferguson *et al.*, 1993). Cette méthode semble être applicable, mais elle est très coûteuse en temps et pourrait poser problème dans les espèces à caryotype comprenant des chromosomes de taille très différentes.

Elhajouji et ses collègues (1998) ont rapporté une nouvelle façon de distinguer les composés aneugènes des composés clastogènes dans le test CBMN. Les auteurs ont montré que certains composés aneugènes augmentaient la fréquence des MNx dans les cellules mononucléées ainsi que des cellules binucléées, tandis que les composés clastogènes induisent des MNx uniquement dans les cellules binucléées. Cette différence pourrait permettre la discrimination entre les MNx générés par les composés aneugènes et les composés clastogènes. Une autre étude a confirmé les résultats obtenus par Elhajouji et ses collègues (1998). En effet, Rosefort *et al.* (2004) ont aussi démontré que les composés aneugènes augmentaient la fréquence des MNx dans les cellules mononucléées et les cellules binucléées, alors que les composés clastogènes induisent des MNx uniquement dans les cellules binucléées.

Ces résultats suggèrent que l'étude des MNx dans les cellules mononucléées pourrait constituer un paramètre supplémentaire intéressant dans le test CBMN permettant de différencier les composés aneugènes et les composés clastogènes.

II.3.5 Facteur de variation

Le test des MNx est un biomarqueur empreint d'une grande variabilité (cf. Figure 59). Il existe d'abord une variabilité inter-laboratoire, mais également une importante variabilité inter-individuelle liée à des facteurs propres à l'individu (sexe, âge) ou à son mode de vie (tabagisme, alcool, habitudes alimentaires) (Fenech, 1998 ; Bonassi *et al.*, 2001 et 2003 ; Fenech *et al.*, 2003).

Pour mémoire, la proportion de MNx centromériques spontanés sur lymphocytes humains de sujets témoins, mesurés par des anticorps CREST ou FISH, varie de 30 à 80% selon les études (Norppa et Falck, 2003).

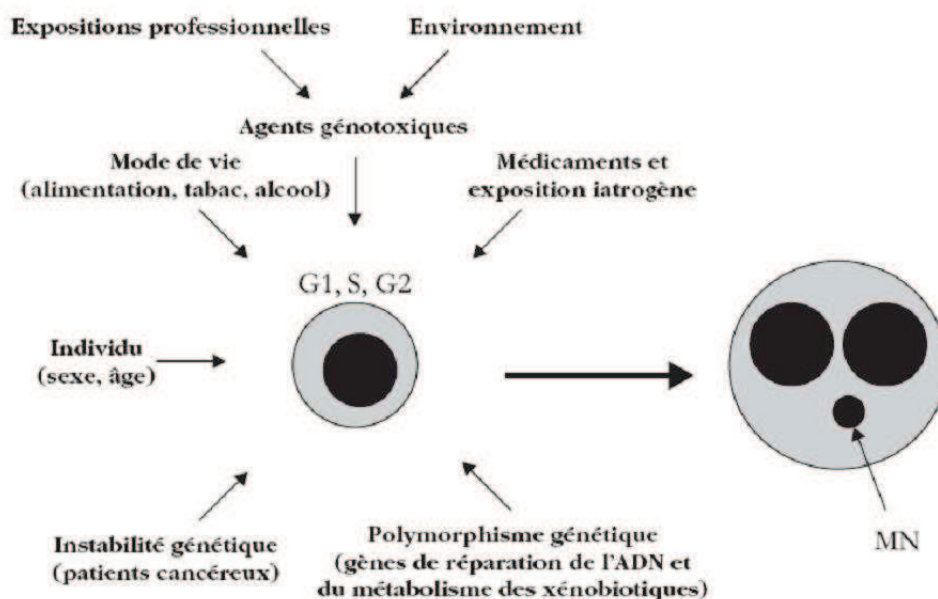


Figure 59. Facteurs de variation dans la biosurveillance au moyen du test des MN (d'après Iarmarcovai *et al.*, 2007)

II.3.5.a Variabilité inter-laboratoire

Cette variabilité inter-laboratoire est notamment liée à des différences de protocole et/ou critères de lecture, ce qui rend difficile la comparaison des résultats d'une étude à l'autre (Surralles et Natarajan, 1997 ; Bonassi *et al.*, 2001). La cytochalasine B peut aussi influencer la fréquence et le contenu centromérique (Fenech, 2006b).

Plusieurs études d'optimisation et de validation sont en cours en vue de proposer des protocoles harmonisés sur le plan international (Fenech *et al.*, 1999 ; Albertini *et al.*, 2000 ; Clare *et al.*, 2006). Ainsi une large étude collaborative internationale, intitulée The Human MicroNucleus (HUMN) Project, a été initiée il y a quelques années avec les objectifs suivants (Fenech *et al.*, 1999 ; Bonassi *et al.*, 2001 ; Fenech *et al.*, 2003 et 2007) :

- déterminer le niveau de variation des valeurs « normales » entre différents laboratoires et étudier l'influence de divers facteurs tels que l'âge, le sexe, le mode de vie, sur les fréquences basales des MNx ;
- étudier les effets des différences de protocoles expérimentaux sur les fréquences de MNx ;
- définir et tester des protocoles optimisés pour les différents types cellulaires.

II.3.5.b Facteurs individuels

L'âge constitue un facteur de confusion important, une augmentation de la fréquence des MN en fonction de l'âge étant rapporté dans la plupart des études, notamment celles portant sur de grands

effectifs. Cet effet de l'âge peut refléter une augmentation progressive de l'instabilité chromosomique spontanée, associée à une accumulation des dommages de l'ADN due à une diminution liée à l'âge des capacités de réparation (Bolognesi *et al.*, 1997). Il a également été démontré que cette augmentation de la fréquence des MNx en fonction de l'âge est liée à une perte de fragments acentromériques (Norppa et Falck, 2003). C'est d'ailleurs ce que Thierens et ses collaborateurs ont mis en évidence dans des études de biosurveillance utilisant le test des MNx sur lymphocytes couplé au FISH de sondes pancentromériques (Thierens *et al.*, 1999 et 2000).

Un autre facteur de confusion classiquement évoqué est le tabagisme, pour lequel les données de la littérature quant à un éventuel effet sur la fréquence des MNx restent contradictoires (Norppa et Falck, 2003 ; Demarini, 2004). Une augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques chez les fumeurs a été rapportée dans la plupart des études portant sur des grands effectifs (Norppa et Falck, 2003). Dans une étude européenne, seulement un tiers des laboratoires interrogés a détecté un effet significatif du tabagisme sur la fréquence des MNx (Surralles et Natarajan, 1997). Une analyse cumulée réalisée dans le cadre du projet HUMN (HUMAN Micronucleus) n'a pas retrouvé une fréquence augmentée des MNx chez les fumeurs. Cependant, une fois l'interaction avec l'exposition professionnelle prise en compte dans l'analyse statistique, les gros fumeurs (et seulement les gros fumeurs) présentaient une augmentation significative de la fréquence des MNx (Bonassi *et al.*, 2003). Le tabac devrait plus particulièrement induire des MNx acentromériques du fait de ses propriétés clastogènes, cet effet n'est pas retrouvé lors de l'analyse de la littérature (Scarpato *et al.*, 1996 ; Norppa et Falck, 2003).

La consommation d'alcool peut également influencer la fréquence de MNx (Castelli *et al.*, 1999 ; Maffei *et al.*, 2000 et 2002). En effet, Maffei et ses collaborateurs ont retrouvé une fréquence de MNx centromériques plus élevée chez les alcooliques, et plus particulièrement des MNx centromériques (Maffei *et al.*, 2002). Les données de la littérature sont contradictoires quant à l'existence de corrélations entre l'élévation de la fréquence des MNx et une consommation de boissons alcoolisées chronique en quantité importante, ou fonction de la durée avouée de l'alcoolisme.

Les habitudes alimentaires ont également été identifiées comme pouvant influencer la fréquence des MNx dans les lymphocytes. Ainsi Fenech a mis en évidence une corrélation négative entre la fréquence de MNx et la teneur plasmatique en acide folique et en vitamine B1, jouant tous deux un rôle important dans la synthèse de l'ADN (Fenech, 1998 ; Fenech, 2005b). Les médicaments (immunosuppresseurs, cytostatiques, vaccins, antibiotiques) et l'exposition iatrogène (examens radiologiques) peuvent également constituer un facteur de variation important.

II.3.6 Avantages et limites

La numération des MNx, qui se fait en interphase, représente un moyen fiable d'évaluer les anomalies chromosomiques de nombre et de structure (\pm FISH) (Fenech, 2000). Ce test est rapide (avec toutefois le temps de culture cellulaire) et simple avec un comptage relativement facile. Son coût est peu élevé. Il permet de comptabiliser les cellules en apoptose, en nécrose ainsi que les ponts nucléoplasmiques et les bourgeons nucléaires. Il est applicable à plusieurs types cellulaires. Sa puissance statistique est bonne en raison du grand nombre de cellules comptées. Le test des MNx ne permet pas cependant de détecter toutes les anomalies chromosomiques de structure ; seuls les fragments acentromériques sont mis en évidence, tandis que les aberrations plus subtiles (translocations) ne peuvent être détectées que par l'analyse des chromosomes en métaphase. Les MNx ne peuvent s'exprimer qu'après une division cellulaire, ce qui rend le test applicable seulement à des cellules qui se divisent.

II.3.7 Micronoyaux et polymorphisme génétique

Plus de 99 % du génome est commun à tous les humains. La fraction restante, bien qu'infime, est essentielle parce que les variations dans la séquence des acides nucléiques qu'elle comporte influencent la susceptibilité aux maladies, leur expression clinique, leur évolutivité et également la réponse aux agents génotoxiques. Le polymorphisme génétique correspond à l'existence de variations de la séquence de l'ADN à un locus donné. Ces variations peuvent siéger dans des exons et éventuellement modifier la phase de lecture du gène. Elles sont donc susceptibles de moduler l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques (cytochromes P450 mono-oxygénases, glutathion S-transférases, N-acétyl-transférases, sulfotransférases) ou dans la réparation des lésions de l'ADN (tels que hOGG1, XRCC1 ou XRCC3) (Norppa, 2004), mais n'ont pas de conséquence pathologique du fait d'une dysfonction du gène ou de la protéine, ce qui les différencie des mutations à proprement parler. Globalement, il n'existe pas de « bon » ou de « mauvais » polymorphisme. Un même polymorphisme pouvant être « à risque » dans une situation et inversement « protecteur » dans une autre suivant les types d'exposition et de métabolisation mis en œuvre (Garte *et al.*, 2001).

À chacune des étapes de la cancérogenèse, depuis la plus précoce (la génotoxicité) jusqu'à la plus tardive (le clone tumoral constitué), l'environnement et l'hérédité sont en étroite interaction. Un autre champ d'investigation est d'associer aux biomarqueurs de susceptibilité génétique, capables de rendre compte de différences interindividuelles dans la réponse à une exposition génotoxique, le test des MNx, témoin d'une interaction entre l'environnement et le matériel génétique de la cellule. Les modulations

des dommages à l'ADN et plus particulièrement de la fréquence des MNx ou du contenu centromérique des MNx par le polymorphisme génétique de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (activation ou détoxification), dans la réparation des lésions de l'ADN ou dans le métabolisme des folates, sont désormais bien documentées (Kirsch-Volders *et al.*, 2006 ; Mateuca *et al.*, 2006).

Les polymorphismes de GSTT1 et GSTM1 sont d'une grande importance dans la modulation de la fréquence des dommages chromosomiques chez les individus exposés à des agents génotoxiques et dans les populations non exposées. En effet, une récente analyse poolée a montré que des personnes sans GSTT1 avaient des fréquences de MNx moins élevées que ceux qui possédaient l'allèle sauvage (Kirsch-Volders *et al.*, 2006). Il a également été démontré que les personnes GSTM1 non muté présentaient des fréquences de MNx acentromériques (MNC-) plus élevées comparées à des individus sans GSTM1, le polymorphisme génétique pouvant également influencer un mécanisme spécifique de formation des MNx et donc le contenu centromérique des MNx (Iarmarcovai *et al.*, 2006). Des variants du gène ALDH2 sont systématiquement associés à la formation de MNx induite par la consommation d'alcool (Ishikawa *et al.*, 2007). Les porteurs de mutations BRCA1 et BRCA2 (avec ou sans cancer du sein) montrent une sensibilité accrue à des agents clastogènes (Speit *et al.*, 2004). En outre, certaines données suggèrent que les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (XRCC1 et XRCC3) (Fukasawa, 2005) et les gènes du métabolisme des folates (MTHFR) (Norppa, 2004) influent également sur la formation des MNx (Tuimala *et al.*, 2004). La majorité des résultats sont basés sur un nombre relativement restreint de sujets, des études à plus grande échelle sont par conséquent nécessaires pour prendre en compte l'évaluation de critères supplémentaires tels que la numération des MNx couplée avec l'hybridation fluorescente *in situ* de sondes pancentromériques ou bien l'analyse des ponts nucléoplasmiques.

III. Effets génotoxiques de l'uranium observés avec le test des comètes, l'immunomarquage de γ -H2AX et le test des MNx

La Partie C (Génotoxicité de l'U) de ce mémoire fait une revue bibliographique des différents effets génotoxiques induits par une exposition à l'U en détaillant les données en fonction des différents dommages observés. Le **Tableau 8**, présenté par la suite, résume les effets génotoxiques de l'U observés à l'aide du test des comètes, du test des micronoyaux ainsi qu'après un immunomarquage de l'histone γ -H2AX. Ce tableau permet de synthétiser par technique les données de la littérature.

Tableau 8. Synthèse des effets génotoxiques de l'U observés avec le test des comètes, l'immunomarquage de γ -H2AX et le test des MNx

Test utilisé	Type cellulaire	Type d'étude	Composé utilisé	Effets génotoxiques	Références
Test des comètes	Cellules d'ovaires de hamsters chinois	<i>In vitro</i>	Acétate d'uranyle appauvri	Augmentation des dommages de l'ADN	Stearns <i>et al.</i> , 2005
Test des comètes en condition alcaline et neutre	Cellules broncho-alvéolaires de rat	<i>In vivo</i>	Dioxyde d'uranium (UO ₂) et Tétraoxyde d'uranium (UO ₄) = UA	Augmentation des dommages de l'ADN	Monteau <i>et al.</i> , 2006a et 2006b
Test des comètes en condition alcaline	Cellules proximales rénales de rat (NRK-52 ^E)	<i>In vitro</i>	Uranium appauvri	Augmentation des dommages de l'ADN	Thiébault <i>et al.</i> , 2007
Immunofluorescence γ-H2AX				Augmentation des CDBs	
Test des comètes en condition alcaline	Erythrocytes de poisson zèbre	<i>In vivo</i>	Nitrate d'uranyle	Augmentation des dommages de l'ADN	Barillet <i>et al.</i> , 2005
Numération des MNx	Cellules d'ovaires de hamsters chinois	<i>In vitro</i>	Nitrate d'uranyle	Augmentation du nombre de MNx, chromatides sœurs	Lin <i>et al.</i> , 1993
Numération des MNx	Lignée d'ostéoblastes humains (HOS)	<i>In vitro</i>	Uranium appauvri (chlorure d'uranyle appauvri)	Augmentation de la fréquence des MNx,	Miller <i>et al.</i> , 2002b et 2003
Numération des MNx	Cellules de la moelle osseuse de rat	<i>In vivo</i>	Uranium appauvri	Augmentation fréquence de MNx	Hao <i>et al.</i> , 2009
Numération des MNx	Lymphocytes humains. (Personnes vivant dans des zones contaminées à l'uranium appauvri (des conflits dans les Balkans)	<i>In vivo</i>	Uranium	Augmentation significative de la fréquence des MNx	Krunic <i>et al.</i> , 2005
Numération des MNx	Lymphocytes humains (Personnes vivant dans des zones contaminées à l'uranium appauvri (Bosnie et Herzégovine)	<i>In vivo</i>	Uranium appauvri	Augmentation significative de la fréquence des MNx et corrélation avec l'âge	Ibrulj <i>et al.</i> , 2004
Numération des MNx + FISH	Lymphocytes humains. (Mineurs d'uranium)	<i>In vivo</i>	Uranium	Augmentation des MNx centromère-négatifs (MNx avec fragments acentriques)	Kryscio <i>et al.</i> , 2001

IV - Différentes approches en génotoxicologie - Synthèse

La génotoxicologie est une discipline scientifique ayant essentiellement pour objet l'identification des agents génotoxiques, la détermination des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les phases de bioactivation, d'interaction avec l'ADN, de réparation des lésions primaires, et l'évaluation des conséquences initiales des dites lésions. Compte tenu de la grande diversité des anomalies susceptibles d'être induites au niveau d'un patrimoine génétique, il n'existe pas un mais plusieurs tests de génotoxicité susceptibles de révéler tels ou tels types de lésions ou de mutations (comme par exemple le test des comètes, la détection des adduits ou le test des micronoyaux). De nombreuses études toxicologiques présentées dans le chapitre précédent ont fait état du caractère génotoxique de l'U. Divers biomarqueurs sont disponibles pour mettre en évidence les effets génotoxiques des agents chimiques ainsi que des rayonnements ionisants, qu'il s'agisse de lésions primaires de l'ADN (susceptibles d'être réversibles sous l'effet des systèmes de réparation) ou de mutations (lésions stables et héréditaires du patrimoine génétique).

Les lésions primaires à l'ADN représentent le premier stade consécutif à l'action d'un agent génotoxique. Le test des comètes en condition alcaline permet de visualiser les lésions précoces de l'altération du matériel génétique à savoir les cassures simple brin, cassures double brin et sites labiles alcalins. Le marquage par immunofluorescence de l'histone γ -H2AX permet d'étudier de manière spécifique les cassures double brin, lésions décrites comme étant radio-induites. Mal réparées, les lésions primaires peuvent conduire à des mutations qui augmentent le risque de cancers pour les cellules somatiques et de maladies héréditaires pour les cellules germinales. Ces deux précédentes techniques permettent ainsi de détecter des manifestations précoces de l'altération du matériel génétique, en amont de phénomènes aux conséquences plus lourdes pour le devenir de la cellule tels que les effets clastogènes ou aneugènes. Le test de numération des micronoyaux associé à la technique FISH utilisant des sondes centromériques permet de discriminer les mutations chromosomiques de structure (effets clastogènes) des mutations chromosomiques de nombre (effets aneugènes). Il faut bien noter que différents tests de génotoxicité doivent être associés pour apprécier sur un même type cellulaire à la fois les intensités des lésions primaires de l'ADN et les mutations géniques et chromosomiques.

STRATEGIE DE RECHERCHE



L'U est un métal lourd naturellement radioactif. La contamination interne par l'U est un risque majeur pour les travailleurs impliqués dans la production du combustible nucléaire ; elle peut se produire accidentellement principalement par inhalation ou passage percutané en milieu industriel et par ingestion suite à une pollution environnementale. Sa toxicité résulte à la fois de la toxicité chimique (métal lourd) et de la toxicité radiologique (émetteur de particules α) et s'exprime principalement au niveau du rein. Le suivi radiotoxicologique des travailleurs est aujourd'hui fondé essentiellement sur des dosages des différents isotopes de l'U dans les urines et/ou les fèces (biomarqueurs d'exposition). Les résultats obtenus permettent, à l'aide de modèles mathématiques élaborés par la Commission International de Protection Radiologique (CIPR), de calculer le niveau d'incorporation de ce toxique et une valeur d'équivalent de dose engagée. Dans certains cas de contamination interne accidentelle avec un U enrichi en isotope 235, une mesure *in vivo* de la radioactivité émise par l'organisme, et donc de son contenu en U, peut être effectuée à l'aide de techniques d'anthroporadiométrie. C'est à partir de l'ensemble de ces données comparées à des valeurs réglementaires (limites de dose basées sur les recommandations de la CIPR) ou recommandées (limites de toxicité chimique) que le médecin du travail estime le risque sanitaire pour les travailleurs. Bien que les biomarqueurs d'exposition permettent d'estimer un risque moyen pour la santé d'un individu ayant subi une contamination interne, ils ne prennent pas en compte la variabilité inter-individuelle de réponse de l'organisme aux toxiques. Ainsi, certains individus seront plus sensibles et d'autres plus résistants que la population moyenne à l'apparition des effets toxiques de l'U. Ce sont les biomarqueurs d'effets et de susceptibilité qui vont en rendre compte. Le but des biomarqueurs d'effets est d'estimer les dysfonctionnements physiologiques des organes (avec les marqueurs plasmatiques ou urinaires) ou les effets génotoxiques (marqueurs de génotoxicité) causés par l'incorporation de radionucléides. Plusieurs études ont démontré des effets génotoxiques de l'U induisant diverses anomalies au niveau du matériel génétique des cellules d'un organisme telles que des micronoyaux, des échanges de chromatides sœur, des aberrations chromosomiques ou bien encore des cassures double brin (Hu et Zhu, 1990 ; Lin *et al.*, 1993 ; Miller *et al.*, 2002 et 2003 ; Monleau *et al.*, 2006 ; Thiébault *et al.*, 2007). Mais à partir de toutes ces études il est difficile de déterminer si les effets observés sont dus à la toxicité chimique et/ou radiologique de l'U. Compte tenu des connaissances actuelles sur les effets biologiques d'une contamination interne à l'U, les marqueurs de génotoxicité semblent être les candidats les plus prometteurs pour préciser la proportion d'effets toxiques due soit aux propriétés radiologiques, soit aux propriétés chimiques de l'U.

L'U stable, celui qui permettrait de s'affranchir des effets du rayonnement α et de ne visualiser que les effets chimiques du métal lourd n'existe pas. La contamination par différents mélanges isotopiques de l'U permet de discriminer de façon indirecte l'effet chimiotoxique de l'effet radiotoxique de l'U. En effet, à concentration égale, la toxicité chimique est identique pour tous les isotopes de l'U alors que la toxicité radiologique est différente car elle dépend de l'activité spécifique propre à chaque isotope de l'U.

Les objectifs de cette étude sont :

1 - d'identifier des marqueurs biologiques permettant de discriminer les effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'U, qui pourraient être utilisés afin d'améliorer le suivi de personnes victimes d'une contamination interne ;

2 - d'étudier l'influence de la composition isotopique d'un mélange uranifère sur ses effets cellulaires précoces (cytotoxicité, lésions primaires de l'ADN, stress oxydant et retards ou blocages de la progression du cycle de division cellulaire).

La première partie de l'étude a été réalisée *in vitro* sur des fibroblastes embryonnaires de souris (C3H10T1/2). Ce modèle biologique a permis d'identifier différents marqueurs de génotoxicité pouvant être soit spécifiques d'un effet chimiotoxique de l'U, soit spécifiques d'un effet radiotoxique de l'U. La validité des marqueurs biologiques ainsi définis a été confirmée dans la deuxième partie de cette étude pour un modèle de rat contaminé *in vivo* par injection d'U ; puis sur un modèle de sang humain contaminé *in vitro* présenté dans la troisième partie de ce travail de thèse.

◆ Étude *in vitro* sur les fibroblastes embryonnaires de souris (C3H10T1/2) : Partie A

Cette première étude a été réalisée sur un modèle cellulaire simple et bien maîtrisé. La lignée cellulaire utilisée est une lignée de fibroblastes embryonnaires de souris C3H10T1/2 clone 8 (American type Tissue Culture collection ATCC, Rockville, MDC. cf. Figure 60). Cette lignée cellulaire est de type p53 sauvage (Coleman *et al.*, 1994), elle a tout d'abord été développée pour des études de transformation néoplasique (Reznikoff *et al.*, 1973). Cette lignée de cellules adhérentes présente une haute stabilité génétique, ce qui la rend appropriée pour l'évaluation des dommages de l'ADN ainsi que pour l'évaluation des effets des rayonnements ionisants (Calini *et al.*, 2002 et 2003 ; OCDE, 2007).

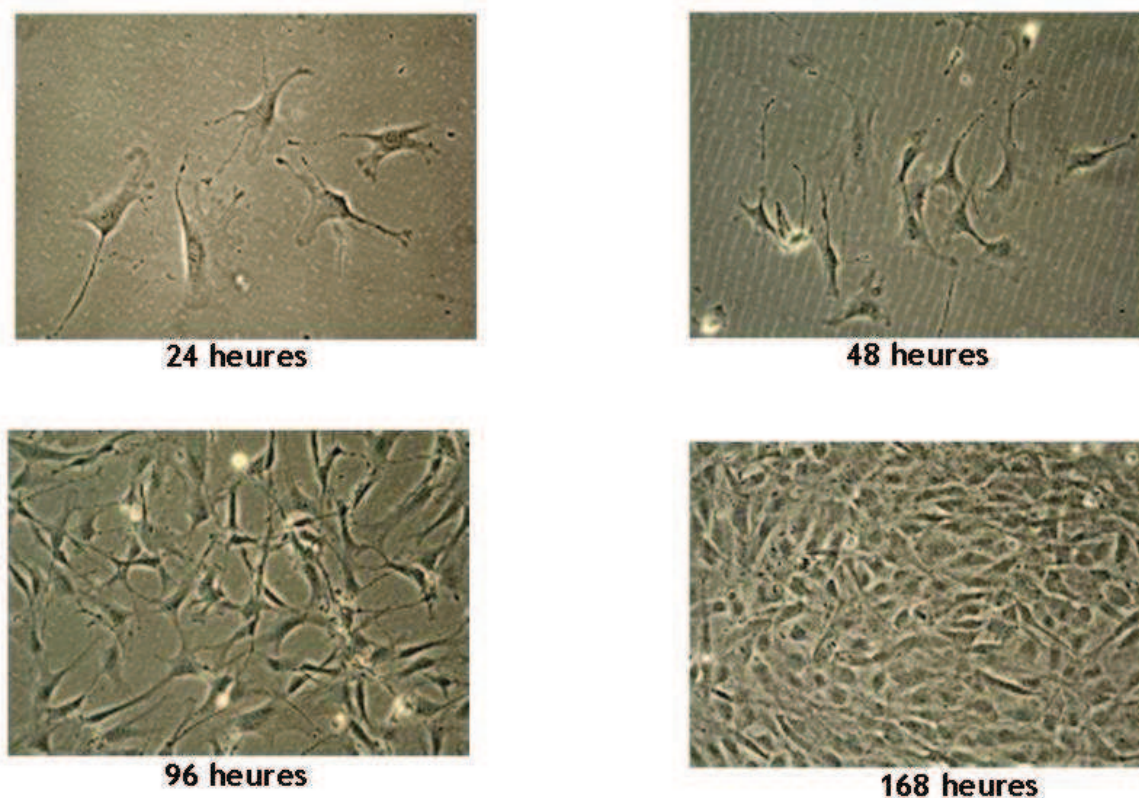


Figure 60. Prolifération des fibroblastes de souris C3H/10T1/2

L'objectif principal de cette étude était de discriminer les effets aneugènes des effets clastogènes de l'U. Pour cela, la comparaison entre les effets causés par une contamination à l'UA à 0,3 % en ^{235}U (activité spécifique de $1,47 \cdot 10^4 \text{ Bq.g}^{-1}$) et ceux causés par une contamination à l'UE à 12 % en ^{235}U (activité spécifique de $3,06 \cdot 10^5 \text{ Bq.g}^{-1}$) a été réalisée. En effet, à concentration égale, la toxicité chimique est identique pour les deux mélanges isotopiques d'U alors que la toxicité radiologique est environ 20 fois supérieure pour l'UE à 12% en ^{235}U (l'activité spécifique de l'UE est 20 fois supérieure à l'activité spécifique de l'UA). L'étude a donc été effectuée sur **différents mélanges isotopiques de l'U** : UA (0,3 % en ^{235}U , activité spécifique de $1,47 \cdot 10^4 \text{ Bq.g}^{-1}$) et UE (12 % en ^{235}U , activité spécifique est $3,06 \cdot 10^5 \text{ Bq.g}^{-1}$) avec différentes concentrations (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM) afin de discriminer de façon indirecte l'effet chimiotoxique de l'effet radiotoxique de l'U.

Pour atteindre cet objectif, le modèle statistique suivant a été considéré : deux mélanges isotopiques d'U (UA et UE) ont été combinés dans un schéma factoriel à quatre concentrations (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM). Nous avons donc généré via ce modèle 8 lots expérimentaux (cf. **Figure 61**).

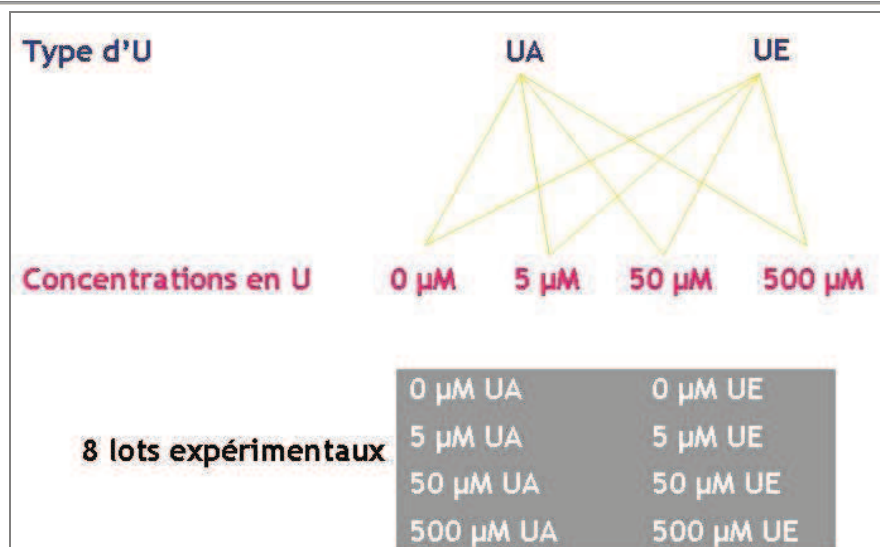


Figure 61. Présentation des 8 lots expérimentaux

La toxicité de l'U a tout d'abord été évaluée *in vitro* sur les fibroblastes embryonnaires de souris C3H10T1/2. Cette évaluation a été réalisée par une étude de la prolifération et de la mortalité cellulaire après contamination des fibroblastes en culture avec de l'UA à 0,3 % en ^{235}U et de l'UE à 12 % en ^{235}U (UE).

Étant donné la génotoxicité de l'U précédemment décrite, les effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'U ont été étudiés au niveau cellulaire et plus particulièrement au niveau des lésions de l'ADN induites par la contamination de l'un ou l'autre des deux mélanges isotopiques (UA ou UE). Afin de visualiser les dommages à l'ADN après contamination par l'U, plusieurs techniques ont été utilisées. Le test des comètes en condition alcaline a permis de visualiser l'ensemble des lésions primaires de l'ADN (sites labiles alcalins, cassures simple et double brin). Afin d'étudier plus spécifiquement les cassures double brin de l'ADN (CDBs), cette technique a été complétée par la visualisation par immunofluorescence de l'histone H2AX qui se trouve phosphorylée en γ au voisinage des cassures double brin de l'ADN, lésions décrites dans la littérature comme étant principalement radio-induites. Enfin, le stress oxydatif a été analysé en étudiant la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs). Toutes les lésions de l'ADN n'ont été étudiées et visualisées spécifiquement et sachant que la réparation de chaque type de lésions de l'ADN est réalisée par un mécanisme spécifique ; une étude de l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN a été réalisée afin d'avoir une vue d'ensemble sur les lésions potentiellement induites par l'U. La technique de RT-PCR a permis de quantifier l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans ces mécanismes de réparation. La variation d'expression de ces gènes a donné une indication sur le mécanisme utilisé et donc le type de lésions à l'ADN causé par les différents mélanges isotopiques de l'U. Enfin, les conséquences des cassures

d'ADN non ou mal réparées ont été estimées en analysant la formation de micronoyaux avec blocage de la cytotodiérèse par la cytochalasine B (ou en anglais *Cytokinesis Block Micronucleus assay* : CBMN) reflétant une instabilité génomique. La numération des micronoyaux (MNx) avec blocage de la cytotodiérèse couplée avec une hybridation *in situ* avec sondes d'ADN spécifiques du centromère a permis de discriminer les effets aneugènes des effets clastogènes de l'U (et dans une certaine mesure les effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'U). En plus de sa capacité à détecter les micronoyaux (cassures et pertes chromosomiques), d'autres mesures de génotoxicité ont été réalisées avec le test CBMN : chromosomes dicentriques via les cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques et les cellules mononucléées avec des MNx. Enfin, pour compléter l'étude, la cytométrie de flux a permis de suivre la progression des cellules au travers de leur cycle de division. Les techniques de coloration de l'ADN cellulaire avec l'iodure de propidium ainsi que l'incorporation de BrdU, analogue de la thymidine, pendant la phase S de réplication ont permis d'observer l'évolution du cycle cellulaire en fonction des différentes conditions de contamination par l'U (0 μ M, 5 μ M, 50 μ M et 500 μ M d'UA ou d'UE). Finalement, pour interpréter les données biologiques obtenues et pour corréler les effets biologiques observés avec la dose de rayonnements ionisants absorbée par les cellules, une modélisation mathématique a été réalisée. Le développement de cette modélisation a nécessité dans un premier temps nécessaire de mesurer la quantité d'U dans les cellules et dans le milieu de culture (ce travail a été réalisé au LRTOX par dosage ICPMS). Dans un deuxième temps, avec le résultat des dosages et l'analyse morphométrique des cellules, un calcul microdosimétrique a été réalisé afin de définir la dose délivrée aux cellules.

◆ Étude in vivo sur les lymphocytes de rat : Partie B

Les données obtenues avec les fibroblastes embryonnaires de souris ont permis de définir un ensemble de marqueurs biologiques de contamination *in vitro* par l'UA et par l'UE via le test CBMN. En effet, cette première étude a révélé que le seul dénombrement des cellules binucléées avec un micronoyau ne suffirait pas à évaluer avec précision la génotoxicité de l'U. En revanche, les fréquences d'apparition de cellules binucléées avec un micronoyau centromère négatif (BN-1MNC-) et les cellules binucléées avec un pont nucléoplasmique (BN-PNPs) pourraient refléter le niveau des effets radiotoxiques d'un mélange isotopique donné de l'U. Par ailleurs, la numération des cellules binucléées avec un micronoyau centromère positif (BN-1MNC+) et celle des cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx) pourraient refléter le niveau des effets chimiotoxiques d'un mélange isotopique donné de l'U.

Il faut noter que ce travail *in vitro* est un des premiers à réaliser une analyse comparative des effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'U.

Le second objectif de ce travail visait à valider *in vivo*, sur des lymphocytes de sang circulant de rat, le test des micronoyaux avec blocage en cytodière (CBMN) comme biomarqueur sanguin de contamination interne par l'U. Actuellement, les sondes d'ADN pancentromériques spécifiques pour le rat ne sont pas encore commercialisées. Par conséquent, l'hybridation *in situ* de sondes pancentromériques n'a pu être réalisée sur lymphocytes de rat.

Le modèle animal choisi est le rat blanc de laboratoire, *Rattus norvegicus*, souche OFA Sprague Dawley des laboratoires Charles River. Les expériences sont toutes réalisées sur des rats mâles adultes, âgés de neuf semaines afin de limiter les facteurs de l'âge, du sexe, des variations hormonales et du stade physiologique (grossesse, maladie ...). L'étude a été réalisée sur 15 rats Sprague-Dawley contaminés *in vivo* par injection d'UA (0,5 mg / activité incorporée : 8 Bq) ou d'UE (0,5 mg / activité incorporée $1,48.10^2$ Bq) pour comparer les effets génotoxiques de ces deux mélanges isotopiques via le test de numération des MNx. Le sang total est prélevé sur les rats contaminés, puis maintenu *in vitro* en culture. Les biomarqueurs définis suite à l'utilisation de ces deux types de mélanges isotopiques, pourraient se révéler respectivement caractéristiques de la chimiotoxicité et de la radiotoxicité de l'U. La validation a été effectuée sur des échantillons de sang issus de plusieurs animaux afin d'estimer la variabilité inter-individuelle de la réponse du test.

◆ Étude *in vitro* sur les lymphocytes humains : Partie C

Les données obtenues avec les fibroblastes embryonnaires de souris et les lymphocytes de rat, via le test de numération des MNx, ont permis de définir uniquement des marqueurs de génotoxicité et de radiotoxicité de l'U. En effet, ces deux études ont révélé que le seul dénombrement des cellules binucléées avec un micronoyau ne suffisait pas à évaluer avec précision la génotoxicité de l'U. En revanche, les fréquences d'apparition de cellules binucléées avec un micronoyau centromère négatif (BN-1MNC- : étude sur les fibroblastes embryonnaires de souris) et de cellules binucléées avec un pont nucléoplasmique (BN-PNPs : étude sur les fibroblastes embryonnaires de souris et sur les lymphocytes de rat) reflétaient le niveau des effets radiotoxiques d'un mélange isotopique donné de l'U. Par ailleurs, les fréquences d'apparition des cellules binucléées avec un micronoyau centromère positif (BN-1MNC+ : étude sur les fibroblastes embryonnaires de souris) et des cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx : étude sur les fibroblastes embryonnaires de souris et sur les lymphocytes de rat) reflétaient le niveau des effets chimiotoxiques d'un mélange isotopique donné de l'U.

L'objectif principal de nos travaux étant de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U, une nouvelle étude a été définie afin de pouvoir au mieux répondre à cet objectif. En effet, en comparant les effets de l'UA et de l'UE, seuls des marqueurs de radiotoxicité ont pu être identifiés. Pour dissocier l'influence respective des effets chimique et radiologique, trois niveaux de l'effet chimique testé (3 concentrations molaires différentes : C1 (0,5 μM), C2 (5 μM) et C3 (50 μM)) ont été combinés dans un schéma factoriel à trois niveaux de l'effet radiologique étudié (3 activités volumiques différentes : A1 (175 Bq/L), A2 (1750 Bq/L) et A3 (17500 Bq/L)). La recherche de biomarqueurs d'effets génotoxiques de l'U a été mise en œuvre sur des lymphocytes humains exposés *in vitro* à divers mélanges isotopiques de l'U (9 lots expérimentaux ; cf. Figure 62). Le test de numération des micronoyaux couplé à une hybridation *in situ* de sondes pancentromériques a été réalisé afin de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U.*

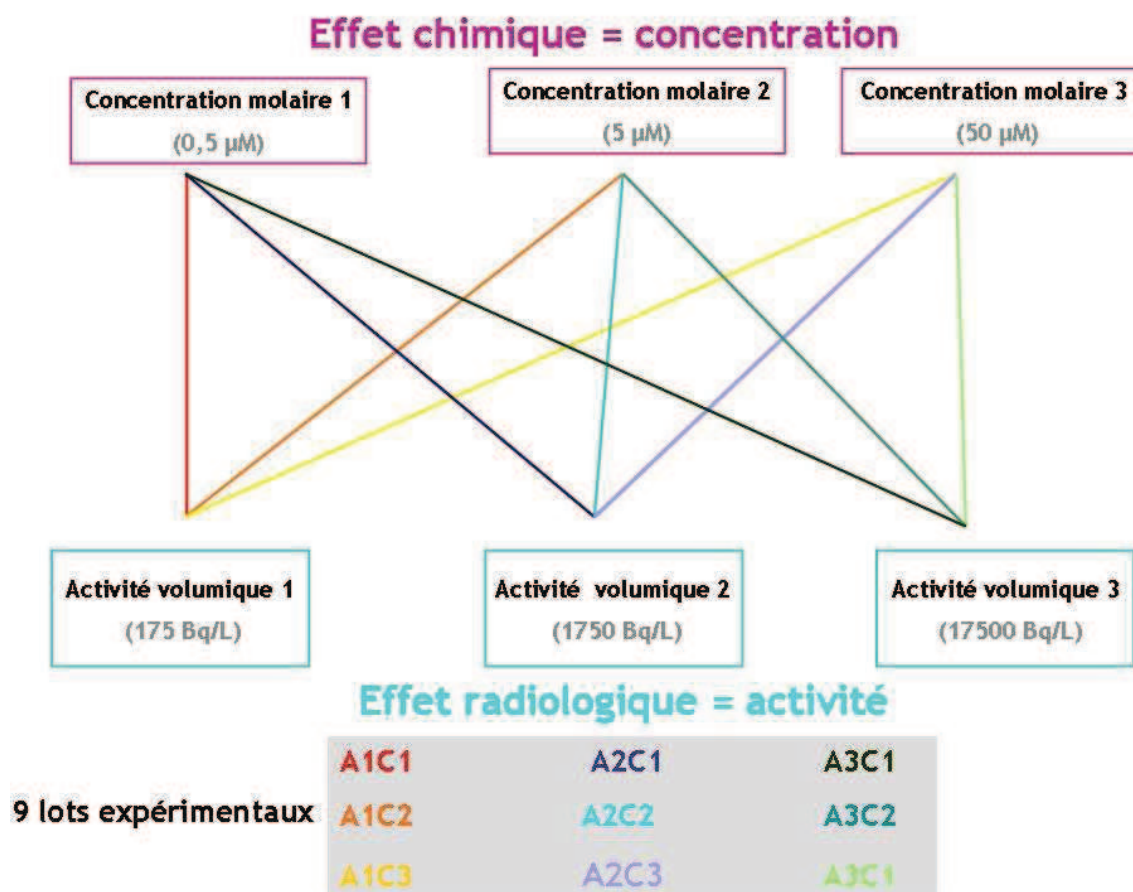


Figure 62. Présentation des neuf lots expérimentaux

Certains facteurs, propres à l'individu ou à son mode, de vie sont connus pour induire une variabilité inter-individuelle sur les marqueurs étudiés (micronoyaux) : l'âge, le sexe, la consommation de tabac, d'alcool (Ban *et al.*, 1993 ; Fenech et Morley, 1985 ; Bonassi *et al.*, 2001 et 2003 ; Fenech *et al.*, 2003). En

effet, des études ont montré que l'âge, le sexe ou bien encore la consommation de tabac modifieraient le taux de base de micronoyaux (MNx) (cf. État de l'art Partie D. II.3.5.b). En revanche, ces facteurs influenceraient le taux de MNx spontanés, mais non la fréquence de MNx après irradiation (Odagiri *et al.*, 1997). Partant de ces observations, nous avons travaillé sur une population bien définie de 10 donneurs afin de limiter au maximum l'influence de la variabilité inter-individus sur les marqueurs biologiques étudiés.

Cette étude préliminaire a été réalisée sur des lymphocytes humains (sur une population bien définie) afin de valider sur l'Homme les marqueurs biologiques définis précédemment chez les rongeurs (Partie A et B) avant de les valider sur des cas réels de contamination par l'U.

Critères de sélection des donneurs :

- Sexe : homme
 - Age : 30-40 ans
 - Non fumeur
 - Pas d'addiction (alcool, drogue)
 - Pas de traitement médical particulier en cours
 - Pas de pathologie particulière connue (indemne de maladie grave)
 - Pas de radiographie récente
 - Pas de radiothérapie ou chimiothérapie récente
 - Personnes non exposées aux rayonnements ionisants
 - Personnes non exposées à des substances génotoxiques connues
 - Personnes ne pratiquant pas un sport de façon intensive
- } Si possible

Le donneur idéal n'existant pas, nous avons effectué l'étude sur des personnes répondant un maximum aux critères cités ci-dessus.

MATERIELS ET METHODES



I. Modèles expérimentaux

La première partie de l'étude a été réalisée *in vitro* sur les fibroblastes embryonnaires de souris (lignée C3H10T1/2). La seconde partie de l'étude a été réalisée sur des lymphocytes de rat après contamination *in vivo* à l'U par injection. Enfin, la dernière partie de l'étude a été réalisée *in vitro* sur des lymphocytes de sang humain.

I.1 Fibroblastes embryonnaires de souris (lignée C3H10T1/2)

I.1.1 Culture cellulaire

I.1.1.a Décongélation des cellules

Les cellules sont placées au bain-marie à 37°C jusqu'à décongélation totale du milieu. Elles sont ensuite rapidement mise en culture dans 20 mL de milieu BME (Basal Medium Eagle, Invitrogen®) complété de 10 % de sérum de veau foetal (SVF, Invitrogen®), préalablement décomplémenté à 56°C pendant 30 min, et de L-Glutamine à 2 mM, dans une atmosphère saturée en humidité et enrichie en CO₂.

I.1.1.b Culture de la lignée cellulaire C3H10T1/2

Les cellules sont mises en culture dans des flasques de 75 cm² de surface (Greiner®) munis de bouchons filtrants 0,22 µm, placées dans un incubateur à 37°C en atmosphère contenant 5 % de CO₂. Sous ces conditions le pH est maintenu à 7,4. Afin d'assurer leur prolifération, le milieu de culture est remplacé tous les 2 jours. Les cellules ont été régulièrement contrôlées pour la contamination par des mycoplasmes avec un colorant fluorescent spécifique de l'ADN (DAPI : 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (Uphoff *et al.*, 1992). Les cellules testées négatives aux mycoplasmes sont repiquées régulièrement pour maintenir la croissance exponentielle. Chaque semaine, arrivées à confluence, les cellules sont repiquées à une densité de 1 600 cellules/cm². Pour cela, le milieu de culture est aspiré puis le tapis cellulaire est préalablement rincé avec 5 mL de PBS à 37°C avant de le décoller de la flasque par dissociation enzymatique sous l'action de la trypsine-EDTA (Invitrogen®) 5 min à 37°C. La trypsine est éliminée de la suspension cellulaire en centrifugeant 10 min à 25°C et à une vitesse de 150 g. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est repris dans un volume défini de milieu de culture, dissociées par pipetages répétés et le nombre de cellules/mL de milieu de culture est déterminé après comptage sur cellule de Malassez. Les cellules sont ensuite réensemencées.

Les cellules C3H10T1/2 ont :

- un temps de « doublement » d'environ 24 heures,

- ✦ une efficacité « d'adhérence » autour de 40 %,
- ✦ une densité de saturation (confluence) d'environ $7 \cdot 10^4$ cellules/cm².

I.1.2 Préparation des solutions de contamination

Les fibroblastes embryonnaires de souris (C3H10T1/2) ont été contaminés avec 2 mélanges isotopiques de l'U (UA et UE) ainsi qu'avec des contrôles positifs connus pour être génotoxiques (Mitomycine C, Vincristine Sulfate, H₂O₂).

I.1.2.a Composés uranifères

L'ensemble des expérimentations (manipulation de radioéléments et d'échantillons contaminés) a été réalisé conformément à la législation française et en respect des consignes de sécurité et de radioprotection en vigueur au sein de l'IRSN et celles propres au laboratoire de RadioTOxicologie expérimentale (LRTOX) de Pierrelatte. La concentration en U représente la somme des concentrations des trois isotopes principaux (²³⁸U + ²³⁵U + ²³⁴U).

Solution d'Uranium appauvri (UA)

L'UA en ²³⁵U à 0,3 % (UA. AREVA NC, Pierrelatte) est utilisé sous forme de poudre de nitrate d'Uranyle hexahydraté (UO₂(NO₃)₂ · 6H₂O - 502,13 g.mol⁻¹). Pour solubiliser le nitrate d'Uranyle hexahydraté, il est dissout dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (NaHCO₃) à 0,1 M ; une solution mère à 10 mM est ainsi obtenue. En effet, de nombreuses études réalisées *in vitro* et *in vivo* au sein du LRTOX sur la spéciation de l'U ont permis la détermination de paramètres optimaux de mises en solution du nitrate d'uranyle notamment pour des études sur des fibroblastes. Le jour de la contamination des cellules, cette solution mère d'UA est diluée dans le milieu de culture pour obtenir la gamme de concentration désirée (0 µM, 5 µM, 50 µM et 500 µM).

Solution d'Uranium enrichi (UE)

Le même protocole expérimental est utilisé pour préparer la solution d'UE en ²³⁵U à 12 % (UE. AREVA NC, Pierrelatte). La solution mère est réalisée en diluant une solution d'UE à 250 g.L⁻¹, qui est initialement dissout dans de l'acide nitrique, dans le bicarbonate afin d'obtenir une concentration de 10 mM. L'ajout de 0,7 % de NaOH 10 N permet d'obtenir une solution à un pH de 7,5. Le jour de la contamination des cellules, cette solution mère d'UE est diluée dans le milieu de culture pour obtenir la gamme de concentration désirée (0 µM, 5 µM, 50 µM et 500 µM).

I.1.2.b Contrôles positifs génotoxiques

En parallèle, des contrôles positifs génotoxiques connus ont été utilisés.

La Mitomycine C (Mito C : Sigma Aldrich M0503, numéro CAS 50-07-7) et la Vincristine Sulfate (VS : Sigma Aldrich V8879, numéro CAS 2068-78-2), ont été utilisées comme contrôle positif clastogène et contrôle positif aneugène, respectivement (Rosefort *et al.*, 2004). De plus, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été utilisé, en effet il est connu pour induire majoritairement des cassures simple brins.

I.1.3 Traitement des fibroblastes embryonnaires de souris (C3H10T1/2)

I.1.3.a Contamination des cellules avec des composés uranifères

Vingt-quatre heures avant la contamination, 3.10⁶ fibroblastes sontensemencés par flacon de culture de 75 cm². Pour reproduire le plus fidèlement possible la configuration tissulaire, les cellules sont exposées à confluence. Les cellules à confluence (80 % en G0-G1) ont été contaminées, soit avec de l'UA (0,3 % en ²³⁵U, pureté de l'U > 99%) soit avec de l'UE (12 % en ²³⁵U, pureté de l'U > 99%). La composition isotopique et l'activité spécifique (Bq.g⁻¹) de l'UA, de l'UN et de l'UE sont détaillées dans le **Tableau 9**. L'UA (activité spécifique: 1,47.10⁴ Bq.g⁻¹) et l'UE (activité spécifique: 30,6.10⁴ Bq.g⁻¹) ont été achetés auprès d'AREVA NC (Pierrelatte, France).

Tableau 9. Composition isotopique et activité spécifique (Bq/g) de l'uranium appauvri en ²³⁵U à 0,3 %, de l'uranium naturel et de l'uranium enrichi en ²³⁵U à 12 %.

Isotopes naturels de l'uranium		²³⁴ U	²³⁵ U	²³⁸ U
Uranium appauvri en ²³⁵U à 0,3 %	Pourcentage en masse (%)	0.001	0.27	99.8
	Activité spécifique (Bq/g)		1.47 x 10 ⁴	
Uranium naturel	Pourcentage en masse (%)	0.0056	0.72	99.28
	Activité spécifique (Bq/g)		2.5 x 10 ⁴	
Uranium enrichi en ²³⁵U à 12 %	Pourcentage en masse (%)	0.1248	12.091	87.733
	Activité spécifique (Bq/g)		30.6 x 10 ⁴	

Pour chaque expérience, les cellules ont été exposées à l'UA ou à l'UE à diverses concentrations (0 µM, 5 µM, 50 µM et 500 µM) dilué dans un milieu de culture pendant 24 heures à 37°C et 5 % de CO₂. Le contrôle négatif (0 µM) a été réalisé sans ajout d'U dans le milieu de culture, uniquement en ajoutant du bicarbonate de sodium. Pour chaque condition, des *dupliqua* de culture sont réalisés. Dans ces conditions, l'UO₂(CO₃)₃⁴⁻ est le complexe majeur d'U(VI) trouvé dans le milieu utilisé lors de l'exposition de cellules (Carrière *et al.*, 2004). Dans les liquides biologiques, les études théoriques de spéciation ont rapporté que

l'U est principalement lié à du carbonate et du phosphate (Jones *et al.*, 2002) ou des protéines de grande taille (Chevari et Likhner, 1968). L' $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$, complexe U(VI) de faible poids moléculaire pourrait être impliqué dans l'accumulation d'U(VI) et dans la toxicité cellulaire (Carrière *et al.*, 2004). Nous avons choisi de contaminer les fibroblastes à l'U pendant 24 heures, car le temps de doublement de la population est de 24 heures. En effet, afin de détecter au maximum l'action de l'U à un stade bien précis du cycle cellulaire, il est important qu'un nombre suffisant de cellules soit traité avec la substance test pendant les différentes étapes du cycle cellulaire (Kirsch-Volders *et al.*, 2003 ; OCDE, 2007). Nous avons limité la contamination par l'U à un maximum de 500 μM (UA ou UE), car au-delà de cette concentration, un précipité se forme dans le milieu de culture cellulaire et induit une mort cellulaire massive.

I.1.3.b Contamination des cellules avec les contrôles positifs génotoxiques

En ce qui concerne les contrôles positifs génotoxiques, les cellules confluentes (80 % en G0-G1) ont été contaminées soit à la Mitomycine C (1,5 μM : le contrôle clastogène) soit à la Vincristine Sulfate (16 μM : le contrôle aneugène) ou bien avec l' H_2O_2 dilués dans un milieu de culture pendant 24 heures à 37°C et 5 % de CO_2 . Pour chaque condition, deux réplicats de culture ont été réalisés.

I.2 Lymphocytes de rat

I.2.1 Préparation des solutions de contamination d'uranium

Le nitrate d'uranyle est considéré comme le composé d'U le plus soluble puisque c'est un composé de valence (+VI). Comme la forme physico-chimique influence fortement la toxicité de l'U, ce composé est considéré comme très toxique.

Le choix de la quantité de nitrate d'uranyle injectée se doit d'être judicieux puisque la concentration d'U au niveau rénal ne doit pas dépasser 3 $\mu\text{g d'U.g}^{-1}$ de rein chez le rat afin d'éviter une trop forte chimiotoxicité qui induirait une mort des cellules rénales par nécrose (Houpert *et al.*, 2003). En se fondant sur les données issues d'études réalisées notamment sur la néphrotoxicité de l'U (Houpert *et al.*, 2003), la concentration d'U choisie pour une injection intrapéritonéale chez le rat est de 0,01 M. De nombreuses études réalisées *in vitro* et *in vivo* au sein du LRTOX sur la spéciation de l'U ont permis de déterminer les paramètres optimaux de mises en solution du nitrate d'uranyle notamment pour des études sur des fibroblastes.

Pour solubiliser le nitrate d'uranyle, deux possibilités se présentent: soit utiliser une solution de chlorure de sodium 0,9 %, soit utiliser une solution de bicarbonate de sodium 0,1 M. Le pH de la solution

de nitrate d'uranyle à injecter doit être proche du pH physiologique (pH=7,4) pour éviter des dommages tissulaires dus à l'acidité de la solution. Mais d'après les mesures rassemblées dans le [Tableau 10](#), le pH de la solution de nitrate d'uranyle (appauvri ou enrichi) solubilisé dans la solution de NaCl est très acide alors que la solution de NaCl seule est proche de celui physiologique (pH=7,4). En revanche, le pH de la solution de nitrate d'uranyle (appauvri ou enrichi) solubilisé dans la solution de bicarbonate de sodium reste physiologiquement compatible.

Tableau 10. Valeurs de pH mesurées au pH-mètre des solutions d'uranium appauvri et enrichi

pH	NaCl 0,9 %	NaHCO ₃ 0,1 M
Seul	5,82	8,4
Avec uranium appauvri	3,19	7
Avec uranium enrichi 12 %	1,53	6,1

Notre choix s'est donc orienté vers l'utilisation de la solution de bicarbonate de sodium 0,1 M pour solubiliser le nitrate d'uranyle.

1.2.2 Contamination *in vivo* des rats par l'uranium

Cinq rats Sprague Dawley contaminés à l'UA (0,3 % ²³⁵U), cinq autres rats contaminés à l'UE (12 % ²³⁵U) et cinq autres rats contrôles ont été réalisés. Pour cela, les solutions de nitrate d'uranyle appauvri (Areva NC, France) et enrichi (Areva NC, France) à 0,01 M sont préparées dans du bicarbonate de sodium 0,1 M.

- 200 µL de solution de nitrate d'uranyle appauvri (UA) sont injectées dans cinq rats : 5 rats UA,
- 200 µL de solution de nitrate d'uranyle enrichi (UE) sont injectés dans cinq autres rats : 5 rats UE,
- et 200 µL de solution de bicarbonate de sodium (0,1 M) sont injectés dans cinq autres rats : 5 rats contrôles non contaminés.

Les masses et activités des mélanges isotopiques d'U injectées dans chaque rat sont données dans le [Tableau 11](#).

Tableau 11. Masses incorporées, activités spécifiques et activités incorporées des mélanges isotopiques d'uranium injectés dans chaque rat contaminé (soit dans les 200 µL de solution à injecter)

	Activité spécifique (Bq/g)	Masse incorporée (g)	Activité incorporée (Bq)
Uranium appauvri à 0,3 % en ²³⁵ U (UA)	16 000	5.10 ⁻⁴	8
Uranium enrichi à 12 % en ²³⁵ U (UE)	296 540	5.10 ⁻⁴	1,42.10 ²

Après injection d'U (UA ou UE), les rats sont mis en cages traditionnelles deux par deux, avec nourriture (croquettes) et eau à volonté.

I.2.3 Culture des lymphocytes de rat

I.2.3.a Protocole de prélèvement du sang total

Le prélèvement de sang est effectué sur quinze rats au total : un premier groupe de cinq rats contrôles non contaminés, un deuxième groupe de cinq rats contaminés par de l'UA et un troisième groupe de cinq rats contaminés par de l'UE. Le sang des rats contaminés à l'UA et à l'UE est prélevé 24 heures après les injections. Les rats sont anesthésiés au fluothane à l'aide du dispositif d'anesthésie gazeuse utilisé par le laboratoire LRTOX.

Le sang est prélevé au niveau de l'artère abdominale dans des tubes héparine-lithium. Les rats sont ensuite euthanasiés par exsanguination.

I.2.3.b Mise en culture du sang total de rat

Les quinze échantillons de sang sont mis en culture. A partir de chaque échantillon de sang prélevé, 0,5 mL de sang sont mis en culture dans des falcons stériles dans : 5 mL de milieu RPMI Medium 1X, sans L-Glutamine (Gibco Invitrogen®) supplémenté avec 20 % de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen®), 2 mM L-Glutamine, 1 % d'antibiotiques (Pénicilline 10 000 U.mL⁻¹ et Streptomycine 10 000 µg.mL⁻¹), 0,1 % de β-2-mercapto-éthanol et 2,5 % de Phytohémagglutinine (agent mitogène spécifique des lymphocytes).

Les cultures de lymphocytes sont faites en « *duplicate* » pour chaque condition (c'est à dire pour chaque animal) puis elles sont incubées dans une atmosphère enrichie en CO₂ à 5 % et 37°C.

I.3 Lymphocytes humains

I.3.1 Prélèvements sanguins sur les donneurs sélectionnés

Le consentement éclairé a été obtenu pour l'ensemble des donneurs après leur avoir expliqué la nature et les objectifs de l'étude. Il a été bien spécifié à chaque personne qu'il s'agissait d'une étude de recherche et non d'une étude de diagnostic. L'identité de la personne n'a pas été communiquée par le service médical. En revanche, une description précise du donneur a été fournie (tout en gardant l'anonymat) : âge, sexe, fumeur ou non, addiction ou non (alcool, drogues), exposée ou non, lieu de travail, maladie connue, traitement médical en cours, activité sportive (fréquence par semaine)...

Les prélèvements ont été réalisés par ponction veineuse sur tubes héparine-lithium, sur 10 donneurs volontaires, suivis par la médecine du travail AREVA et répondant un maximum aux critères de sélection mentionnés précédemment. Pour chacun des donneurs sélectionnés, 2 tubes héparine-lithium (10 ml) ont été prélevés (au minimum) afin d'avoir au minimum 15 ml de sang total par donneur.

Une numération formule sanguine a été effectuée sur chaque prélèvement. Cette numération a été réalisée par le laboratoire d'analyses biologiques médicales de Bollène. Les résultats sont transmis par le service médical de façon totalement anonyme (respect de la confidentialité des résultats).

1.3.2 Mise en culture du sang total humain

Le prélèvement de sang veineux a été réalisé sur des tubes héparine-lithium. A partir de chaque échantillon de sang prélevé, 0,5 mL de sang total ont été mis en culture dans des falcons stériles dans : 4,5 ml de Milieu RPMI (RPMI 1640 medium 1X, sans glutamine, Invitrogen®) supplémenté avec 20 % de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen®), 1 % d'antibiotiques (Pénicilline 10 000 U.mL⁻¹ et Streptomycine 10 000 µg.mL⁻¹), 1 % de L-Glutamine et 1 % de Phytohémagglutinine, agent mitogène spécifique des lymphocytes (Invitrogen®). Les cultures sont faites en dupliqua pour chaque condition puis sont incubées dans une atmosphère enrichie en CO₂ à 5 % et à 37°C.

1.3.3 Préparation des solutions de contamination

Les lymphocytes humains ont été contaminés avec différents mélanges isotopiques d'U (UA et ²³³U) ainsi qu'avec des contrôles positifs connus pour être génotoxiques (Mitomycine C et Vincristine Sulfate).

1.3.3.a Composés uranifères

Différents mélanges isotopiques de l'U délivrant des activités volumiques radiologiques différentes tout en conservant une même concentration molaire d'U total, et inversement (des concentrations molaires d'U total différentes tout en conservant une même activité volumique radiologique), ont été préparés.

Ainsi, une première condition expérimentale consiste en une exposition avec un milieu de culture contenant de l'UA à une concentration molaire de 0,5 µM (C1) ayant une activité volumique de 175 Bq/L (A1) (essentiellement caractérisé par sa chimiotoxicité). La seconde condition expérimentale consiste en un enrichissement de la première solution d'UA (à 0,5µM : A1) par de l'²³³U pour avoir une activité volumique radiologique 10 fois plus importante que celle du premier mélange (0,5 µM d'UA (A1) - 1750 Bq/L (C2)). Enfin, la troisième condition consiste en un nouvel enrichissement de la première solution

d'UA ($0,5\mu\text{M}$: A1) par de l' ^{233}U pour atteindre une activité volumique radiologique 100 fois plus importante que le mélange de départ (soit 17500 Bq/L : C3). Nous avons fait de même pour deux autres concentrations molaires d'UA : $5\mu\text{M}$ et $50\mu\text{M}$. A partir de ces deux concentrations ($5\mu\text{M}$ et $50\mu\text{M}$), différentes combinaisons d'isotopes de l'U (obtenues à partir d'UA et de ^{233}U) ont été constituées pour obtenir les 3 mélanges radioactifs (175 Bq/L , 1750 Bq/L , 17500 Bq/L).

Nous avons ainsi pour trois concentrations molaires en U (C1, C2 et C3) une seule et même activité volumique radiologique (A1). Et inversement, pour trois activités volumiques (A1, A2 et A3) nous avons une seule et même concentration molaire (C1). Ceci est identique pour chaque concentration molaire et pour chaque activité volumique. Au final, nous avons donc 9 lots expérimentaux :

A1C1, A1C2, A1C3

A2C1, A2C2, A2C3

A3C1, A3C2, A3C3 (cf. Figure 63).

Effet chimique

		[C]		
		C1 ($0,5\mu\text{M}$)	C2 ($5\mu\text{M}$)	C3 ($50\mu\text{M}$)
Effet radiologique	Activité			
	A1 (175 Bq/L)	A1C1	A1C2	A1C3
	A2 (1750 Bq/L)	A2C1	A2C2	A2C3
A3 (17500 Bq/L)	A3C1	A3C2	A3C3	

Figure 63. Neuf lots expérimentaux
A1-A3 : Activité 1 à Activité 3 (Bq/L)
C1-C3 : Concentration 1 à Concentration 3 (μM)

I.3.3.b Contrôles positifs génotoxiques

En parallèle, la Mitomycine C (Mito C : Sigma Aldrich M0503, numéro CAS 50-07-7) à $1,5\mu\text{M}$ et la Vincristine Sulfate (VS : Sigma Aldrich V8879, numéro CAS 2068-78-2) à $16\mu\text{M}$, ont été utilisées comme contrôle positif clastogène et contrôle positif aneugène, respectivement (Rosefort *et al.*, 2004).

I.3.3 Contamination des lymphocytes

II.3.3.a Contamination des cellules avec les composés uranifères

Vingt-quatre heures après la mise en culture du sang total, les cellules ont été contaminées avec différents mélanges isotopiques d'U dilué dans un milieu de culture pendant 20 heures à 37°C et 5 % de CO₂ afin d'obtenir 9 lots expérimentaux (cf. Figure 64). Un contrôle négatif (0 µM) a aussi été réalisé en ajoutant du bicarbonate de sodium. Chaque condition a été réalisée en double.

		Effet chimique		
		C1 (0,5 µM)	C2 (5 µM)	C3 (50 µM)
[C]				
Activité				
Effet radiologique	A1 (175 Bq/L)	A1C1 UA=1,742 Bq/L ²³³ U=173,2 Bq/L	A1C2 UA=1,676 Bq/L ²³³ U=1748 Bq/L	A1C3 UA=1,014 Bq/L ²³³ U=17490 Bq/L
	A2 (1750 Bq/L)	A2C1 UA=17,49 Bq/L ²³³ U=157,4 Bq/L	A2C2 UA=17,42 Bq/L ²³³ U=1732 Bq/L	A2C3 UA=16,76 Bq/L ²³³ U=17480 Bq/L
	A3 (17500 Bq/L)	A3C1 UA=174,9 Bq/L ²³³ U=0 Bq/L	A3C2 UA=174,9 Bq/L ²³³ U=1574 Bq/L	A3C3 UA=1747,2 Bq/L ²³³ U=17320 Bq/L

Figure 64. Neuf lots expérimentaux avec activité spécifique en UA et en ²³³U

A1-A3 : Activité 1 à Activité 3
C1-C3 : Concentration 1 à Concentration 3

II.3.3.b Contamination des cellules avec les contrôles positifs génotoxiques

En parallèle, des lymphocytes humains ont été contaminés avec des contrôles positifs génotoxiques connus : la Mitomycine C (1,5 µM) et la Vincristine Sulfate (16 µM) diluées dans un milieu de culture pendant 20 heures à 37°C et 5 % de CO₂. Chaque essai a été réalisé en double.

II. Test de cytotoxicité : évaluation de la mortalité cellulaire par coloration au Bleu Trypan

Une étude de la viabilité et de la mortalité cellulaire a été réalisée sur les fibroblastes embryonnaires de souris contaminés par de l'UA ou de l'UE. Pour cela, les fibroblastes sont colorés avec du Bleu trypan afin de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes.

Pour chaque concentration en UA et en UE, trois dénombrements cellulaires ont été réalisés au temps T+48h (24 heures après contamination). Les cellules sont détachées des flasques par dissociation enzymatique sous l'action de la trypsine-EDTA (Invitrogen[®], Eragny Sur Oise, France). Après centrifugation à 150 g pendant 10 min à température ambiante, le culot cellulaire est repris dans du milieu et homogénéisé. Des volumes de 100 µL de la suspension cellulaire sont dilués dans 100 µL de Bleu Trypan (0,4 %, Invitrogen[®], Eragny Sur Oise, France), avant d'être compté sur cellule de Malassez en distinguant les cellules mortes colorées en bleue, ayant perdu leur intégrité membranaire, des cellules vivantes non colorées. La mortalité cellulaire est évaluée en comptant au moins 3 x 100 cellules par condition et est exprimée comme un pourcentage : (cellules mortes / cellules totales) x 100.

III. Étude des lésions primaires de l'ADN

L'étude des lésions primaires de l'ADN a été réalisée après 24 heures de contamination, à l'UA ou à l'UE à différentes concentrations (0 µM, 5 µM, 50 µM et 500 µM), de fibroblastes embryonnaires de souris (C3H10T1/2). Afin de visualiser les lésions primaires de l'ADN après contamination par l'U, plusieurs techniques ont été envisagées. Le test des comètes en conditions alcalines, technique microélectrophorétique, a permis dans un premier temps de visualiser l'ensemble des dommages de l'ADN (sites labiles alcalins, cassures simple et double brin). Afin d'étudier plus spécifiquement les cassures double brin de l'ADN (CDBs), cette technique a été complétée par la visualisation par immunofluorescence de l'histone H2AX qui se trouve phosphorylée en γ au voisinage des cassures double brin de l'ADN, lésions décrites dans la littérature comme étant radio-induites.

III.1 Le test des comètes

III.1.1 Étude des lésions primaires de l'ADN

Le test des comètes (ou en anglais "Single Cell Gel Electrophoresis" (SCGE)) est défini comme une technique microélectrophorétique rapide, simple et sensible qui permet de visualiser les dommages de l'ADN chez les cellules eucaryotes. Il est devenu ces dernières années un des tests les plus utilisés pour évaluer le pouvoir génotoxique d'un composé. En conditions alcaline (pH>13), ce test peut détecter les cassures simple et double brin, les sites labiles alcalins et les sites incomplets de réparations.

Le test des comètes en condition alcaline est basé sur les travaux de Singh (Singh *et al.*, 1988) modifié (De Boeck *et al.*, 1998 ; De Meo *et al.*, 1991 ; Hartmann *et al.*, 2003). Le protocole est détaillé par la suite.

Le test des comètes a été réalisé sur les fibroblastes embryonnaires de souris (C3H10T1/2) contaminé par l'U (0 μM ; 5 μM ; 50 μM et 500 μM d'UA ou d'UE) *in vitro* (cf. Figure 65). En parallèle, des cellules ont été exposées à de l' H_2O_2 afin d'avoir un contrôle positif. En effet, le peroxyde d'hydrogène est un composé chimique connu pour induire majoritairement des cassures simple brin.

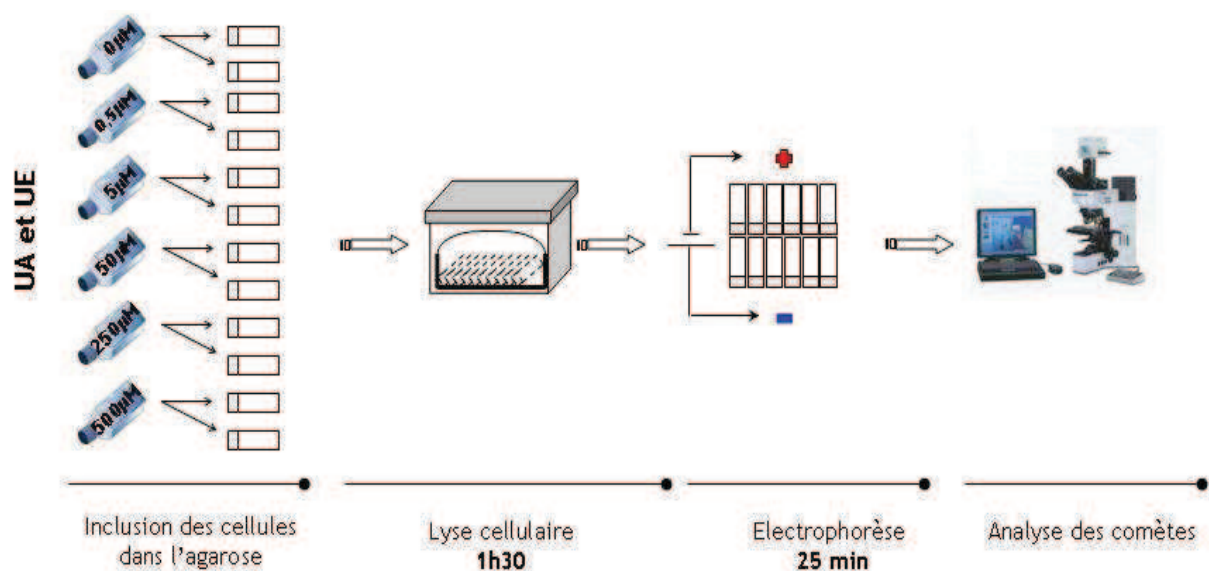


Figure 65. Principe du test des comètes

III.1.2 Mode opératoire (cf. Figure 65)

III.1.2.a Prétraitement des lames

Après une exposition de 24 heures à l'U (UA ou UE) aux différentes concentrations (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM), les fibroblastes sont isolés sous l'action de la trypsine-EDTA (Invitrogen®) à 37°C puis centrifugés 10 min, 300 g, à 4°C et repris dans un volume adéquat de PBS (sans Ca^{++} et sans Mg^{++}) afin d'obtenir une solution finale à 10^6 cellules. mL^{-1} . Les fibroblastes isolés sont ensuite mélangés volume à volume à de l'agarose (0,5 %) à bas point de fusion et déposés sur des lames (ESCO 24 x 75 mm) préalablement recouvertes d'une couche de gel d'agarose à 1 %. Le test est réalisé en double.

Contrôle positif

Afin de s'assurer de la fiabilité du protocole expérimental, un contrôle positif est réalisé en exposant les fibroblastes dans une solution d' H_2O_2 (10 μM) à 37°C pendant 30 min.

III.1.2.b Lyse

Les fibroblastes, emprisonnés dans le gel, sont lysés en plongeant les lames pendant 1h30, à 4°C en absence de lumière, dans un tampon à pH 10 contenant des détergents et une forte concentration en sels (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA Na₂, 0,01 M Tris, 1 % de sarcosinate de sodium, 1 % de Triton X-100 et 10 % de DMSO).

III.1.2.c Dénaturation

Précédant l'électrophorèse, les lames sont incubées dans le tampon alcalin (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA) pour produire de l'ADN simple brin. La dénaturation s'effectue à température ambiante, en l'absence de lumière pendant 25 minutes.

III.1.2.d Électrophorèse

Une fois les conditions électrophorétiques établies, 0,66 V.cm⁻¹, soit 25 V et 300 mA pour le type de générateur PS305 (Apelex®) et de cuve Maxigel Eco 2 (Apelex®) utilisés, une électrophorèse est réalisée pendant 25 min. Les lames sont déposées dans la cuve en les orientant dans le sens du passage du courant.

III.1.2.e Neutralisation et Fixation

Afin d'obtenir une structure bicaténaire des fragments d'ADN au sein du gel après migration, on rince les lames dans un tampon de neutralisation (Tris 0,4 M ajusté à pH 7,5 avec de l'HCl) à deux reprises pendant 5 min. Le gel est ensuite déshydraté en plaçant les lames sur plaques chauffantes (40-45°C) et les cellules sont fixées dans un bain d'éthanol absolu pendant 10 min. On peut ainsi conserver les lames à 4°C.

III.1.2.f Coloration et analyse

Le jour de l'analyse, les lames sont réhydratées pendant 10 minutes avec une solution aqueuse d'Iodure de Propidium à 5 µg.ml⁻¹ pour colorer l'ADN. On utilise un microscope à épifluorescence (Olympus®), objectif x40 et un filtre U-25ND (Olympus®), équipé d'une caméra CCD (Cohu®) couplée à un système d'acquisition et d'analyse d'image (Komet 5.5, Kinetic Imaging Ltd, Nottingham, UK) pour enregistrer les paramètres de chacune des 200 comètes analysée par lames. L'analyse consiste à placer un ensemble de deux fenêtres sur le noyau cellulaire. La fenêtre principale vient entourer la comète alors que la fenêtre secondaire est utilisée pour calculer le bruit de fond environnant qui sera soustrait à la

fenêtre principale pour calculer les différents paramètres (cf. Figure 66). Les comètes doivent répondre à trois critères :

- ✦ Elles doivent être isolées de façon à pouvoir placer les fenêtres sur une seule comète sans chevauchement avec une autre.
- ✦ Il est impératif de pouvoir faire une mise au point parfaite sur celles-ci afin de ne pas fausser le calcul des paramètres.
- ✦ On analyse les comètes qui apparaissent aléatoirement selon le déplacement de la lame.

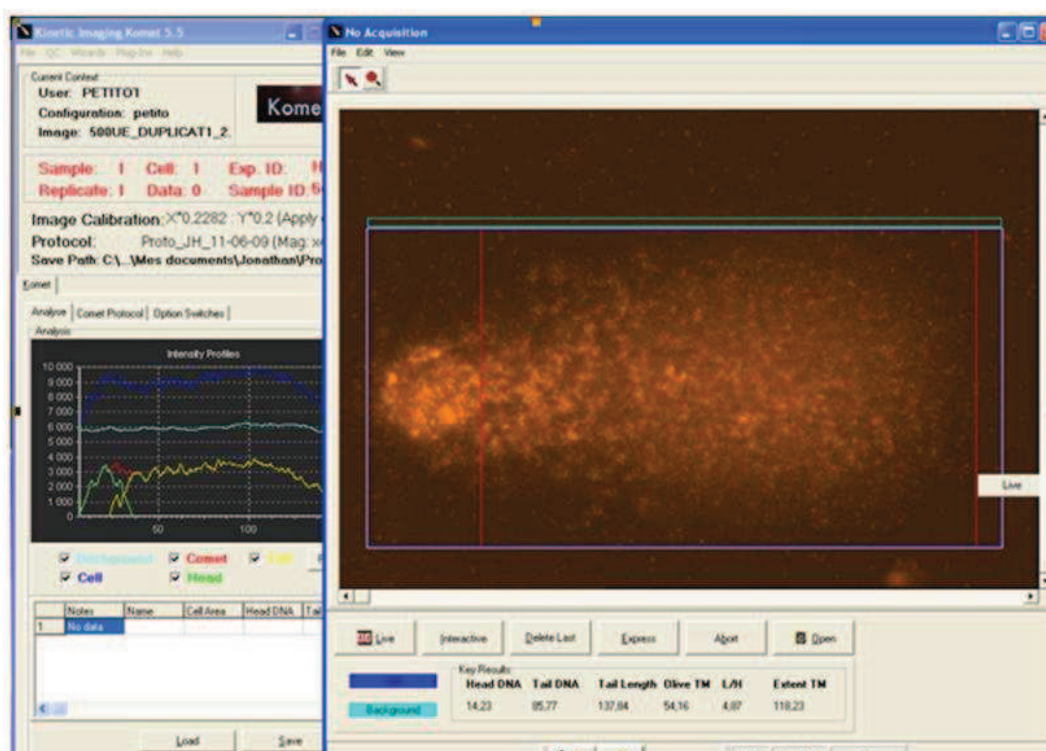


Figure 66. Analyse des comètes avec le logiciel Komet 5.5

III.1.2.g Quantification des dommages de l'ADN

Actuellement, il n'existe pas encore de protocole et de méthode d'interprétation standardisés. Lors de l'analyse d'image, le logiciel calcule 34 paramètres relatifs à la région nucléaire et à la queue de comète. Le *Tail moment* avec son dérivé, l'*Olive Tail Moment* (OTM) (Olive et al., 1990) sont les paramètres les plus fréquemment utilisés. Nous avons choisi d'utiliser l'OTM au cours de notre étude. L'OTM correspond au produit de la quantité d'ADN dans la queue (% DNA in the tail) par la distance entre les barycentres de la tête et de la queue de la comète (μm). La quantité d'ADN dans la queue étant calculée grâce à la différence d'intensité de fluorescence entre la tête et la queue.

$$\text{TM} = \% \text{ DNA dans la queue} \times \text{longueur de la comète } (\mu\text{m})$$

$$\text{OTM} = \% \text{ DNA dans la queue} \times \text{distance entre les barycentres } (\mu\text{m})$$

III.2 L'immunofluorescence : γ -H2AX

III.2.1 Étude des cassures double brin

Parmi les lésions radio-induites, les cassures double brin (CDBs) de l'ADN sont considérées comme étant biologiquement les plus significatives. En effet, mal réparées, elles peuvent conduire à des mutations qui augmentent le risque de cancers et de maladies héréditaires.

L'induction de cassures double brin entraîne la phosphorylation rapide de l'histone H2AX de part et d'autre de la lésion. La visualisation des CDBs, en employant l'immunofluorescence γ -H2AX, pourrait être une nouvelle approche pour évaluer le risque de faibles doses de rayonnements. L'immunofluorescence γ -H2AX peut être utilisée comme un biomarqueur spécifique et sensible de la présence de CDBs. Cette technique permet d'estimer de façon quantitative le nombre de cassures double brin dans une cellule (Rogakou *et al.*, 1999).

III.2.2 Mode opératoire (cf. Figure 67)

III.2.2.a Contamination des cellules

Pour cette étude d'immunofluorescence, les fibroblastes sontensemencés et contaminés en labteks 8 puits (0,7 cm²/puits). Après 24 heures de contamination (UA ou UE - 0 μ M, 5 μ M, 50 μ M et 500 μ M), le milieu contaminé est aspiré et les puits des labteks sont retirés de la lame. Les lames subissent alors un bain de rinçage dans du PBS puis un bain de fixation dans une solution de PFA 4 % pendant 25 min.

III.2.2.b Lyse des cellules

Après un rinçage au PBS, les fibroblastes sont lysés pendant 2 min dans une solution à 4°C composée de 20 mM de Tris pH 7, 20 mM de NaCl, 300 mM de sucrose, 3 mM de MgCl₂ et 0,5 % de Triton.

III.2.2.c Incubation anticorps primaire

Ensuite une incubation de 40 min à 37°C est effectuée avec l'anticorps primaire Anti-phospho-Histone H2AX (Ser139) (clone JBW301, UPSTATE, USA) dilué au 1/800 dans une solution de PBS-BSA.

III.2.2.d Incubation anticorps secondaire

Après un rinçage au PBS, les fibroblastes sont de nouveau incubés 20 min à 37°C avec l'anticorps secondaire Anti-Mouse IgG-FITC produit chez la chèvre (Sigma) et dilué au 1/100 dans une solution de PBS-BSA.

III.2.2.e Contre coloration des noyaux cellulaires

Les fibroblastes sont, après un dernier rinçage au PBS, colorés avec le milieu de montage Vectashield®-DAPI pour être conservées à -20°C jusqu'à leur observation.

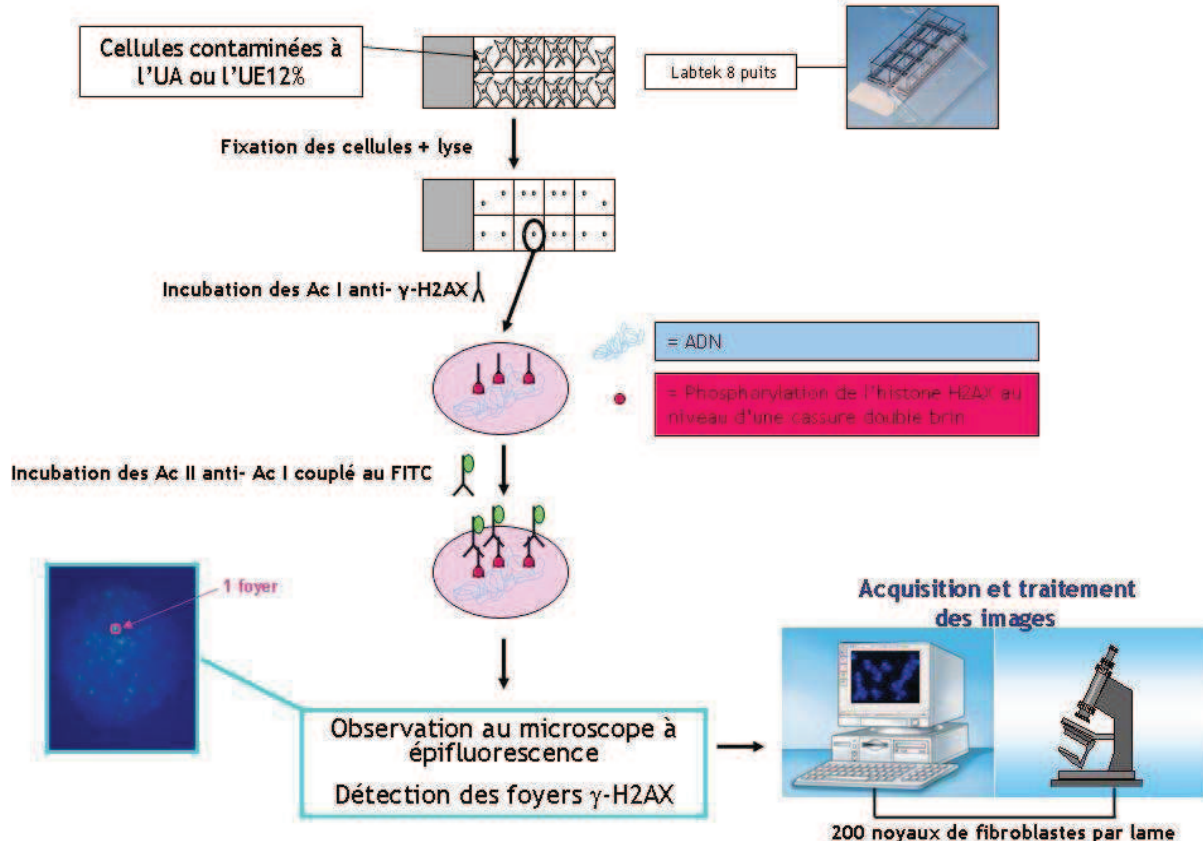


Figure 67. Mode opératoire de l'immunofluorescence de γ -H2AX

III.2.2.f Observation des lames

Les lames sont observées au microscope à épifluorescence, objectif X60, couplé à une caméra CCD.

Pour étudier les foyers γ -H2AX, deux logiciels sont utilisés. *Cartograph* permet d'acquérir les foyers γ -H2AX. *Histolab* permet d'acquérir et de définir le contour noyaux cellulaires, il permet aussi de détecter les foyers au sein des noyaux cellulaires.

IV.2.2.g Expression des résultats

Lors de cette étude, les foyers de 200 fibroblastes sont examinés. Les résultats sont exprimés en nombre moyen de foyers par cellules.

IV. Évaluation du stress oxydant au niveau cellulaire

IV.1 Étude de la production d'espèces réactives de l'oxygène

La production des espèces réactives de l'oxygène (EROs) est quantifiée par l'utilisation d'une sonde fluorescente, le 2',7'-dichlorofluoresceine diacétate (DCFH-DA) (cf. Figure 68).

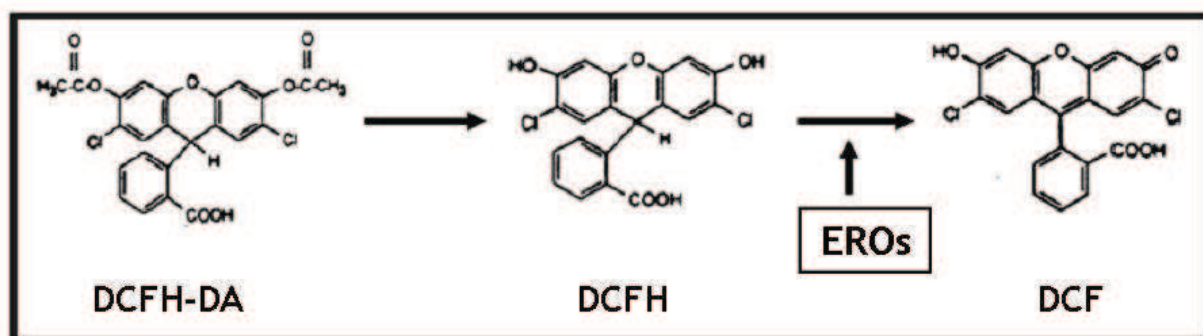


Figure 68. Principe du test de mesure de la 2',7'-dichlorofluoresceine DCF-DA, 2',7'-dichlorofluoresceine diacétate ; DCFH, (2',7'-dichloro-dihydrofluoresceine) ; DCF, 2',7'-dichlorofluoresceine) ; EROs, Espèces Réactives Dérivées de l'Oxygène.

Le DCFH-DA est hydrolysé en 2',7'-dichloro-dihydrofluoresceine (DCFH) qui diffuse dans les cellules. La DCFH est ensuite oxydée par les EROs produites en 2',7'-dichlorofluoresceine (DCF) hautement fluorescent. La quantité d'EROs est proportionnelle à la fluorescence du DCF. L'analyse en cytométrie de flux permet de suivre leur production d'EROs à un temps choisi (cf. Figure 69)

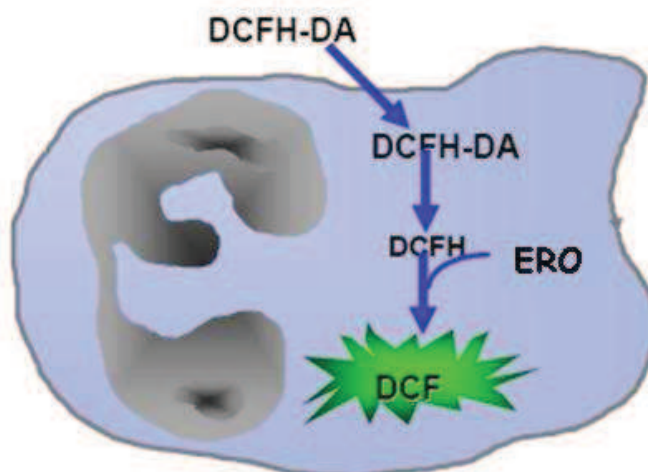


Figure 69. Mesure du stress oxydatif avec le test de mesure de la 2',7'-dichlorofluoresceine

La production d'EROs a été étudiée dans les fibroblastes embryonnaires de souris après 24 heures d'exposition à l'U (0 μ M, 5 μ M, 50 μ M et 500 μ M d'UA ou d'UE).

IV.2 Mode opératoire

IV.2.1 Incubation avec le DCFH-DA

Le test DCFH-DA a été utilisé pour déterminer la génération d'EROs après 24 heures d'exposition à l'U (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM d'UA ou d'UE) des fibroblastes embryonnaires de souris. Après 24 heures d'exposition à l'U, les fibroblastes ont été incubés en présence de 5 μM de DCFH-DA pendant 15 min à 37°C. Les fibroblastes sont ensuite trypsinés, puis rincés trois fois avec du PBS et enfin fixés dans 1 % de paraformaldéhyde (PFA).

IV.2.2 Culture des fibroblastes sans incubation au DCFH-DA

En parallèle, l'autofluorescence naturelle des fibroblastes a été étudiée pour chaque condition expérimentale (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM d'UA et d'UE). Pour cela, les fibroblastes ont été contaminés 24 heures à l'U (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM d'UA ou d'UE). Au bout de 24 heures de contamination. Les fibroblastes ont été trypsinés, puis rincés trois fois avec du PBS et enfin fixés dans 1 % de paraformaldéhyde (PFA).

IV.2.3 Analyse en cytométrie de flux

La formation de 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF), composé hautement fluorescent, a été analysée en cytométrie de flux. En parallèle, l'autofluorescence naturelle des fibroblastes a également été étudiée en cytométrie de flux. L'analyse a été réalisée à l'aide d'un cytomètre de flux de type FACSCalibur (BD[®], France) et de son logiciel informatique BD CellQuest Pro.

Les fibroblastes sont analysés en position "run low" du cytomètre ce qui correspond à un passage d'environ 300-400 cellules par seconde avec la dilution effectuée. Un total de 10 000 fibroblastes par condition est analysé par condition et l'analyse est réalisée en triple. Un histogramme est utilisé pour permettre de suivre soit l'intensité moyenne de fluorescence des fibroblastes exposés au DCFH-DA, l'intensité moyenne de fluorescence naturelle des fibroblastes.

IV.2.4 Expression des résultats

Les fibroblastes étant naturellement fluorescent, l'intensité moyenne de fluorescence naturelle des fibroblastes (non exposé au DCFH-DA) est soustraite à l'intensité moyenne des fibroblastes exposés au DCFH-DA.

Les résultats sont exprimés pour chaque condition en pourcentage d'intensité de fluorescence par rapport au pourcentage du contrôle non exposé à l'U (0 μM).

V. Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR

Chaque type de lésions de l'ADN engendre l'implication d'un mécanisme de réparation bien particulier. Ne pouvant étudier et visualiser spécifiquement chacune des lésions de l'ADN, les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN entrant en jeu lors d'une contamination par l'U ont été étudiés. Pour cela, la RT-PCR a permis d'étudier l'expression de différents gènes codant pour des protéines impliquées dans divers mécanismes de réparation des lésions de l'ADN. La variation d'expression de ces gènes pourrait nous donner une indication sur le mécanisme utilisé et donc le type de lésions à l'ADN causés par les différents mélanges isotopiques.

L'étude de l'expression des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN a été réalisée après 24 heures de contamination par l'U des fibroblastes embryonnaires de souris.

V.1 Extraction d'ARN

Après 24 heures de contamination par l'UA ou par l'UE, les fibroblastes sont rincés deux fois avec du PBS puis ils sont directement lysés dans la boîte de Pétri avec 2 mL d'une solution de lyse composée de 4 M de thiocyanate de guanidium, 25 mM de citrate de sodium di-hydraté, 0,5 % de sodium lauryl sarcosinate et 0,1 M de β -mercaptoéthanol. Les fibroblastes ainsi lysés sont transférés dans des tubes Eppendorf dans lesquels sont ajoutés séquentiellement 0,1 mL d'acétate de sodium 2 M pH 4, 0, 1 mL de phénol et 0,2 mL de chloroforme alcool isoamylique pour 1 mL de solution de lyse. Les tubes sont vortexés pendant 10 secondes puis incubés 15 minutes dans la glace. Le traitement au phénol acide permet de séparer l'ADN, dégradé à pH acide, de l'ARN se trouvant dans la phase aqueuse. Après l'incubation, les tubes sont centrifugés à 10 000 g pendant 20 min à 4°C afin de séparer la phase organique de la phase aqueuse qui est transférée ensuite dans un tube propre auquel on ajoute un volume équivalent d'isopropanol permettant ainsi la précipitation de l'ARN pendant 1h30 à -20°C. A la sortie du congélateur les tubes subissent de nouveau une centrifugation à 10 000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est retiré puis le culot est dissout avec 0,3 mL de solution de lyse pour 1 mL de solution de lyse utilisé lors de la première étape. Après ajout d'un volume équivalent d'isopropanol, les tubes sont de nouveau mis à -20°C pendant 1h30. L'ARN est ensuite sédimenté par centrifugation à 16 000 g pendant 10 min à 4°C. Après élimination du surnageant, l'ARN est lavé par 1 mL d'éthanol à 75 % puis il subit de nouveau une centrifugation à 16 000 g pendant 10 min à 4°C. Cette étape de lavage est répétée une fois puis l'éthanol est évaporé avant de dissoudre le culot dans 20 μ L d' H_2O RNase free.

Afin de vérifier la qualité des ARN extraits, une électrophorèse sur gel d'agarose 2 % TAE 1X a été réalisée. Les échantillons d'ARN sont préparés en mélangeant 1 µL de Blue Stain 10X, 8 µL d'H₂O RNase free et 1 µL d'ARN. Ces 10 µL sont déposés dans les puits du gel et subissent une migration de 45 min à 106 V. Le gel, contenant du BET, est ensuite observé sur une table UV couplée à une caméra et une imprimante.

La concentration des ARN extraits est déterminée grâce au spectrophotomètre BioPhotometer (Eppendorf®), une unité DO correspondant à 40 µg.mL⁻¹ d'ARN. Le rapport A260/A280 est également calculé afin de contrôler la contamination protéique des échantillons, si ce rapport est supérieur à 1,5, la qualité des ARN est bonne.

Dans le but de s'assurer de la non-contamination des ARN par de l'ADN, un traitement à la DNase dont le protocole est décrit dans le kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen®) leur est appliqué (cf. [Annexe 2](#)).

V.2 Transcription inverse des ARN en ADNc

La transcription inverse a été réalisée selon le protocole décrit dans le kit RT²PCR Array First Strand commercialisé par Superarray® (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, Maryland). Le volume d'ARN après traitement à la DNase utilisé pour la préparation du mélange de dénaturation est de 9 µL soit environ 0,8 µg d'ARN. Ce volume d'ARN a été mélangé avec 1 µL d'amorces aléatoires puis chauffé 3 min à 70°C pour permettre la dénaturation des molécules d'acides nucléiques. A ce mélange sont ajoutés 10 µL de mélange RT composé de 4 µL de tampon RT 5X, 4 µL d'H₂O RNase-free, 1 µL d'inhibiteur de RNase et 1 µL de reverse transcriptase. Après une incubation à 37°C pendant 1 heure, l'ensemble est chauffé à 95°C pendant 5 min afin d'hydrolyser l'ARN et d'inactiver la reverse transcriptase. Les tubes sont enfin conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

V.3 PCR en temps réel

V.3.1 PCR de vérification

La PCR de vérification permet de voir si la réaction de transcription inverse a bien fonctionné avant de lancer les plaques de PCR en temps réel. Le gène choisi pour effectuer cette PCR est le gène exprimant la β-2-microglobuline (NM_009735) qui est une petite globuline appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Cette protéine serait surexprimée lors d'une irradiation (données du laboratoire non publiées).

La réaction de PCR est réalisée en utilisant le kit de réaction SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystem®) sur le thermocycleur ABI PRISM 7000 et analysée par le logiciel ABI PRISM 7000 SDS Software. Brièvement, pour un volume final de 25 µL, on ajoute 0,625 unité d'AmpliTaQ Gold ADN polymérase et 0,25 unité d'AmpErase UNG à 2,5 µL de tampon de PCR 10X SYBR Green, 6 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 5 pmol d'amorce sens, 5 pmol d'amorce antisens et 1 µL d'ADNc obtenu par la réaction de transcription inverse décrite précédemment (soit environ 40 ng si rendement RT de 100 %) QSP 25 µL d'eau stérile. Après une étape de 10 min à 95°C (activation de l'ADN polymérase hot start), suivent 40 cycles [15 secondes à 95°C (dénaturation), 1 minute à 60°C (appariement-élongation)].

Les séquences des amorces, désignées grâce au logiciel Primer Express, sont présentées dans le [Tableau 12](#). La taille de l'amplicon obtenu est de 61 paires de base.

Tableau 12. Oligonucléotides utilisés lors de la PCR de vérification

Nom de l'amorce	Séquence
B2m mouse sens	5' GAC TGA TAC ATA CGC CTG CAG AGT 3'
B2m mouse antisens	5' CTC GAT CCC AGT AGA CGG TCT T 3'

V.3.2 Plaque PCR

Les plaques PCR utilisées dans cette expérience permettent une estimation simultanée de différents gènes dans un même échantillon et permet ainsi l'analyse d'un panel de gènes reliés à une voie biologique qui correspond ici principalement aux mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. La plaque contient 84 puits utilisés pour la détection de gènes d'intérêts, 5 puits nécessaires à la détermination de l'expression de gènes de ménages permettant la normalisation des données PCR et 7 puits contrôles (contrôle de contamination d'ADN génomique, contrôle RT et contrôle PCR) comme le montre la [Figure 70](#).

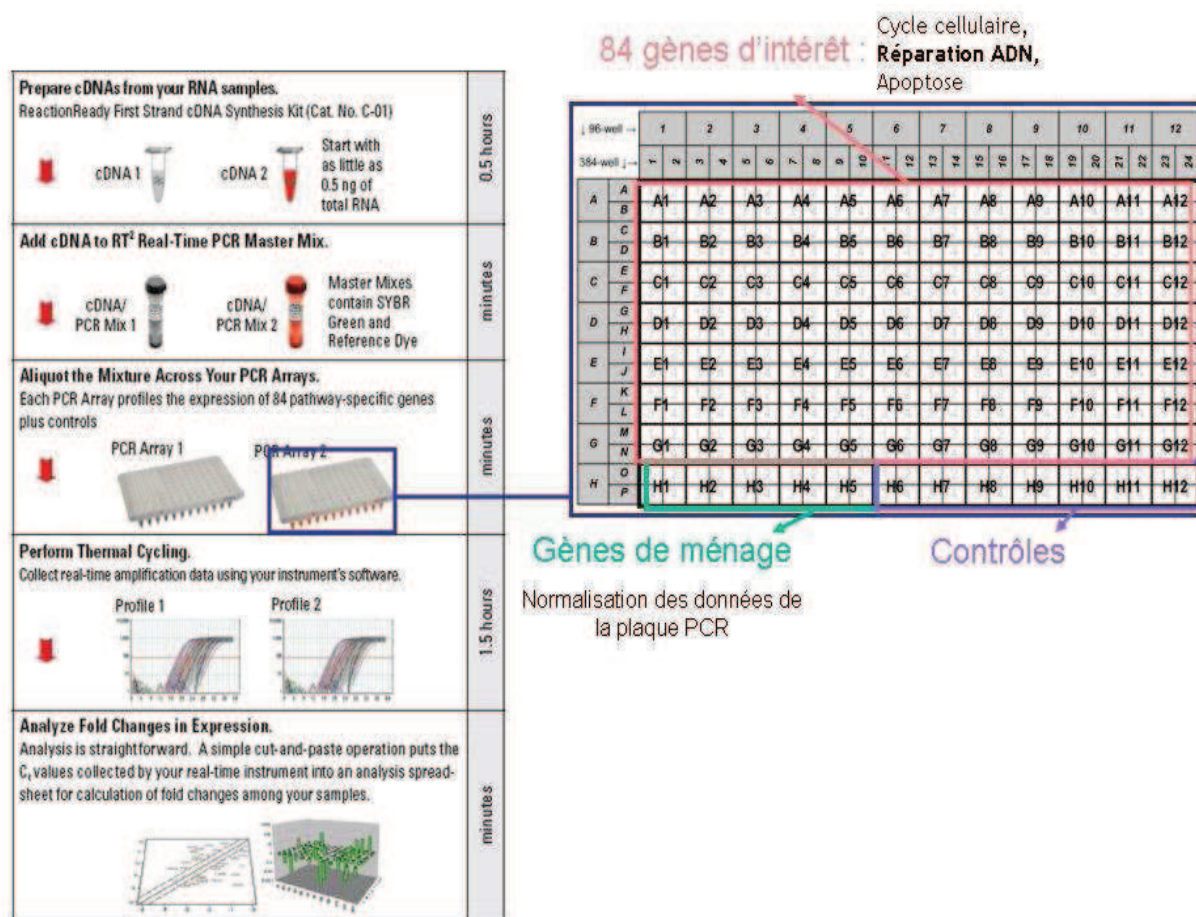


Figure 70. Description du protocole de PCR en temps réel sur plaque

Techniquement, l'ADNc restant après la PCR de vérification est dilué dans de l'eau stérile comme précisé dans le protocole RT² Profiler PCR Array System (Superarray) puis mélangé au RT² Real Time SYBR Green/ROX PCR Master Mix (Superarray) contenant du tampon de PCR en temps réel, la Taq DNA polymérase HotStart, des nucléotides, du SYBR Green et du ROX pour former le cocktail expérimental. On dépose ensuite 25 µL de ce cocktail dans chaque puits de la plaque PCR de dommage à l'ADN nommée Mouse DNA Damage Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array (dont la liste des gènes est présentée en [Annexe 3](#)) contenant, dans le fond des puits, les amorces lyophilisées permettant l'amplification de différents gènes d'intérêts. Ainsi dans chaque puits il y a 1 µL d'ADNc (soit environ 7 ng si le rendement de RT est de 100 %) pour 12,5 µL de mix et 11,5 µL d'eau stérile.

La plaque PCR est ensuite centrifugée brièvement afin d'éliminer les bulles puis elle est recouverte d'un film en téflon optiquement transparent avant d'être insérée dans l'ABI PRISM 7000 pour subir une PCR composée d'un cycle de 10 min à 95°C (activation de l'ADN polymérase hot start) suivi de 40 cycles [15 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C]. La fluorescence du SYBR Green est alors détectée et enregistrée dans tous les puits durant l'étape d'hybridation de chaque cycle. Le logiciel ABI PRISM 7000

SDS Software (Applied Biosystems, France) permet enfin de déterminer le cycle seuil (Ct) pour chaque puits.

VI. Les analyses du cycle cellulaire en cytométrie de flux

La mesure de la quantité d'ADN et l'analyse du cycle cellulaire peuvent être réalisées par cytométrie de flux. La proportion des fibroblastes dans les différentes phases du cycle cellulaire a été mesurée par quantification du contenu en ADN de la cellule par cytométrie de flux grâce au marquage de l'ADN à l'iodure de propidium. De plus, la cytométrie de flux peut permettre de marquer les cellules lors de leur passage en phase S du cycle cellulaire. En effet, l'incorporation du bromodeoxyuridine (BrdU), analogue de la thymidine, dans l'ADN cellulaire au moment de la phase S de réplication, peut être marquée par un anticorps monoclonal (anti-BrdU) couplé à un fluorochrome.

L'analyse des différentes phases du cycle cellulaire a été réalisée sur les fibroblastes embryonnaires de souris après 24 heures de contamination par l'UA et par l'UE (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM).

VI.1 L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux

VI.1.1 La préparation des échantillons

Les fibroblastes après 24 heures de contamination par l'UA ou par l'UE (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM) sont trypsinés puis rincés une fois dans du PBS. Après comptage du nombre de cellules vivantes par coloration au bleu trypan, un total de $2 \cdot 10^6$ cellules est re-suspendu dans 500 μL de PBS et est placé dans un tube à fond conique de 15 ml puis fixées goutte à goutte en vortexant avec 10 ml d'éthanol 70 % froid puis stockées à -20°C jusqu'à l'analyse.

VI.1.2 Le marquage

Au moment de l'analyse, les fibroblastes fixés sont centrifugés 10 min à 300 g puis le surnageant d'éthanol 70 % est aspiré, les fibroblastes sont ensuite rincés 3 fois dans du PBS. Les fibroblastes sont re-suspendus au final dans 500 μL d'une solution de PBS contenant de l'iodure de propidium (IP : concentration finale de $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) et de la RNase A (concentration finale de $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) puis incubées 30 minutes à 37°C . L'incorporation d'IP est proportionnelle au contenu en ADN des cellules.

VII.1.3 L'analyse et l'acquisition des données

Les acquisitions sont réalisées sur un FACSCalibur (Becton Dickinson, France) à l'aide du logiciel Cell-Quest (Becton Dickinson, version 5.2.1). La fluorescence de l'IP est collectée à l'aide du bloque filtre FL3. Les données collectées pour 10 000 évènements à chaque expérience sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Cell-Quest.

VI.1.3.a Évaluation de la population cellulaire en sub G0-G1

Une augmentation du pourcentage de cellules en sub G0-G1 indique l'induction de l'apoptose (Chang *et al.*, 2007). La proportion des cellules en sub G0-G1 est mesurée par quantification du contenu en ADN de la cellule par cytométrie de flux grâce au marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (*cf.* Figure 71). Cette quantification est réalisée après 24 heures d'exposition à l'UA ou à l'UE (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM). La population en sub G0-G1 est analysée dans les fibroblastes non traités (0 μM UA ou UE), les fibroblastes contaminés par l'U (5 μM ; 50 μM et 500 μM UA ou UE) et les fibroblastes traités avec des agents de contrôle génotoxiques (Mitomycine C et Vincristine Sulfate).

L'analyse est réalisée à l'aide d'un cytomètre de flux de type FACSCalibur (BD[®], France) et de son logiciel informatique BD CellQuest Pro. Les cellules sont analysées en position "run low" du cytomètre ce qui correspond à un passage d'environ 300-400 cellules par seconde avec la dilution effectuée. L'étape suivante consiste à définir une fenêtre R1 de manière à sélectionner uniquement les cellules qui nous intéressent pour l'expérimentation, pour éviter d'analyser les débris cellulaires, les doublets et triplets ou encore les populations de cellules polyploïdes (phénomène d'endoréplication). Ainsi lors du réglage des paramètres d'acquisition on demande au logiciel d'effectuer une analyse de 10 000 cellules se trouvant dans la fenêtre R1. Enfin un histogramme est utilisé pour permettre de suivre les fréquences de cellules classées en fonction de l'intensité de fluorescence de l'IP (*cf.* Figure 71).

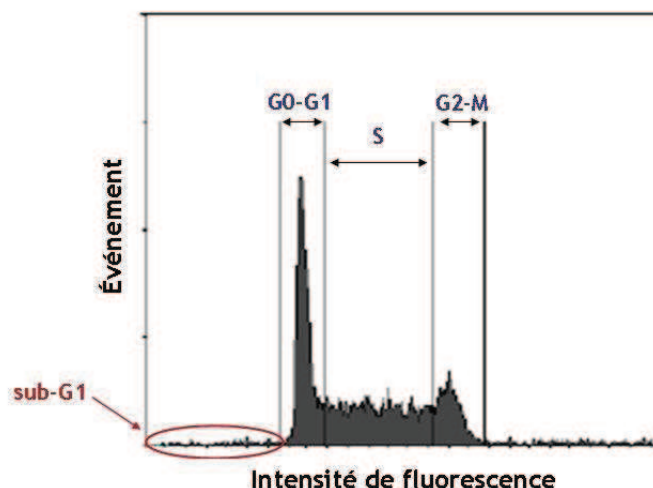


Figure 71. Cycle cellulaire analysé en cytométrie de flux

VI.1.3.b Analyse du cycle cellulaire

La proportion des fibroblastes dans les différentes phases du cycle cellulaire est mesurée (comme précédemment) par quantification du contenu en ADN de la cellule par cytométrie de flux grâce au marquage de l'ADN à l'iodure de propidium. Cette quantification est réalisée après 24 heures d'exposition à l'UA et à l'UE.

VI.2 L'analyse en cytométrie de flux d'un pool de cellules par incorporation de BrdU lors d'un pulse après contamination par l'uranium

VI.2.1 Le principe de l'expérimentation

Le milieu de culture des cellules asynchrones est remplacé par du milieu frais contenant $10 \mu\text{M}$ de BrdU durant un pulse de 30 minutes. Les cellules en phase S, au moment de ce pulse, incorporent du BrdU et c'est l'évolution dans le cycle cellulaire, à l'aide d'une contre-coloration IP, de ce pool de cellules marquées par un anticorps anti-BrdU-FITC qui est suivie.

VI.2.2 Mode opératoire (cf. Figure 72)

VI.2.2.a Incorporation du BrdU

Dans cette étude expérimentale, les fibroblastes ayant été exposés pendant 24 heures à des concentrations différentes d'U ($0 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ et $500 \mu\text{M}$ d'UA ou d'UE) sont réensemencés à une densité de $2,25 \cdot 10^6$ cellules par flasque. Après 24 heures de réensemencement, le BrdU est ajouté aux milieux de culture à une concentration finale de $10 \mu\text{M}$ et cela durant un pulse de 30 minutes pendant lequel les cellules en phase S incorporent ce BrdU. A la fin du pulse, le milieu de culture est retiré et les fibroblastes sont lavés trois fois de suite avec 5 mL de PBS à 37°C . Les fibroblastes sont ensuite remis en

culture avec du milieu frais pour qu'ils continuent de progresser dans leur cycle et les fixer aux temps voulus. Ce protocole expérimental a été effectué selon deux techniques : nous avons fixé les fibroblastes immédiatement après le pulse de BrdU pour la première expérience. Pour la seconde expérience, nous avons replacé les fibroblastes dans l'incubateur pendant 3 heures après le pulse.

VI.2.2.b Fixation

Le milieu de culture est aspiré et les fibroblastes sont décollés des flasques en ajoutant 3 mL de trypsine à 37°C pendant 5 min. Après des étapes de centrifugation, 10 min à 300 g, des lavages au PBS sont de nouveau effectués. Les fibroblastes peuvent ensuite être fixés en ajoutant goutte à goutte de l'éthanol à 70 % froid tout en vortexant à vitesse modérée.

VI.2.2.c Dénaturation

Le jour de l'analyse, les cellules fixées sont centrifugées, puis le culot cellulaire est repris dans 2 mL de pepsine diluée à 0,5 mg.mL⁻¹ dans de l'HCl 30 mM et incubées 20 min à 37°C afin de dénaturer l'ADN cellulaire. Après centrifugation, les cellules sont à nouveau incubées 20 min à température ambiante dans 1 mL d'HCl 2 N. Une neutralisation est alors effectuée en ajoutant 5 mL de PBS. Une centrifugation est réalisée, le surnageant est éliminé, puis le culot est re-suspendu dans 4 mL de PBS contenant 0,5 % de Triton X100.

VI.2.2.d Marquage

Le culot, obtenu après centrifugation (300 g, 10 min, 25°C) de la suspension cellulaire, est re-suspendu dans 100 µL de PBS contenant 0,1 % de BSA et l'anticorps anti-BrdU-FITC (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) à une concentration de 10 µg.mL⁻¹. L'incubation dure 30 min à température ambiante dans l'obscurité. Au terme de l'incubation, les fibroblastes sont rincés au PBS avant d'être suspendus dans du PBS contenant 25 µg.mL⁻¹ d'IP.

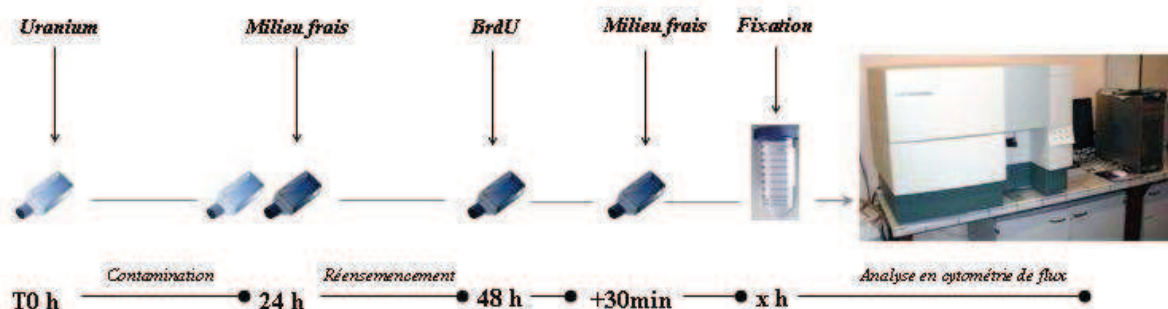


Figure 72. Principe de l'étude du cycle cellulaire

VI.2.3 Analyse du cycle

L'analyse est réalisée à l'aide d'un cytomètre de flux de type FACSCalibur et de son logiciel informatique BD CellQuest Pro. Les cellules sont analysées en position "run low" du cytomètre ce qui correspond à un passage d'environ 300-400 cellules par seconde avec la dilution effectuée (cf. Partie VII.2.3.a pour l'explication avec définition de la fenêtre R1 (cf. Figure 73 A)). Deux histogrammes sont utilisés pour nous permettre d'interpréter les résultats. Le premier correspond aux fréquences de fibroblastes classés en fonction de l'intensité de fluorescence de l'IP (cf. Figure 73 B). Le second histogramme représente l'intensité de fluorescence du FITC (proportionnelle à la quantité de BrdU) en fonction de l'intensité de fluorescence de l'IP (cf. Figure 73 C).

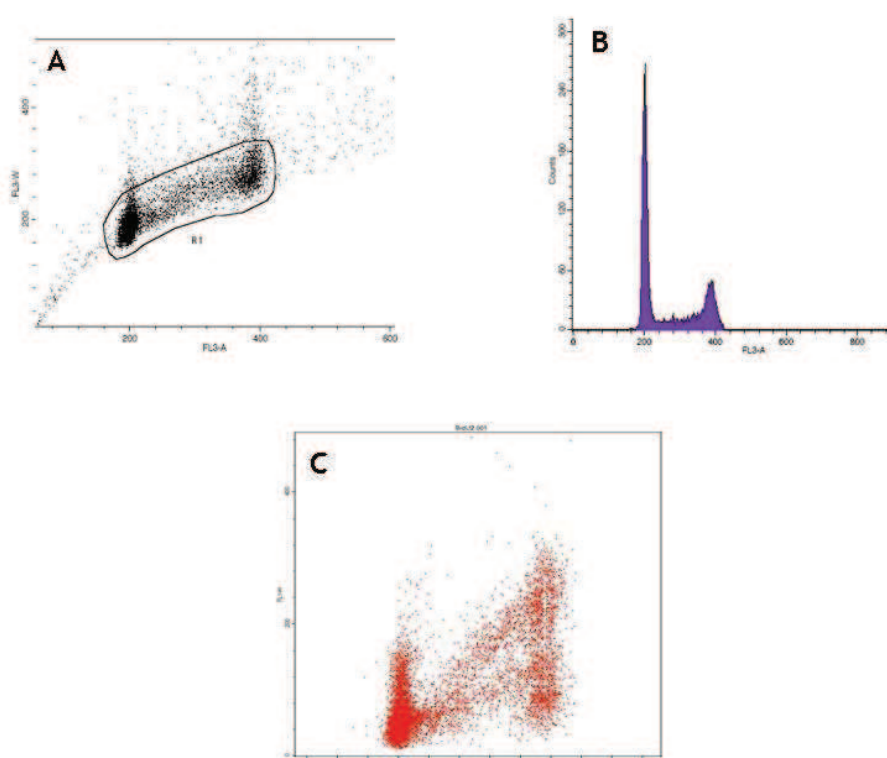




Figure 73. Étude du cycle cellulaire avec CellQuest Pro après marquage au BrdU

VII. Test de numération des micronoyaux

La numération des micronoyaux (MNx) avec blocage de la cytotérièse a été réalisée sur 3 types cellulaires différents :

🌈 Fibroblastes embryonnaires de souris contaminés *in vitro* pendant 24 heures à l'UA ou à l'UE (0 μ M, 5 μ M, 50 μ M et 500 μ M)

 **Lymphocytes de rat.** Des rats ont été contaminés *in vivo* par injection d'UA ou d'UE pendant 24 heures puis le sang total a été mis en culture (cf. Partie I.2 dans Culture cellulaire).

 **Lymphocytes humains** contaminés *in vitro* par différents mélanges isotopiques de l'U. Des prélèvements sanguins sur 10 donneurs ont été réalisés puis le sang total a été mis en culture (cf. Partie I.3 dans Culture cellulaire).

La numération des micronoyaux a été couplée avec une hybridation fluorescente *in situ* avec sondes d'ADN spécifiques du centromère afin d'essayer de discriminer les effets aneugènes (considéré dans notre étude comme effet chimiotoxique) et les effets clastogènes (considéré dans notre étude comme effet radiotoxique) de l'U. Cette hybridation fluorescente *in situ* avec sondes d'ADN spécifiques du centromère a été réalisée sur :

 **Fibroblastes embryonnaires de souris**

 **Lymphocytes humains**

L'hybridation *in situ* de sondes n'a pu être réalisée sur les lymphocytes de rats. En effet, à l'heure actuelle il n'existe pas de sondes spécifiques pour le rat.

En plus de sa capacité à détecter les micronoyaux (cassures et pertes chromosomiques), d'autres mesures de génotoxicité et de cytotoxicité ont été réalisées avec le test des micronoyaux avec blocage de la cytodierèse (CBMN) : chromosomes dicentriques via les cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques et les cellules mononucléées avec des MNx.

[VII.1 Le test de numération des micronoyaux \(Cytokinesis Block Micronucleus assay CBMN assay\)](#)

Nous avons pratiqué le test des MNx avec blocage en cytodierèse (ou en anglais *Cytokinesis Block Micronucleus assay* : CBMN), décrit initialement par Fenech et Morley (Fenech et Morley, 1985), sur les fibroblastes embryonnaires de souris (C3H10T1/2) binucléés, sur les lymphocytes de rat binucléés ainsi que sur les lymphocytes humains binucléés. Le principe du test des micronoyaux consiste à dénombrer, au sein de cellules en interphase, les micronoyaux, qui sont des entités nucléaires indépendantes du noyau principal constituées soit de chromosomes entiers, soit de fragments chromosomiques acentromériques.

VII.1.1 Rappel sur les cultures cellulaires

Après 24 heures de contamination (à différentes concentrations d'UA ou d'UE, et de Mitomycine C et de Vincristine Sulfate pour les contrôles positifs génotoxiques - cf. paragraphe III. Traitement des cellules), les fibroblastes sont à confluence (pour se rapprocher de la configuration tissulaire) et par conséquent en phase plateau. Une division cellulaire étant nécessaire pour l'expression des MNx, les fibroblastes sont immédiatement trypsinés et réensemencés à $2,25 \cdot 10^6$ fibroblastes par flasque de 75 cm^2 pendant 24 heures ce qui correspond à leur temps de doublement et leur permet donc de réaliser un cycle mitotique (et leur permet également de nouveau bien adhérer au support pour une bonne prolifération) (protocole cf. Figure 74).

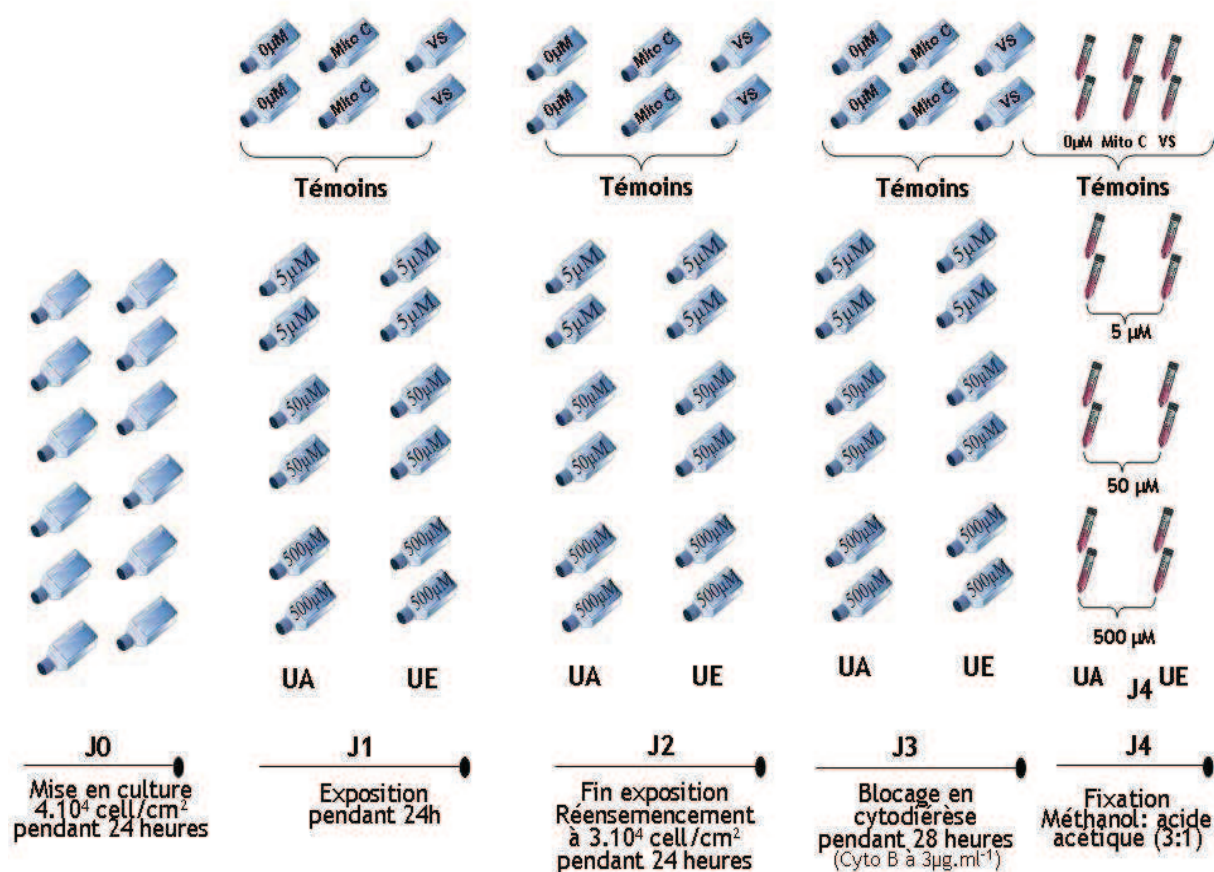


Figure 74. Protocole culture cellulaire des fibroblastes embryonnaires de souris (C3H10T1/2) en vue de la numération des MNx

Mito C : Mitomycine C, VS : Vincristine Sulfate, UA : Uranium Appauvri, UE : Uranium Enrichi

Pour les lymphocytes de rat, le sang total contaminé *in vivo* par injection d'UA ou d'UE est mis en culture pendant 44 heures (Protocole cf. Figure 75).

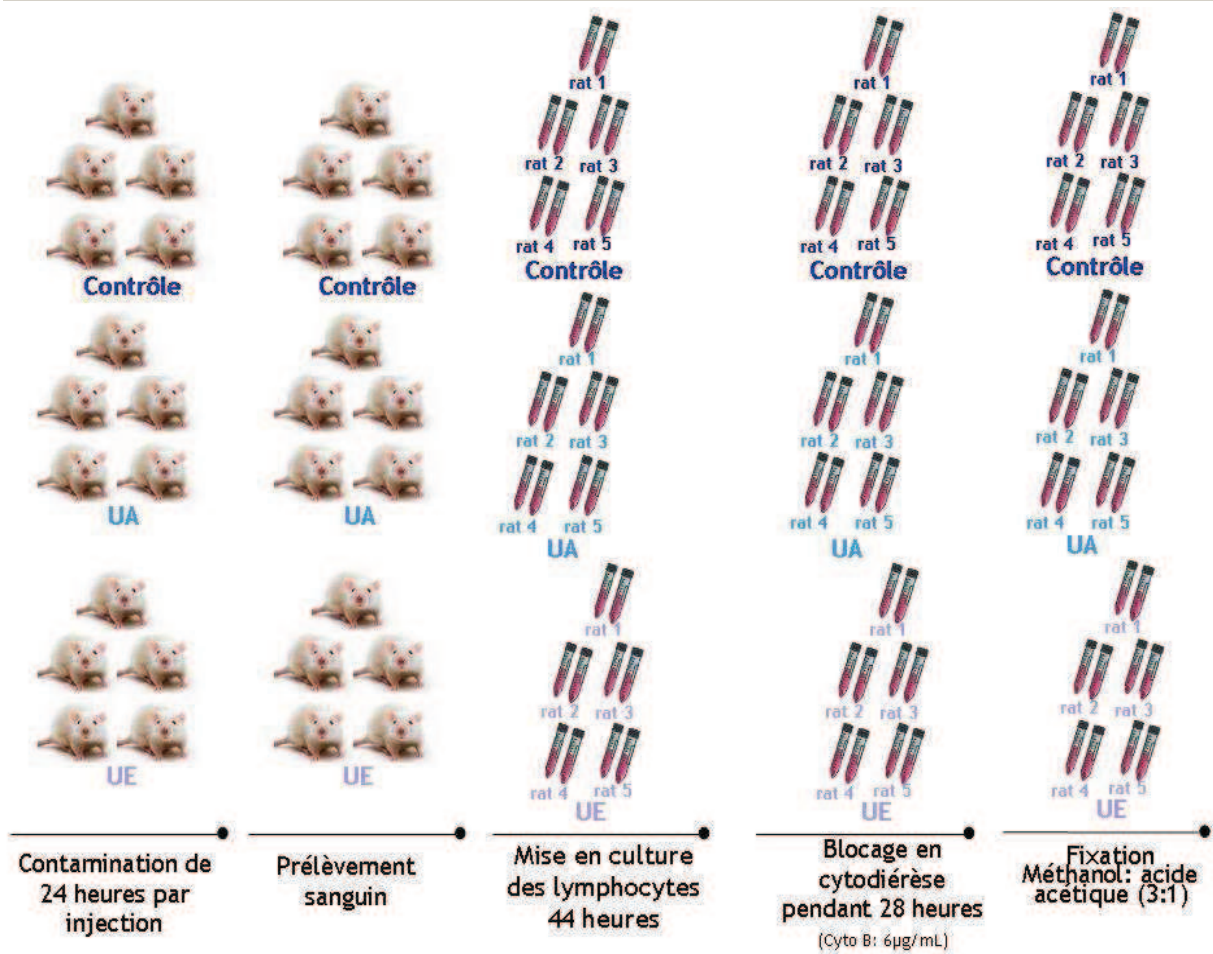


Figure 75. Protocole de la numération des MNx après contamination *in vivo*

Enfin pour les lymphocytes humains, le sang total est mis en culture pendant 24 heures puis contaminés par différents mélanges isotopiques de l'U (9 lots expérimentaux) pendant 20 heures (Protocole *cf.* Figure 76).

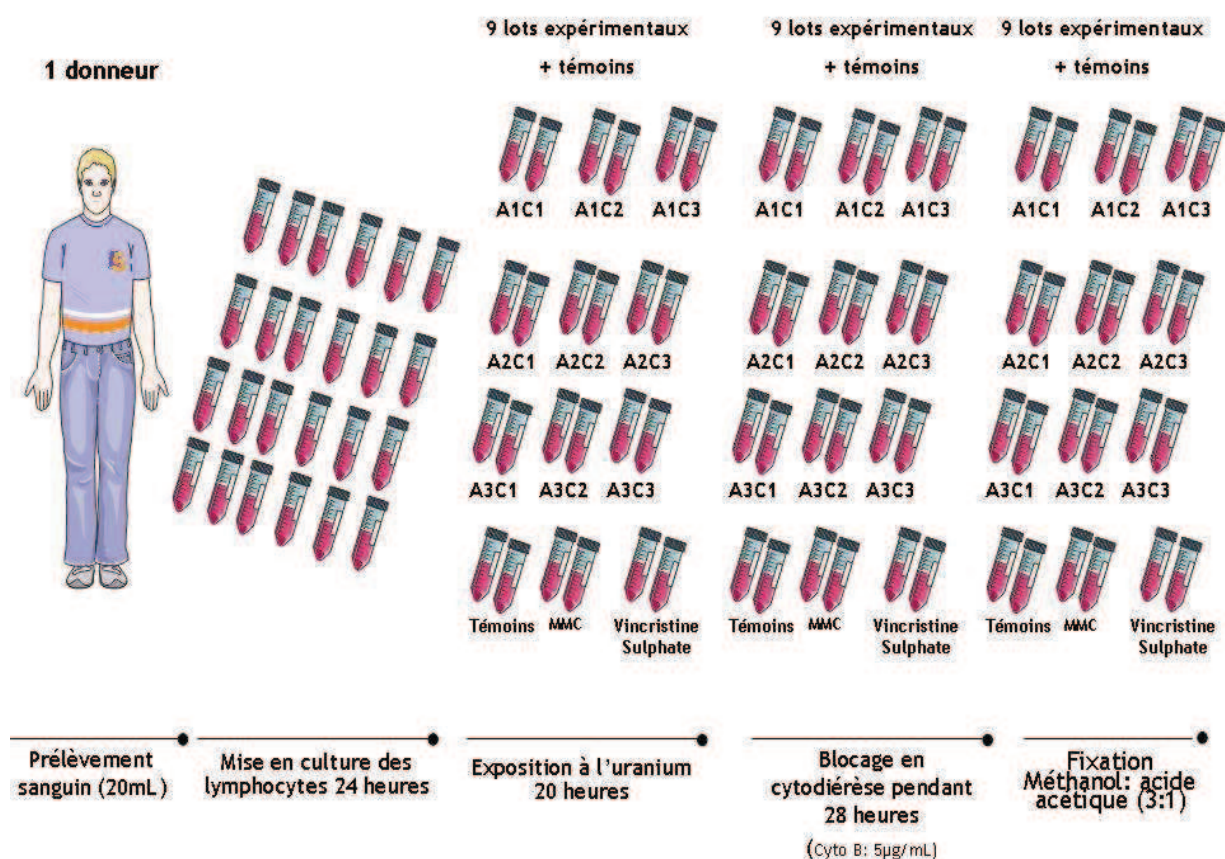


Figure 76. Protocole de numération des micronoyaux sur sang humain (exemple pour un donneur)

VII.1.2 Ajout de la cytochalasine B

Pour la numération des MNx, la cytochalasine B (Sigma®) est ajoutée à la concentration finale de 3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour les fibroblastes embryonnaires de souris, 6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour les lymphocytes de rat et 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour les lymphocytes humains, afin de bloquer les cellules en cytotdiérèse. La concentration de cytochalasine B a été adaptée en fonction du type cellulaire dans le but d'obtenir un nombre maximum de cellules binucléées. La cytochalasine B est un inhibiteur de la polymérisation de l'actine nécessaire pour la formation de microfilaments qui comprime le cytoplasme entre les noyaux des deux cellules sœurs pendant la cytotdiérèse.

VII.1.3 Choc hypotonique puis fixation des cellules

Après 28 heures d'incubation à 37°C avec la cytochalasine B, les cellules sont centrifugées (150 g pendant 10 minutes à température ambiante) puis fixées dans le fixateur de Cornoy (méthanol : acide acétique (3:1)). Les cellules fixées sont étalées sur des lames de microscope. Les lames sont séchées à l'air ambiant durant 24 heures puis colorées avec une solution de DAPI Vectashield® (Abcys SA, Paris,

France). Les culots cellulaires restants sont conservés à -20°C dans du fixateur de Cornoy en vue de la réalisation éventuelle du marquage centromérique par FISH.

Après 28 heures d'incubation à 37°C, les lymphocytes de rat et les lymphocytes humains sont soumis à un choc hypotonique doux : les culots cellulaires sont suspendus dans 5 mL de KCl 0,075 M contenant une solution fixatrice (KCL 0,075M : Méthanol : Acide Acétique : 30 : 9 :1) préalablement incubés à 37°C puis centrifugés immédiatement à 300 g durant 5 min. Cette étape de choc hypotonique n'est pas nécessaire pour les fibroblastes embryonnaires de souris car le cytoplasme est bien décollé du noyau (un tel choc détruit complètement le cytoplasme des fibroblastes). Après élimination du surnageant, les cellules (fibroblastes, lymphocytes de rat et lymphocytes humains) sont fixées dans le fixateur de Cornoy (méthanol : acide acétique (3:1)). Les cellules sont de nouveau centrifugées à 300 g pendant 10 min et une deuxième fixation avec 5 mL de fixateur de Cornoy est réalisée. Cette étape de fixation est répétée jusqu'à l'obtention d'un surnageant limpide et sans débris. Les cellules fixées sont étalées puis conservées à -20°C. Les culots cellulaires restants sont conservés dans 5 mL de fixateur de Cornoy à -20°C en vue de la réalisation d'une nouvelle numération des MNx ou bien d'une hybridation *in situ* de sondes pancentromériques.

VII.1.4 Lecture des lames

Les étalements sont examinés au microscope à épifluorescence (Olympus® BX61), grossissements (x60). Les lames sont codées et lues de façon séquentielle, soit verticalement soit horizontalement. La lecture commence à un angle de la lame et finie à l'angle opposé. Une ligne est suivie jusqu'au bord opposé. La lecture se fait alors en sens inverse et ainsi de suite jusqu'à atteindre le nombre de cellules à lire ou la fin de la lame. Pour chaque condition, 1000 cellules binucléées sont examinées et les cellules micronucléées contenant un MN sont comptabilisées selon les critères définis par Fenech (Fenech, 2000).

Les critères de lecture des cellules binucléées et des MNx sont définis très précisément (Fenech, 2000).

➤ Critères de sélection des cellules binucléées

- les deux noyaux doivent avoir une membrane nucléaire intacte et doivent être situés au sein du même cytoplasme ;
- les deux noyaux doivent être approximativement de même taille et de même coloration (aspect et intensité) ;

- les deux noyaux peuvent être reliés par un fin pont nucléoplasmique dont la largeur ne doit pas excéder $\frac{1}{4}$ du diamètre du noyau ;
- les deux noyaux peuvent se toucher mais idéalement ne doivent pas se chevaucher ; une cellule dont les deux noyaux se chevauchent peut être comptabilisée seulement si les limites nucléaires de chacun des noyaux peuvent être distinguées ;
- la limite cytoplasmique doit se distinguer clairement des limites cytoplasmiques des cellules adjacentes.

➤ **Critères de lecture des MNx**

Le micronoyau est morphologiquement identique mais plus petit que le noyau principal. Leurs caractéristiques sont les suivantes (Fenech, 2000) :

- le diamètre des MNx varie habituellement entre $\frac{1}{16}$ et $\frac{1}{3}$ du diamètre moyen des noyaux principaux ;
- les MNx sont ronds ou de forme ovale ;
- les MNx ne sont pas réfringents et peuvent être par conséquent rapidement distingués des artéfacts comme les particules de colorant ;
- les MNx ne sont pas liés ou reliés aux noyaux principaux ;
- les MNx peuvent toucher les noyaux principaux mais sans chevauchement et les limites des MNx et des noyaux principaux doivent se distinguer facilement ;
- les MNx ont habituellement la même intensité de couleur que les noyaux principaux, mais occasionnellement la couleur peut être moins intense.

Finalement, toutes les lectures ont été effectuées en aveugle.

VII.1.5 Expression des résultats

Dans notre travail de thèse, nous avons comptabilisé :

➤ **Les cellules binucléées avec MN (BN-1MN ou BN-MNx).**

Après contamination des fibroblastes embryonnaires de souris nous avons uniquement observés des cellules binucléées avec un MN (aucune cellule binucléée avec plusieurs MNx). On parlera donc pour les fibroblastes de cellules binucléées avec un MN (BN-1MN).

En revanche, avec les lymphocytes (de rat et humains), nous avons observés des cellules binucléées avec un MN ainsi que des cellules binucléées avec plusieurs MNx. Nous n'avons pas séparé l'étude des cellules

binucléées avec un, deux ou trois MNx car peu de cellules binucléées avec deux ou trois MNx ont été observées (majoritairement des cellules binucléées avec un MN sont observées) et ne permettent donc pas d'établir des tests statistiquement significatifs. Cependant, en les incluant dans les cellules binucléées avec des MNx, cela augmente la puissance du test statistique. On parlera donc pour les lymphocytes (de rat et humains) de cellules binucléées avec des MNx (BN-MNx).

Un total de 1000 cellules binucléées par condition est examiné pour la présence ou non d'un ou plusieurs MNx. Les données sont présentées comme le nombre de cellules binucléées avec un micronoyau pour 1000 cellules binucléées (% BN-1MN) pour les fibroblastes ; et comme le pourcentage de cellules binucléées avec des micronoyaux (% BN-MNx) analysé sur 1000 cellules binucléées pour les lymphocytes (de rat et humains).

➔ **Les cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs).**

Les ponts nucléoplasmiques (PNPs) résultent de la présence de chromosomes dicentriques dont les deux centromères ont été tirés vers les pôles opposés de la cellule durant l'anaphase et qui ont été ensuite recouverts d'une membrane nucléaire (Fenech, 2000).

Un total de 1000 cellules binucléées par condition est examiné pour la présence de PNPs. Les données sont présentées comme le nombre de cellules binucléées avec des PNPs pour 1000 cellules binucléées (% BN-PNPs) pour les fibroblastes, les lymphocytes de rat et les lymphocytes humains.

➔ **Les cellules mononucléées avec un, deux ou trois MNx (Mono-MNx).**

Elhajouji et ses collègues (1998) ont rapporté une nouvelle façon de distinguer les composés aneugènes et les composés clastogènes avec le test de numération des MNx avec blocage en cytotédière (CBMN). En effet, les auteurs ont montré que certains composés aneugènes augmentaient la fréquence des MNx dans les cellules mononucléées ainsi que dans les cellules binucléées, tandis que les composés clastogènes induisaient des MNx uniquement dans les cellules binucléées. Cette différence pourrait permettre la discrimination entre les MNx générés par les composés aneugènes et les composés clastogènes.

Les micronoyaux dans les cellules mononucléées sont comptabilisés lorsque leur diamètre est compris entre 1/16 et 1/3 du diamètre du noyau principal, quand ils sont de forme ronde, non réfringents, et que la structure de la chromatine et la couleur de coloration sont semblables à ceux du noyau principal.

Les cellules mononucléées avec ou sans MNx ont été examinées et les données sont présentées comme le pourcentage de cellules mononucléées avec des micronoyaux (% Mono-MNx) pour les fibroblastes, les lymphocytes de rat et les lymphocytes humains.

VII.2 Hybridation *in situ* de sondes pancentromériques

L'association de l'hybridation *in situ* fluorescente de sondes pancentromériques au test des MNx permet de différencier les MNx contenant des fragments chromosomiques acentromériques (MN centromère-négatif) et ceux contenant des chromosomes entiers (MN centromère-positif). Le but de l'hybridation *in situ* fluorescente est de mettre en évidence la présence d'un (ou plusieurs) centromère(s) au sein du MN (spot de fluorescence) témoin de la présence d'un chromosome entier (événement aneugène) ou l'absence de centromère au sein du MN (absence de spot de fluorescence) témoin de la présence de fragments chromosomiques (événement clastogène).

Le principe de l'hybridation est le suivant : les deux brins d'une molécule d'ADN sont appariés par des liaisons hydrogène qui s'établissent entre les paires AT et GC (cf. Figure 77). La dénaturation de l'ADN correspond à la rupture de ces liaisons entraînant la séparation des deux brins. Il est nécessaire de dénaturer l'ADN chromosomique (ADN-cible) pour former des hybrides. Les brins non ou mal hybridés sont éliminés par lavages et les hybrides spécifiques sont révélés par fluorescence.

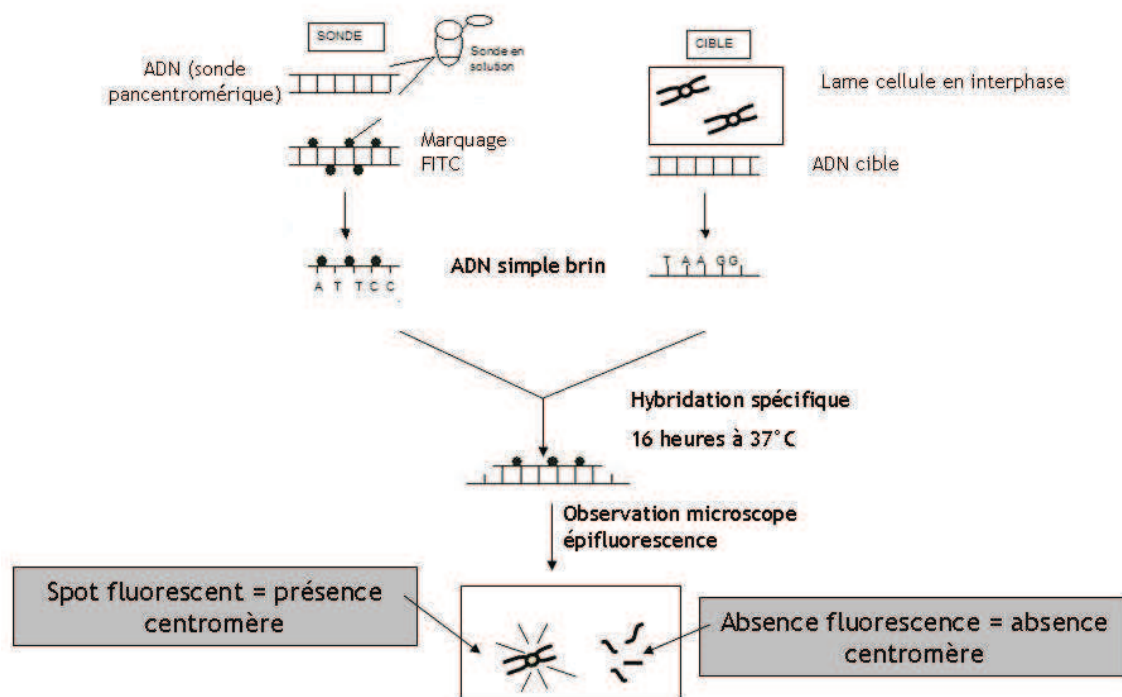


Figure 77. Hybridation *in situ* de sondes pancentromériques.

La technique FISH employée dérive de celles initialement décrites par Norppa et ses collaborateurs ainsi que par Migliore et ses collaborateurs (Norppa *et al.*, 1993 ; Migliore *et al.*, 1996).

L'hybridation fluorescente *in situ* avec sondes d'ADN spécifiques du centromère a été réalisée sur les fibroblastes embryonnaires de souris ainsi que sur les lymphocytes humains. Elle n'a pu être réalisée sur les lymphocytes de rats. En effet, à l'heure actuelle il n'existe pas de sondes spécifiques pour le rat.

Pour cela, nous avons utilisé une sonde pancentromérique de souris directement marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Adgenix, Voisins-le-Bretonneux, France ; Cambio, Cambridge, UK) pour les fibroblastes embryonnaires de souris ; et une sonde pancentromérique humaine directement marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Adgenix, Voisins-le-Bretonneux, France ; Cambio, Cambridge, UK) pour les lymphocytes humains. Ces sondes pancentromériques permettent d'identifier la région centromérique de chaque chromosome de souris ou d'Homme. Cette hybridation est pratiquée sur les cellules interphasiques préparées pour le test des MNx, fixées et conservées à -20°C. Au moment de l'hybridation, les cellules étalées sur lames congelées ont été ramenées à température ambiante.

VII.2.1 Prétraitement des lames

Les lames sont déshydratées dans de l'éthanol à l'occasion de 3 bains successifs de 2 minutes chacun dans de l'éthanol respectivement à 70 %, 90 % et 100 % afin d'empêcher une interférence avec l'acide et sont séchées à l'air ambiant puis stocker pour plusieurs jours. Les lames sont ensuite plongées dans de l'acétone pendant 10 min puis séchées. Les lames sont incubées pendant 1 heure à 37°C dans du 2x SSC (saline sodium citrate buffer) + RNase (100 µg.ml⁻¹) afin d'éviter que l'ARN cause des liaisons non spécifiques avec la sonde et produise un bruit de fond. Elles sont rincées dans du 2x SCC pendant 5 min puis dans du PBS pendant 5 min. L'excès de protéines est enlevé en incubant les lames avec de la pepsine (1 mg.ml⁻¹). Finalement, elles sont rincées par un bain de PBS pendant 5 min puis déshydratées par une série de lavages à l'éthanol (70 %, 90 % et 100 %).

VII.2.2 Dénaturation de l'ADN cible

L'immersion des lames, pendant 2 minutes à 70°C, dans une solution de formamide désionisée à 70 % dans du tampon 2x SSC entraîne la dénaturation de l'ADN des préparations chromosomiques. Les préparations sont ensuite immédiatement transférées dans des solutions de lavage consistant en 4 bains de 2 minutes chacun dans de l'éthanol froid à 70 %, puis dans des solutions d'éthanol successivement à 70, 90 et 100 %.

VII.2.3 Hybridation

La sonde (de souris ou d'Homme) directement marquée au FITC (Adgenix, Voisins-le-Bretonneux, France ; Cambio, Cambridge, UK) est fournie accompagnée d'une solution d'hybridation. La sonde est préalablement chauffée 5 min à 37°C. Après mélange avec le tampon d'hybridation, la sonde est dénaturée par chauffage à 85°C pendant 10 minutes, puis placée immédiatement dans la glace. Elle est alors déposée (25 µL) sur les lames dont l'ADN a été dénaturé (Cf. partie VIII.2.2) puis recouvert d'une lamelle en verre. Les lames sont ensuite conservées dans un milieu humide et incubées à 37°C pendant 16 heures.

VII.2.4 Rinçage post-hybridation

Ces rinçages ont pour but d'éliminer les hybrides illicites et la sonde non hybridée tout en préservant les hybrides spécifiques. Les lames sont immergées, sans agitation, successivement pendant 5 min à 37°C dans un bain de 2x SSC, puis dans 2 bains de 50 % formamide/2x SSC et enfin dans deux bains de 2x SSC à température ambiante.

VII.2.5 Coloration

Le contre marquage du matériel génétique est réalisé par addition sur chaque lame d'une goutte de DAPI Vectashield® (Abcys SA, France). Le Vectashield® permet de retarder la décroissance de la fluorescence sous l'action des photons. Les lames sont alors placées à 4°C et peuvent être observées au microscope à épifluorescence pendant une semaine.

VII.2.6 Lecture des lames

Les lames sont examinées sur un microscope à épifluorescence (Olympus BX61) équipé d'un objectif x60 et de deux filtres d'excitation, l'un pour l'observation du marquage au DAPI et l'autre pour le marquage au FITC. Dans un premier temps, les cellules binucléées avec un cytoplasme bien conservé et contenant un micronoyau sont recherchées en fluorescence DAPI. Quand une cellule binucléée avec un MN est repérée, le filtre est changé afin de détecter le marquage FITC, pour révéler les MNx contenant des signaux centromériques (MNx centromères-positifs ou MNx centromères-négatifs).

Pour chaque fibroblaste binucléé avec un MN, le nombre de spots de fluorescence (correspondant chacun à un centromère et donc à un chromosome) est enregistré au sein de chaque MN. Un total de 1000

cellules binucléées par condition est examiné pour la présence d'un micronoyau avec (BN-1MNC+) ou sans (BN-1MNC-) signaux centromériques.

Pour chaque lymphocyte binucléé avec des MNx (un ou plusieurs MNx), le nombre de spots de fluorescence (correspondant chacun à un centromère et donc à un chromosome) est enregistré au sein de chaque MN. Un total de 1000 cellules binucléées par condition est examiné pour la présence de micronoyau avec (BN-MNC+) ou sans (BN-MNC-) signaux centromériques. Les MNx centromériques (MNC+, contenant des chromosomes entiers) ont été classés en MNx monocentromériques (MNC1+) et en MNx multicentromériques (MNCx+) suivant le nombre de spots fluorescents (correspondant chacun à un centromère donc à un chromosome) au sein de chaque MN.

Toutes les analyses sont effectuées en aveugle et par le même opérateur.

VII.2.7 Expression des résultats

Tous les résultats sont exprimés pour 1000 cellules binucléées. Les paramètres enregistrés sont les suivants :

Fibroblastes embryonnaires de souris

Les cellules binucléées avec un MN (% BN-1MN), les cellules binucléées avec un MN acentromérique (% BN-1MNC-), les cellules binucléées avec un MN centromérique (% BN-1MNC+).

Lymphocytes humains

Les cellules binucléées avec des MNx (% BN-MNx), les cellules binucléées avec des MNx acentromériques (% BN-MNC-), les cellules binucléées avec des MNx centromériques (% BN-MNC+), les cellules binucléées avec des MNx contenant un seul centromère (% BN-MNC1+), les cellules binucléées avec des MNx contenant deux ou plusieurs centromères (% BN-MNCx+).

VIII. Détermination de la dose reçue par les cellules

Dans le cadre des contaminations cellulaires (fibroblastes embryonnaires de souris et lymphocytes humains), le dosage des différentes solutions de contamination a été réalisé systématiquement afin de vérifier la bonne concentration des solutions mères et des milieux de contamination.

Par ailleurs, les milieux après 24 heures de contamination ainsi que les culots cellulaires après 24 heures de contamination des fibroblastes embryonnaires de souris ont aussi été dosés afin de pouvoir définir la dose reçue par les cellules grâce à une modélisation mathématique.

Afin d'établir une relation entre les effets biologiques observés et la dose de rayonnement ionisant reçue par les cellules (fibroblastes embryonnaires de souris) de ce modèle *in vitro*, une modélisation mathématique a été réalisée. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Sandrine FRELON (pour ce qui est du dosage en ICPMS) et David BROGGIO (pour ce qui est de la modélisation mathématique).

VIII.1 Dosage de l'uranium: Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS)

Les mesures ont été réalisées sur un *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer* (ICPMS -VGPO Excell, Thermoelectron, France).

L'ICP-MS est une technique analytique destinée à quantifier les éléments par spectrométrie de masse à partir d'ions générés par un plasma d'argon à couplage inductif. Le bismuth sert d'étalon interne ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$), il est ajouté lors de la dilution de l'échantillon à analyser dans de l'acide nitrique ultra pur. L^{238}U et L^{235}U sont les deux ions quantifiés pour aboutir à une valeur en U total. Chaque échantillon est dosé cinq fois à partir d'une même dilution. La limite de détection théorique est de $1,07 \cdot 10^{-4} \mu\text{g.L}^{-1}$.

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

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

VIII.2.1 Préparation des solutions de milieux cellulaires

L'ICP-MS nécessite que l'échantillon à analyser soit sous forme liquide. De ce fait, la mesure de l'U dans les échantillons de milieux cellulaires contaminés et de culots cellulaires contaminés ne nécessite aucun traitement préalable si ce n'est leur acidification au moyen d'acide nitrique (ajout de 0,4 % d'acide nitrique concentré à 2 % dans chacun des échantillons).

Pour les fibroblastes de souris, les échantillons de milieux cellulaires contenant $0 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ et $500 \mu\text{M}$ d'UA ou d'UE ont été mélangés puis dilués à 2×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} et 1×10^{-7} , respectivement, dans de l'acide nitrique 2%.

Pour les lymphocytes humains, les échantillons de milieux cellulaires contenant $0 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ d'U ont été mélangés puis dilués à 2×10^{-3} , 4×10^{-4} , 2×10^{-4} , 4×10^{-5} , respectivement, dans de l'acide nitrique 2%.

VIII.2.2 Préparation des solutions pour les culots cellulaires

Pour les fibroblastes de souris, les culots cellulaires des échantillons contenant 0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM d'UA ou d'UE ont été bien dissous puis dilués à 2×10^{-1} , 1×10^{-1} , 1×10^{-1} , 2×10^{-3} et 1×10^{-4} , respectivement, dans de l'acide nitrique 0,4%.

VIII.2 Calcul Monte-Carlo de la dose induite par UE et UA pour des fibroblastes *in vitro*

VIII.2.1 Position du problème

Le but de cette étude est de modéliser les conditions d'irradiation des fibroblastes de souris contaminés *in vitro* par des mélanges d'UA ou d'UE. L'objectif final de cette étude étant de corrélérer les observations biologiques (taux de cellules binucléées avec un micronoyau, taux de cellules binucléées avec des pont nucléoplasmique, taux de cellules mononucléées avec des micronoyaux, etc.) relevées précédemment avec des quantités dosimétriques pertinentes.

Les contaminations étant réalisées à de très faibles concentrations en U, les conditions permettant une dosimétrie classique ne sont pas réunies. En effet, seule une très faible quantité de cellules est susceptible d'être atteinte par le rayonnement α . En conséquence la notion macroscopique de dose est inopérante. La distribution de dépôt d'énergie aux cellules (et aux noyaux) et le taux de cellule (noyaux) touchées sont donc calculés pour l'UA et l'UE, en fonction de la concentration. La première quantité donne la probabilité de dépôt d'énergie lorsque la cible est atteinte par le rayonnement, le second est le nombre attendu de cible effectivement touché. Un code de calcul a ainsi été développé.

VIII.2.2 Développement d'un code de calcul

VIII.2.2.a Données physiques d'entrée

Le code de calcul développé s'appuie sur les données expérimentales de base (dimension des fibroblastes, concentration des contaminants, isotopie des mélanges, durée de l'expérience, etc.) qui permettent de déterminer le nombre d'émission α durant la durée de l'expérience.

Les spectres d'émission de ^{234}U , ^{235}U , et ^{238}U sont simplifiés de manière à ne garder qu'un rayonnement α d'énergie moyenne pour chaque isotope (CIPR, 1983). Le dépôt d'énergie des rayonnements α est calculé en prenant en compte leur perte d'énergie dans l'eau liquide, dans l'approximation CSDA (*Continuos Slowing Down Approximation*) ; la relation énergie/parcours pour les α

dans l'eau est obtenue grâce à la base de données du NIST (Berger *et al.*, 2005). Les électrons secondaires émis lors du ralentissement des α ne sont donc pas pris en compte par la suite.

VIII.2.2.b Modélisation des fibroblastes en réseau

Afin de pouvoir réaliser la modélisation mathématique des fibroblastes, nous avons dû obtenir des informations morphométriques (cf. Figure 78) sur les fibroblastes afin de modéliser ces cellules. Des photos au microscope électronique ont été réalisées pour définir une taille moyenne des fibroblastes.

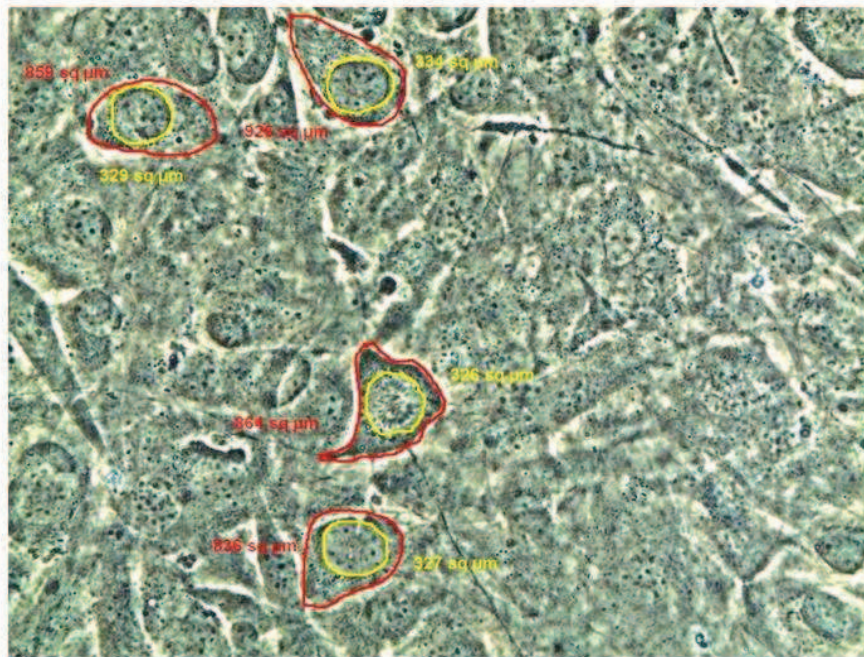


Figure 78. Photographie de fibroblastes à confluence

Les fibroblastes sont modélisés comme des volumes dont chaque coupe axiale est une ellipse dont le rapport des longueurs des axes est constant (cf. Figure 79 A, 79 B et 79 C). Une équation paramétrique permet de décrire la forme voulue, et notamment d'obtenir un recouvrement du noyau par le cytoplasme conforme à la réalité (cf. Figure 79 D). En effet, la forme de la cellule a été analytiquement définie par une surface paramétrique de la forme $(X = x(t, \theta), Y = y(t, \theta), Z = t)$, telle qu'elle définit dans tous les plans Z une ellipse dont le ratio des axes long et court a été fixé. Ce ratio a été déterminé après observation et mesure des images microscopiques des cellules à modéliser. La surface « adhérente » des fibroblastes est une ellipse de demi-axes de 22 μm (long) et 12,6 μm (court). À l'intérieur de la cellule le noyau est aussi modélisé par une sphère de rayon 10 μm . La hauteur totale de la cellule est de 20 μm , ainsi le noyau affleure parfaitement le sommet de la cellule.

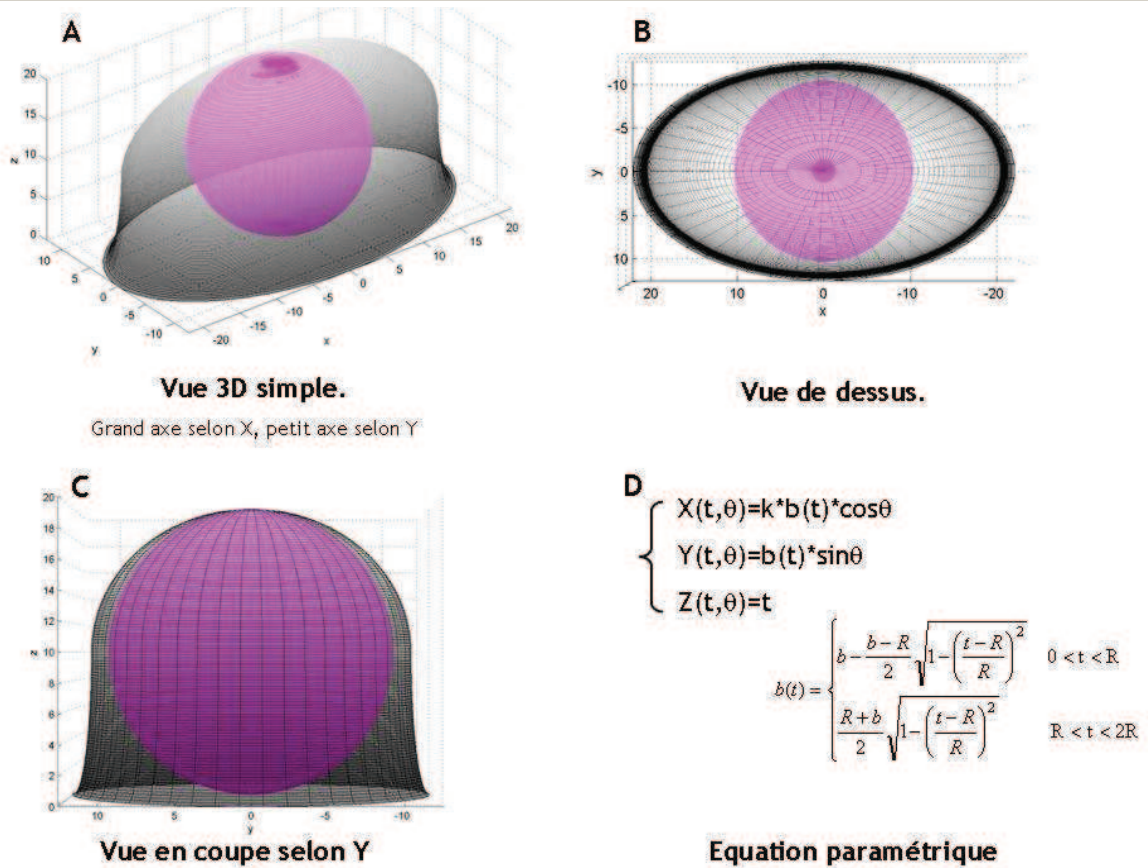


Figure 79. Modélisation des fibroblastes

(A) Vue 3D simple. (B) Vue de dessus. (C) Vue en coupe selon Y. (D) Équation paramétrique décrivant la forme souhaitée d'un fibroblaste

Pour modéliser les fibroblastes à confluence, un réseau de compacité maximum (minimisant l'espace libre entre les cellules) est réalisé en plaçant les cellules individuelles de manière adéquate. Un total de 5000 cellules est ainsi considéré lors des simulations (cf. Figure 80). Un nombre important de cellules permet de réduire les "effets de bord" lors du calcul (la perte de particules simulées sortant du volume décrit). La description paramétrique des fibroblastes permet de calculer leur surface et volume de manière rigoureuse. Différentes surfaces paramétriques ont été essayées jusqu'à l'obtention d'une forme réaliste.

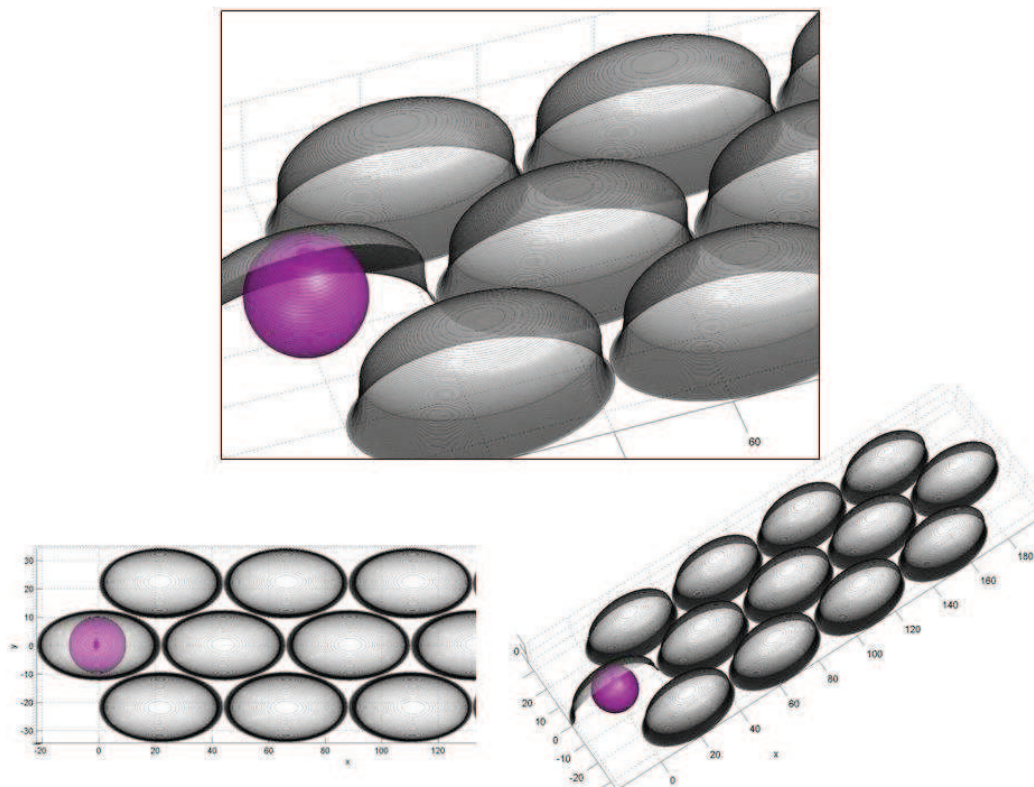


Figure 80. Construction d'un réseau de fibroblastes

VIII.2.2.c Principe de l'algorithme développé

Le code de calcul développé permet de générer une distribution uniforme de la source, de développer aléatoirement les directions d'émission des particules et de suivre leur ralentissement dans le milieu. La distribution peut être fixée dans le noyau, le cytoplasme ou à l'extérieur, en prenant en compte les valeurs de concentrations d'U mesurées expérimentalement. Pour suivre les particules dans le milieu, l'énergie est échantillonnée de manière uniforme. Pour chaque énergie échantillonnée, la localisation du rayonnement alpha est enregistrée, si bien que les dépôts d'énergie aux cibles d'intérêt sont facilement calculés. Le dépôt d'énergie calculé est simplement obtenu comme la différence d'énergie entre l'entrée et la sortie de la cible. Le code développé permet également d'obtenir le taux de cibles atteintes. Il faut noter que la structure périodique du réseau construit permet de simplifier les calculs, puisque on se ramène systématiquement à une maille élémentaire.

« *La probabilité d'un impact* » (en anglais « one hit probability ») est obtenue en deux étapes. Dans un premier temps, connaissant la durée expérimentale, l'activité spécifique, la concentration et la composition isotopique de l'UA et de l'UE, le volume simulé, le nombre total de désintégration dans ce volume est calculé pour chaque isotope. Dans un deuxième temps, le nombre moyen d'événements à un coup est calculé pour un nombre important de particules, puis ramené au nombre de particules émises

dans le volume. De cette manière, la précision sur la "probabilité de un coup" est meilleure. Quand l'U est dans le cytoplasme il est supposé qu'une désintégration donne un coup à la cellule, mais pas au niveau du noyau et dans ce cas "la probabilité d'un coup" doit être calculée (du cytoplasme l'alpha peut partir vers l'extérieur de la cellule plutôt que vers le noyau).

IX. Traitement statistique des résultats

IX.1 Fibroblastes embryonnaires de souris

IX.1.1 Schéma factoriel

Le modèle statistique suivant a été considéré : deux mélanges isotopiques d'U (UA et UE) ont été combinés dans un schéma factoriel à quatre concentrations (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM). Nous avons donc généré via ce modèle 8 lots expérimentaux (cf. Figure 81).

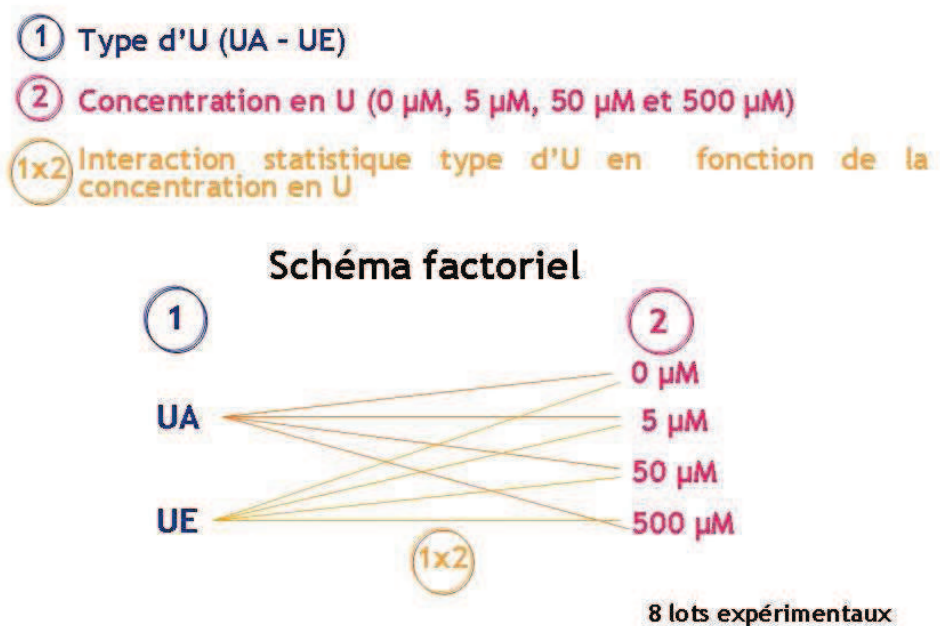


Figure 81. Modèle mathématique dans lequel deux mélanges isotopiques d'U (UA et UE) sont combinés dans un schéma factoriel à 4 concentrations (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM)

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS (*Statistical Analysis Systems*, 1999) avec la procédure CATMOD (Categorical Modelling). Les variables qualitatives :

- pourcentage de cellules mortes,
- pourcentage de cellules en sub G0-G1,
- nombre de foyers γ -H2AX par cellules,
- pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire

- pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire après marquage

BrdU

- intensité moyenne de fluorescence (% par rapport au contrôle) : étude EROs
- %o cellules BN-1MN,
- %o cellules BN-1MNC+,
- %o cellules BN-1MNC-,
- %o cellules BN-PNPs

- CBPI (*Cytokinesis-Block Proliferation Index*) ont été analysées avec un test χ^2 généralisé (procédure Catmod : Categorical Modelling). Dans cette analyse, nous avons testé les effets du type d'U (UA et UE) (cf. Figure 81 ^①), de la concentration en U (0 μ M, 5 μ M, 50 μ M et 500 μ M) (cf. Figure 81 ^②) et de l'interaction type d'U x concentration en U (cf. Figure 81 ^{①x②}). La méthode des contrastes a été utilisée pour comparer 2 à 2 les niveaux de chaque facteur.

Pour les contrôles positifs aneugène et clastogène, la méthode des contrastes a été utilisée pour comparer chaque contrôle (contrôle non contaminé (0 μ M) vs Mitomycine C, contrôle non contaminé (0 μ M) vs Vincristine Sulfate et Mitomycine C vs Vincristine Sulfate).

IX.1.2 Test des comètes

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

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

A partir des paramètres individuels (c'est-à-dire les 400 OTM), il est donc possible d'obtenir la distribution de ces valeurs, et ceci en passant par la détermination de fréquences normalisées (50 classes entre les valeurs minimales et maximales). L'utilisation du logiciel TableCurve 2D (Jandel, version 5.0) permet ensuite de trouver l'équation de la fonction χ^2 qui représente le mieux cette distribution et de déterminer la valeur du degré de liberté n, qui est renommé OTM χ^2 . On obtient donc une valeur OTM χ^2 par condition.

IX.1.3 Expression des gènes de réparation de l'ADN

L'analyse des données obtenues par RT-PCR, sur l'étude des gènes de réparation de l'ADN, a été effectuée à partir d'un fichier fournit par Superarray®. Dans un premier temps, la moyenne des cycles seuils (Ct) obtenus pour les 5 gènes de référence (Actb, Gapdh, Gusb, Hprt1 et Hsp90ab1) est utilisée pour normaliser les données des gènes d'intérêts. Cette normalisation permet de s'affranchir des variations potentielles entre les plaques. Ensuite, les données obtenues pour les cellules après contamination par l'U sont comparées aux données obtenues pour les cellules contrôles. L'équation suivante résume ces deux étapes de l'analyse :

$$\frac{2^{-[\text{Ct}(\text{GOI}) - \text{Ct}(\text{HK})] \text{ expt}}}{2^{-[\text{Ct}(\text{GOI}) - \text{Ct}(\text{HK})] \text{ control}}}$$

avec **GOI** = Gene Of Interest, gène d'intérêt

HK = HouseKeeping gene , gène de normalisation

Ainsi, on considère qu'il y a surexpression du gène lorsque la valeur obtenue est supérieure à 2 et on considère qu'il y a sous-expression quand la valeur est inférieure à 0,5. Le test statistique du Chi2 a été utilisé pour savoir si les valeurs obtenues étaient significatives avec $p < 0,05$.

IX.2 Lymphocytes de rat

Les données du test de numération des micronoyaux (cellules BN-MNx, Cellules BN-PNPs, cellules Mono-MN, et CBPI) ont été traitées à l'aide du logiciel SAS ([Statistical Analysis Systems, 1999](#)). La significativité des différences entre les moyennes des échantillons contaminés (UA et UE) et des

échantillons contrôles non contaminés a été évaluée à l'aide de la méthode des contrastes pour $p < 0,05$. Une analyse statistique similaire a été réalisée pour tester les différences entre les moyennes des échantillons contaminés avec l'UA et l'UE.

IX.3 Lymphocytes humains

Les données obtenues avec les fibroblastes embryonnaires de souris et les lymphocytes de rat ont permis d'identifier uniquement des marqueurs de génotoxicité et de radiotoxicité de l'U.

L'objectif de l'étude étant de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U, une nouvelle étude (avec un nouveau modèle statistique) a été définie afin de pouvoir au mieux répondre à cet objectif ; en effet en comparant UA et UE, des marqueurs de radiotoxicité ont pu uniquement être identifiés. Pour dissocier l'influence respective des 2 facteurs (effet chimique et effet radiotoxique), trois niveaux de l'effet chimique (3 concentrations différentes : A1 (0,5 μM), A2 (5 μM) et A3 (50 μM)) ont été combinés dans un schéma factoriel à trois niveaux de l'effet radiologique (3 activités différentes : A1 (175 Bq/L), A2 (1750 Bq/L) et A3 (17500 Bq/L)) (cf. Figure 82).

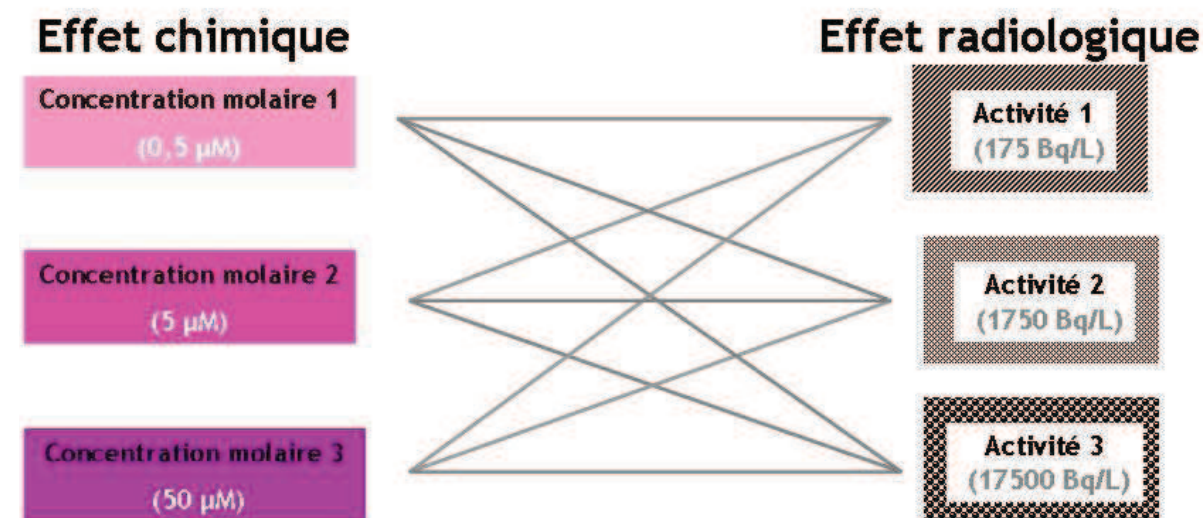


Figure 82. Schéma factoriel défini pour discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'uranium. Trois niveaux de l'effet chimique (concentration) ont été combinés dans un schéma factoriel à trois niveaux de l'effet radiologique (activité). Pour pouvoir dissocier ces 2 effets (chimique et radiologique), il faut pour 3 concentrations différentes avoir une seule activité fixe et inversement pour 3 activités différentes avoir une seule concentration fixe. Si les 2 effets bougent en même temps impossible de dissocier ces 2 effets.

Toutes les données ont été analysées en utilisant le logiciel SAS (*Statistical Analysis Systems, 1999*). Toutes les variables (cellules BN-MNx, cellules BN-MNC+, cellules BN-MNC1+, cellules BN-MNCx+, cellules BN-MNC-, cellules BN-PNPs, et cellules Mono-MNx) ont été analysées en tant que variables de Bernoulli

(intervalle 0-1) par analyse de variance à l'aide de la procédure « Proc mixed » de SAS. Le modèle statistique comprend deux effets fixes :

- effet chimique avec la concentration molaire en U avec trois niveaux (C1, C2 et C3)

- et effet radiologique avec l'activité volumique en U avec trois niveaux (A1, A2 et A3). L'interaction entre les 2 effets fixes, concentration molaire en U x activité volumique en U, a aussi été testée. Aucune interaction significative entre les deux facteurs (concentration molaire en U et activité volumique en U) n'a été notée pour les différents paramètres analysés. L'effet du donneur a été considéré comme un terme aléatoire.

RESULTATS / DISCUSSION



Dans ce chapitre, l'ensemble des résultats obtenus à l'issue des différentes expérimentations menées est exposé. Afin d'en faciliter la lecture, un ensemble de conventions graphiques a été respecté tout au long de ce document. Ces conventions sont décrites dans la **Figure 83**.

Un schéma synthétique propre à chacune des expérimentations menées est d'abord proposé de manière à synthétiser leurs objectifs, les conditions testées, et les analyses réalisées. Les représentations graphiques relatives aux résultats obtenus suivent par le biais des différentes analyses réalisées.

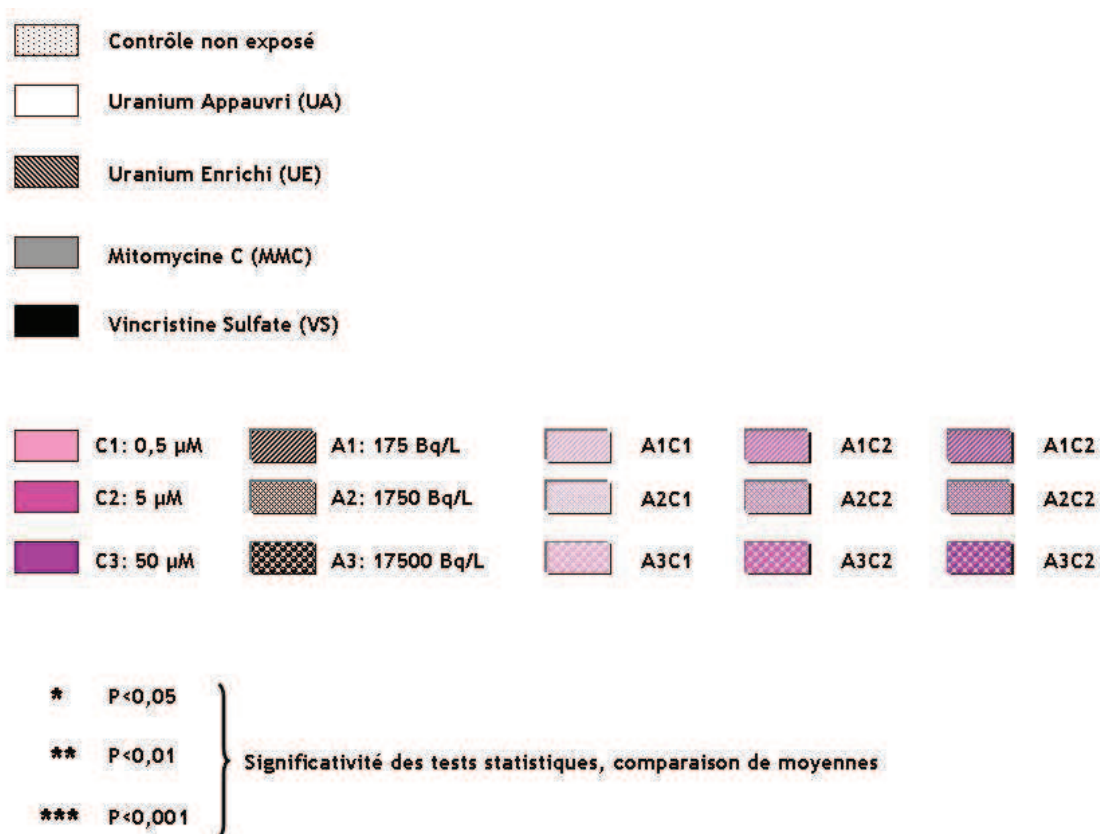


Figure 83. Conventions graphiques respectées dans ce manuscrit

*Partie A. Étude sur les
fibroblastes
embryonnaires de souris
in vitro*

Tableau 13. Tableau de synthèse des études réalisées sur les fibroblastes embryonnaires de souris

Objectifs	Techniques utilisées	Conditions testées	Réplicats par condition
Type cellulaire étudié	Fibroblastes embryonnaires de souris C3H10T1/2		
Analyses réalisées	Recherche de marqueurs biologiques permettant de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques Observer si les lésions de l'ADN détectées sont dépendantes de la composition isotopique de l'U utilisé		
Cytotoxicité	Coloration au Bleu de Trypan	UA et UE 0 µM 5 µM 50 µM et 500 µM	100 cellules minimum en triple
	Analyse sub G0-G1 en cytométrie de flux		10 000 cellules en double
Génotoxicité	Test des comètes		200 cellules en double
	Numération des micronoyaux (MNx) : - Binucléées avec un MN (BN-1MN) - Binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) - Mononucléées avec des MNx (Mono-MNx)		1000 cellules binucléées en double
	Hybridation <i>in situ</i> de sondes pancentromériques (FISH) : - Binucléées avec un MN centromère-positif (BN-1MNC+) - Binucléées avec un MN centromère-négatif (BN-1MNC-)		1000 cellules binucléées en double
Étude du stress oxydant (EROs)	Immunofluorescence γ-H2AX		200 cellules en double
Mécanisme de réparation des lésions de l'ADN	Marquage au DCF-DA		10 000 cellules en double
Étude du cycle cellulaire	Étude de l'expression des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation par RT-PCR		En double
	Cycle cellulaire en cytométrie de flux		10 000 cellules en double
Calcul de la dose reçue par les cellules	Blocage dans le cycle cellulaire en cytométrie de flux (BrdU)		10 000 cellules en double
	Dosage ICPMS		En double
	Modélisation mathématique		

RESULTATS

I. Mortalité cellulaire des fibroblastes embryonnaires après exposition à l'uranium appauvri ou à l'uranium enrichi

Dans nos conditions expérimentales, l'UE (12 % en ^{235}U) a une activité spécifique environ 20 fois plus élevée que l'UA (0,3 % en ^{235}U).

I.1 Test de cytotoxicité

Les cellules sont exposées à confluence (80 % en G0-G1) pendant 24 heures à différentes concentrations d'UA ou d'UE (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM), ou avec les contrôles positifs génotoxiques (Mitomycine C : 1,5 μM et Vincristine Sulfate : 16 μM). Un test de mortalité cellulaire est réalisé après ces 24 heures de contamination à l'aide d'une coloration au bleu Trypan.

Aucune toxicité n'a été observée après la contamination avec les différentes concentrations testées d'UA ou d'UE (5 μM , 50 μM et 500 μM) (cf. Figure 84 A) ainsi qu'avec les contrôles positifs génotoxiques (Mitomycine C et Vincristine Sulfate) (cf. Figure 84 B) par rapport au contrôle non exposé (0 μM) avec la technique de coloration au bleu Trypan (mort cellulaire < 2 %).

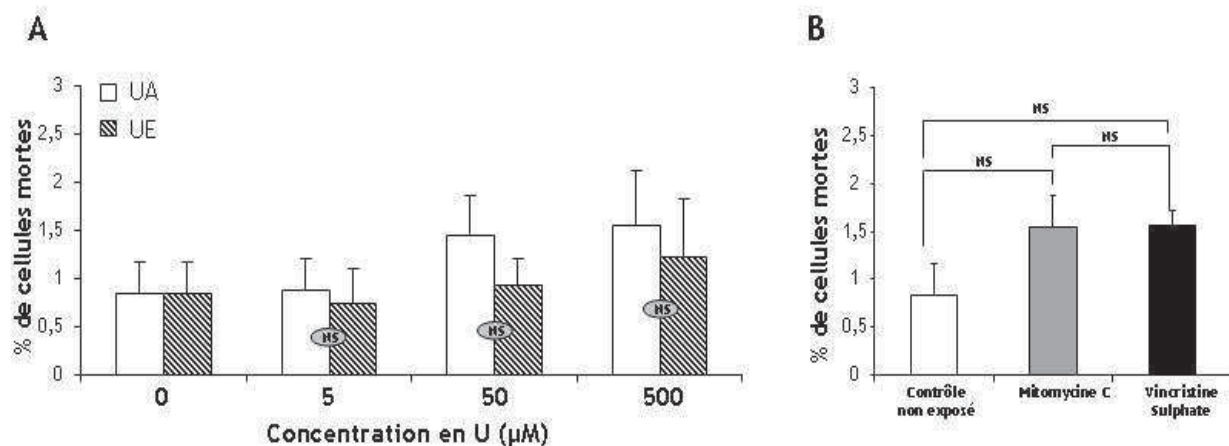


Figure 84. Effet de l'uranium appauvri (UA : barres blanches) ou de l'uranium enrichi (UE : barres hachurées et grisées) (A) et de la Mitomycine C (contrôle positif clastogène : barre grise) ou de la Vincristine Sulfate (contrôle positif aneugène : barre noire) (B) sur la mortalité cellulaire (moyenne du pourcentage de fibroblastes morts \pm SD) après 24 heures d'exposition à l'aide d'une coloration au bleu Trypan

NS : (A) aucune différence statistiquement significative entre UA et UE (méthode des contrastes) - (B) aucune différence statistiquement significative entre les contrôles positifs génotoxiques et le contrôle non exposé (méthode des contrastes).

1.2 Évaluation de la population cellulaire en sub G0-G1

Une augmentation du pourcentage de cellules en sub G0-G1 indique l'induction de l'apoptose. Les résultats obtenus précédemment ont été confirmés par des expériences de cytométrie en flux. En effet, le pourcentage de cellules en sub G0-G1 n'a pas été significativement modifié après la contamination avec les différentes concentrations d'UA ou d'UE (cf. Figure 85 A), ainsi qu'après la contamination avec la Mitomycine C (1,5 μ M) ou la Vincristine Sulfate (16 μ M) (cf. Figure 85 B).

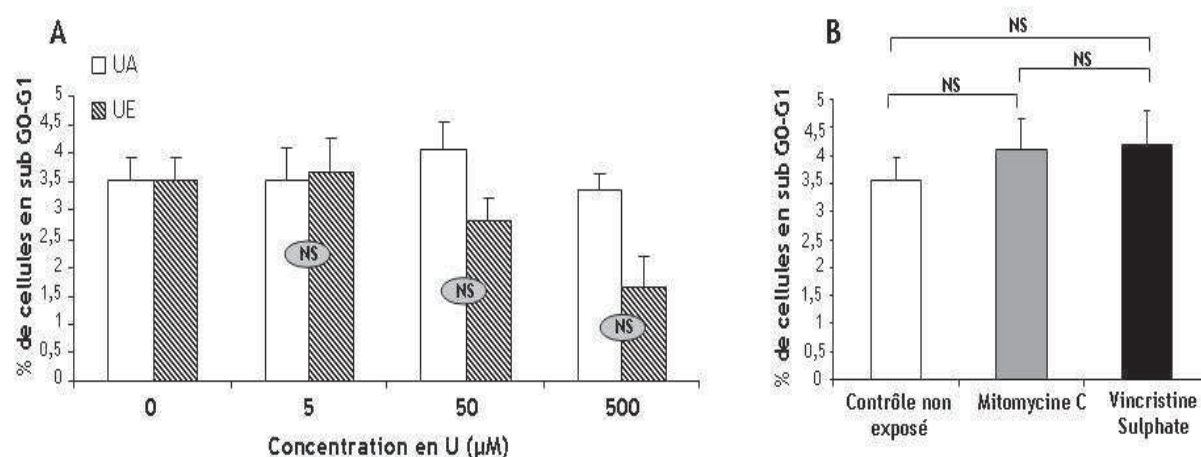


Figure 85. Effet de l'uranium appauvri (UA : barres blanches) ou de l'uranium enrichi (UE : barres hachurées et grisées) (A) et de la Mitomycine C (contrôle positif clastogène : barre grise) ou de la Vincristine Sulfate (contrôle positif aneugène : barre noire) (B) sur la mortalité cellulaire (sub G0-G1). Le pourcentage de cellules en sub G0-G1 a été mesuré en cytométrie de flux.

NS : (A) aucune différence statistiquement significative entre l'UA et l'UE (méthode des contrastes) - (B) aucune différence statistiquement significative entre les contrôles positifs génotoxiques et le contrôle non exposé (méthode des contrastes).

Nous pouvons par conséquent conclure de ces deux études que les expositions à l'UA et à l'UE ne sont pas cytotoxiques pour toutes les concentrations testées lors de notre étude.

II. Étude des lésions primaires de l'ADN

II.1 Le test des comètes

Les lésions primaires de l'ADN (cassures simple et double brin et les sites labiles en condition alcaline) sont analysés par la version alcaline du test des comètes après 24 heures d'exposition des fibroblastes embryonnaires de souris C3H10T1/2 à différentes concentrations d'UA ou d'UE (5 μ M, 50 μ M et 500 μ M). Pour chaque échantillon, 400 cellules (2 x 200 cellules) ont été analysées. L'augmentation de l'Olive Tail Moment (OTM) a été utilisée pour quantifier les dommages de l'ADN dans les cellules

individuelles et l' $OTM\chi^2$ pour quantifier le taux de lésions au niveau des échantillons. Ainsi, il a été possible de comparer l' $OTM\chi^2$ de chaque concentration avec l' $OTM\chi^2$ du groupe contrôle non exposé.

II.1.1 Contrôle positif (10 μM H_2O_2)

Le contrôle positif a été réalisé en exposant les cellules à une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 10 μM pendant 30 min à 37°C. L'analyse de ces cellules à cette concentration (cf. Figure 86 A) montre que la totalité des noyaux se trouvent sous la forme de comètes très diffuses. Les queues sont longues et contiennent de multiples fragments d'ADN. De plus, l'histogramme représentant la distribution des fréquences (cf. Figure 86 B) montre que les valeurs sont très dispersées. La totalité des cellules ont subi un stress oxydant induisant des cassures simple brin de l'ADN et des bases oxydées principalement et cela est mis en évidence par les valeurs élevées que prennent les $OTM\chi^2$. Ce contrôle positif démontre l'efficacité du test des comètes en condition alcaline pour détecter les cassures de brin d'ADN générées par le puissant agent oxydant qu'est le peroxyde d'hydrogène.

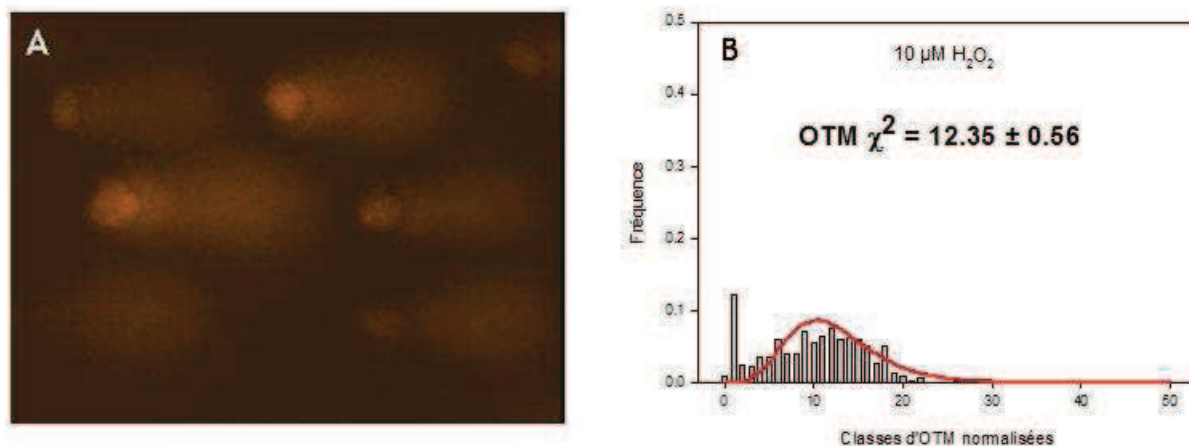


Figure 86. Noyaux des cellules traitées avec une solution d' H_2O_2 à 10 μM (A) ; Distribution des $OTM\chi^2$ après contamination de cellules avec une solution d' H_2O_2 à 10 μM (B)

II.1.2 Contamination à l'uranium appauvri ou à l'uranium enrichi

L'observation microscopique des comètes, issues des cellules contaminées par les différentes solutions d'UA ou d'UE (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM) met en évidence l'évolution de celles-ci en fonction du nombre de dommages de l'ADN. Les différentes morphologies des cellules obtenues au cours de cette étude avec leurs valeurs calculées d' OTM sont illustrées dans la Figure 87.

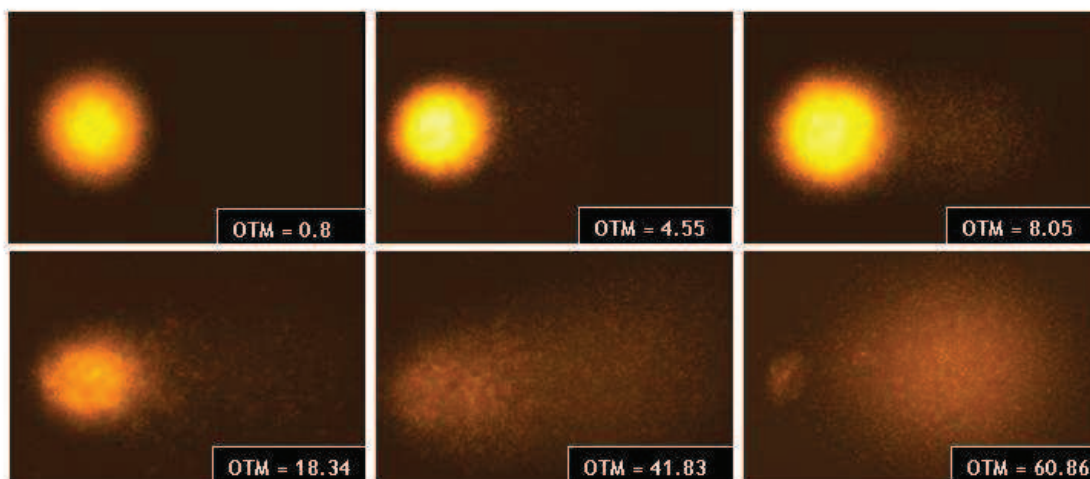


Figure 87. Différents niveaux de fragmentation de l'ADN observables par le test des comètes après contamination des cellules C3H/10T1/2 par l'uranium enrichi

Les OTM_{χ^2} calculés pour les populations cellulaires contaminées par l'UA (cf. Figure 88) ou par l'UE (cf. Figure 89) ont été représentés tout d'abord sous la forme d'une distribution. Les histogrammes représentent les fréquences normalisées de 400 comètes analysées par condition regroupées par classe (50 classes d' OTM_{χ^2} ont été réalisées entre les valeurs minimales et maximales). Chaque histogramme représente la distribution des OTM pour une concentration d'U.

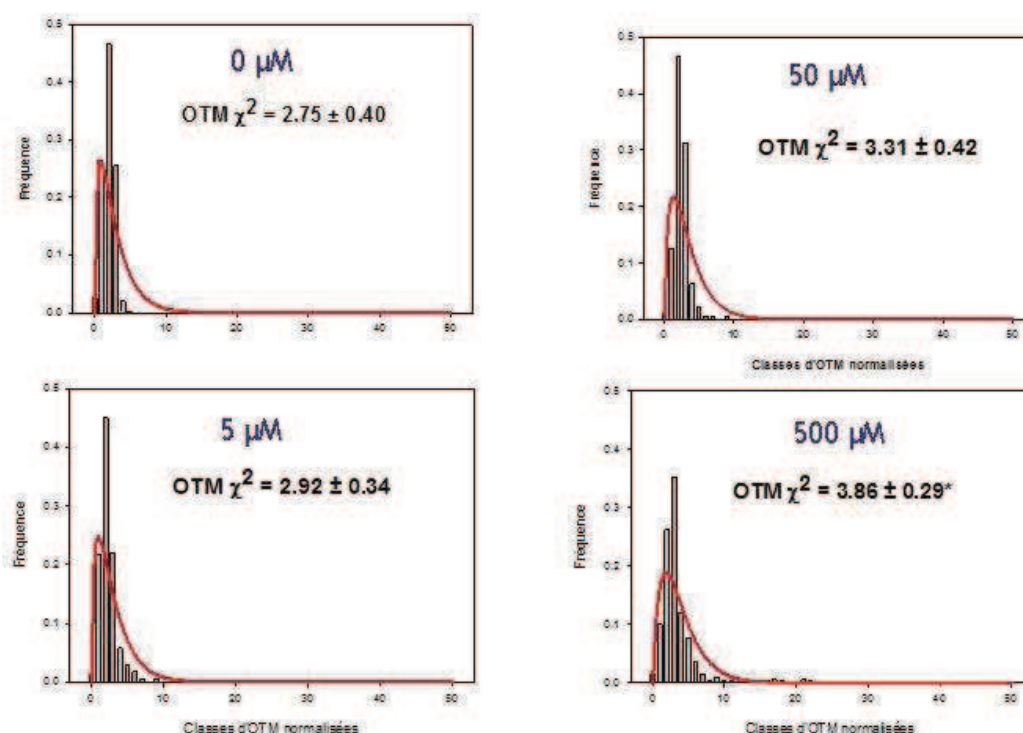


Figure 88. Histogrammes des distributions de fréquences rangées par classes d'OTM (pas de variation 2 ua OTM) pour chaque concentration de contamination d'UA (0 μM, 5 μM, 50 μM et 500 μM)

La fonction χ^2 est représentée en rouge

* : $P < 0,05$

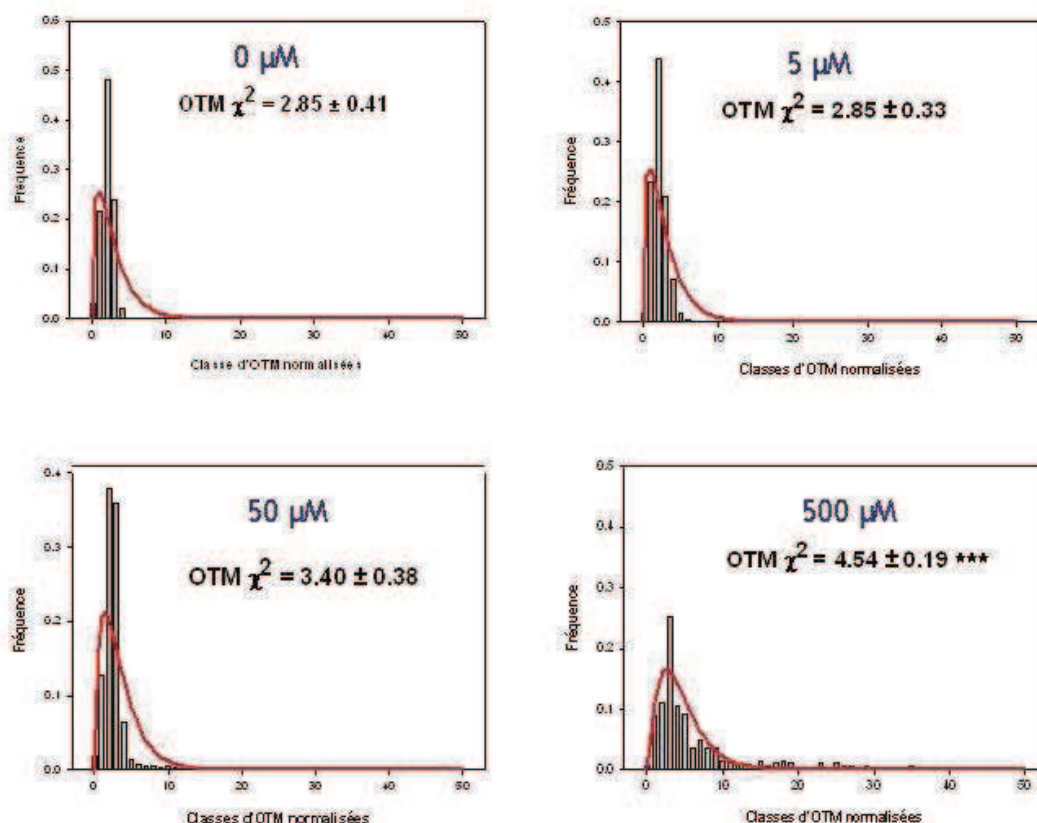


Figure 89. Histogrammes des distributions de fréquences rangées par classes d'OTM (pas de variation 2 ua OTM) pour chaque concentration de contamination de UE (0 μM, 5 μM, 50 μM et 500 μM)

La fonction χ^2 est représentée en rouge

*** : $P < 0,001$

L'analyse des histogrammes montre les distributions des $OTM\chi^2$ non gaussiennes. Les distributions sont monodispersées et suivent une loi de χ^2 . Les dispersions augmentent avec les concentrations en U mais il n'y a pas de décalage des distributions comme on peut l'observer avec l'exposition à l' H_2O_2 . La majorité des valeurs prises par les $OTM\chi^2$ pour toutes les concentrations de contamination sont comprises comme pour le contrôle non exposé entre 0 et 6. Ce qui évolue de façon significative avec les fortes concentrations et le nombre de comètes avec un $OTM\chi^2$ élevé. Ce phénomène est observé majoritairement après une contamination à 500 μM d'UE.

Comme le laissait entendre l'analyse des histogrammes de distribution des $OTM\chi^2$, il y a une augmentation des $OTM\chi^2$ moyens qui est fonction de la concentration en U. En ce qui concerne la contamination aux faibles concentrations d'U (5 μM et 50 μM d'UA et d'UE), il n'y a pas de différences significatives des $OTM\chi^2$ comparativement au contrôle non exposé. La valeur des $OTM\chi^2$ pour les contrôles non exposés sont de $2,75 \pm 0,40$ et $2,85 \pm 0,41$ pour les expériences avec UA et UE respectivement. Ces valeurs augmentent progressivement pour atteindre des valeurs de $3,86 \pm 0,29$ ($P < 0,05$) et $4,54 \pm 0,19$ ($P < 0,001$) pour une contamination à 500 μM d'UA et d'UE respectivement.

L'augmentation des $OTM\chi^2$ semble être davantage liée à l'activité spécifique du mélange uranifère. L'augmentation des dommages pourrait provenir de l'effet radiotoxique de l'U. En effet, les comparaisons des $OTM\chi^2$ avec les contrôles montrent des différences plus marquées avec UE.

Le test des comètes a donc permis de visualiser l'ensemble des lésions de l'ADN (sites labiles en condition alcaline, cassures simple et double brin) mais il n'est pas possible de dire s'il y a un type de dommage particulier engendré par l'effet radiotoxique de l'U. Ces données demandent par conséquent à être complétées. Le marquage par immunofluorescence de l'histone γ -H2AX permettra de visualiser spécifiquement les cassures double brin, lésions de l'ADN connues pour être radio-induites.

II.2 Visualisation par immunofluorescence de l'histone γ -H2AX

L'histone H2AX se trouve phosphorylée en γ au voisinage des cassures double brin de l'ADN sur une région allant jusqu'à deux mégabases dans les cellules de mammifères. Par conséquent, l'exploitation de cette caractéristique permet de visualiser un seul type de dommage de l'ADN décrit dans la littérature comme induit par la radiotoxicité de U : les cassures double brin (CDBs).

II.2.1 Contrôles positifs

Le protocole d'immunofluorescence γ -H2AX a été mis au point en utilisant de la Mytomycine C (agent radiomimétique). Des spots de fluorescence, visible sur la [Figure 90](#), ont pu être observés montrant ainsi la bonne fixation des anticorps. Aucun comptage de foyers γ -H2AX n'a été réalisé sur ces témoins positifs.

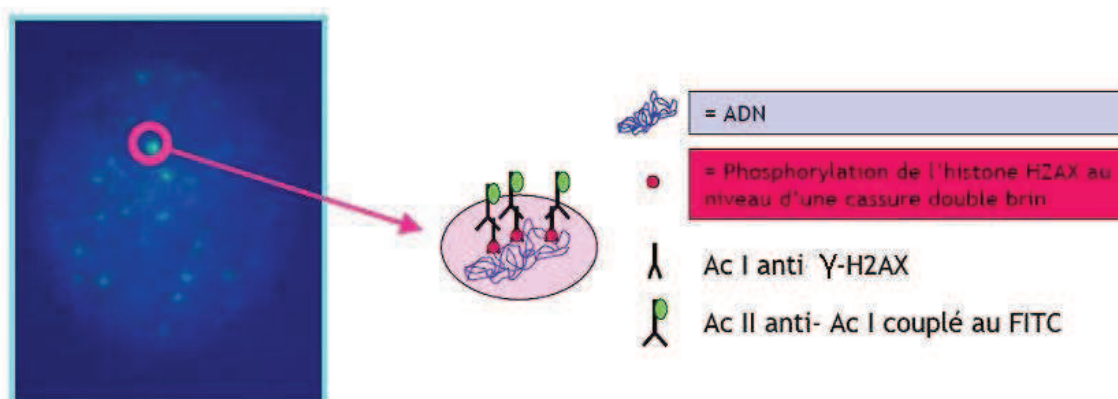


Figure 90. Observation microscopique (x60) d'une cellule C3H10T1/2 après contamination par la Mitomycine C et après marquage immunologique de l'histone H2AX phosphorylée (γ -H2AX)

II.2.2 Contamination à l'uranium appauvri ou à l'uranium enrichi

Les foyers γ -H2AX, générés dans le noyau cellulaire en réponse à des cassures double brin, sont analysés après 24 heures d'exposition des fibroblastes embryonnaires de souris C3H10T1/2 à différentes concentrations d'UA ou d'UE (5 μ M, 50 μ M et 500 μ M). La Figure 91 illustre le type de marquage obtenu au cours de cette étude.

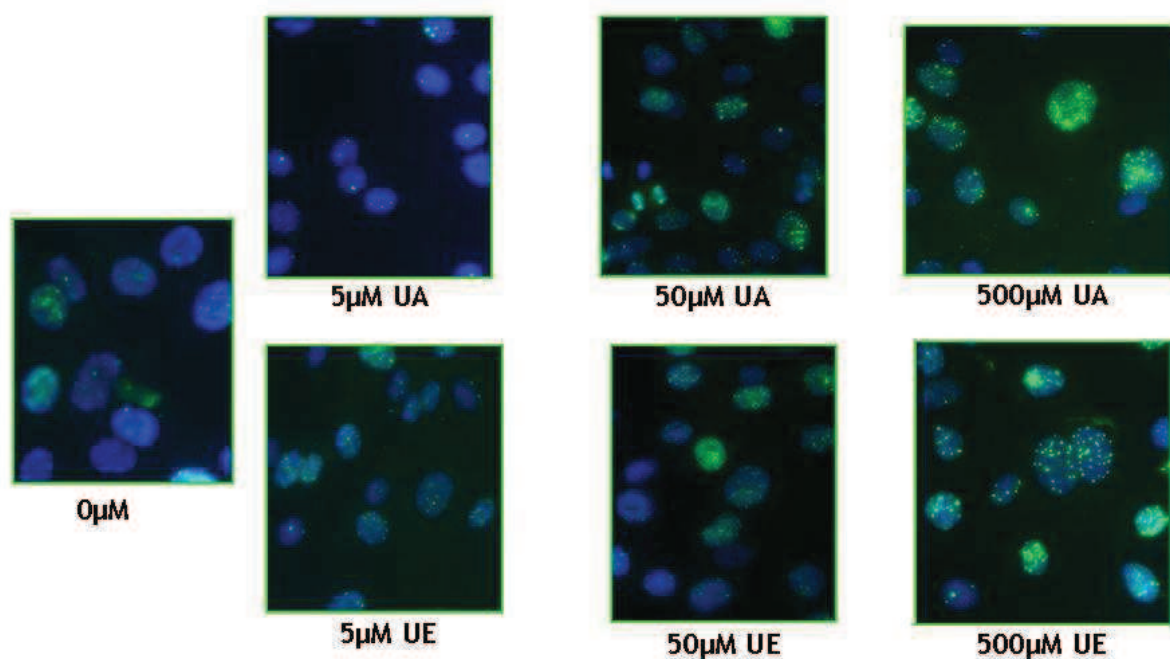


Figure 91. Induction de cassures double brin dans les cellules C3H10T1/2 après exposition aux différentes concentrations d'UA ou d'UE (5 μ M, 50 μ M et 500 μ M)

Dans les cellules contrôles non exposées, un léger signal γ -H2AX a été détecté. En effet, un peu moins de 2 foyers γ -H2AX par cellules sont formés dans les cellules contrôle non exposées. La production de foyers γ -H2AX après exposition à l'U est influencée à la fois par la concentration en U ($P < 0,001$) et par le type d'U ($P < 0,001$), sans aucune interaction (cf. Figure 92). Par conséquent, la concentration en U et le type d'U sont bien dissociables ; l'un ne dépend pas de l'autre.

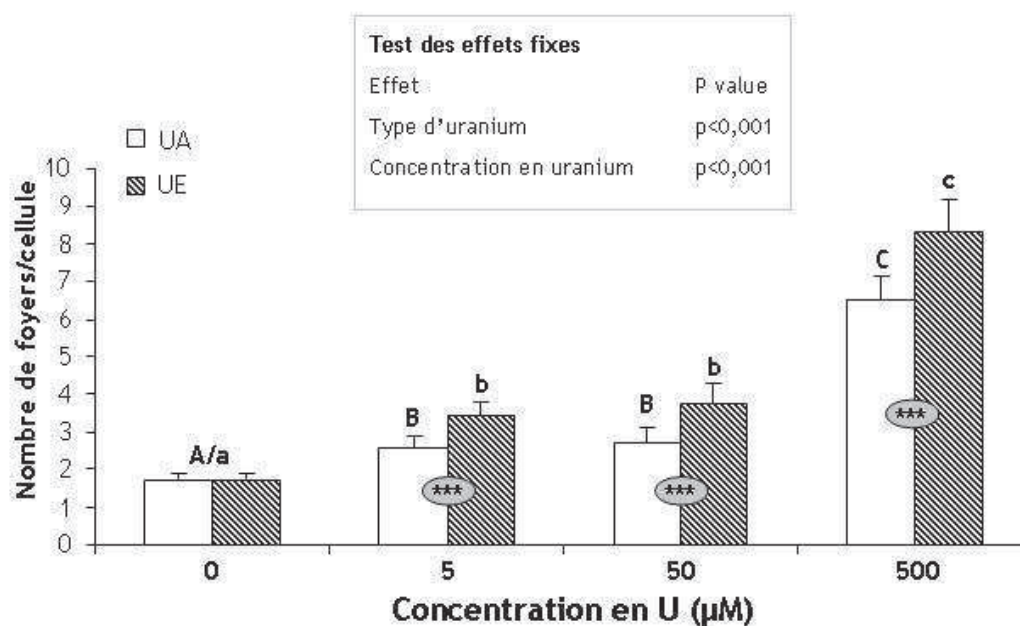


Figure 92. Induction de cassures double brin dans les cellules C3H10T1/2 après contamination par l'uranium appauvri (UA : barres blanches) ou par l'uranium enrichi (UE : barres hachurées et grisées) après marquage immunologique de l'histone H2AX phosphorylée (γ -H2AX)

Les cellules sont exposées pendant 24 heures à différentes concentrations d'UA ou d'UE (5 μ M, 50 μ M et 500 μ M). Après immunomarquage, le nombre de foyers nucléaires est compté manuellement dans chaque noyau cellulaire. Deux cent cellules sont recensées. Les résultats sont indiqués en moyenne \pm SD.

A, B, C : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes (méthode des contrastes) entre les concentrations d'UA ($P < 0,05$)

a, b, c : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes (méthode des contrastes) entre les concentrations d'UE ($P < 0,05$)

*** $P < 0,001$ Différence statistiquement significative entre UA et UE (méthode des contrastes)

Le nombre de foyers nucléaires γ -H2AX par cellule augmente avec la concentration en U (cf. Figure 92). Après exposition à l'UA, le nombre de foyers nucléaires γ -H2AX par cellule est significativement supérieur au contrôle non exposé dès la plus faible concentration testée (par exemple 2,6 foyers γ -H2AX par cellule en moyenne pour 5 μ M UA vs 1,75 foyers γ -H2AX par cellule en moyenne pour le contrôle non exposé). En outre, le nombre de foyers nucléaires γ -H2AX par cellule augmente avec la concentration en UA (2,6 ; 2,7 et 6,4 foyers γ -H2AX par cellule pour 5 μ M, 50 μ M et 500 μ M respectivement). Après exposition à l'UE, le nombre de foyers nucléaires γ -H2AX par cellule est aussi significativement supérieur au contrôle non exposé dès la plus faible concentration testée (3,4 foyers γ -H2AX par cellule en moyenne pour 5 μ M UE vs 1,75 foyers γ -H2AX par cellule en moyenne pour le contrôle non exposé). Comme pour l'UA, le nombre de foyers nucléaires γ -H2AX par cellule augmente avec la concentration en UE (3,4 ; 3,7 et 8,3 foyers γ -H2AX par cellule pour 5 μ M, 50 μ M et 500 μ M respectivement). De plus, l'UE induit significativement plus de foyers nucléaires γ -H2AX par cellule que l'UA pour toutes les concentrations testées (par exemple 3,7 foyers γ -H2AX par cellule en moyenne pour 50 μ M UE vs 2,7 foyers γ -H2AX par cellule en moyenne pour 50 μ M UA). En effet, l'UE induit 2 et 4 fois plus de foyers

nucléaires γ -H2AX par cellule que l'UA pour les concentrations 5 μ M-50 μ M et pour la concentration 500 μ M, respectivement.

En conclusion, l'exposition à l'UA et à l'UE induit la formation de cassures double brin dès la plus faible concentration testée. De plus, à concentration égale l'UE induit significativement plus de cassures double brin que l'UA. L'augmentation du nombre de lésions de l'ADN observées avec le test des comètes semblait être induite par l'effet radiotoxique de l'U. Les résultats obtenus avec l'immunomarquage γ -H2AX pourraient confirmer cette hypothèse de toxicité radiologique. En effet, l'augmentation des lésions de l'ADN avec l'augmentation de l'activité spécifique pourrait provenir en partie de l'augmentation de cassures double brin principalement radio-induites.

III. Étude du stress oxydant (formation d'espèces réactives de l'oxygène (EROs))

Pour identifier une cause possible d'altération de l'ADN, nous avons évalué la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) dans les cellules exposées à l'U. La production d'EROs a été quantifiée par l'utilisation d'une sonde fluorescente, le 2',7'-dichlorofluoresceine diacétate (DCFH-DA) dans les fibroblastes embryonnaires de souris (C3H10T1/2) après 24 heures d'exposition aux différentes concentrations d'UA ou d'UE (0 μ M, 5 μ M, 50 μ M et 500 μ M). La [Figure 93](#) représente l'intensité moyenne de fluorescence (% par rapport au contrôle non exposé) en fonction des différentes concentrations en U testées.

Cette étude a révélé que les cellules exposées à l'U induisent la production d'EROs pour les différentes concentrations testées. Cependant, cette production d'EROs n'est pas modulée par le type d'U (UA ou UE; $P=0,1$). En effet, l'UA induit autant d'EROs que l'UE pour les faibles concentrations testées (5 μ M et 50 μ M) (aucune différence significative). En revanche, l'UE induit significativement plus d'EROs que l'UA à 500 μ M. Par ailleurs, la production d'EROs est affectée par la concentration en U ($P<0,001$). En effet, la production d'EROs augmente avec la concentration en U (par exemple, 162 % pour 5 μ M UA vs 250 % pour 500 μ M UA ; 150 % pour 5 μ M UE vs 430 % pour 500 μ M UE). De plus, la production d'EROs est significativement plus élevée dans les cellules contaminées par l'U (pour les différentes concentrations utilisées) que dans le groupe contrôle non exposé (par exemple, 223 % pour 50 μ M UA vs 100 % pour le contrôle non exposé ; et 215 % pour 50 μ M UE vs 100 % pour le contrôle non exposé).

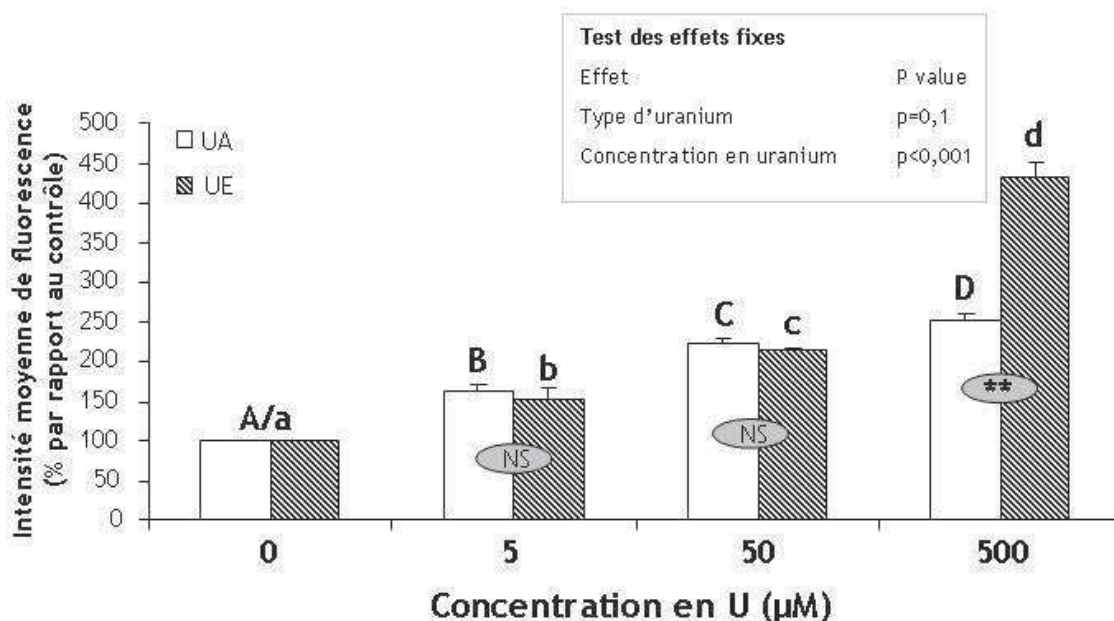


Figure 93. Production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) après exposition des fibroblastes embryonnaires de souris aux différentes concentrations (5 µM, 50 µM et 500 µM) d'uranium appauvri (UA : barres blanches) ou d'uranium enrichi (UE : barres hachurées et grisées)

La production d'EROs a été évaluée en mesurant l'intensité de fluorescence de DCFH-DA qui est proportionnelle à la quantité de peroxydes produite par les cellules.

L'intensité de fluorescence est représentée comme un pourcentage moyen par rapport au contrôle (\pm SD)

A, B, C : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes (méthode des contrastes) entre les concentrations d'UA ($P < 0,05$)

a, b, c : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes (méthode des contrastes) entre les concentrations d'UE ($P < 0,05$)

NS : aucune différence statistiquement significative entre UA et UE (méthode des contrastes)

** $P < 0,01$ Différence statistiquement significative entre UA et UE (méthode des contrastes)

En conclusion, l'exposition à l'U induit la production d'EROs quelle que soit la concentration testée (différence significative avec le contrôle non exposé). En revanche, une différence entre l'exposition à l'UA et à l'UE est observable dans la production d'EROs uniquement aux fortes concentrations (500 µM). En effet, l'exposition à l'UE induit significativement plus d'EROs que l'exposition à l'UA à 500 µM. Par conséquent, la production d'EROs permet de discriminer les effets de l'UA et de l'UE aux fortes concentrations.

IV. Mécanismes de réparation des dommages à l'ADN entrant en jeu après contamination par différents mélanges isotopiques de l'uranium

L'étude de l'expression des gènes après contamination des cellules par l'UA ou l'UE permet de déterminer les actions déclenchées par la cellule face à cette agression. Les gènes codant des protéines impliquées dans les différents mécanismes de réparation des dommages à l'ADN ont été plus

particulièrement étudiés afin de compléter les résultats obtenus avec les tests de visualisation de ces dommages. En effet, chaque type de lésions de l'ADN engendre l'activation d'un mécanisme de réparation bien spécifique.

La qualité des ARN extraits des cellules contaminées par des concentrations croissantes d'UA ou d'UE (de 5 μM à 500 μM) a été vérifiée d'une part sur gels d'agarose sur lesquels les bandes des ARN ribosomiaux 28S et 18S étaient bien distinctes, preuve d'un ARN non dégradé, et d'autre part par spectrophotométrie UV (cf. [Annexe 4](#)). De plus, une PCR de vérification a été réalisée dans laquelle le gène de la β -2-microglobuline a été amplifié pour tous les échantillons testés afin de vérifier que la PCR fonctionne correctement.

Les plaques PCR permettant d'évaluer l'expression de 84 gènes d'intérêt, listés en [Annexe 3](#), contiennent cinq puits contenant les amorces nécessaires à l'amplification de 5 gènes de ménage : Gusb, Hprt1, Hsp90ab1, Gapdh et Actb. Pour pouvoir normaliser les données obtenues pour les gènes d'intérêt avec celles obtenues pour les gènes de ménage, il faut que l'expression de ces derniers ne présente aucune variation entre les concentrations 5 μM , 50 μM et 500 μM d'UA ou d'UE. En effet, ce sont des gènes dit «de référence » dont l'expression ne doit pas varier même si la cellule subit une agression. Dans notre étude, aucun gène « de référence » ne présente de variation d'une concentration d'U à une autre (données non présentées). Par conséquent, c'est la moyenne des Ct des gènes « de référence » qui est utilisée pour normaliser les Ct des gènes d'intérêt. Cette normalisation permet de s'affranchir des biais potentiels qu'il pourrait y avoir entre les plaques.

L'analyse de nos données consiste en une comparaison de l'expression génique entre les cellules contrôles non exposées et les cellules contaminées (5 μM , 50 μM et 500 μM) par l'un ou l'autre des mélanges isotopiques de l'U (UA ou UE). Les données obtenues ne correspondent donc pas à de la quantification absolue mais à de la quantification relative : l'expression d'un gène sera plus ou moins élevée par rapport à l'expression de ce même gène dans l'échantillon contrôle. Ainsi on estime qu'il y a surexpression d'un gène lorsque la différence entre le Ct du contrôle non exposé et le Ct de l'échantillon à analyser est au moins de 1.

Afin de simplifier l'analyse des données, seules les variations d'expressions observées à 500 μM UA ou 500 μM UE sont présentées. En effet, peu de variation d'expressions dans les gènes testés sont notables pour les deux autres concentrations testées (5 μM et 50 μM) ; de plus aucune différence d'expression dans

les gènes n'est observée entre UA et UE pour 5 μM et 50 μM . L'ensemble des valeurs obtenues pour les trois concentrations (5 μM , 50 μM et 500 μM) d'UA ou d'UE est néanmoins répertorié en [Annexe 5](#). Un test de χ^2 a permis de déterminer si les valeurs obtenues pour les contaminations à l'UA ou à l'UE étaient significativement différentes des valeurs obtenues pour les contrôles non exposés avec $P < 0,05$. De plus le test de χ^2 a permis de déterminer si les valeurs obtenues pour les contaminations à l'UA étaient significativement différentes des valeurs obtenues pour les contaminations à l'UE. Le [Tableau 14](#) résume les variations d'expression génique observées chez les cellules contaminées avec 500 μM d'UA ou 500 μM d'UE.

Tableau 14. Variations de l'expression génique des cellules contaminées avec 500µM UA ou 500µM UE classées selon les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN

Voie impliquée	UA		UE	
	Gènes	Rapport Contaminé/Contrôle (<i>p value</i>)	Gènes	Rapport Contaminé/Contrôle (<i>p value</i>)
Checkpoint : les points de contrôle du cycle cellulaire	Atrx	0,42 (0,007)	Atrx	0,51 (0,01)
			Chek1	2,39 (0,001)
	Gadd45a	0,37 (0,009)	Gadd45a	0,57 (0,03)
	Smc3	1,5 (0,02)	Smc3	2,12 (0,01)
	Rad9b	0,45 (0,004)	Rad9b	1,61 (0,002)
	Tlk1	0,47 (0,002)	Tlk1	0,58 (0,002)
Excision de base : BER	Apex1	1,7 (0,003)	Apex1 *	4,8 (<0,001)
	Fen1	2,1 (0,002)	Fen1	3,17 (0,004)
	Lig1	1,7 (0,003)	Lig1	2,92 (0,02)
	Nthl1	0,3 (<0,001)	Nthl1	0,28 (0,001)
	Ogg1	0,4 (0,001)	Ogg1	0,47 (0,007)
	Mpg	0,27 (<0,001)	Mpg	0,20 (<0,001)
	Poli	0,32 (<0,001)	Poli	0,4 (<0,001)
	Wrn	0,32 (<0,001)	Wrn	0,22 (<0,001)
Excision de nucléotides : NER	Xpa	0,17 (0,02)	Xpa	0,1 (<0,001)
	Xpc	0,3 (0,002)	Xpc	0,22 (<0,001)
Mismatch Repair : MMR	Mbd4	0,34 (0,02)	Mbd4	0,4 (0,005)
	Mgmt	0,5 (0,02)	Mgmt	0,24 (0,003)
	Mlh1	0,45 (0,001)	Mlh1	0,54 (0,002)
	Msh2	0,34 (<0,001)	Msh2	0,29 (<0,001)
	Msh3	0,19 (<0,001)	Msh3	0,31 (<0,001)
	Pms1	0,47 (<0,001)	Pms1	0,58 (0,007)
	Trex1	0,47 (<0,001)	Trex1	0,4 (<0,001)
Recombinaison homologue: HR	Brca2	0,43 (0,003)	Brca2	0,54 (0,008)
			Fancg	0,47 (0,008)
	Rad51	2,29 (0,005)	Rad51	2,25 (0,006)
	Rad51c	0,26 (<0,001)	Rad51c	0,25 (<0,001)
	Rad51l1	0,31 (0,001)	Rad51l1	0,34 (<0,001)
	Xrcc3	0,36 (<0,001)	Xrcc3	0,4 (0,002)
	Xrn2 *	0,20 (0,001)	Xrn2	0,72 (0,2)
Recombinaison non homologue: NHEJ	Prkdc	0,28 (<0,001)	Prkdc	0,39 (0,002)

Les gènes répertoriés dans ce tableau présentent une variation d'expression significative par rapport au contrôle avec $P < 0,05$ selon le test du Chi2

Les deux gènes indicés d'une * sont des gènes donc l'expression diffère en fonction du mélange isotopique d'U

Les gènes notés en bleu et en rouge sont respectivement les gènes sous-exprimés (<0,5) et surexprimés (>2) par rapport au contrôle après contamination par l'UA et par l'UE.

Les gènes notés en rose sont inférieur à 2 (en étant très proche) et les gènes notés en vert supérieur à 0,5 (en étant très proche) mais ils sont significativement différents du contrôle non exposé

D'après le [Tableau 14](#), il y aurait tout d'abord une différence entre les deux mélanges isotopiques au niveau de l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans les « *checkpoints* » du cycle cellulaire. En effet, après contamination par l'UE, il y a une surexpression de Smc3 (sous unité d'une cohésine). De plus, une surexpression de Chek1 qui code pour la protéine CHK1 est observée après exposition à l'UE. Parallèlement, après contamination par l'UA une sous-expression de Atrx, Gadd45, Rad9b et de Tlk1 est observée. Ces quatre protéines entrent en jeu dans les *checkpoints* du cycle cellulaire mais à des niveaux différents. L'UE a également tendance à induire une sous expression de Atrx, Gadd45, et de Tlk1 ; cette sous-expression est cependant très légèrement supérieure à 0,5 mais statistiquement significative comparé au contrôle non exposé. Deux situations assez distinctes sont observées avec d'une part les cellules contaminées à l'UE qui induisent une surexpression semblent de certains gènes intervenant dans les points de contrôles du cycle cellulaire alors que les cellules contaminées à l'UA n'induisent pas de surexpression de gènes codant des facteurs intervenant dans les *checkpoints*.

Un certain nombre de gènes impliqués dans le mécanisme de réparation par excision de base (en anglais *Base Excision Repair* : BER) sont surexprimés après exposition à l'U (cf. [Tableau 14](#)). En effet, pour les deux mélanges isotopiques de l'U, une surexpression du gène Fen1 codant pour une endonucléase intervenant pendant l'excision de base est observée. De plus, après exposition à l'UE, le gène Apex1 est significativement surexprimé comparé au contrôle mais aussi comparé à l'UA. Cependant, les gènes des ADN glycosylases Nthl1, Ogg1 et Mpg, sont significativement sous-exprimés après contamination par l'UA ou par l'UE. De plus, après exposition à l'UA ou à l'UE, le gène wrn est sous-exprimé. D'autre part, le gène de la polymérase γ (Poli) est sous-exprimé après contamination par l'UA ou par l'UE. Enfin, la voie de réparation utilisée après le clivage du brin endommagé semble être la *Long Patch Repair* (voie longue), étant donné que Fen1 (UA et UE) et Lig1 (UE) sont surexprimés alors que Xrcc1 (impliqué dans la voie courte) ne montre pas de variation.

Pour les autres mécanismes de réparation des lésions portant sur un brin de l'ADN que sont le NER (en anglais *Nucleotid Excision Repair*) et le MMR (en anglais *Mismatch Repair*), des sous-expressions des gènes codant pour certaines protéines intervenant dans ces deux mécanismes de réparation sont uniquement observées. En effet, en ce qui concerne le NER, les gènes codant pour les protéines Xpc et Xpa sont sous-exprimés après contamination par l'UA ou par l'UE. En ce qui concerne le MMR, de nombreux gènes sont sous-exprimés après contamination par l'UA ou par l'UE tels que les gènes codant pour les protéines Msh2 et Msh3 ou bien encore Mlh1.

Les cellules ayant subi une contamination par l'un ou l'autre des mélanges isotopiques d'U (UA ou UE) sous-expriment également une grande partie des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation des cassures double brin (CDBs), décrites dans la littérature comme induites par les radiations ionisantes. En effet, le mécanisme le plus fidèle pour la réparation des CDBs qu'est la recombinaison homologue (en anglais *Homologous Recombination*: HR) présente un certain nombre de sous-expressions de gènes communes aux deux mélanges isotopiques de l'U (UA ou UE). Le gène codant pour l'exonucléase 5'-3' XRN2 en fait notamment partie. L'UA sous-exprime significativement plus XRN2 que l'UE. Interviennent ensuite un ensemble de protéines, dont les gènes sont également significativement sous-exprimés, qui interagissent avec RAD51. Il s'agit de RAD51L1, RAD51c et XRCC3. Rad51L1 forme un complexe, qui vient se fixer à l'ADN simple brin, avec XRCC2 (dont l'expression ne varie pas), RAD51c et RAD51L3. Le seul gène présentant une surexpression dans le mécanisme de HR est Rad51. Cette surexpression significative est visible après contamination par l'UA ainsi qu'après contamination par l'UE. Le mécanisme de recombinaison non homologue (en anglais *Non-Homologous End Joining*: NHEJ) est représenté sur la plaque PCR des dommages à l'ADN par les gènes Xrcc6, codant la protéine KU70, domaine de fixation à l'ADN du complexe DNA-PK, et Prkdc codant pour la sous-unité catalytique de ce même complexe. Seul Prkdc présente une sous-expression significative après contamination par l'un ou l'autre des mélanges isotopiques de l'U.

D'après l'ensemble de ces résultats, il semble que les fibroblastes embryonnaires de souris répondent à l'agression qu'est la contamination par l'UA ou l'UE en surexprimant principalement un des gènes impliqués dans le mécanisme du BER (Apex1, Fen1 et Lig1), mais aussi certains gènes impliqués dans le mécanisme de la HR (Rad51). Les gènes impliqués dans les autres mécanismes de réparation des lésions de l'ADN sont en grand partie sous-exprimés.

V. Influence de l'uranium sur le cycle cellulaire

La cytométrie de flux est une technique utilisée pour l'étude de plusieurs paramètres propres à chaque cellule : taille, réfringence, granulosité, quantité d'ADN, etc. Les cellules qui traversent à grande vitesse et une à une un faisceau laser, réémettent une lumière par diffusion ou fluorescence qui permet de les classer en sous-populations selon leurs caractéristiques. Ce principe a été utilisé pour étudier la progression des cellules dans leur cycle en fonction des différentes contaminations en U et ainsi observer

l'effet radiologique (émetteur de rayonnements α) et/ou l'effet chimique (métal lourd) de l'U sur le cycle cellulaire.

V.1 Étude des différentes phases du cycle cellulaire

La proportion de fibroblastes dans chaque phase du cycle cellulaire a été mesurée par cytométrie de flux après coloration de l'ADN à l'iodure de propidium (cf. Figure 94) dans le but de voir s'il y'a des variations au cours de ce cycle après 24 heures de contamination.

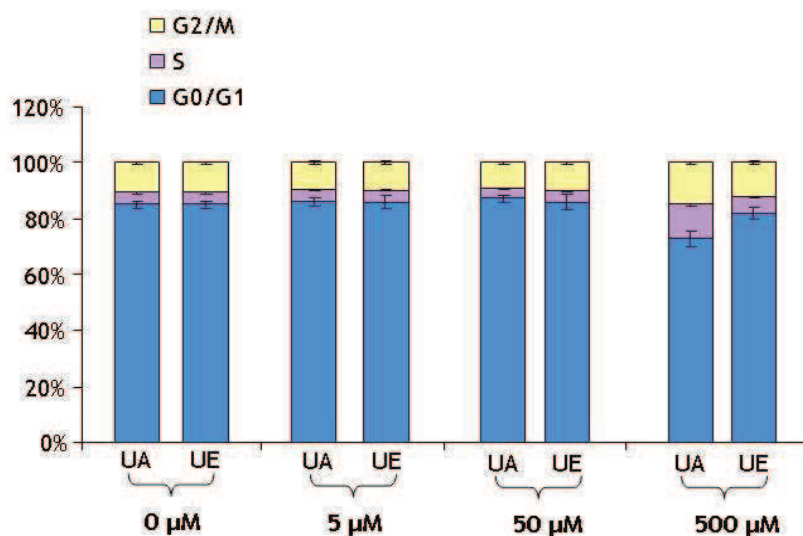


Figure 94. Étude du cycle cellulaire après 24 heures de contamination des fibroblastes aux différentes concentrations d'UA ou d'UE (0 µM, 5 µM, 50 µM et 500 µM)
Les données sont représentées sous forme de moyenne ± SEM

La majorité des cellules se trouvent en phase G0-G1. En effet, les cellules sont à confluence (80 % en moyenne des cellules pour 0 µM, 5 µM et 50 µM et 70% en moyenne pour 500 µM) après 24 heures de contamination ; les cellules par conséquent ne cyclent que très peu. Le pourcentage de cellules en phase S pour les faibles concentrations d'UA et d'UE (4 % en moyenne) est identique au contrôle non exposé. En revanche, à 500 µM le pourcentage de cellules en phase S est nettement supérieur (11 % pour l'UA et 6 % pour l'UE). Il faut noter que ces différences ne sont cependant pas significatives, il s'agit seulement de tendance.

Ces résultats tendent à faire penser que les cellules après contamination par l'U (500 µM) subiraient un ralentissement en phase S. De plus, ce ralentissement en phase S semble être plus marqué après une contamination par l'UA qu'après une contamination par l'UE. Pour confirmer cet éventuel blocage en phase S, une nouvelle étude du cycle cellulaire a été réalisée avec incorporation de BrdU.

V.2 Analyse en cytométrie de flux d'un pool de cellules par incorporation de BrdU lors d'un pulse après contamination à l'uranium

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que 80 % en moyenne des cellules se trouvent en phase G1 du cycle cellulaire après exposition à l'U des cellules C3H/10T1/2 dans nos conditions de cultures (ensemencement à $3 \cdot 10^6$ cellules par flasque et contamination 24 heures après). Ceci signifie que la quasi-totalité des cellules ne prolifère plus. Ainsi pour étudier l'effet de l'U sur le cycle cellulaire il a été nécessaire de réensemencer les cellules après les 24 heures de contamination pour que les cellules reprennent à nouveau leur cycle de croissance. L'expérience a été réalisée dans deux conditions différentes :

1- Pour la première expérience, les cellules ont été fixées immédiatement après un pulse de BrdU d'une durée de 30 minutes.

2- Pour la seconde expérience, les cellules ont été réincubées pendant 3 heures après le pulse afin de définir où se situent ces mêmes cellules après 3 heures de progression dans leur cycle.

Les résultats de la première expérience sont présentés dans les [Figures 95 et 96](#). Les valeurs brutes obtenues donnent un histogramme de la quantité de BrdU en fonction de la quantité d'IP pour chaque échantillon. Un histogramme du contrôle non exposé ainsi qu'un histogramme pour la contamination à $500 \mu\text{M}$ d'UE sont représentés dans la [Figure 95](#).

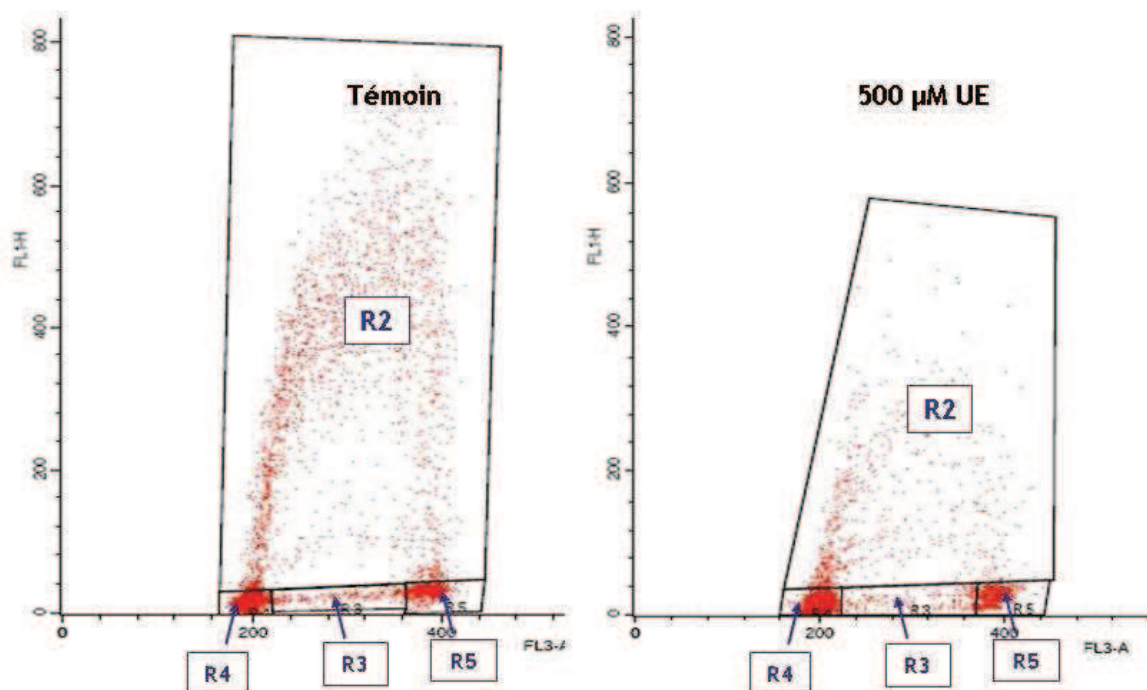


Figure 95. Exemple d'histogrammes de la quantité de BrdU en fonction de la quantité d'IP pour le contrôle non exposé et la contamination 500 µM d'UE après analyse en cytométrie de flux

Les outils analytiques du logiciel CellQuest Pro permettent de définir plusieurs fenêtres correspondant à des sous-populations cellulaires. La définition de ses sous-populations permet de connaître précisément le pourcentage de cellules qu'elles contiennent. Nous avons par conséquent choisi de définir les fenêtres suivantes :

- **R2** : cette sous-population correspond aux cellules en phase de réplication au moment du pulse et ayant par conséquent incorporé du BrdU au niveau de l'ADN néoformé ;
- **R3** : cette sous-population correspond aux cellules en phase S mais n'ayant pas incorporé le BrdU ;
- **R4** : cette sous-population correspond aux cellules qui ont une quantité 2N d'ADN et n'ayant pas incorporé le BrdU, ce sont les cellules en G0/G1 ;
- **R5** : cette sous-population correspond aux cellules en G2/M ayant une quantité 4N d'ADN et n'ayant pas incorporé le BrdU.

La **Figure 96** illustre le pourcentage de cellules dans les différentes sous-populations R2 (A) et R4 (B) en fonction des différentes concentrations en U testées (0 µM, 5 µM, 50 µM et 500 µM UA ou UE). Le pourcentage de cellules dans les fenêtres R3 et R5 n'a présenté aucune différence significative entre les différentes concentrations testées d'U ainsi qu'entre UA et UE (données non représentées).

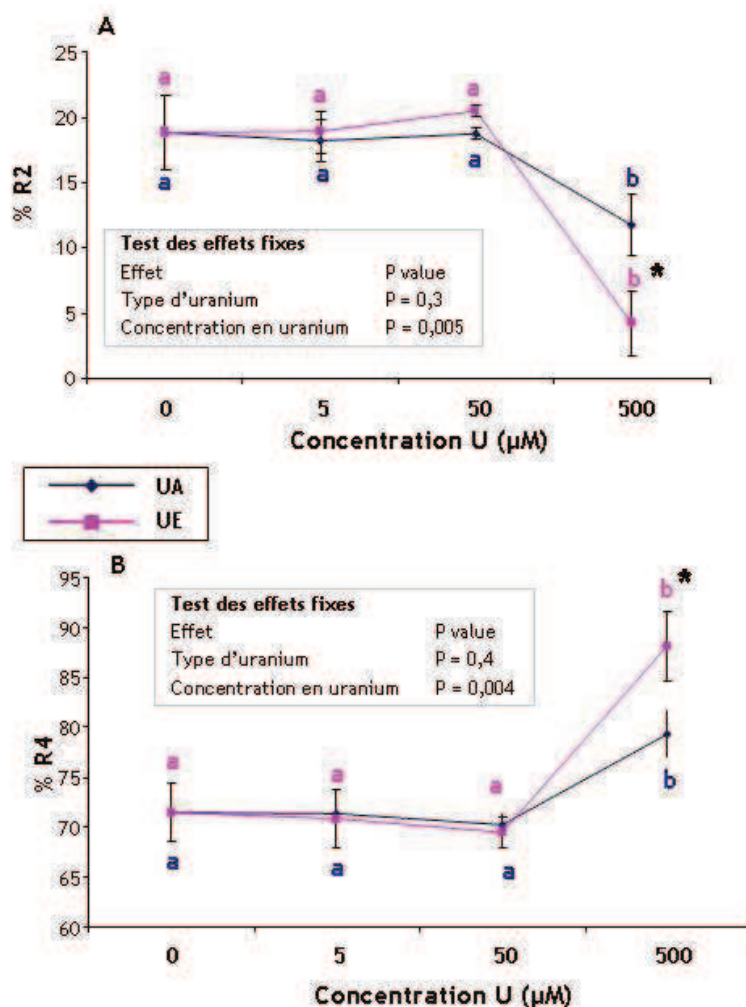


Figure 96. Étude des différentes sous populations (A : R2, B : R4) cellulaires pour les différentes concentrations en uranium testées (0 µM, 5 µM, 50 µM et 500 µM UA (bleu) ou UE (rose))

a, b, c : les points avec une lettre différente sont significativement différents (méthode des contrastes) entre les concentrations d'UA ou d'UE ($P < 0,05$)

* $\leq 0,06$ Différence statistiquement significative entre UA et UE (méthode des contrastes)

Lorsque le pourcentage de cellules dans la fenêtre R2 (cf. Figure 96 A) en fonction des concentrations en U est analysé, jusqu'à 50 µM d'U (UA et UE) il n'y a pas de variation significative comparativement au contrôle non exposé (0 µM). En revanche, à 500 µM d'UA et d'UE il y a une chute importante du nombre de cellules en phase S. En effet, la concentration en U a une influence sur le pourcentage de cellules en phase S ($P=0,005$). De plus, cette diminution à 500 µM est plus marquée pour les cellules contaminées par la solution d'UE que pour les cellules contaminées par la solution d'UA. Cependant, il s'agit d'une tendance, en effet la différence est proche de la significativité ($p = 0,05$). Par conséquent, la première information qui ressort de cette expérience est qu'il y a une baisse considérable du nombre de cellules en phase S ayant incorporé le BrdU pour la plus forte concentration testée, que ce soit après une contamination par l'UA ou par l'UE ; cette baisse du nombre de cellules en phase S est plus

importante avec l'UE qu'avec l'UA. En effet, pendant le pulse de BrdU, 18 % des cellules contrôles ont progressé en phase de réplication durant leur cycle alors que seulement 12 % des cellules contaminées à 500 μM d'UA et 4 % des cellules contaminées à 500 μM d'UE ont évolué dans cette phase S pendant le pulse. Cette différence de pourcentage entre les cellules contrôles non exposées et celles contaminées à 500 μM d'UA et d'UE est parfaitement corrélée avec l'évolution des cellules en phase G1 (cf. Figure 96 B : R4). La population cellulaire en G1, observée dans la fenêtre R4, est constante pour des concentrations de 0 à 50 μM d'UA et d'UE. Pour des concentrations de 500 μM d'U (UA et UE), il y a une augmentation de la proportion de cellules population en phase G1 d'une amplitude qui vient compenser la baisse du nombre de cellules en phase S (ayant incorporé le BrdU) (cf. Figure 96 A : R2). En effet, la concentration en U a une influence sur le pourcentage de cellules en phase G1 ($P=0,004$). De plus, cette augmentation à 500 μM est plus accentuée pour les cellules contaminées par la solution d'UE que pour les cellules contaminées par la solution d'UA. Il s'agit encore une fois d'une tendance, en effet la différence est proche de la significativité ($p = 0,06$).

En conclusion, l'analyse des cycles par cytométrie en flux montre qu'à partir d'une concentration d'UA et d'UE située entre 50 μM et 500 μM , les cellules sont en partie bloquées en phase G1, ce qui explique l'augmentation du nombre de cellule dans cette phase du cycle, qui ne peuvent donc pas progresser dans la phase de réplication S. Par conséquent, ceci explique la baisse du nombre de cellules ayant incorporé le BrdU. De plus, ce phénomène de blocage en phase G1 est plus accentué pour une contamination par l'UE ce qui laisse présager la prépondérance de l'effet radiotoxique par rapport à l'effet chimiotoxique.

L'expérience à été renouvelée mais cette fois-ci en réincubant les cellules pendant trois heures après le pulse de BrdU (cf. Figure 97) afin d'observer comment les cellules évoluent à travers leur cycle. Trois heures après le pulse de BrdU, les cellules ayant incorporé cet analogue de la cytosine ont évolué dans différentes phases du cycle (cf. Figure 97). En effet, par exemple des cellules qui ont incorporé le BrdU et qui ont une quantité 2N d'ADN sont observées. Ce sont des cellules qui étaient en phase S durant le pulse, qui ont passé les phases G2 et M pour revenir en G1 trois heures plus tard. C'est précisément cette population cellulaire que nous avons choisi d'étudier en définissant la fenêtre R2 sur les histogrammes. Nous avons également défini d'autres populations cellulaires mais nous nous sommes intéressés davantage aux cellules en phase S qui ont incorporé le BrdU représentées dans la fenêtre R3 (cf. Figure 97).

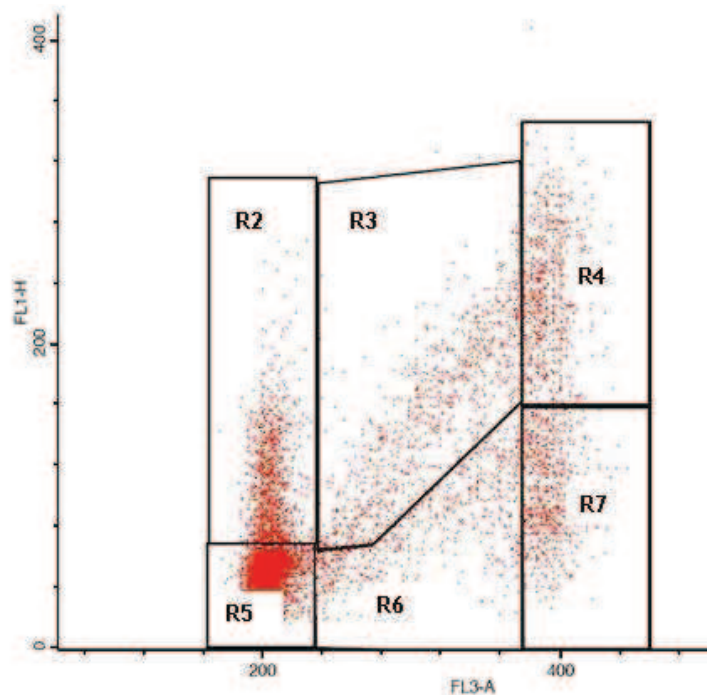


Figure 97. Histogrammes représentant la quantité de BrdU en fonction de la quantité d'IP après analyse en cytométrie de flux

Exemple de découpage du cycle cellulaire en sous populations (R2, R3, R4, R5, R6 et R7)

Lorsqu'on analyse le pourcentage de cellules dans la fenêtre R2 (cf. Figure 98 A1) en fonction des concentrations en U, une baisse importante du nombre de cellules dans R2 est observée lorsque la concentration en UA et UE augmente et ceci dès la plus faible concentration testée (5 μM). En effet, environ 8 % des cellules non exposées et se trouvant en phase de réplication pendant le pulse de BrdU se sont divisées et se retrouvent trois heures plus tard en G1. En revanche, cette population cellulaire n'est seulement que d'environ 2 % pour les cellules contaminées à 500 μM d'UA et d'UE. La concentration en U a une influence sur le pourcentage de cellules en phase G1 ($P=0,03$). Ces résultats démontrent donc qu'il y a un ralentissement du cycle cellulaire lorsque la concentration en U augmente.

De plus lorsque le pourcentage de cellules en phase S ayant incorporé du BrdU durant le pulse (cf. Figure 98 A2) est analysé, il n'y a pas de différence entre les cellules du contrôle non exposé et les cellules contaminées à l'UE. Pour les cellules contaminées à l'UA, la tendance est différente puisqu'il y a une nette augmentation de la population pour la concentration de 500 μM . La comparaison des cellules en phase S de la première expérience (juste après le pulse de BrdU) avec les cellules en phase S de la deuxième expérience (3 heures après la fin du pulse de BrdU) montre que les cellules après contamination à 500 μM d'U (UA et UE) n'ont pas progressé dans le cycle (cf. Figure 98 B). En effet, le pourcentage de cellules en phase S est identique entre les deux expériences, ce qui signifie que la progression en phase S

des cellules après une contamination à 500 µM d'U est fortement ralentie. En revanche, pour les faibles concentrations en U (5 µM et 50 µM), une diminution du pourcentage de cellules en phase S lors de la deuxième expérience est notée, ce qui signifie que les cellules ont progressé normalement dans le cycle cellulaire. Ces résultats traduisent par conséquent un phénomène d'accumulation des cellules dans la phase S et un fort ralentissement dans la progression à travers le cycle.

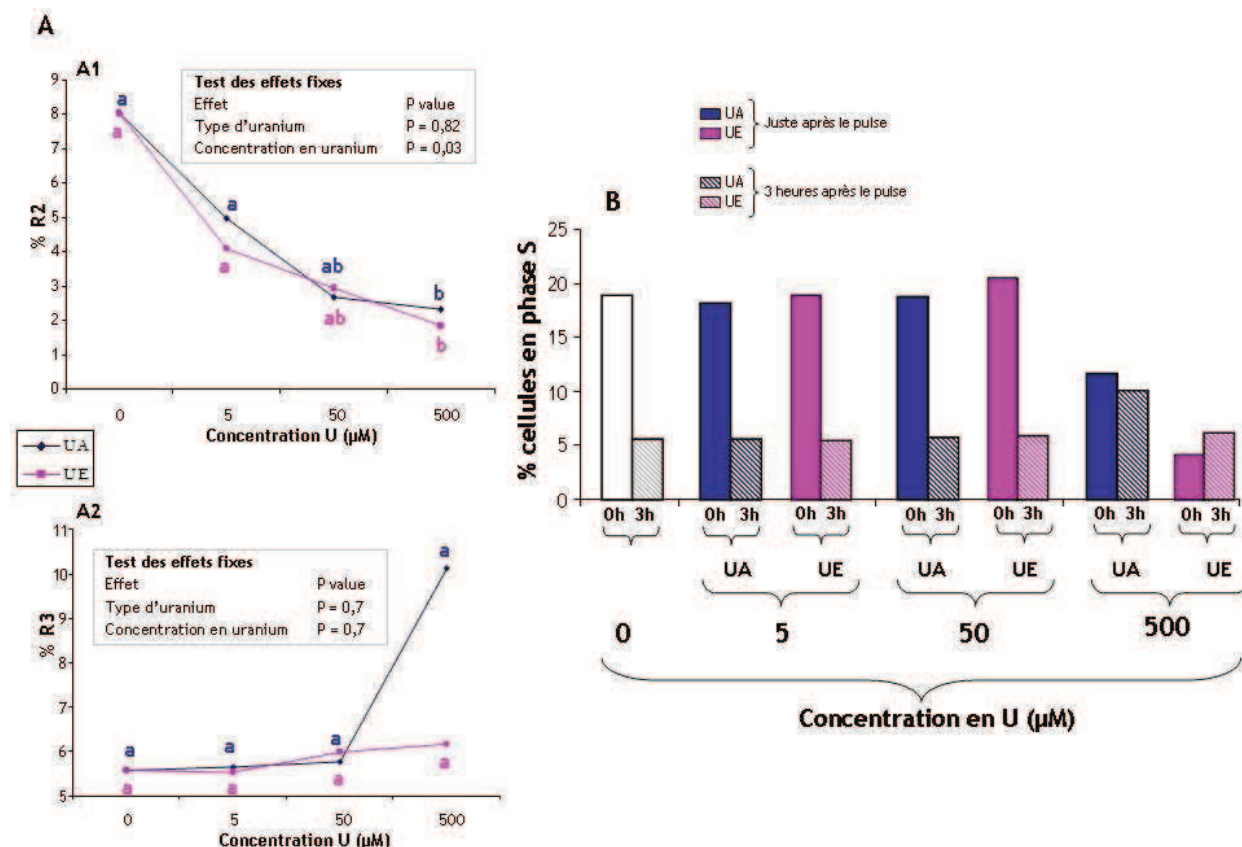


Figure 98. (A) Étude des sous populations cellulaires, R2 (A1) et R3 (A2), pour les différentes concentrations en uranium testées (0 µM, 5 µM, 50 µM et 500 µM). (B) Comparaison des cellules en phase S entre les deux conditions étudiées (i) les cellules sont fixées immédiatement après un pulse de BrdU d'une durée de 30 minutes. (ii) les cellules sont réincubées pendant 3 heures après le pulse) a, b, c : les points avec une lettre différente sont significativement différents (méthode des contrastes) entre les concentrations d'UA ou d'UE ($P < 0,05$)

VI. Le test de numération des micronoyaux et hybridation *in situ* de sondes pancentromériques (FISH)

Le test de numération des micronoyaux associé à la technique d'hybridation *in situ* fluorescente de sondes pancentromériques a été utilisé.

Le nombre d'aberrations chromosomiques a été compté sur les cellules mononucléées, binucléées, trinucléées et quadrinucléées. Seules sont représentées les données sur les cellules mononucléées et,

binucléées, les autres valeurs étant négligeables. Le nombre de cellules en apoptose ou en nécrose n'était pas significatif.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'influence respective de la concentration en U et du type d'U (UA ou UE) :

- sur la formation dans les cellules binucléées de micronoyaux (BN-1MN) provenant soit de fragments acentriques (événement clastogène: BN-1MNC-) soit de chromosomes entiers (événement aneugène: BN-1MNC+),
- sur la formation des cellules binucléées avec des PNPs (BN-PNPs),
- et sur la formation des cellules mononucléées avec des MNx (Mono-MNx).

VI.1 Les cellules binucléées avec un micronoyau (BN-1MN)

Dans notre étude, seulement les cellules binucléées avec un micronoyau (BN-1MN) sont comptabilisées parce qu'aucune cellule binucléée avec 2 ou plusieurs MNx n'a été observée.

La **Figure 99** illustre la proportion de cellules binucléées avec un micronoyau (BN-1MN) après exposition à l'UA ou à l'UE à différentes concentrations (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM) (cf. **Figure 99 A**) ou après une exposition à la Mitomycine C ou à la Vincristine Sulfate (contrôles positifs de génotoxicité) (cf. **Figure 99 B**). Le test de numération des MNx a révélé que les cellules BN-1MN sont induites après exposition à l'U, en revanche la production de cellules BN-1MN n'est pas modulée par le type d'U (UA ou UE; $P=0,81$). En effet, l'UA induit autant de cellules BN-1MN que l'UE et ceux-ci pour toutes les concentrations testées (aucune différence significative). La production de cellules BN-1MN est affectée par la concentration en U ($P<0,001$). En effet, la fréquence de cellules binucléées augmente avec la concentration en U (par exemple, 15 ‰ pour 5 μM UA et 5 μM UE vs 38 ‰ pour 500 μM UA et 500 μM UE). De plus, la fréquence de cellules BN-1MN est plus élevée dans les cellules exposées à l'U (pour les différentes concentrations utilisées) que dans le groupe contrôle non exposé ($P<0,001$; par exemple, 18 ‰ pour 50 μM UA vs 4 ‰ pour le contrôle non exposé ; et 22 ‰ pour 50 μM UE vs 4 ‰ pour le contrôle non exposé).

Par ailleurs, la Mitomycine C et la Vincristine Sulfate induisent significativement plus de cellules BN-1MN que le contrôle non exposé (0 μM). Le nombre de cellules BN-1MN après exposition à la Mitomycine C (contrôle positif clastogène) et à la Vincristine Sulfate (contrôle positif aneugène) est comparable à la plus forte concentration en U (500 μM).

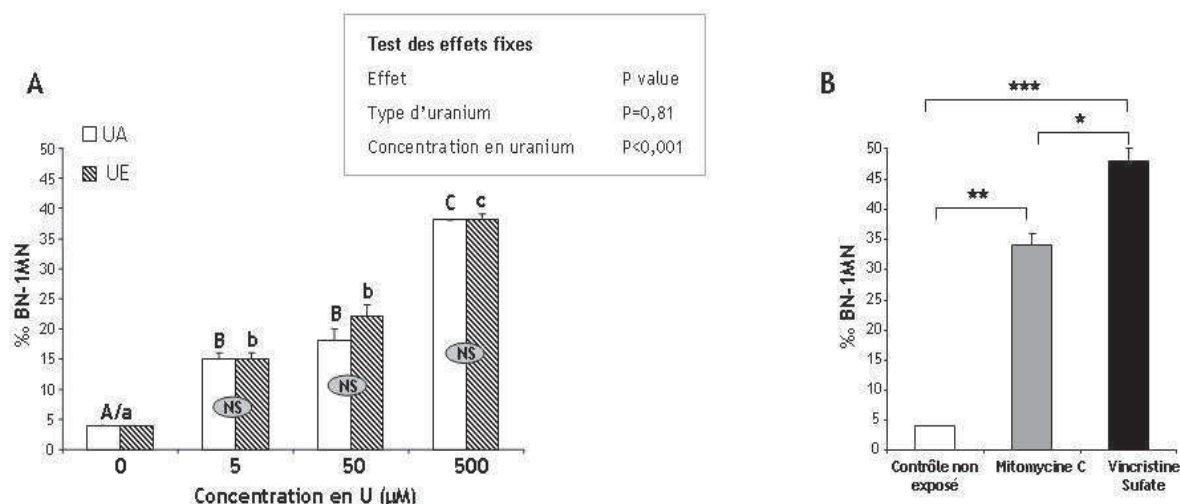


Figure 99. Proportions de fibroblastes binucléés avec un micronoyau (BN-1MN) après exposition à différentes concentrations (0 µM, 5 µM, 50 µM et 500 µM) d'uranium appauvri (UA : barres blanches) ou d'uranium enrichi (UE : barres hachurées et grisées) (A) et de Mitomycine C (1,5 µM. contrôle positif clastogène : barre grise) ou de Vincristine Sulfate (16 µM. contrôle positif aneugène : barre noire) (B)

% BN-1MN : % cellules binucléées avec un micronoyau

A, B, C : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes (méthode des contrastes) entre les concentrations d'UA (P<0,05)

a, b, c : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes (méthode des contrastes) entre les concentrations d'UE (P<0,05)

NS : aucune différence statistiquement significative entre UA et UE (méthode des contrastes)

* P<0,05 Différence statistiquement significative entre la Mitomycine C et la Vincristine Sulfate (méthode des contrastes)

** P<0,01 Différence statistiquement significative entre la Mitomycine C (contrôle positif clastogène) et le contrôle non exposé (méthode des contrastes)

*** P<0,001 Différence statistiquement significative entre la Vincristine Sulfate (contrôle positif aneugène) et le contrôle non exposé (méthode des contrastes)

Avec l'utilisation de la cytochalasine B dans le test de numération des MNx, une estimation de la prolifération cellulaire est possible et traduit, *in vitro*, la cytotoxicité des produits étudiés. L'incidence d'une exposition sur la capacité des cellules à proliférer est déterminée au moyen de l'index CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation Index) avec la formule suivante :

$$CBPI = \frac{Mono + 2*Bi + 3*(Tri+Tétra)}{N}$$

Avec **Mono** : nombre de cellules mononucléées

Bi : nombre de cellules binucléées

Tri : nombre de cellules trinucléées

Tétra : nombre de cellules tétranucléées

N : nombre total de cellules comptabilisées

Cet index est déterminé sur 500 cellules. Dans notre étude, le CBPI n'a pas été significativement modifié après exposition à l'UA, à l'UE, à la Mitomycine C et à la Vincristine Sulfate (cf. [Tableau 15](#)). Par conséquent, ces résultats indiquent l'absence d'un effet inhibiteur de l'U sur la prolifération des fibroblastes.

Tableau 15. CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation Index) chez des fibroblastes traités par de l'uranium appauvri (UA) ou enrichi (UE)

Concentration (µMol)	UE			UA			Contrôles			
	0	5	50	500	5	50	500	Contrôle non exposé (0µM)	Mitomycine C (1,5 µM)	Vincristine Sulfate (16 µM)
CBPI	1,36±0,01	1,36±0,01	1,38±0,02	1,31±0,01	1,36±0,01	1,35±0,02	1,36±0,02	1,36±0,01	1,35±0,01	1,34±0,01

Il a été calculé avec la formule suivante : $CBPI = \frac{[Mono + 2*Bi + 3*(Tri+Tetra)]}{N}$ avec Mono représentant le nombre de cellules mononucléées, Bi représentant le nombre de cellules binucléées, Tri représentant le nombre de cellules trinucléées, Tétra représentant le nombre de cellules tétranucléées et N représentant le nombre total de cellules comptabilisées (Surrallès *et al.*, 1995). Cet index est déterminé sur 500 cellules classées en fonction du nombre de noyaux (Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

VI.2 Hybridation *in situ* fluorescente de sondes pancentromériques (FISH)

La **Figure 100** illustre la proportion de cellules binucléées avec un micronoyau centromère-positif (BN-1MNC+: avec un ou plusieurs centromères ; cf. **Figures 100 A1 et 100 A2**) et les cellules binucléées avec un micronoyau centromère-négatif (BN-1MNC-: sans centromère; cf. **Figures 100 B1 et 100 B2**) après une exposition à l'UA ou à l'UE à différentes concentrations (cf. **Figures 100 A1 et 100 B1**) et à la Mitomycine C (1,5 μM) ou à la Vincristine Sulfate (16 μM . cf. **Figures 100 A2 et 100 B2**). L'hybridation *in situ* de sondes pancentromériques a révélé la présence de cellules BN-1MNC+ et de cellules BN-1MNC-dans les cellules exposées à l'UA, à l'UE, à la Mitomycine C et à la Vincristine Sulfate.

Après exposition à l'UA, la production de cellules BN-1MNC+ a été observée pour toutes les concentrations testées (5 μM , 50 μM et 500 μM) comparativement au groupe contrôle non exposé (cf. **Figure 100 A1**). La fréquence de cellules BN-1MNC+ est 6, 7,5 et 14 fois plus élevée dans le groupe exposé à l'UA (pour 5 μM , 50 μM et 500 μM , respectivement) que dans le groupe contrôle non exposé (0 μM). La différence est statistiquement significative pour les trois concentrations testées par rapport au contrôle non exposé. Après exposition à l'UE, la fréquence de cellules BN-1MNC+ a également augmenté avec la concentration, mais la différence par rapport au contrôle non exposé (0 μM) est significative qu'au dessus de 50 μM . La concentration en U a une influence statistiquement significative sur l'induction de cellules BN-1MNC+ ($P < 0,001$). L'exposition à l'UA tend à induire plus de cellules BN-1MNC+ que l'exposition à l'UE ($P = 0,06$), et cette différence est statistiquement significative pour 500 μM ($P = 0,02$). En effet, l'UA induit en moyenne 2 fois plus de cellules BN-1MNC+ que l'UE.

De manière globale, la fréquence de cellules BN-1MNC- augmente avec la concentration en U ($P < 0,001$) pour les deux types d'U testé (UA et UE, $P = 0,007$) (cf. **Figure 100 B1**). Le niveau de cellules BN-1MNC- après exposition à l'UE (pour toutes les concentrations testées) est nettement supérieur au contrôle non exposé (0 μM). En effet, la fréquence de cellules BN-1MNC- est 5, 7,5 et 12,5 fois plus élevée dans le groupe exposé à l'UE (pour 5 μM , 50 μM et 500 μM , respectivement) que dans le groupe contrôle non exposé (0 μM). En revanche, la fréquence de cellules BN-1MNC- est significativement plus élevée après exposition à l'UA que dans le groupe contrôle non exposé, uniquement pour la concentration de 500 μM . De plus, la fréquence de cellules BN-1MNC- est nettement plus importante après exposition à l'UE qu'après exposition à l'UA. En effet, l'UE induit 3 ; 5 et 2,5 fois plus de cellules BN-1MNC- que l'UA (pour 5 μM , 50 μM et 500 μM , respectivement), cette différence est statistiquement significative pour les trois concentrations testées.

La production de cellules BN-1MN après exposition à l'UA est donc principalement attribuable à une augmentation de la fréquence des cellules BN-1MNC+, reflétant une augmentation de perte chromosomique. En effet, l'UA induit au minimum 3 fois plus de cellules BN-MNC+ que de cellules BN-1MNC- ($P < 0,001$). En revanche, la production de cellules BN-1MN après exposition à l'UE est principalement attribuable à une augmentation de la fréquence de cellules BN-1MNC- reflétant une augmentation de cassures chromosomiques. En effet, l'UE induit au minimum 2 fois plus de cellules BN-1MNC- que de cellules BN-1MNC+ ($P = 0,005$).

La Mitomycine C ($1,5 \mu\text{M}$), connue pour avoir essentiellement un effet clastogène, induit significativement plus de cellules BN-1MNC- ($P = 0,005$) et moins de cellules BN-1MNC+ ($P = 0,005$) comparativement à la Vincristine Sulfate ($16 \mu\text{M}$), connue pour avoir essentiellement un effet aneugène (cf. Figures 100 A2 et 100 B2). La Mitomycine C induit 3 fois plus de cellules BN-1MNC- que de cellules BN-1MNC+. Ces résultats sont comparables à ceux observés après une exposition à l'UE indiquant un effet potentiellement clastogène. En revanche, la Vincristine Sulfate induit 2 fois plus de cellules BN-1MNC+ que de cellules BN-1MNC-. Ces résultats sont comparables à ceux observés après exposition à l'UA, indiquant un effet potentiellement aneugène.

En conclusion, la concentration en U et le type d'U influence la formation de cellules BN-1MNC-, sans aucune interaction entre ces deux facteurs. En outre, ces résultats montrent que les cellules BN-1MNC- permettent de discriminer les effets de l'UA de ceux de l'UE, quelle que soit la concentration testée (de $5 \mu\text{M}$ à $500 \mu\text{M}$). Toutefois, les cellules BN-1MN et les cellules BN-1MNC+ sont seulement influencées par la concentration en U ($P < 0,001$). Par conséquent, les cellules BN-1MN (de $5 \mu\text{M}$ à $500 \mu\text{M}$) et les cellules BN-1MNC+ (de $5 \mu\text{M}$ à $50 \mu\text{M}$) ne permettent pas de discriminer les effets de l'UA de ceux de l'UE.

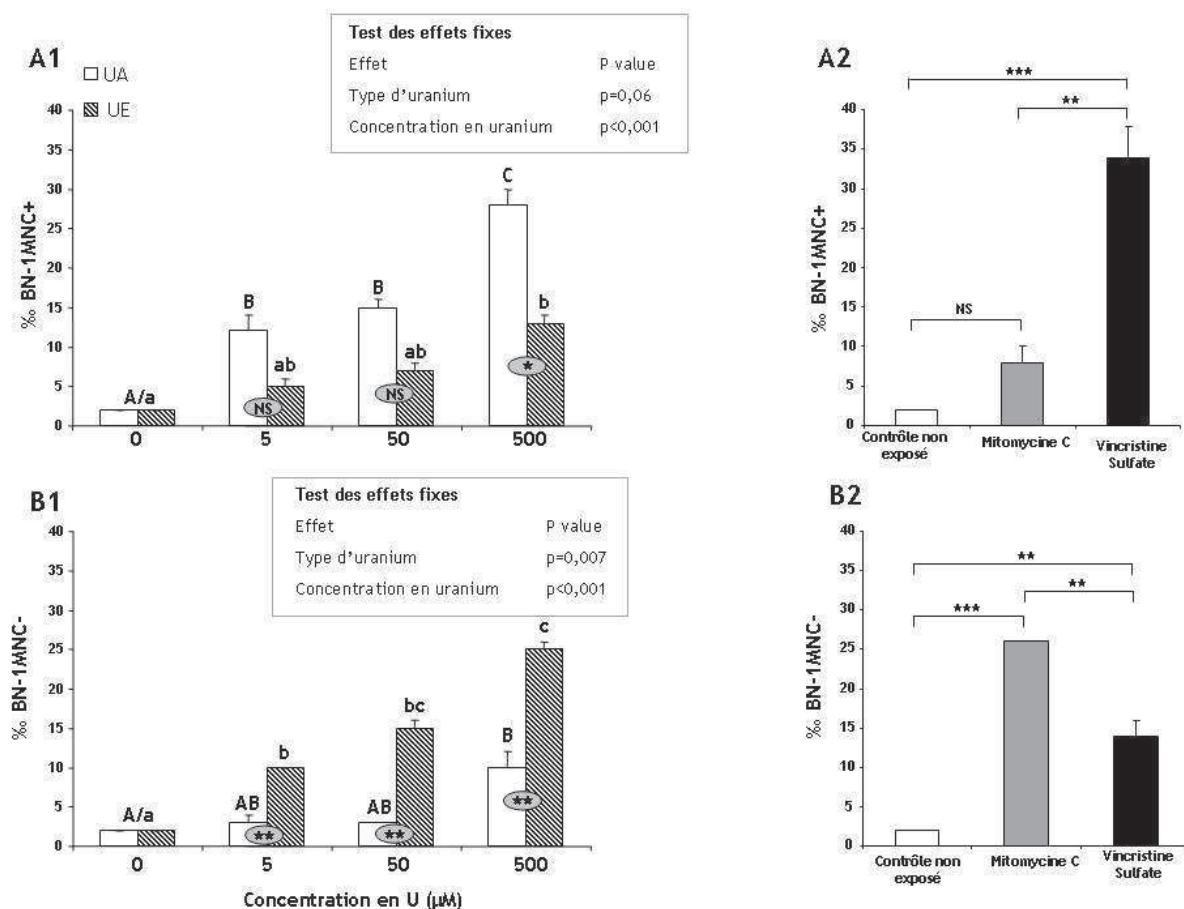


Figure 100. Contenu centromérique des micronoyaux dans les fibroblastes embryonnaires de souris binucléés après exposition à différentes concentrations en uranium appauvri (UA) ou en uranium enrichi (UE) (A1 et B1) et à la Mitomycine C ou à la Vincristine Sulfate (A2 et B2)

La présence (A: BN-1MNC+) ou l'absence (B: BN-1MNC-) d'ADN centromérique a été évaluée par une hybridation *in situ* avec des sondes d'ADN pancentromériques fluorescentes. Les cellules ont été contaminées avec différentes concentrations (0 µM, 5 µM, 50 µM et 500 µM) en UA (barres blanches) ou en UE (barres hachurées et grisées), et à la Mitomycine C (contrôle positif clastogène, 1,5 µM : barre grise) ou à la Vincristine Sulfate (contrôle positif aneugène, 16 µM : barre noire).

% BN-1MNC+ : % de cellules binucléées avec un micronoyau contenant un ou plusieurs centromères (micronoyau centromère-positif)

% BN-1MNC- : % de cellules binucléées avec un micronoyau sans centromère (micronoyau centromère-négatif)

A, B, C : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes (méthode des contrastes) entre les concentrations d'UA (P<0,05)

a, b, c : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes (méthode des contrastes) entre les concentrations d'UE (P<0,05)

NS : (A) aucune différence statistiquement significative entre UA et UE (méthode des contrastes) - (B) aucune différence statistiquement significative entre la Mitomycine C (contrôle positif clastogène) et le contrôle non exposé (méthode des contrastes)

* P<0,05 Différence statistiquement significative entre UA et UE (méthode des contrastes)

** P<0,01 (A) Différence statistiquement significative entre UA et UE - (B) Différence statistiquement significative entre les contrôles positifs (Mitomycine C et Vincristine Sulfate) et le contrôle non exposé (méthode des contrastes)

*** P<0,001 Différence statistiquement significative entre les contrôles positifs (Mitomycine C et Vincristine Sulfate) et le contrôle non exposé (méthode des contrastes)

VI.3 Cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs)

La Figure 101 illustre la proportion de cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) après une exposition à l'UA ou à l'UE à différentes concentrations (5 µM, 50 µM et 500 µM) (cf.

Figure 101 A) et à la Mitomycine C (1,5 μM) ou à la Vincristine Sulfate (16 μM , cf. Figure 101 B). La production de cellules BN-PNPs après exposition à l'U est influencée à la fois par la concentration en U ($P < 0,001$) et par le type d'U ($P < 0,001$), sans aucune interaction entre ces deux facteurs. Par conséquent, la concentration en U et le type d'U sont bien dissociables. Après exposition à l'UE, la fréquence de cellules BN-PNPs pour toutes les concentrations testées (5 μM , 50 μM et 500 μM) est supérieure au contrôle non exposé (0 μM) (par exemple 13,5 % pour 50 μM UE vs 2,5 % pour le contrôle non exposé). La fréquence de cellules BN-PNPs est 3,4 ; 5,4 et 7,6 fois plus élevée avec l'UE (pour 5 μM , 50 μM et 500 μM , respectivement) qu'avec le contrôle non exposé. De plus, la fréquence de cellules BN-PNPs augmente avec la concentration en UE pour atteindre un maximum de 19 % à 500 μM .

En revanche, après exposition à l'UA, la fréquence de cellules BN-PNPs aux faibles concentrations (5 μM et 50 μM) est comparable à celle du contrôle non exposé (0 μM). La fréquence de cellules BN-PNPs est 3 fois plus élevée que le contrôle non exposé à partir de 500 μM d'UA. D'autre part, l'UE induit significativement plus de cellules BN-PNPs que l'UA. En effet, l'UE induit 3,4 ; 5,4 et 2 fois plus de cellules BN-PNPs que l'UA (pour 5 μM , 50 μM et 500 μM , respectivement), cette différence est statistiquement significative pour les trois concentrations testées.

La fréquence de cellules BN-PNPs induite par l'agent clastogène, la Mitomycine C, est significativement supérieure à la fréquence de cellules BN-PNPs induite par l'agent aneugène, la Vincristine Sulfate. La proportion de ponts nucléoplasmiques après l'exposition à la Vincristine Sulfate est comparable à celle du contrôle non exposé et à celle aux faibles concentrations en UA (5 μM et 50 μM). Ces résultats pourraient indiquer une absence probable de clastogénicité de l'UA à faible concentration. En revanche, la proportion de cellules BN-PNPs après une exposition à la Mitomycine C est similaire à celle observée après une exposition à la plus forte concentration d'UA (500 μM) et à la concentration la plus faible d'UE (5 μM). Ces résultats pourraient indiquer une potentielle clastogénicité de l'UE.

En conclusion, ces résultats montrent que les cellules BN-PNPs permettent de différencier les effets induits par l'UA de ceux induits par l'UE, quelle que soit la concentration testée. Des taux élevés de BN-PNPs reflète l'activité clastogène de l'UE.

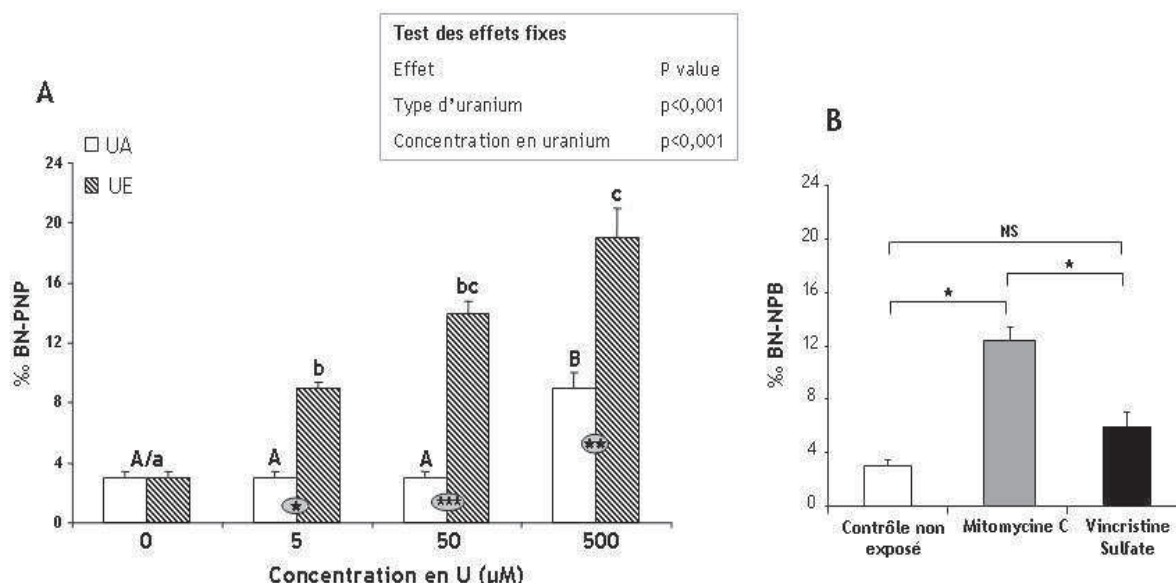


Figure 101. Proportion (moyenne \pm écart type) de cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) contaminées avec différentes concentrations (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM) d'uranium appauvri (UA : barres blanches) ou d'uranium enrichi (UE : barres hachurées et grisées) (A) et de Mitomycine C (contrôle positif clastogène, 1,5 μM : barre grise) ou de Vincristine Sulfate (contrôle positif aneugène, 16 μM : barre noire) (B)

‰: BN-PNPs : ‰ de cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques

A, B, C : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes (méthode des contrastes) entre les concentrations d'UA ($P < 0,05$)

a, b, c : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes (méthode des contrastes) entre les concentrations d'UE ($P < 0,05$)

NS: aucune différence statistiquement significative entre la Vincristine Sulfate et le contrôle non exposé (méthode des contrastes)

* $P < 0,05$ (A) Différence statistiquement significative entre UA et UE (méthode des contrastes) - (B) Différence statistiquement significative entre les contrôles positifs (Mitomycine C et Vincristine Sulfate) et le contrôle non exposé (méthode des contrastes)

** $P < 0,01$ Différence statistiquement significative entre UA et UE (méthode des contrastes)

*** $P < 0,001$ Différence statistiquement significative entre UA et UE (méthode des contrastes)

VI.4 Cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx)

La Figure 102 illustre le pourcentage de cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx) après exposition à différentes concentrations (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM) d'UA ou d'UE (cf. Figure 102 A) et de Mitomycine C (1,5 μM) ou de Vincristine Sulfate (16 μM) (cf. Figure 102 B). La production de cellules Mono-MNx après exposition à l'U est influencée à la fois par la concentration en U ($P = 0,005$) et par le type d'U ($P < 0,001$), sans aucune interaction entre ces deux facteurs. Par conséquent, la concentration en U et le type d'U sont bien dissociables. Le pourcentage de cellules Mono-MNx est 1,8 et 1,3 fois plus élevé après une exposition à 5 μM d'UA et 5 μM d'UE respectivement par rapport au contrôle non exposé (0 μM). Contrairement à d'autres paramètres étudiés, le pourcentage de cellules Mono-MNx diminue lorsque la concentration en U augmente de 5 μM à 500 μM (7,2 % vs 5,6 % pour 5 μM et 500 μM d'UA, respectivement ;

5,2 % vs 4,4 % pour 5 μM et 500 μM d'UE, respectivement). L'UA induit plus de cellules Mono-MNx que l'UE, cette différence est statistiquement significative pour toutes les concentrations testées.

Le pourcentage de cellules Mono-MNx induit par l'agent aneugène (la Vincristine Sulfate) est significativement plus élevé que le pourcentage de cellules Mono-MNx induit par l'agent clastogène (la Mitomycine C). Le pourcentage de cellules Mono-MNx après exposition à la Mitomycine C est comparable au pourcentage de cellules Mono-MNx du contrôle non exposé (0 μM) ainsi qu'aux concentrations les plus élevées d'UE (50 μM et 500 μM). En revanche, la proportion de cellules Mono-MNx après exposition à la Vincristine Sulfate est semblable à celle observée après exposition à la plus faible concentration d'UA (5 μM).

En conclusion, ces résultats montrent que les cellules Mono-MNx permettent de différencier les effets induits par l'UA de ceux induits par l'UE, quelle que soit la concentration testée ; l'UA favorisant l'induction de cellules Mono-MNx.

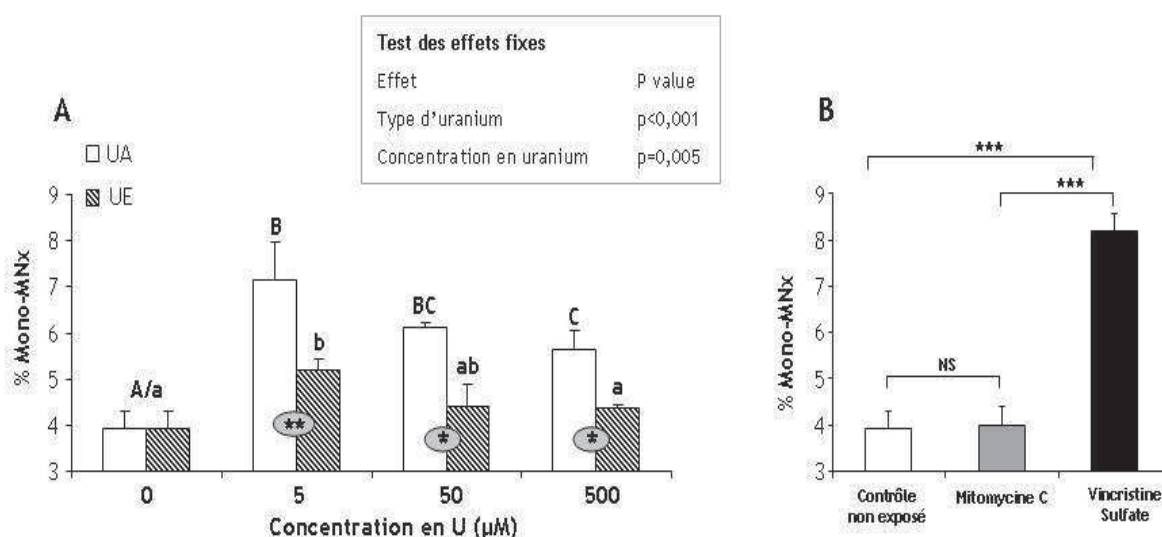


Figure 102. Pourcentage (moyenne \pm écart type) de cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx) contaminées avec différentes concentrations (0 μM , 5 μM , 50 μM et 500 μM) d'uranium appauvri (UA : barres blanches) ou d'uranium enrichi (UE : barres hachurées et grisées) (A) et de Mitomycine C (contrôle positif clastogène : barre grise) ou de Vincristine Sulfate (contrôle positif aneugène : barre noire) (B)

% Mono-MNx : % des cellules mononucléées avec des micronoyaux

A, B, C : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes (méthode des contrastes) entre les concentrations d'UA ($P < 0,05$)

a, b, c : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes (méthode des contrastes) entre les concentrations d'UE ($P < 0,05$)

NS : aucune différence statistiquement significative entre la Mitomycine C et le contrôle non exposé (méthode des contrastes)

* $P < 0,05$ Différence statistiquement significative entre UA et UE (méthode des contrastes)

** $P < 0,01$ Différence statistiquement significative entre UA et UE (méthode des contrastes)

*** $P < 0,001$ Différence statistiquement significative entre les contrôles positifs (Mitomycine C et Vincristine Sulfate) et le contrôle non exposé (méthode des contrastes)

VII. Estimation des doses reçues par les cellules

VII.1 Quantité d'uranium dans les cellules

Après 24 heures de contamination, la concentration d'U intracellulaire a été directement mesurée par ICP-MS dans les culots cellulaires (cf. [Tableau 16](#)). La quantité d'U dans les cellules augmente avec la concentration en U dans le milieu de culture. Après exposition à l'UE, la quantité d'U dans les cellules varie de 0,46 à 150 ng U/10⁶ cellules. Après exposition à l'UA, la quantité d'U dans les cellules varie de 0,62 à 144,6 ng U/10⁶ cellules.

Tableau 16. Résultats de la mesure de l'uranium dans les cellules

Concentration (μMol)	UE				UA			
	0	5	50	500	0	5	50	500
Quantité d'U dans les cellules (ng U/10 ⁶ cellules)	0,02±0,1	0,46±0,2	3,2±0,5	150±1,1	0,02±0,1	0,62±0,5	4,6±0,7	144,6±0,5

Les mesures de concentration en uranium sont exprimées en ng d'U par 10⁶ cellules. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne d'un minimum de 3 valeurs \pm SE

VII.2 Estimation des doses reçues par les cellules

Les valeurs expérimentales du dosage d'U intracellulaire dans les cellules ont été utilisées pour calculer la probabilité d'un impact (en anglais « one hit probability ») à la cellule et au noyau. Sans information sur la distribution de l'U entre le cytoplasme et le noyau, une distribution uniforme a été utilisée. En dépit des mesures de la concentration en U intracellulaire, la concentration initiale en U a été utilisée pour calculer la probabilité « d'un impact » résultant de l'U dans le milieu intercellulaire. En effet, la pénétration de l'U dans les cellules ne modifie pas significativement la concentration intercellulaire en U, mais il est susceptible d'augmenter significativement la probabilité d'impact, puisque l'émission α intracellulaire induit nécessairement un impact à la cellule et elle a plus d'une chance sur deux de donner un impact au noyau.

Les distributions d'énergie « d'un impact » communiquées à la cellule entière et au noyau ont été calculées pour l'UA et pour l'UE, dans le cas de contaminations intercellulaires. Dans tous les cas, ces distributions se sont révélées similaires pour l'UA et pour l'UE ; les moyennes de distribution n'étaient pas statistiquement différentes. En effet, les distributions de doses dépendent principalement des énergies des particules α émises. Pour l'U, enrichi ou non, les énergies des α émises sont identiques, seules les

proportions changent. Les distributions d'énergie « d'un impact » communiquées à la cellule entière et au noyau dans le cas de contaminations intercellulaires pour l'UA et pour l'UE sont présentées dans la [Figure 103](#).

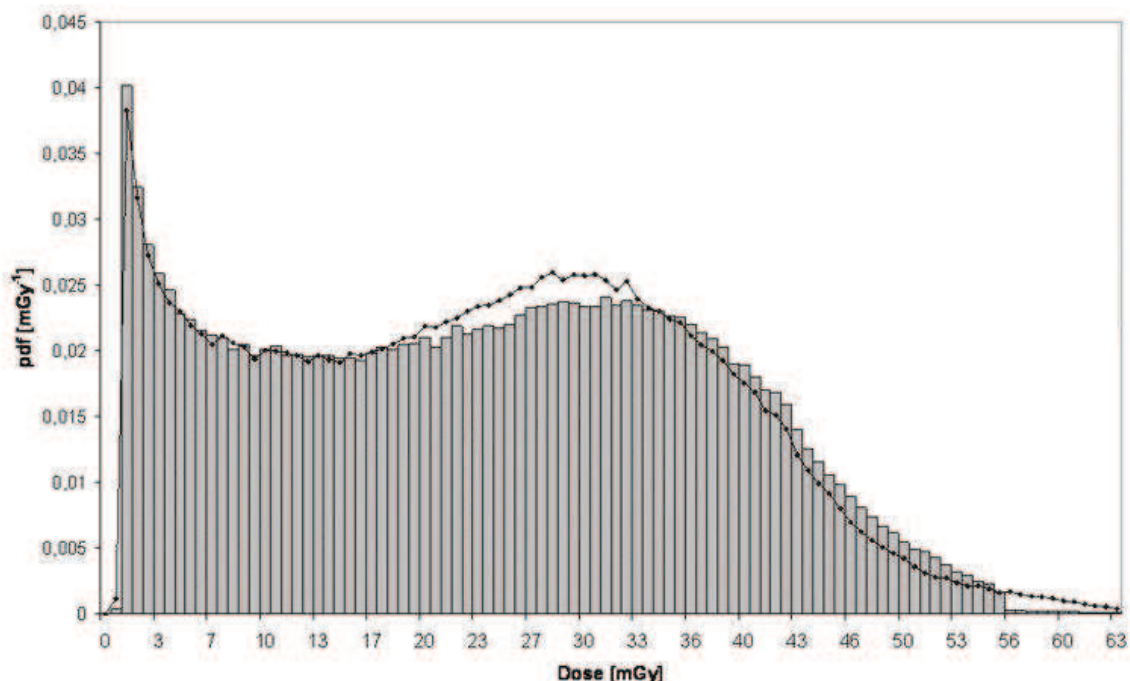


Figure 103. Distribution de l'énergie d'un impact unique délivrée à la cellule par l'uranium intercellulaire, UA (barres) et UE (point)

Une petite différence a été notée dans les valeurs de haute énergie, en raison de la forte proportion en ²³⁴U dans l'UE. Pour ces distributions, les moyennes sont de 23,6 mGy et 23,4 mGy pour l'UA et pour l'UE, respectivement. Si la cible était considérée comme le noyau, ces moyennes seraient de 41,2 mGy et 39,6 mGy pour l'UA et pour l'UE, respectivement (distributions non présentées).

La relation entre les effets biologiques et les grandeurs dosimétriques critiques a été calculé en utilisant l'équation dose moyenne suivante :

$$D = f_{in} \overline{D}_{in} + f_{out} \overline{D}_{out} = f_{tot} \overline{D}_{tot}$$

L'indice «in» se réfère au milieu intracellulaire et «out» au milieu intercellulaire. \overline{D} est la moyenne de la distribution d'énergie d'un impact distribué et «f» est la probabilité d'un impact. Ces quantités ont été calculées avec le noyau et la cellule entière comme cibles. L'addition des fréquences d'événements dus aux émissions α intra et extracellulaires conduit à définir une dose et une fréquence « totale », comme mentionné dans la dernière partie de l'équation ci-dessus. Comme attendu, f_{out} est directement proportionnelle à la concentration en U dans le milieu et environ 20 fois plus importante pour l'UE que

pour l'UA (les particules α d' ^{234}U ont une « gamme plus longue » que d'autres particules α et leur plus grande proportion dans l'UE aboutit à un plus grand nombre de particules susceptibles d'atteindre la cible; donc le rapport de f_{out} pour l'UA et l'UE est légèrement différent du rapport des activités spécifiques). En considérant le noyau comme cible, f_{out} est respectivement $0,3 \cdot 10^{-3} \%$ et $7,1 \cdot 10^{-3} \%$ pour $5 \mu\text{M}$ d'UA et $5 \mu\text{M}$ d'UE. La valeur pour UA pourrait être comparée avec la valeur donnée par [Miller et ses collaborateurs \(1998\)](#), en utilisant un code microdosimétrique développé par [Humm \(1987\)](#). En effet, la fréquence d'un impact à $10 \mu\text{M}$ pour une contamination d'ostéoblastes *in vitro* au DU-UO₂Cl₂ était de $1,4 \cdot 10^{-3} \%$. Bien que la modélisation des ostéoblastes ne soit pas décrite, la fréquence d'un impact calculée dans notre étude pourrait être envisagée pour donner un ordre de grandeur, de plus les deux simulations ont décrit un environnement cellulaire réaliste et comparable. Pour l'UE et l'UA à $5 \mu\text{M}$ et $50 \mu\text{M}$, la contribution maximale des émetteurs intracellulaires est de 3 % pour la dose à la cellule et de 9 % pour la dose au noyau. À $500 \mu\text{M}$, les concentrations intracellulaires expérimentalement mesurées ont augmenté cette contribution à 8,5 % et 25 % (UE et UA, respectivement) pour la dose à la cellule, et à 10 % et 25 % (UE et UA, respectivement) pour la dose au noyau. Les doses totales reçues par les cellules sont exprimées en μGray (cf. [Tableau 17](#)). Les cellules exposées à l'UE ont reçu des doses allant de 7,2 μGy à 760,5 μGy , tandis que les cellules exposées à l'UA ont reçu des doses allant de 0,3 μGy à 38,4 μGy . Les cellules exposées à l'UE ont reçu une dose 20 fois supérieure à celles exposées à l'UA pour la même concentration (par exemple 38,4 μGy et 760,5 μGy pour $500 \mu\text{M}$ UA et $500 \mu\text{M}$ UE, respectivement). Afin de simplifier au maximum, les contributions des événements intra et extracellulaires ne sont pas indiqués dans le [Tableau 16](#), pas plus que les doses reçues par le noyau.

Tableau 17. Résultats des doses reçues par les cellules selon le calcul microdosimétrique (μGray)

Concentration (μMol)	UE				UA			
	0	5	50	500	0	5	50	500
Dose reçues par les cellules (μGray)	0	7,2	70,9	760,5	0	0,3	3	38,4
Fréquences d'impact des cellules	-	$3,1 \cdot 10^{-4}$	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$3,4 \cdot 10^{-2}$	-	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-3}$

VII.3 Corrélation de la dose reçue par les cellules avec les effets biologiques observés

La **Figure 104** illustre la corrélation entre la dose reçue par les cellules et les cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmique (BN-PNPs : cf. **Figure 104 A**), et entre la dose reçue par les cellules et les cellules binucléées avec un micronoyau centromère-négatif (BN-1MNC- : cf. **Figure 104 B**). La corrélation entre la dose reçue par les cellules et les effets biologiques observés (BN-PNPs et BN-1MNC-) a consolidé et validé nos résultats. En effet, une corrélation hautement significative entre les effets biologiques et la dose reçue par les cellules tend à montrer un effet radiologique. En revanche, une faible corrélation entre les effets biologiques et la dose reçue par les cellules tend à montrer plutôt un effet chimique. Les cellules BN-1MNC- et les cellules BN-PNPs (cf. **Figures 104 A et 104 B**) sont significativement corrélées avec les doses reçues par les cellules ($y = 2,8311 \ln(x) + 3,2559$, $R^2 = 0,87$, $P < 0,001$ pour les BN-1MNC- ; $y = 2,2086 \ln(x) + 3,0421$, $R^2 = 0,88$, $P < 0,001$ pour les BN-PNPs).

Toutefois, les cellules BN-1MN, les cellules BN-1MNC+ et les cellules Mono-MNx ne sont pas significativement corrélées aux doses reçues par les cellules (données non présentées). Une tendance similaire a été obtenue lorsqu'on utilise la dose au noyau plutôt que la dose à la cellule.

La relation entre les doses et les fréquences de cellules BN-PNPs et de BN-1MNC-, comme l'illustre la **Figure 104**, est fournie uniquement pour donner une tendance des effets observés et pourrait être utilisée pour donner un ordre de grandeur des effets dans la fourchette de doses étudiées.

Cette tendance illustre l'augmentation rapide des effets à faible dose (-50 μ Gy) suivie d'un ralentissement des effets avec l'augmentation de la dose. Néanmoins, il faut noter que la dose prise en compte est le produit de la probabilité d'impact et la dose moyenne, ce qui aboutit à la moyenne de la dose moyenne communiquée à un petit nombre de cellules à travers toutes les cellules.

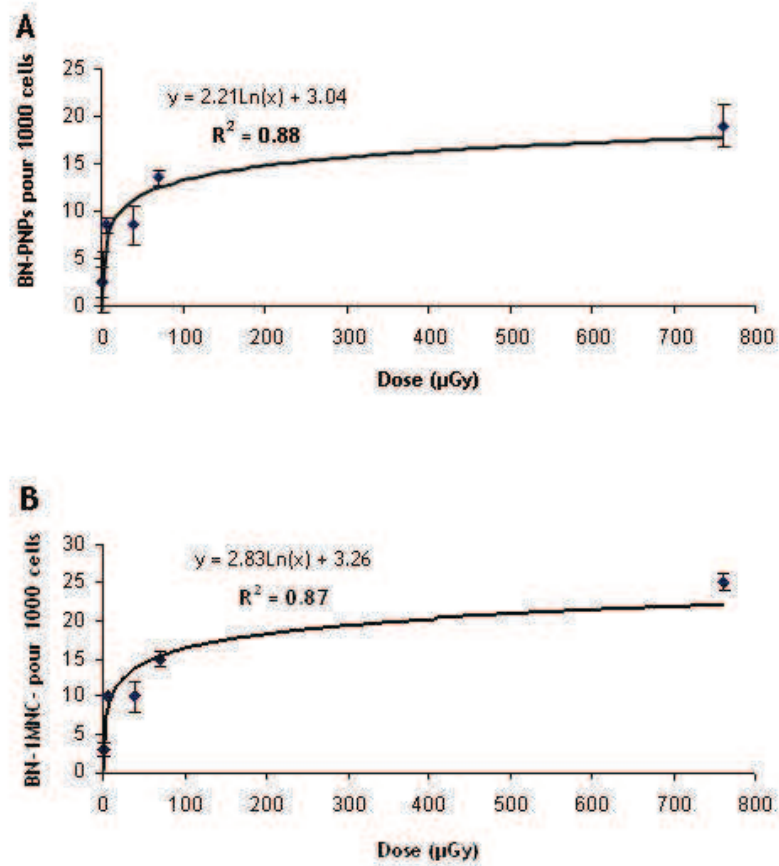


Figure 104. Relation dose-réponse des cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmique (A) et des cellules binucléées avec un micronoyau centromère-négatif (B)

Tableau 18. Tableau de synthèse des résultats obtenus sur les fibroblastes embryonnaires de souris *in vitro*

Objectifs	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Recherche de marqueurs biologiques permettant de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques ➤ Observer si les lésions de l'ADN détectées sont dépendantes de la composition isotopique de l'U utilisé 		Bilan
Type cellulaire étudié	Fibroblastes embryonnaires de souris C3H10T1/2		
Analyses réalisées	Techniques utilisées	Conditions testées	Résultats
Cytotoxicité	Coloration au Bleu de Trypan	<p style="text-align: center;">UA et UE 0 µM 5 µM 50 µM et 500 µM</p>	Absence cytotoxicité U (mort cellulaire < 2 %)
	Analyse sub G0-G1 en cytométrie de flux		Absence augmentation % cellules en sub G0-G1
Génotoxicité	Test des comètes		<p>↗ OTM_γ² avec la concentration en U OTM_γ² UE (500 µM) > OTM_γ² UA (500 µM) > Contrôle</p>
	Immunofluorescence γ-H2AX		<p>↗ CDBs avec la concentration en U CDB UE >> CDB UA >> Contrôle</p>
	Numération des MNx : BN-1MN		<p>Concentration (p < 0,001) Type d'U (p = 0,81) ↗ BN-1MN avec la concentration en U UA = UE > Contrôle</p>
	BN-PNPs		<p>Concentration (p < 0,001) Type d'U (p < 0,001) ↗ BN-PNP avec la concentration en U UE >> UA > Contrôle</p>
	Mono-MNX		<p>Concentration (p < 0,001) Type d'U (p < 0,001) ↘ Mono-MNX avec la concentration en U UA > UE > Contrôle</p>
	FISH : BN-1MNC+		<p>Concentration (p < 0,001) Type d'U (p = 0,06) UA (500 µM) > UE (500 µM) > Contrôle</p>
BN-1MNC-		<p>Concentration (p < 0,001) Type d'U (p = 0,007) UE >> UA > Contrôle</p>	<p>Augmentation des CDBs induite par l'effet radiologique de l'U</p> <p>Marqueur de génotoxicité de l'U</p> <p>Marqueur de radiotoxicité de l'U</p> <p>Marqueur de chimiotoxicité de l'U</p> <p>Marqueur de radiotoxicité de l'U</p> <p>UA : BN-MNC+ > BN-MNC- UE : BN-MNC- > BN-MNC+</p>

<p>Étude du stress oxydant (EROs)</p>	<p>Marquage au DCF-DA</p>		<p>Concentration (p<0,001) Type d'U (p=0,1) UA = UE (5µM et 50 µM) > Contrôle UE (500 µM) >> UA (500 µM) > Contrôle</p>	<p>U induit ERO dès 5 µM ↗ production EROs induite par l'effet radiologique de l'U</p>																												
<p>Mécanisme de réparation des lésions de l'ADN</p>	<p>Étude de l'expression des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation par RT-PCR</p>	<p>UA et UE 0 µM 5 µM 50 µM et 500 µM</p>	<p>≠ UA et UE : Checkpoint (Surexpression UE) UA et UE : Surexpression gènes impliqués dans le BER et la HR</p>	<p>Implication des mécanismes BER et HR en réponse à une exposition à l'U (UA et UE)</p>																												
<p>Étude du cycle cellulaire</p>	<p>Blocage dans le cycle cellulaire en cytométrie de flux (BrdU)</p>		<p>↘ nombre cellules en phase S : UE (500 µM) > UA (500 µM) ↗ nombre cellules en phase G1 UE > UA</p>	<p>Accumulation cellules en phase S (UA > UE) Arrêt cellules en phase G1 (UE > UA) → Ralentissement dans la progression au travers du cycle cellulaire</p>																												
<p>Calcul de la dose reçue par les cellules</p>	<p>Modélisation mathématique</p>		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2"></th> <th colspan="3">UE</th> <th colspan="3">UA</th> </tr> <tr> <th>Concentration (µMol)</th> <th></th> <th>0</th> <th>5</th> <th>50</th> <th>500</th> <th>0</th> <th>5</th> <th>50</th> <th>500</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Dose reçues par les cellules (µGray)</td> <td></td> <td>0</td> <td>7,2</td> <td>70,9</td> <td>760,5</td> <td>0</td> <td>0,3</td> <td>3</td> <td>38,4</td> </tr> </tbody> </table>			UE			UA			Concentration (µMol)		0	5	50	500	0	5	50	500	Dose reçues par les cellules (µGray)		0	7,2	70,9	760,5	0	0,3	3	38,4	<p>Doses reçues par les cellules avec UA 20 fois inférieures à celles reçues par les cellules avec UE</p>
		UE			UA																											
Concentration (µMol)		0	5	50	500	0	5	50	500																							
Dose reçues par les cellules (µGray)		0	7,2	70,9	760,5	0	0,3	3	38,4																							

DISCUSSION

Cette étude, réalisée *in vitro* sur fibroblastes embryonnaires de souris a comparé, pour la première fois, les effets génotoxiques de l'UA à 0,3 % en ^{235}U et de l'UE à 12 % en ^{235}U . L'étude des effets génotoxiques de l'U a été réalisée en utilisant diverses techniques. Dans un premier temps, les effets aneugènes et clastogènes de l'UA et de l'UE ont été mesurés par le test de numération des micronoyaux (CBMN) couplée à l'hybridation fluorescente *in situ* de sondes pancentromériques. Le statut dosimétrique bien caractérisé de ce modèle a permis de corrélérer l'effet clastogène de l'U et la dose de rayonnements ionisants reçue par les cellules. Cette première étude a principalement permis de comparer les effets clastogènes et aneugènes de l'U. Afin de comprendre comment est induite l'instabilité génomique observée après exposition à l'UA et à l'UE à l'aide du test CBMN, les lésions précoces de l'altération du matériel génétique ont ensuite été étudiées. Pour cela, le test des comètes en condition alcaline complété par le marquage par immunofluorescence de l'histone $\gamma\text{-H2AX}$ ont été réalisés. L'utilisation du DCFH-DA a permis d'étudier par la suite l'induction de stress oxydant après exposition à l'U. Les différentes lésions primaires de l'ADN peuvent être spécifiquement étudiées par diverses techniques ; cependant la mise en place et l'analyse de ces diverses techniques auraient été très longues et fastidieuses. C'est pourquoi, une étude de l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN a été réalisée afin d'avoir une vue d'ensemble sur les lésions potentielles induites par une exposition à l'U. Pour compléter ces études, la cytométrie de flux a permis de suivre la progression des cellules au travers de leur cycle de division en fonction des différentes conditions de contamination par l'U.

La génotoxicité de l'U résulte de la combinaison de ses propriétés chimiques, en tant que métal lourd, et de ses propriétés radiologiques, en tant qu'émetteur de rayonnements ionisants ce qui conduit à des effets à la fois aneugènes et clastogènes (Lin *et al.*, 1993 ; Miller *et al.*, 1998 et 2003 ; Monleau *et al.*, 2006 ; Stearns *et al.*, 2005). Actuellement il n'existe aucune analyse comparative des différents mélanges isotopiques de l'U ; de plus le profil génotoxique de l'U (clastogène / aneugène) en fonction de son enrichissement n'a jamais été évalué. La comparaison des effets de l'exposition à l'UA et à l'UE a démontré que les changements dans la composition isotopique de l'U, impliquant une augmentation de l'activité spécifique, ont entraîné une augmentation des effets radiotoxiques et peuvent spécifiquement modifier le taux d'anomalies cytogénétiques.

I. Cytotoxicité de l'uranium

Dans notre étude sur les fibroblastes embryonnaires de souris, l'exposition à l'UA et à l'UE n'est pas cytotoxique pour toutes les concentrations (ou doses) testées (pas de mortalité significative après exposition à l'U pour les doses de $3 \cdot 10^{-4}$ mGy à 0.76 mGy). De plus, l'exposition à l'UA et à l'UE n'a eu aucun effet sur la prolifération des fibroblastes (pas de variation significative du CBPI). Ces résultats sont en accord avec les données de diverses études (Calini *et al.*, 2002 ; Mitchell *et al.*, 2004).

En effet, Mitchell et ses collaborateurs (2004) ont publié des données concernant la survie clonogénique des cellules C3H10T1/2 après la traversée nucléaire de particules α de 5,3 MeV. La plus faible fluence utilisée dans leurs expériences est « la traversée » de 2 particules α par noyau. Cette fluence est bien plus élevée que celle utilisée dans nos expériences (au moins 5,9 fois). En effet, dans notre étude, un maximum de 3,4 % des cellules (cytoplasme + noyau) ont été irradiées par seulement une particule α . Les résultats obtenus par Mitchell et ses collaborateurs (2004) sont compatibles avec les nôtres. En effet, pour la plus faible fluence (traversée de 2 particules α par noyau) utilisée, aucune diminution significative de la survie clonogénique des cellules irradiées, à basse ou haute densité, par rapport aux cellules témoins non irradiées n'a été observée.

Par ailleurs, Calini et ses collaborateurs (2002) ont publié des données concernant la viabilité des cellules C3H10T1/2 après irradiation γ (^{137}Cs) à 1,5 et 10 Gray. Après 24 heures et 48 heures d'irradiation, la croissance cellulaire n'a pas été affectée. Par conséquent, l'irradiation γ (^{137}Cs) sur les fibroblastes C3H10T1/2 n'est pas cytotoxique pour toutes les doses testées (1,5 et 10 Gray) après 24 heures et 48 heures d'irradiation.

La lignée de fibroblastes embryonnaires de souris (C3H10T1/2) utilisée, comme de nombreuses lignées ou cultures primaires de fibroblastes, est très résistante à la mort cellulaire. En effet, les études citées précédemment ont montré que la viabilité des fibroblastes C3H10T1/2 après irradiation (α ou γ) n'a pas été affectée.

II. Anomalies cytogénétiques induites par l'uranium

Le test *in vitro* de numération des micronoyaux avec blocage en cytotérièse (CBMN) est une méthode fiable pour quantifier les cassures et les pertes chromosomiques dans les cellules nucléées.

II.1 Les cellules binucléées avec un micronoyau (BN-1MN)

Cette étude a montré que toutes les concentrations d'U testées (UA et UE) induisent une augmentation des cellules BN-1MN. En effet à la concentration la plus élevée (500 μM), l'UA et l'UE (38 %) induisent environ 10 fois plus de cellules BN-1MN que le contrôle non exposé (4 %). Ces résultats confirment des travaux précédents qui avaient montré une augmentation des micronoyaux dans des cellules d'ovaires de hamsters chinois (CHO), dans des cellules d'ostéoblastes humaines (HOS), ainsi que dans des lymphocytes humains après exposition à l'U (Lin *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 2003; Ibrulj *et al.*, 2004; Krunic *et al.*, 2005). En parallèle, les résultats de cette étude confirment l'augmentation de micronoyaux après exposition à un agent clastogène, la Mitomycine C, et à un agent aneugène, la Vincristine Sulfate (Elhajouji *et al.*, 1998 ; Rosefort *et al.*, 2004).

Étonnamment, aucune différence statistiquement significative dans la fréquence des cellules BN-1MN entre l'UA et l'UE n'a été observée dans la présente étude. En outre, nos résultats montrent que la fréquence des cellules BN-1MN n'est pas corrélée avec la dose de rayonnements ionisants reçue par les cellules. Plusieurs études *in vitro* ont été menées sur des cellules adhérentes irradiées par des particules α provenant d'une source d' ^{241}Am ou d'un microfaisceau ou bien encore provenant du radon, avec des doses plus élevées que dans notre modèle expérimental (Brooks *et al.*, 1994 ; Nelson *et al.*, 1996 ; Yamada *et al.*, 2002). Ces travaux ont démontré une relation linéaire entre le nombre de particules α ou la dose absorbée par les cellules et les fréquences de micronoyaux. Dans notre étude, sauf pour 500 μM UE, la proportion de cellules touchées par les particules α variait de 0,01 % à 3,1 %, proportion nettement inférieure à la fréquence observée des micronoyaux qui oscillait entre 15 % et 22 %. Dans ces conditions, la fraction des micronoyaux induits par les particules α pourrait résulter d'effets de voisinage (« effet bystander »). La relation dose-réponse non-linéaire obtenue est en accord avec les modèles de microdosimétrie développés pour analyser la réponse adaptative ainsi que « le comportement dose-réponses des effets de voisinage » (Leonard, 2008).

Toutefois, l'augmentation de la fréquence des cellules BN-1MN avec la concentration en U n'est pas seulement le résultat d'effets de voisinage (« effet bystander ») liés à l'irradiation α , mais il est également le résultat de la toxicité chimique de l'U liée à ses propriétés de métal lourd. En effet, les métaux sont connus pour induire des micronoyaux (Migliore *et al.*, 2002 ; Seoane et Dulout, 2001). Les connaissances actuelles sur les mécanismes de génotoxicité des métaux suggèrent que plusieurs mécanismes pourraient expliquer leur potentiel génotoxique. Leur action principale semble être la formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène menant à la peroxydation lipidique, la formation

d'adduits à l'ADN et l'interférence avec les mécanismes de réparation et / ou de réplication de l'ADN (Hartwig, 1995 ; Salnikow et Zhitkovich, 2008).

De nombreuses études de biosurveillance ont démontré que la détermination des fréquences des MNx était un biomarqueur fiable dans les populations humaines exposées thérapeutiquement (Ramirez *et al.*, 1997), professionnellement (Thierens *et al.*, 1999 et 2000), accidentellement ainsi que par l'environnement (Fenech *et al.*, 1997) à des rayonnements ionisants ayant de faibles transferts d'énergie linéique (TEL). En considérant les radiations ionisantes à TEL élevés, comme les particules α produites par l'U, aux très faibles doses, nos résultats ont montré que la fréquence de cellules BN-1MN n'était pas un bon marqueur pour évaluer les effets radiotoxiques de l'U (dans notre modèle expérimental de contamination *in vitro*). Cependant, les cellules BN-1MN pourraient être un bon marqueur des effets chimiotoxiques de l'U puisque leur induction est uniquement impactée par la concentration en U. Le problème est de savoir si les cellules BN-1MN sont seulement dues à l'effet chimiotoxique de l'U.

II.2 Hybridation *in situ* de sondes pancentromériques

Pour explorer cette possibilité, l'hybridation fluorescente *in situ* avec des sondes pancentromériques a par la suite été réalisée. Les fréquences des micronoyaux se sont révélées être augmentées par l'exposition à des agents clastogènes et aneugènes ainsi que dans les cellules présentant une instabilité génomique (Fenech, 2000 ; Gisselsson *et al.*, 2001 ; Norppa et Falck, 2003). Le contenu de micronoyaux, évalué par des sondes d'ADN centromériques, reflète leur origine (Kirsch-Volders *et al.*, 1997 ; Norppa et Falck, 2003). Pour chaque cellule micronucléée, nous pouvons différencier : (i) les micronoyaux sans signal d'hybridation fluorescent (acentromériques ou MNC-) contenant des fragments chromosomiques acentromériques issus d'un événement clastogène, et (ii) les micronoyaux présentant un ou plusieurs spots de fluorescence (centromériques ou MNC+) contenant des chromosomes entiers perdus au cours de la mitose précédente à la suite d'un événement aneugène.

Les micronoyaux avec marquage centromérique (MN centromère positif : BN-MNC+, principalement des BN-1MNC+ dans notre étude car nous observons que des cellules binucléées avec un seul MN) sont produits par des agents aneugènes et sont considérés comme contenant des chromosomes entiers. Cette étude a montré que l'augmentation de la fréquence des cellules BN-1MN après exposition à l'UA est principalement attribuable à une augmentation des cellules binucléées centromère positif (BN-1MNC+). Les cellules BN-1MNC+ ont tendance à être préférentiellement induit par l'UA (BN-1MNC+ représentent 80 % et 33 % des BN-1MN après exposition à l'UA et à l'UE, respectivement). Ces résultats reflètent une

augmentation de perte chromosomique associée à l'exposition à l'UA. Avec notre modèle *in vitro*, les cellules BN-1MNC+ induite par l'agent aneugène, la Vincristine Sulfate, représentent 71% des cellules BN-1MN. Ainsi, l'UA pourrait être classé comme un agent aneugène. Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus avec certains métaux par [Seoane et ses collaborateurs \(Seoane et Dulout, 2001\)](#), qui ont constaté que près de 70 % ou plus des cellules BN-1MN étaient des cellules avec un marquage centromérique (BN-MNC+) après une exposition *in vitro* de fibroblastes diploïdes humains au cadmium, au chrome ou aux sels de nickel. Dans notre étude, aucune corrélation significative entre les cellules BN-1MNC+ et les doses de rayonnements ionisants reçues par les cellules n'a été établie. Ainsi, l'augmentation des cellules BN-1MNC+ semble être principalement liée à l'effet chimique de l'U en tant que métal.

Après exposition à l'UE, l'augmentation des cellules BN-1MN est principalement attribuable à une augmentation des cellules binucléées centromère négatif (BN-1MNC-), reflétant une augmentation des cassures chromosomiques. L'induction des cellules BN-1MNC- est deux fois plus élevée avec l'UE qu'avec l'UA pour toutes les concentrations testées. En effet, les cellules BN-1MNC- sont plus induites par l'UE (environ 67 % des BN-1MN) que par l'UA (environ 20 % des BN-1MN). Avec notre modèle d'étude *in vitro*, les cellules BN-1MNC- induite par l'agent clastogène, la Mitomycine C, représentent 76 % des cellules BN-1MN. Ainsi, l'UE pourrait être classé comme un agent clastogène. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par [Darroudi et ses collaborateurs \(1996\)](#) qui ont trouvé qu'environ 70 % ou plus des cellules binucléées avec des micronoyaux étaient constituées par des cellules BN-MNC- dans les lymphocytes du sang périphérique humain après une exposition *in vitro* à des agents clastogènes connus (rayons X ou « methyl methanesulphonate »). [Sari-Minodier et ses collaborateurs \(2002\)](#) ont également montré que 70 % ou plus des cellules binucléées avec des micronoyaux étaient constituées de cellules BN-MNC- dans une population de radiologues industriels exposée à des sources émettrices de rayonnements γ ou de rayons X. Dans nos conditions expérimentales, les cellules BN-1MNC- pourraient donc être dues en partie aux effets radiologiques de l'U en tant qu'émetteur α . En outre, la corrélation significative entre les cellules BN-1MNC- et les doses de rayonnements ionisants reçues par les cellules confirme bien que les effets clastogènes de l'U quantifié par les cellules BN-1MNC- dépendent principalement des effets radiologiques de l'U.

Dans nos conditions expérimentales, les cellules BN-1MN sont composées à la fois de cellules BN-1MNC+ et de cellules BN-1MNC-. La numération des cellules BN-1MN n'a pas montré de différence significative entre les effets génotoxiques de l'UA et ceux de l'UE. Cependant, l'hybridation fluorescente *in situ* avec des sonde pancentromériques a permis de différencier les actions aneugénique et clastogénique

des mélanges isotopiques de l'U. Ainsi, l'induction de cellules BN-1MN n'est pas seulement le résultat des effets chimiques de l'U en tant que métal. L'UA (0,3 % en ^{235}U) peut être ainsi classé comme un agent principalement aneugène alors que nous avons vu précédemment l'UE (12 % en ^{235}U) peut être classé comme un agent principalement clastogène.

II.3 Les cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs)

Dans la plupart des études utilisant le test de numération des micronoyaux, les cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) sont rarement étudiées. Récemment, [Umegaki et Fenech \(2000\)](#) ont suggéré de compter les ponts nucléoplasmiques (PNPs) entre les noyaux des cellules binucléées dans le test CBMN. En effet, ces PNPs fournissent une mesure de réarrangement chromosomique qui ne se mesure pas si on s'intéresse uniquement aux cellules binucléées. Les PNPs proviennent de chromosomes dicentriques induits par des cassures double brin. Avec l'augmentation du nombre de CDBs après exposition à l'U il nous a par conséquent semblé intéressant d'étudier les variations des taux de PNPs dans des cellules traitées par l'UA et l'UE. De plus, l'analyse concomitante des ponts nucléoplasmiques (PNP) et des MNx n'augmente pas le temps d'analyse et peut fournir des informations utiles concernant le type d'agent mutagène impliqué (clastogène ou aneugène). Grâce à l'analyse des MNx avec blocage en cytotidérèse, les cellules binucléées avec des PNPs peuvent s'accumuler par le blocage en cytotidérèse. Les métaux lourds comme le nickel ou le tungstène, considéré comme de faibles agents clastogènes, n'induisent pas de chromosomes dicentriques et par conséquent pas de ponts nucléoplasmiques ([Miller et al., 2002b](#)). En revanche, l'induction de chromosomes dicentriques, et donc de ponts nucléoplasmiques, par les rayonnements α , considérés comme de forts agents clastogènes, est bien documenté ([Greinert et al., 1999](#) ; [Plan et al., 2005](#) ; [Stephan et al., 2005](#)). [Plan et ses collaborateurs \(2005\)](#) ont démontré une augmentation de la fréquence des chromosomes dicentriques avec la dose dans un modèle *in vitro* de fibroblastes humains irradiés par des particules α émises par une source de ^{238}Pu . Dans l'ensemble, les chromosomes dicentriques, et donc les ponts nucléoplasmiques, sont considérés comme des indicateurs spécifiques de l'exposition aux rayonnements ionisants, en raison de leur faible fréquence spontanée dans la population non exposée ([Hoffmann et Schmitz-Feuerhake, 1999](#) ; [Miller et al., 2002b](#)).

Dans notre étude, l'exposition à l'UE induit plus de cellules BN-PNPs que l'exposition à l'UA pour toutes les concentrations testées. Ces résultats confirment les travaux de [Miller et ses collaborateurs \(2002b\)](#), qui ont montré une augmentation du nombre de chromosomes dicentriques après exposition à l'U. De plus, ils ont validé l'utilisation de chromosomes dicentriques comme un biomarqueur des lésions de

l'ADN et du réarrangement chromosomique après exposition à l'U. La numération des cellules BN-PNPs dans le test des MNx donne des informations sur le réarrangement chromosomique asymétrique qui est actuellement uniquement obtenu avec l'analyse des chromosomes dicentriques en métaphase (Thomas *et al.*, 2003). Par conséquent, la numération des cellules BN-PNPs dans le test CBMN fournirait un complément utile à l'utilisation des chromosomes dicentriques en dosimétrie biologique lors d'exposition aux rayonnements (IAEA, 2001).

Par ailleurs, Thomas et ses collaborateurs (2003) ont suggéré que le ratio PNP/MN pourrait être un marqueur essentiel pour évaluer les effets toxiques des composés testés. Ainsi, l'induction de MNx en l'absence de PNP pourrait refléter l'action d'agents aneugènes, tel qu'un poison du fuseau, puisque le MN serait le résultat de pertes de chromosomes. Par conséquent, un agent aneugène tel qu'un poison du fuseau aurait un ratio PNP/MN proche de 0, tandis qu'un agent hautement clastogène tels que les rayonnements ionisants aurait un ratio PNP/MN proche de 0,77 (Thomas *et al.*, 2003). Dans notre étude, le ratio moyen PNP/MN est de 0,2 pour l'UA et de 0,6 pour l'UE confirmant que l'UA pourrait principalement être identifié comme un agent aneugène tandis que l'UE pourrait principalement être identifié comme un agent clastogène (cf. Tableau 19). De plus, l'étroite corrélation entre le nombre de cellules BN-PNPs et les doses de rayonnements reçues par les cellules montre que les cellules BN-PNPs sont principalement dues aux effets radiologiques de l'U.

Tableau 19. Synthèse du ratio PNP/MN sur les fibroblastes embryonnaires de souris (C3H10T1/2) contaminés avec l'UA ou l'UE

			MNx (%)	PNP (%)	Ratio PNP/MN
UA	5 μ M	Faibles activités spécifiques	1,5	0,3	0,2
	50 μ M		1,8	0,3	0,2
	500 μ M		3,8	0,9	0,2
UE	5 μ M	Plus fortes activités spécifiques	1,5	0,9	0,6
	50 μ M		2,2	1,4	0,6
	500 μ M		3,8	1,9	0,5

En conclusion, la présence de cellules BN-PNPs reflète les effets clastogènes de l'U qui augmentent avec l'enrichissement en ^{235}U . Ces résultats confirment les conclusions antérieures obtenues avec le test CBMN associé à l'hybridation *in situ* de sondes d'ADN pancentromériques (cellules BN-MNC-).

II.4 Les cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx)

Avec le test de numération des micronoyaux, d'autres anomalies cytogénétiques peuvent être observées et comptabilisées telles que les cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx). Ce

marqueur cytogénétique (Mono-MNx) a été analysé afin de confirmer les conclusions antérieures obtenues avec le test CBMN et un marquage centromérique.

De récentes études ont démontré que les composés aneugènes, et non les composés clastogènes, induisent des micronoyaux dans les cellules mononucléées (Elhajouji *et al.*, 1998 ; Rosefort *et al.*, 2004). En accord avec ces études, nos résultats ont montré que la Mitomycine C (agent clastogène) n'a pas augmenté les fréquences des MNx dans les cellules mononucléées, alors que la Vincristine Sulfate (agent aneugène) a induit une augmentation des MNx dans les cellules mononucléées. Dans notre étude, l'UA induit plus de cellules mononucléées avec des MNx (Mono-MNx) que l'UE et cette différence est statistiquement significative pour toutes les concentrations testées. Ce résultat suggère par conséquent que les cellules Mono-MNx pourraient être un facteur supplémentaire permettant de discriminer les effets induits par l'UA de ceux induits par l'UE et ceci indépendamment de la concentration testée. Le pourcentage de cellules Mono-MNx après exposition à de fortes concentrations d'UE (50 μM et 500 μM) est comparable au contrôle non exposé ainsi qu'à la Mitomycine C. L'UE pourrait donc être classé comme un faible agent aneugène. En revanche, le pourcentage de cellules Mono-MNx après une exposition à la plus faible concentration d'UA (5 μM) est similaire au pourcentage de cellules Mono-MNx observé après une exposition à la Vincristine Sulfate. Par conséquent, l'UA pourrait être classé comme un agent aneugène. Contrairement à d'autres paramètres cytogénétiques étudiés, le pourcentage de cellules Mono-MNx diminue avec l'augmentation des doses de rayonnements ionisants reçues par les cellules et donc avec une augmentation des effets clastogènes. Il semble que les cellules Mono-MNx soient induites par un effet chimiotoxique car elles diminuent voire disparaissent (fréquence identique au contrôle non exposé) quand il y a un effet radiotoxique comme pour l'UE.

En conclusion, la présence de cellules Mono-MNx reflète les effets aneugènes de l'U qui diminuent avec l'enrichissement en ^{235}U . Ces résultats confirment les conclusions antérieures obtenues avec le test CBMN associé à l'hybridation *in situ* de sondes d'ADN pancentromériques : les mélanges isotopiques de l'U à faible activité spécifique ont un effet aneugène qui prédomine. La numération des micronoyaux dans les cellules mononucléées après blocage de la cytotélorèse serait donc utile dans les études de génotoxicité.

Nos travaux ont montré que l'U induit une instabilité génomique par le biais d'une augmentation des micronoyaux (centromériques et acentromériques) dans les cellules binucléées, une augmentation des ponts nucléoplasmiques ainsi qu'une augmentation des micronoyaux dans les cellules mononucléées. De

plus, la comparaison des effets génotoxiques induits par l'UA et par l'UE a permis de démontrer que l'UA serait un agent principalement aneugène alors que l'UE serait un agent principalement clastogène.

Afin de comprendre comment est induite l'instabilité génomique observée après exposition à l'UA et à l'UE, nous nous sommes intéressés à l'étude des altérations précoces du matériel génétique à savoir les lésions primaires de l'ADN.

III. Visualisation globale des lésions primaires de l'ADN

Le test des comètes en condition alcaline a permis de visualiser un large éventail de lésions primaires de l'ADN (sites labiles en condition alcaline, cassures simple et double brin) induites par l'U, sans cependant pouvoir les discriminer. Cette étude a démontré que l'OTM χ^2 des cellules exposées à l'U est corrélé à la concentration d'U. Cette augmentation des dommages avec la concentration est observée quel que soit le type d'U (UA ou UE). Ces résultats sont en accord avec les données obtenues par [Thiébaud et ses collaborateurs \(2007\)](#). Cette équipe a démontré, à l'aide du test des comètes en condition alcaline, que l'exposition *in vitro* de cellules proximales rénales de rat (NRK-52E) à des concentrations sub-létales et létales d'UA entraîne une élévation significative des dommages de l'ADN qui dépendent de la concentration en U. Ce test des comètes en condition alcaline a aussi été utilisé par [Monleau et ses collaborateurs \(2005\)](#) afin d'étudier les lésions de l'ADN de cellules pulmonaires de rat ayant inhalé *in vivo* un aérosol d'U. Ils ont démontré que l'inhalation d'UA provoque des cassures de brins dans l'ADN des cellules broncho-alvéolaires. De plus, ils ont aussi démontré que les dommages de l'ADN observés après exposition à l'U pourraient être en partie une conséquence de la production d'EROs. L'U est connu pour induire un stress oxydant ([Monleau et al., 2006](#) ; [Thiébaud et al., 2007](#) ; [Periyakaruppan et al., 2007](#)). Par conséquent, dans les conditions expérimentales de cette étude, les dommages à l'ADN observés après contamination par l'UA et l'UE (ayant les mêmes propriétés chimiques) pourraient être en partie la conséquence de la production d'EROs. En effet, l'U pourrait induire la production d'EROs en agissant comme catalyseur de la réaction de Fenton comme c'est le cas pour certains métaux (Fer, cuivre) ([Miller et al., 2002a](#) ; [Yazzie et al., 2003](#)).

Par ailleurs, les résultats obtenus dans cette étude ont montré que cette augmentation des dommages de l'ADN est plus marquée après une contamination par l'UE qu'après une contamination par l'UA aux fortes concentrations. L'UA et l'UE ont les mêmes propriétés chimiques et donc la même toxicité chimique, cette différence entre les OTM χ^2 moyens pourrait s'expliquer par la plus forte activité

spécifique de l'UE par rapport à l'UA. En effet, l'activité spécifique de l'UE utilisé est environ 20 fois supérieure à l'activité spécifique de l'UA. La population cellulaire exposée à l'UE est par conséquent soumise à une fluence de particules α 20 fois plus importante que celle exposée à l'UA. L'ADN des cellules exposées à l'UE pourrait donc être plus endommagé par les rayonnements α que l'ADN des cellules exposées à l'UA. Le test des comètes en condition alcaline a par conséquent permis de quantifier l'excès de dommages de l'ADN radio-induits par l'UE par rapport à ceux induits par l'UA aux fortes concentrations. Il est connu que les rayonnements ionisants induisent des cassures double brin (CDB) ; l'excès de dommages à l'ADN observé avec l'UE comparé à l'UA pourrait être la conséquence d'une plus grande augmentation de cassures double brin avec une augmentation de l'activité spécifique de l'U.

Calini et ses collaborateurs (2002) ont observé une relation linéaire entre les dommages à l'ADN et la dose d'irradiation γ . Cette relation linéaire est visible pour une irradiation homogène des cellules comme le font les rayonnements γ mais elle ne peut pas être établie pour les particules α qui frappent les cellules de façon hétérogène et qui par conséquent induisent une relation non-linéaire. Ainsi lors d'une représentation des OTM sous la forme d'une distribution, on a un décalage vers la droite (OTM croissants) de toute la population cellulaire lors d'une augmentation de la dose d'irradiation γ , alors que l'on assiste à un étalement de la distribution lors de l'augmentation de la dose d'irradiation α . Les résultats obtenus dans notre étude traduisent le caractère hétérogène du stress génotoxique induit par l'U et peut s'expliquer en partie par le fait que toutes les cellules ne sont pas touchées par le même nombre de particules α . Par conséquent, il faut observer un grand nombre de comètes avant de déceler un effet lors d'une contamination par un émetteur α . Ainsi, Rössler et ses collaborateurs (2006) ont étudié la sensibilité du test des comètes en condition alcaline pour détecter les lésions de l'ADN induites notamment par des particules α . Ils ont montré une augmentation significative des dommages de l'ADN après exposition de cellules humaines (HSC45-M) aux particules α émises par une source d' ^{241}Am . Ils ont également observé une dispersion plus importante pour les OTM des cellules ayant subi une irradiation α hétérogène que pour les OTM des cellules ayant subi une irradiation γ homogène.

Les effets des rayonnements ionisants sur une molécule cible en particulier l'ADN peuvent être produits par interaction directe du rayonnement avec la molécule ou par interaction indirecte. Dans le dernier cas, il résulte principalement de l'interaction du rayonnement avec la molécule d'eau. Ce phénomène est appelé radiolyse. Cet effet indirect peut contribuer pour une large part aux dommages cellulaires radio-induits. En effet, les effets biologiques de l'irradiation aux rayonnements ionisants peuvent résulter pour une large part de la production d'espèces radicalaires par la radiolyse de l'eau.

Dans nos conditions expérimentales, l'excès de dommages à l'ADN observé avec l'UE comparé à l'UA pourrait être la conséquence d'une production d'espèces radicalaires par la radiolyse de l'eau.

Un autre phénomène pourrait aussi expliquer ces différences de taux de lésions primaires à l'ADN entre l'UE et l'UA : il s'agit de l'effet de voisinage (en anglais *bystander effect*). Cet effet de voisinage, induit par les rayonnements ionisants est un phénomène par lequel des dommages cellulaires (échanges de chromatides sœurs, aberrations chromosomiques, apoptose, etc...) sont exprimés dans des cellules non irradiées mais voisines d'une ou plusieurs cellules irradiées (Nagasawa et Little, 1999). Zhou et ses collaborateurs (2000) ont démontré que des cellules irradiées par des particules α pouvaient induire un effet mutagène de proximité dans les cellules voisines non irradiées. De plus, Narayanan et ses collaborateurs (1997) suggèrent un mécanisme dans lequel les cellules irradiées sécrètent des cytokines et d'autres facteurs qui agissent pour augmenter les taux intracellulaires d'EROs dans les cellules non irradiées. Cela pourrait jouer un rôle important dans le phénomène de transfert des dommages et expliquer pourquoi les cellules contaminées par l'UE sont davantage endommagées que celles contaminées par l'UA.

En conclusion, le test des comètes en condition alcaline a permis de visualiser un ensemble de lésions primaires de l'ADN (sites labiles en condition alcaline, cassures simple et double brin) induites par l'U. De plus, cette augmentation des dommages de l'ADN est plus importante après une contamination par l'UE qu'après une contamination par l'UA aux fortes concentrations. Le test des comètes semblent par conséquent quantifier l'excès de dommages de l'ADN radio-induits par l'UE par rapport à ceux induits par l'UA aux fortes concentrations. Cependant, ce test ne permet pas de dissocier les différentes lésions observées.

Au vue des résultats obtenus, plusieurs hypothèses ont pu être émises pour expliquer cette augmentation de dommages avec l'augmentation de l'activité spécifique :

La première hypothèse qui semble être la plus évidente lorsque l'on parle de stress radio-induit pourrait relier cet excès de dommages à l'ADN à une augmentation du nombre de lésions double brin, lésions connues pour être radio-induites. Cependant, ce phénomène joue un rôle mineur dans l'induction des lésions à l'ADN détectées par le test des comètes.

La deuxième hypothèse est également liée à une augmentation du stress radio-induit mais cette fois-ci plutôt à des effets indirects induits par les rayonnements ionisants émis par l'U. Deux cas peuvent se présenter. Le premier cas concerne les cellules directement irradiées ; en effet ces dernières pourraient

induire une augmentation de la production d'EROs lors de la radiolyse de l'eau. Le deuxième cas concerne les cellules non directement irradiées, cette augmentation de dommages radio-induits pourrait être la conséquence d'une augmentation d'EROs induite par l'effet de voisinage ; en effet les cellules irradiées semblent sécréter des molécules augmentant le taux d'EROs dans les cellules non irradiées. L'induction des lésions par radiolyse et par effet de voisinage représente probablement la source principale de lésions détectées par le test des comètes.

Afin de répondre à ces questions, les CDBs ont été spécifiquement étudiées à l'aide du marquage par immunofluorescence de l'histone γ -H2AX. La production d'EROs a également été étudiée avec le marquage DCFH-DA. En parallèle une étude de l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN a été réalisée afin d'avoir une vue d'ensemble sur les lésions potentiellement induites par une exposition à l'U.

III.1 Induction de cassures double brin (CDBs) par l'uranium

L'augmentation des dommages à l'ADN après contamination par l'U comparé au contrôle non exposé, identifiés par le test des comètes, semble être liée à l'effet radiotoxique de l'U. En effet, l'augmentation des dommages à l'ADN est davantage liée à l'augmentation de la concentration en U et donc à l'activité du mélange uranifère. Cependant, ce test ne nous a permis de préciser le type de lésion engendré par l'effet radiotoxique de l'U. En effet, le test des comètes en conditions alcalines permet de visualiser un large éventail de lésions primaires de l'ADN (Tice *et al.*, 2000).

Le marquage par immunofluorescence de l'histone γ -H2AX a donc été réalisé afin de compléter les données du test des comètes et de voir si les cassures double brin ne seraient pas responsables en partie de l'augmentation des dommages à l'ADN induits par l'UE. L'immunomarquage de l'histone γ -H2AX a permis de visualiser spécifiquement les cassures double brin, lésions de l'ADN radio-induites.

L'exposition à l'U (UA et UE) induit la formation de cassures double brin dès la plus faible concentration testée (5 μ M). Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Thiébault et ses collaborateurs (2007). En effet, cette équipe a démontré, à l'aide de l'immunomarquage de l'histone γ -H2AX, que l'exposition *in vitro* de cellules proximales rénales de rat (NRK-52^E) à des concentrations sub-létales et létales d'UA entraîne une élévation significative du nombre de cassures double brin par cellule. A concentration égale, l'UE induit significativement plus de cassures double brin que l'UA. Le nombre de cassures double brin par cellules augmente avec la concentration en U. Par ailleurs, la quantité de CDBs maximale obtenue dans l'étude de Thiébault et ses collaborateurs (2007) a été obtenue après une

exposition à 500 μ M, au-delà de cette concentration le nombre de CDBs n'est pas statistiquement différent (Thiebault *et al.*, 2007). Nous obtenons un résultat similaire sur les fibroblastes contaminés par l'UA ou par l'UE. En effet, pour des concentrations supérieures à 500 μ M, le nombre de CDBs est grandement diminué. Ces résultats ne sont pas présentés ni exploités pour des concentrations en U supérieures à 500 μ M car dans ces conditions expérimentales, l'U forme un précipité dans le milieu de culture cellulaire. Cependant, ce résultat n'est pas à négliger étant donné que Thiébault et ses collaborateurs (2007) observent le même phénomène. Ceci pourrait suggérer que les cellules aux fortes concentrations en U, ont atteint un maximum de capacité de détection des CDBs ou bien alors développé une capacité de « réponse adaptative ».

Enfin, les résultats obtenus avec l'immunomarquage γ -H2AX pourraient confirmer l'hypothèse de toxicité radiologique émise avec le test des comètes. En effet, l'augmentation des lésions primaires de l'ADN avec l'augmentation de l'activité spécifique pourrait provenir en partie de l'augmentation de cassures double brin principalement radio-induites.

Les cassures double brin mises en évidence lors de l'immunomarquage γ -H2AX sont connues pour solliciter les mécanismes de réparation spécifiques des CDBs : recombinaison homologue (en anglais *Homologous Recombination* : HR) et raboutage (en anglais *Non Homologous End Joining* » : NHEJ) bien décrits dans la littérature (Hoeijmakers, 2001). L'étude par RT-PCR des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN a évalué l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la réparation des cassures doubles brin (CDBs), décrites dans la littérature comme induites par les radiations ionisantes. Le mécanisme le plus fidèle pour la réparation des CDBs qu'est la recombinaison homologue (HR) présente un gène d'intérêt surexprimé de façon significative (Rad 51), 6 gènes sous-exprimés (Brca2, Fancg, Rad51c, Rad51l1, Xrcc3 et Xrn2) et 5 gènes dont l'expression ne varie pas (Atm, Xrcc2, Mre11a, Rad50, Rad52) après contamination par l'U. Le seul gène présentant une surexpression dans le mécanisme de HR est Rad51. Cette surexpression significative est visible après contamination par l'UA ainsi qu'après contamination par l'UE. Un certain nombre de gènes sont sous-exprimés après contamination par l'U. Le gène codant pour l'exonucléase 5'-3' XRN2, intervenant dans la première étape de HR, en fait notamment partie. Interviennent ensuite un ensemble de protéines, dont les gènes sont également significativement sous-exprimés, qui interagissent avec RAD51. Il s'agit de RAD51l1, RAD51c et XRCC3. Rad51l1 forme un complexe, qui vient se fixer à l'ADN simple brin, avec XRCC2 (dont l'expression ne varie pas), RAD51c et RAD51l3. RAD51c forme quant à lui un autre complexe de caractéristique identique, c'est-à-dire se fixant uniquement sur l'ADN simple brin pour former un

complexe ADN-protéine, avec XRCC3. Xrcc3 fait partie d'une famille de gènes isolés sur la base de leur hypersensibilité aux rayons X. La protéine XRCC3 va non seulement intervenir au niveau de l'initiation de HR mais aussi au niveau de la formation et de la résolution des intermédiaires de HR. Il permettrait même la stabilisation de l'hétéroduplex d'ADN.

En conclusion, la recombinaison homologue semble être impliquée après contamination par l'U avec notamment la surexpression de Rad51. Toutefois, le mécanisme de raboutage (NHEJ) connu pour être activé après exposition aux rayonnements ionisants ne montre aucune surexpression de gènes impliqués dans cette voie de réparation.

Le peu de gènes surexprimés impliqués dans la réparation des CDBs a été surprenant. En effet, une surexpression importante des gènes de cette voie de réparation des CDBs était attendue car les rayonnements ionisants induisent des CDBs. Il est important de noter que les mécanismes de régulation aboutissant à l'action d'une protéine sont complexes ; de plus lors de cette étude seule l'expression des gènes (ARNm) a été étudiée. Une augmentation significative du nombre de foyers γ -H2AX après exposition à l'U comparé au contrôle non exposé a été observée ; l'induction de foyers γ -H2AX après exposition à l'U augmente avec la concentration en U. Cependant, cette étude de l'expression des gènes intervenant dans les mécanismes de réparation de l'ADN prend en compte l'ensemble des cellules contaminées mais, sur ces millions de cellules, il y a sans doute des cellules plus touchées que d'autres par des particules α . Les cellules étant touchées par une particule α peuvent déclencher leurs mécanismes de réparation des cassures double brin que sont NHEJ et HR mais si cet événement est rare, il n'est pas visible lorsque l'on étudie l'ensemble de la population cellulaire. En effet, avec le marquage par immunofluorescence de γ -H2AX une augmentation des CDBs après exposition à l'U a été notée mais cette augmentation n'est peut être pas suffisante pour être observée en RT-PCR. Il est aussi possible que les cellules touchées par une particule α subissent trop de CDBs pour pouvoir les réparer et meurent soit par apoptose, soit par nécrose. Ceci peut notamment s'expliquer par le fait que les particules α entraînent, en raison des fortes énergies qu'elles déposent sur leur passage, des CDBs de l'ADN qui sont beaucoup plus difficiles à réparer qu'une « simple » cassure double brin. En effet, il a été établi par exemple dans les cellules V79 que 20 CDBs produites par les particules α sont nécessaires pour conduire à la mort cellulaire alors qu'il en faudrait plusieurs centaines causées par le peroxyde d'hydrogène pour obtenir le même effet (Fox, 1992).

III.2 Induction d'un stress oxydant par l'U

Les dommages à l'ADN peuvent être indirectement provoqué par l'induction d'EROs, qui seraient produites après l'exposition à l'U. Ceci a été démontré *in vivo* par [Monleau et ses collaborateurs \(2006\)](#). En effet, ils ont démontré que les dommages de l'ADN peuvent être en partie une conséquence de la production d'EROs. De plus, une étude récente ([Thiebault et al., 2007](#)) réalisée *in vitro* sur des cellules proximales rénales de rat (NRK-52^F) a démontré une forte production d'EROs après exposition à des concentrations létales d'U (>300 µM). En accord avec cette étude, [Periyakaruppan et ses collaborateurs \(2007\)](#) ont montré qu'un stress oxydant important est induit après exposition par l'U. Dans notre étude, une augmentation de la production d'EROs après exposition à l'U est également observée. En effet, dès la plus faible concentration en U testée, la production d'EROs est significativement supérieure au contrôle non exposé et corrèle avec la concentration en U. Ce résultat est en accord avec une des hypothèses formulée précédemment sur la base des résultats obtenus à l'aide du test des comètes. En effet, étant donné que nous n'avions pas de différence en terme de quantité de dommages à l'ADN entre l'UA et l'UE aux faibles concentrations, nous avons supposé que ces dommages de l'ADN était plutôt liés à l'effet chimiotoxique de l'U et plus précisément à la production d'EROs induisant des lésions simples brins visualisables avec le test des comètes. De plus, l'UE induit plus d'EROs que l'UA uniquement à la plus forte concentration testée (500 µM). Les radicaux libres formés en plus grand nombre après exposition à l'UE pourraient être formés lors de la radiolyse de l'eau et l'effet de voisinage. En effet, les effets indirects des rayonnements ionisants sont liés au phénomène de radiolyse des molécules d'eau ayant pour conséquence l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène dans le milieu intracellulaire. De plus, comme mentionné précédemment l'augmentation de la production d'EROs avec l'augmentation de l'activité spécifique d'un mélange uranifère pourrait jouer un rôle important dans le phénomène de transfert des dommages aux cellules voisines et expliquer en partie pourquoi les cellules contaminées par l'UE sont davantage endommagées que celles contaminées par l'UA.

L'étude de l'expression des gènes en RT-PCR a montré que les cellules contaminées par l'un ou l'autre des deux mélanges isotopiques de l'U répondent à l'agression qu'elles subissent en surexprimant significativement certains gènes impliqués dans l'excision de base (BER). Parmi les différentes lésions réparables par la BER, il y a la réparation des CSB et les lésions simple brin de l'ADN comme par exemple un site abasique ou des bases modifiées. Ces lésions ne sont pas causées par un dépôt direct de l'énergie des rayonnements ionisants sur la molécule d'ADN mais par les radicaux libres formés lors de la radiolyse

de l'eau. Nous avons montré précédemment que les cellules contaminées par l'UA et par l'UE induisent la production d'EROs, ce qui expliquerait la mise en place de la BER par les cellules contaminées à l'U. Par ailleurs, le métal U pourrait induire la production d'EROs en agissant comme catalyseur de la réaction de Fenton (Yazzie *et al.*, 2003). En effet, il a déjà été démontré que l'U serait susceptible d'induire une réduction du peroxyde d'hydrogène intracellulaire, induisant ainsi la formation d'un ion hydroxyde (OH⁻) mais également d'un radical hydroxyle (Miller *et al.*, 2002a) ; cette réaction d'oxydoréduction étant tout à fait similaire à la réaction de Fenton. Cette surproduction d'EROs pourrait être à l'origine d'un stress oxydatif. Par ailleurs, la production d'EROs expliquent notamment les effets de voisinage de dommages à l'ADN. En effet, les impacts nucléaires directs de particules α peuvent causer des lésions à l'ADN mais il a été établi par ailleurs que certains effets biologiques peuvent apparaître dans les cellules dont le noyau et/ou le cytoplasme n'ont pas subi d'interaction avec une particule α . Ces effets de voisinage d'une particule α (en anglais « *bystander effects* ») semblent faire intervenir des mécanismes d'induction de dommages de l'ADN intracellulaires et intercellulaires. Ainsi, Wu et ses collaborateurs (1999) ont réalisé sur le système cellulaire hybride AL homme/hamster des irradiations α localisées au cytoplasme des cellules grâce à un microfaisceau. Ils ont alors démontré que de telles irradiations sont mutagènes. Les irradiations cytoplasmiques par des particules α génèrent des EROs à l'origine des effets de voisinage intracellulaires. Ces effets vont se traduire sous la forme de lésions nucléaires qui engendrent une instabilité génomique et chromosomique. D'autre part, Nagasawa et Little (1999) ont observé dans des cellules CHO l'existence d'un effet mutagène de voisinage intercellulaire de l'irradiation α . Ils ont en effet remarqué la présence de mutations dans des cellules non irradiées voisines de cellules touchées par les particules α .

En conclusion, ces résultats amènent à penser que les lésions de l'ADN observées pourraient être en partie dues à la présence d'espèces radicalaires produites après contamination par l'U étant donné la surexpression d'EROs observées, ces lésions seraient ensuite en partie réparées par la BER.

IV. Influence de l'uranium sur le cycle de division cellulaire

La progression des cellules, contaminées par différents mélanges isotopiques d'U (UA et UE), aux travers de leur cycle a pu être déterminée grâce à une analyse en cytométrie de flux. Les résultats de cette étude ont mis en évidence un ralentissement des cellules en phase G1 pour des contaminations d'U aux concentrations de 500 μ M (UA et UE). Les travaux menés par Scholz et ses collaborateurs (1994) ont démontré que l'U provoque *in vitro* des retards du cycle, notamment en G1, sur des cellules de hamster

Chinois V79. Toutefois les résultats obtenus au cours de ce travail ont révélé que le blocage observé en G1 est plus marqué après une contamination par l'UE qu'après une contamination par l'UA. L'activité spécifique du mélange isotopique UE qui est environ 20 fois supérieure à celle du mélange UA pourrait expliquer cette différence. Dans cette hypothèse, ce serait donc l'effet de l'irradiation des particules α qui serait responsable des blocages en G1 observés. [Gadbois et ses collaborateurs \(1996\)](#) ont réalisé des études qui montrent que les radiations α et γ sont capables d'induire des arrêts irréversibles en phase G1 chez des fibroblastes humains. Plus récemment, [Azzam et ses collaborateurs \(2000\)](#) ont montré que les particules α sont responsables d'arrêts permanents et transitoires en G1 chez des fibroblastes humains avec des effets qui sont au moins aussi importants que ceux observés après une irradiation γ . Les radiations ionisantes sont connues depuis déjà longtemps pour causer des retards ou des arrêts du cycle cellulaire ([Gadbois et al., 1996](#)).

Une étude complémentaire, qui consistait à étudier le cycle cellulaire 3 heures après le pulse de BrdU, a permis de mettre en évidence pour la première fois un phénomène d'accumulation des cellules en phase de réplication de l'ADN. En effet, pour une contamination à 500 μ M d'U (UA et UE), les cellules qui se trouvaient en phase S juste après le pulse de BrdU se retrouvent 3 heures plus tard toujours dans la phase de réplication de l'ADN. Cette accumulation des cellules dans la phase de réplication pourrait être liée à l'activation de mécanismes de réparation mis en œuvre pour restaurer l'ADN endommagé. En effet, un certain nombre de mécanisme de réparation des dommages de l'ADN ont été activés après contamination par l'U (notamment le BER et la HR). Ces derniers, lors d'une réparation correcte des dommages permettent aux cellules de poursuivre leur progression dans le cycle cellulaire. En revanche, lors d'une absence de réparation ou lors d'une réparation fautive, les cellules meurent. Ces arrêts se produisent au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire qui coordonnent, en réponse aux lésions de l'ADN, la machinerie du cycle cellulaire et plusieurs voies biochimiques afin de restaurer la structure de l'ADN. De plus, le blocage en phase de réplication est plus important après une contamination par l'UA qu'après une contamination par l'UE (avec UA le pourcentage de cellules en phase S juste après le pulse et 3 heures après le pulse sont supérieurs aux taux déterminés pour UE). Un blocage plus important des cellules en phase G1 (observé précédemment) après contamination par l'UE pourrait expliquer cette plus faible accumulation de cellules en phase S comparé à l'UA. Toutes ces observations traduisent par conséquent un phénomène d'accumulation des cellules en phase S et un fort ralentissement de la progression des cellules à travers le cycle après exposition aux différents mélanges isotopiques de l'U.

L'étude par RT-PCR des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN a démontré une différence entre les deux mélanges isotopiques au niveau de l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans les points de contrôle du cycle cellulaire. En effet, après contamination par l'U, deux situations distinctes sont observées. Les cellules contaminées par l'UE surexpriment un certain nombre de gènes codant des protéines impliquées dans les points de contrôle du cycle cellulaire. En effet, une surexpression de Smc3 (sous unité d'une cohésine) est observée ; Smc3 est phosphorylée par ATM en réponse aux rayonnements ionisants et active les points de contrôle de la phase G1/S. De plus, une surexpression de Chek1 qui code la protéine CHK1, kinase pouvant induire l'arrêt du cycle cellulaire pendant les phases S, G2 ou M (Chen et Sanchez, 2004) est observée. En revanche, les cellules contaminées à l'UA n'induisent pas de surexpression de gènes codant des facteurs intervenant dans les points de contrôle du cycle cellulaire. Une sous-expression de Atrx, Gadd45, Rad9b et de Tlk1 est observée. Ces quatre protéines entrent en jeu dans les checkpoints du cycle cellulaire mais à des niveaux différents. Atrx codant la kinase multifonctionnelle ATR notamment est activée en réponse aux dommages causés par les rayons UV (Stiff *et al.*, 2006). Rad9b, senseur du dommage à l'ADN, forme le complexe 9-1-1 avec Rad1 et Hus1 (dont les expressions ne varient pas) tandis que Gadd45, effectrice du dommage à l'ADN, inhibe l'entrée des cellules en phase S. Enfin, la kinase Tlk1 est impliquée dans la mise en place des points de contrôles en interagissant avec ATM et CHK1 (Groth *et al.*, 2003) et facilite ainsi la réparation des cassures double brin de l'ADN (Sunavala-Dossabhoy *et al.*, 2005). Après contamination par l'UE, la surexpression de certains gènes codant des protéines impliquées dans les arrêts du cycle principalement en phase G1/S du cycle cellulaire pourrait expliquer le blocage en phase G1 plus important avec l'UE observé juste après le pulse de BrdU. Un blocage plus important en G1 des cellules contaminées par l'UE pourrait expliquer une plus faible accumulation des cellules en phase S comparé à l'UA. L'évolution du cycle cellulaire et les blocages opérés au niveau des points de contrôle seraient donc dépendants de la composition isotopique de l'U utilisé.

En conclusion, l'U induit un phénomène d'accumulation des cellules en phase G1 puis en phase S pouvant éventuellement permettre aux cellules d'effectuer les réparations des dommages de l'ADN avant leur progression dans le cycle de division cellulaire.

Conclusion et perspectives de cette première étude

Cette étude a montré pour la première fois que le profil génotoxique de l'U (aneugène/clastogène) était lié à sa composition isotopique et donc à son activité spécifique.

Elle a tout d'abord démontré que le test des comètes en condition alcaline est suffisamment sensible pour quantifier une augmentation des dommages de l'ADN après contamination des fibroblastes par l'UE par rapport aux dommages observés après contamination par l'UA. Cette augmentation de la quantité de dommages de l'ADN semble lié à l'activité spécifique du mélange uranifère contaminant et donc à sa radiotoxicité. Cependant, si le test des comètes a permis de visualiser un large éventail de lésions de l'ADN (CSB, CDB et site labiles en condition alcaline), il ne permet pas de les discriminer. L'immunomarquage de γ -H2AX a permis de démontrer que l'augmentation de lésions observées avec le test des comètes pourrait en partie provenir de l'augmentation des CDBs principalement induites par l'UE. Des études complémentaires permettraient de préciser la nature des différentes lésions. Une version modifiée du test des comètes en condition alcaline comprenant une étape supplémentaire d'incubation des cellules lysées avec des glycosylases coupant spécifiquement un type de base modifiée avant l'étape de migration électrophorétique, permettrait de quantifier différents types de lésions de bases de l'ADN. De plus, l'utilisation du test des comètes en condition neutre permettrait de quantifier spécifiquement les CDBs de l'ADN, ce qui permettrait de confirmer les données obtenues avec l'immunomarquage de γ -H2AX.

L'étude du cycle cellulaire a montré que la contamination par l'U entraînait un ralentissement du cycle cellulaire, particulièrement en phase G1 et en phase S, quel que soit le mélange isotopique de l'U considéré. Ce ralentissement du cycle cellulaire pourrait éventuellement permettre la mise en place des mécanismes de réparation des lésions primaires provoquées par l'U. Il semblerait donc que les perturbations du cycle cellulaire soient dues à une synergie des effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'U.

La contamination par l'U induit diverses lésions primaires de l'ADN pouvant ou non être réparées. La réparation peut être absente ou incomplète (réparation fautive), dans ce cas l'apparition de dommages chromosomiques tels que les micronoyaux, symbole d'une instabilité génomique, peut être observée. L'étude de numération des MNx révèle que le seul dénombrement des cellules binucléées avec un micronoyau ne suffit pas à évaluer avec précision l'origine de la génotoxicité de l'U. En effet, la fréquence des cellules BN-1MNC- et la fréquence des cellules BN-PNPs ont été nécessaires pour refléter les effets clastogènes d'un mélange isotopique donné de l'U. La corrélation étroite entre ces deux marqueurs génotoxiques et la dose de rayonnements ionisants reçues par les cellules démontre que l'augmentation des effets clastogènes de l'U avec son enrichissement en ^{235}U est liée à une augmentation de sa radiotoxicité. En revanche, la fréquence des cellules BN-1MNC+ et la fréquence des cellules Mono-MNx ont été nécessaires pour refléter les effets aneugènes d'un mélange isotopique donné de l'U. L'ensemble des

anomalies cytogénétiques (BN-MNC+, Mono-MNx et les cellules BN-MNC-, BN-PNPs) observées avec le test CBMN doit être quantifié pour évaluer distinctement les effets aneugènes et clastogènes d'un mélange isotopique donné de l'U. Toutes les données obtenues avec le test CBMN associé à l'hybridation *in situ* de sondes pancentromériques convergent vers la conclusion suivante : **la génotoxicité liée aux effets chimiques de l'U et la génotoxicité liée aux effets radiologiques de l'U ne sont pas des effets additifs.** Lorsque les effets clastogènes de l'U augmentent, dus à une augmentation de l'activité spécifique du mélange isotopique, les effets aneugènes diminuent. Un effet radiologique important prédomine sur l'effet chimique de l'U. Par conséquent, en ce qui concerne la génotoxicité de l'U, les effets clastogènes principalement dus à la radiotoxicité de l'U semblent avoir des effets dominants par rapport aux effets aneugènes dus principalement à la chimiotoxicité et en partie à la radiotoxicité de l'U. Cependant, le mécanisme exact expliquant la relation entre les effets chimiques et les effets radiologiques de l'U aboutissant à la génotoxicité de l'U reste à être clarifié.

Actuellement, le CIRC (Agence Internationale de Recherche sur le Cancer) n'inscrit pas l'U en tant que tel et ses composés comme des cancérigènes. Toutefois, les radionucléides émetteurs de particules α sont eux classés comme agent cancérigène pour l'Homme (IARC, 2001). En conséquence, l'évaluation des risques cancérigènes liés à l'exposition par l'U est uniquement basée sur le calcul des doses d'irradiation (CIPR, 1997). Le Comité scientifique des Nations Unies sur les effets des rayonnements ionisants considère que les dommages à l'ADN causés par les irradiations représentent l'événement principal à l'origine des effets à long terme sur les différents tissus et organes. Les CDBs de l'ADN, responsables des effets clastogènes, sont considérés comme les dommages les plus susceptibles de provoquer l'initiation du cancer (UNSCEAR, 2000). Toutes ces considérations amènent à conclure que le risque cancérigène lié à l'exposition interne de l'UA est inférieur au risque cancérigène lié l'exposition interne de l'UE. Toutefois, les résultats présentés au cours de ces travaux montrent que même si l'UA possède un faible effet clastogène, son effet aneugène est important et conduit à un effet génotoxique global équivalent à l'UE (CBMN : numération unique des cellules BN-1MN). Les agents aneugènes sont connus pour induire l'aneuploïdie qui joue aussi un rôle important dans l'induction des cancers (voir pour revue : Aardema *et al.*, 1998 ; Iarmarcovai *et al.*, 2006). Ainsi, ce travail a souligné la nécessité d'approfondir le rôle potentiel des effets aneugènes de l'UA dans l'évaluation du risque cancérigène lié à l'exposition interne à l'U. Enfin, ces travaux ont permis une avancée sur la compréhension des effets biologiques gouvernant la chimiotoxicité et la radiotoxicité de l'U.

Un des objectifs du travail de thèse est d'identifier des marqueurs biologiques permettant de discriminer les effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'U, qui pourraient être utilisés afin d'améliorer le suivi de personnes victimes d'une contamination interne. De cette première étude sur fibroblastes, il ressort que le test de numération des micronoyaux est un test relativement sensible permettant de définir des marqueurs de génotoxicité spécifiques des effets aneugènes ou clastogènes de l'U. Nous avons par conséquent choisi de poursuivre l'étude en validant les marqueurs identifiés avec ce test CBMN sur modèle de rat contaminé *in vivo* par injection d'U ainsi que sur un modèle de sang humain contaminé *in vitro*.

Partie B. Étude sur
les lymphocytes de rat
in vivo

Tableau 20. Tableau de synthèse des études réalisées sur les lymphocytes de rat (*in vivo*)

Objectifs	<p>➤ Valider les marqueurs biologiques définis <i>in vitro</i> sur fibroblastes embryonnaires de souris, à l'aide du test des micronoyaux, permettant de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U</p>		
Type cellulaire étudié	Lymphocytes circulants de rat		
Analyses réalisées	Techniques utilisées	Conditions testées	Nombre de rats testés
Génotoxicité	Numération des micronoyaux (MNx) avec blocage en cytodièrese :	Contrôle (injection intrapéritonéale de 200 µL de NaHCO ₃ à 0,1 M)	5 rats contrôles
	- Lymphocytes binucléées avec un MN (BN-1MN)	UA (injection intrapéritonéale 1,5 mg/Kg)	5 rats UA
	- Lymphocytes binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs)	UE (injection intrapéritonéale 1,5 mg/Kg)	5 rats UE
	- Lymphocytes mononucléées avec des MNx (Mono-MNx)		

RESULTATS

Le test de numération des micronoyaux

Dans un premier temps, le nombre d'aberrations chromosomiques a été compté sur les cellules mononucléées, binucléées, trinucléées et quadrinucléées. Cependant dans un deuxième temps, seules les données sur les cellules mononucléées et, binucléées ont été gardées, les autres valeurs étant négligeables.

Lors de cette étude *in vivo*, nous nous sommes intéressés à la numération :

- des cellules binucléées avec des micronoyaux (BN-MNx),
- des cellules binucléées avec des PNPs (BN-PNPs),
- et des cellules mononucléées avec des MNx (Mono-MNx).

I. Lymphocytes binucléés avec des micronoyaux

Dans cette étude *in vivo* sur lymphocytes de rat, des cellules binucléées avec un, deux ou trois micronoyaux (BN-MNx) ont été comptabilisées contrairement à l'étude sur les fibroblastes embryonnaires de souris *in vitro* ou uniquement des cellules binucléées avec un micronoyau (BN-1MN) avaient été comptabilisées. Les résultats de cette étude sont donc exprimés en pourcentage de cellules binucléées avec des micronoyaux (% BN-MNx). Nous ne séparons pas l'étude des cellules binucléées avec un, deux ou trois micronoyaux car peu de cellules binucléées avec deux ou trois micronoyaux sont observées et ne permettent donc pas d'établir de tests statistiques significatifs. Cependant, en les incluant dans les cellules binucléées avec des MNx, cela augmente la puissance de l'analyse statistique réalisée sur les données présentées ci-dessous.

La [Figure 105](#) illustre le pourcentage moyen de cellules binucléées avec des micronoyaux (BN-MNx) après contamination des rats à l'UA ou à l'UE ainsi que dans le contrôle non contaminé.

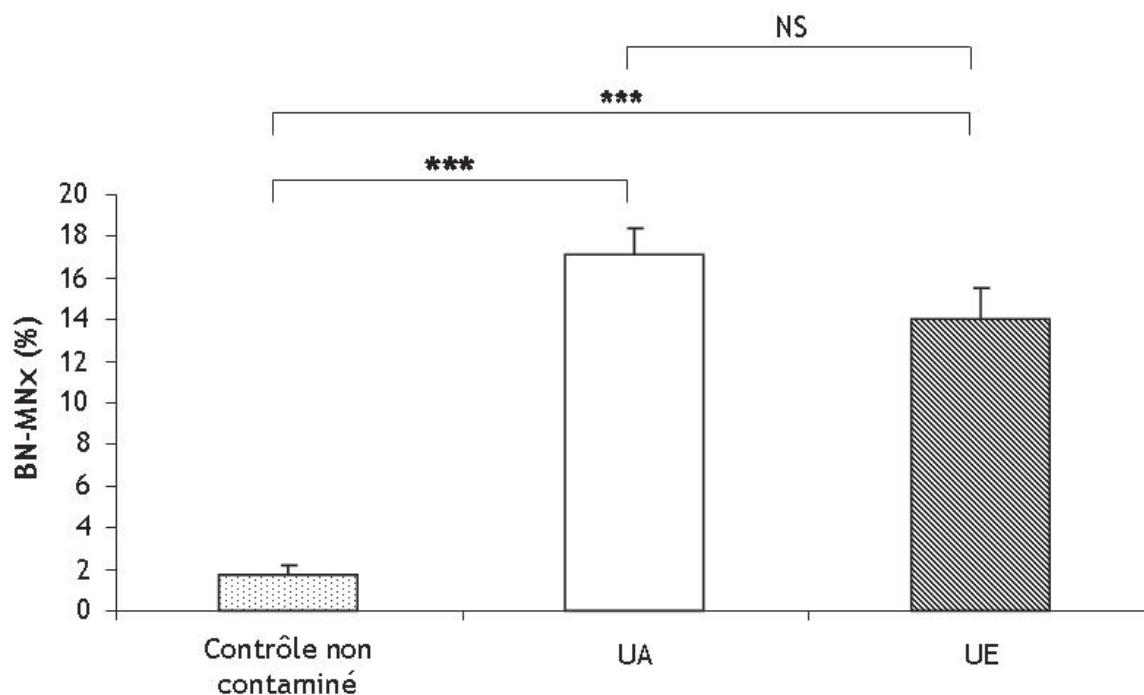


Figure 105. Résultats (moyenne \pm écart type) du test de numération des micronoyaux sur lymphocytes de rats

Pourcentage de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux (BN-MNx) après contamination à l'uranium appauvri (UA : barre blanche) ou à l'uranium enrichi (UE : barre hachurée et grisée) ainsi que dans le contrôle non contaminé (barre à points noirs) (n=5 rats par condition)

% BN-MNx : % cellules binucléées avec des micronoyaux

NS : aucune différence statistiquement significative entre UA et UE (Test Chi2)

*** $P < 0,001$ Différence statistiquement significative entre le contrôle non contaminé et l'UA ou l'UE (Test Chi2)

Le test de numération des MNx a révélé que les lymphocytes binucléés avec des micronoyaux (BN-MNx) sont induits après exposition à l'UA et après exposition à l'UE. En effet, l'UA et l'UE induisent significativement plus de cellules BN-MNx que le contrôle non contaminé (17,2 % pour UA vs 1,8 % pour le contrôle non contaminé ; et 14,1 % pour UE vs 1,8 % pour le contrôle non contaminé).

En revanche, la production de cellules BN-MNx n'est pas modulée par le type d'U (UA ou UE). En effet, l'UA induit autant de cellules BN-MNx que l'UE (aucune différence statistiquement significative).

En conclusion, ces résultats montrent que les cellules BN-MNx ne permettent pas de différencier les effets induits par l'UA de ceux induits par l'UE dans les conditions testées.

Dans notre étude, le CBPI n'a pas été significativement modifié après exposition par l'UA ou par l'UE (cf. [Tableau 21](#)). Par conséquent, ces résultats indiquent l'absence d'un effet toxique de l'U sur la prolifération des lymphocytes à la dose testée.

Tableau 21. CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation Index)

	Contrôle non contaminé	UA	UE
CBPI	1,10±0,005	1,11±0,007	1,14±0,01

Il été calculé avec la formule suivante : $CBPI = [Mono + 2*Bi + 3*(Tri+Tétra)]/N$ avec Mono représentant le nombre de cellules mononucléées, Bi représentant le nombre de cellules binucléées, Tri représentant le nombre de cellules trinucléées, Tétra représentant nombre de cellules tétranucléées et N représentant le nombre total de cellules comptabilisées (Surralles *et al.*, 1995).

II. Lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques

La Figure 106 illustre le pourcentage moyen de lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) après contamination par l'UA ou par l'UE ainsi que dans le contrôle non contaminé.

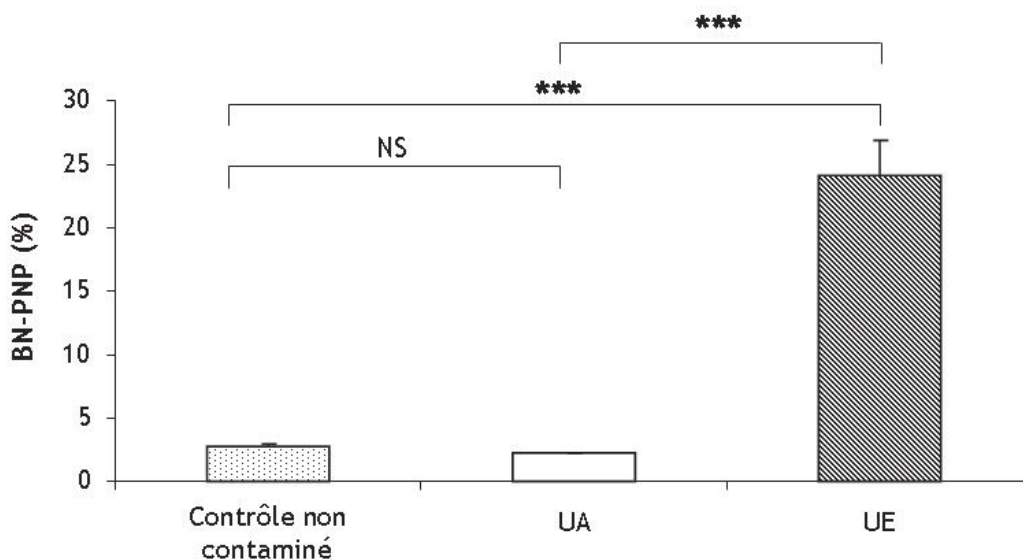


Figure 106. Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs)

Les rats ont été contaminés avec l'uranium appauvri (UA : barre blanche) ou l'uranium enrichi (UE : barre hachurée et grisée) ainsi que dans le contrôle non contaminé (barre à points noirs) (n=5 rats par condition)
%: BN-PNP : % de cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques

NS: aucune différence statistiquement significative entre l'UA et le contrôle non contaminé (Test Chi2)

*** $P < 0,001$ Différence statistiquement significative entre UA et UE et entre le contrôle non contaminé et UE (Test Chi2)

Après exposition à l'UE, le pourcentage moyen de cellules BN-PNPs est significativement supérieur au contrôle non exposé (24,1 % pour UE vs 2,8 % pour le contrôle non contaminé). Le pourcentage de lymphocytes BN-PNPs est presque 8,6 fois plus élevé avec l'UE qu'avec le contrôle non contaminé. En

revanche, après exposition à l'UA, le pourcentage de lymphocytes BN-PNPs est comparable à celui du contrôle non contaminé (2,2 %). D'autre part, l'UE induit significativement plus de cellules BN-PNPs que l'UA. En effet, l'UE induit environ 10 fois plus de cellules BN-PNPs que l'UA (24,1 % pour UE vs 2,2 % pour UA).

En conclusion, ces résultats montrent que les cellules BN-PNPs permettent de différencier les effets induits par l'UA de ceux induits par l'UE.

III. Lymphocytes mononucléés avec des micronoyaux

La [Figure 107](#) illustre le pourcentage moyen de cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx) après exposition par l'UA ou par l'UE ainsi que dans le contrôle non contaminé.

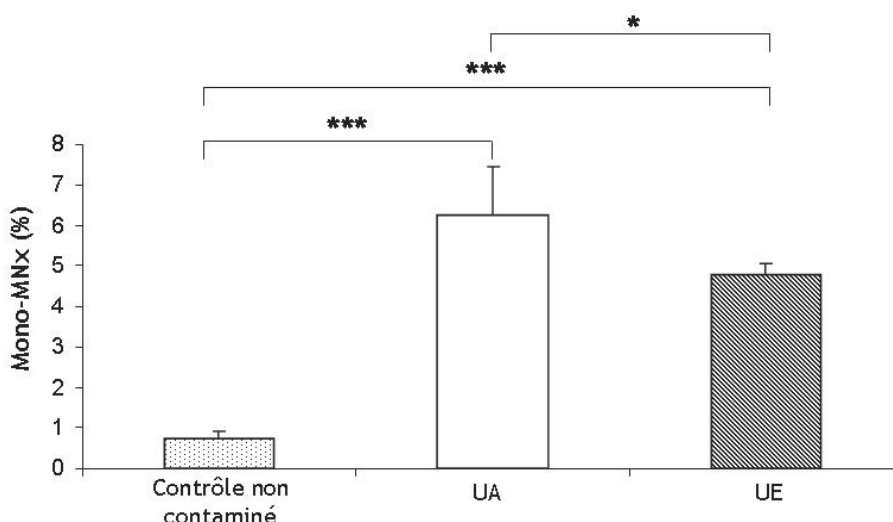


Figure 107. Pourcentage (moyenne \pm écart type) de lymphocytes mononucléés avec des micronoyaux (Mono-MNx)

Les rats ont été contaminés à l'uranium appauvri (UA : barre blanche) ou à l'uranium enrichi (UE : barre hachurée et grisée) ainsi que dans le contrôle non contaminé (barre à points noirs) (n=5 rats par condition)

% Mono-MNx : % des cellules mononucléées avec des micronoyaux

NS : aucune différence statistiquement significative entre UA et UE

* $P < 0,05$ Différence statistiquement significative entre le contrôle contaminé et l'UA ou l'UE (Test Chi2)

*** $P < 0,001$ Différence statistiquement significative entre le contrôle non contaminé et l'UA ou l'UE (Test Chi2)

Le pourcentage moyen de cellules Mono-MNx suite à une contamination *in vivo* de lymphocytes de rat par l'UA ou par l'UE, est significativement supérieur au contrôle non contaminé (0,8 %). En effet, l'UA induit environ 8 fois plus de lymphocytes Mono-MNx que le contrôle non contaminé ; l'UE induit 6 fois plus de lymphocytes Mono-MNx que le contrôle non contaminé. L'UA induit significativement plus de cellules Mono-MNx que l'UE (6,3 % pour l'UA vs 4,8 % pour l'UE).

En conclusion, ces résultats montrent que les cellules Mono-MNx permettent de différencier les effets induits par l'UA de ceux induits par l'UE.

Tableau 22. Tableau de synthèse des résultats obtenus sur les lymphocytes de rats *in vivo*

Objectifs	<p>→ Valider les marqueurs biologiques définis <i>in vitro</i> sur fibroblastes embryonnaires de souris, à l'aide du test des micronoyaux, permettant de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U</p>		
Type cellulaire étudié	Lymphocytes circulants de rat		
Analyses réalisées	Techniques utilisées	Conditions testées	Résultats
Génotoxicité	Numération des micronoyaux (MNx) avec blocage en cytodièrese	Contrôle (injection intrapéritonéale de 200 µL de NaHCO ₃ à 0,1 M)	BN-MNx UA = UE > Contrôle
		UA (injection intrapéritonéale 1,5 mg/Kg)	BN-PNPs UE >> UA = Contrôle
		UE (injection intrapéritonéale 1,5 mg/Kg)	Mono-MNx UA > UE > Contrôle
			Bilan
			Marqueur de génotoxicité de l'U
			Marqueur de radiotoxicité de l'U
			Marqueur de chimiotoxicité de l'U

DISCUSSION

La deuxième partie de ce travail de thèse, réalisée sur les lymphocytes de rat, a comparé les effets génotoxiques de l'UA (0,3% en ^{235}U) et de l'UE (12% en ^{235}U) pour la première fois *in vivo*. Les effets génotoxiques de l'U sur les lymphocytes de rat ont été étudiés en utilisant le test de numération des micronoyaux avec blocage en cytodièrese (CBMN).

Cette étude sur les lymphocytes de rat a montré que l'U (UA et UE) induit une augmentation des cellules binucléées avec des MNx (BN-MNx). En effet, la contamination par l'U induit en moyenne 8 fois plus de cellules BN-MNx que le contrôle non contaminé. Ces résultats confirment les résultats obtenus sur les fibroblastes embryonnaires de souris C3H10T1/2 lors de notre première étude. De plus, ces résultats sont en accord avec des travaux précédents qui avaient montré une augmentation *in vitro* des micronoyaux dans des cellules d'ovaires de hamsters chinois (CHO) et dans des cellules d'ostéoblastes humaines (HOS), ainsi que *in vivo* dans des lymphocytes humains après exposition à l'U (Lin *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 2003 ; Ibrulj *et al.*, 2004 ; Krunic *et al.*, 2005). Comme précédemment avec l'étude sur les fibroblastes (C3H10T1/2), aucune différence statistiquement significative dans la fréquence des cellules BN-MNx entre l'UA et l'UE n'a été observée. Par conséquent, le type de mélange isotopique de l'U ne module pas l'induction de cellules BN-MNx.

Les cellules BN-MNx s'avèrent donc sur lymphocytes de rat, être un bon marqueur de génotoxicité de l'U comme cela a été démontré précédemment sur les fibroblastes embryonnaires de souris (Partie A).

Cette partie de nos travaux révèle que la numération des cellules BN-MNx permet d'évaluer la génotoxicité globale de l'U, sans discriminer les effets induits par l'UA de ceux induits par l'UE. L'hybridation ne pouvant être réalisée, il est par conséquent impossible de connaître le contenu des MNx.

Comme précédemment montré, l'analyse concomitante des ponts nucléoplasmiques (PNPs) et des MNx dans les cellules binucléées fournit des informations concernant le type d'agent étudié (clastogène ou aneugène). Dans notre étude sur les lymphocytes de rats, la contamination par l'UE induit significativement plus de cellules BN-PNPs que l'exposition par l'UA. De plus, l'UA induit autant de cellules BN-PNPs que le contrôle non contaminé. Ces résultats suggèrent que les cellules BN-PNPs pourraient être un facteur permettant de discriminer les effets induits par l'UA de ceux induits par l'UE. Ces résultats confirment les précédents résultats obtenus sur les fibroblastes embryonnaires de souris (Partie A). La

toxicité de l'UE contrairement à celle de l'UA, à la concentration testée, semble induire l'apparition de ponts nucléoplasmiques. Les résultats obtenus sur les lymphocytes confirment aussi les travaux de [Miller et ses collaborateurs \(2002b\)](#), qui ont montré une augmentation du nombre de chromosomes dicentriques après exposition à l'U.

Si on calcule le ratio PNP/MN comme suggéré par [Thomas et ses collaborateurs \(2003\)](#), on obtient un ratio de 0,1 pour l'UA et un ratio de 1,7 pour l'UE. Par conséquent, l'UA pourrait principalement être identifié comme un agent aneugène tandis que l'UE pourrait principalement être identifié comme un agent fortement clastogène.

En conclusion, la présence de cellules BN-PNPs reflète les effets clastogènes (radiotoxiques) de l'U. Il semble pertinent de quantifier les cellules BN-PNPs pour préciser les effets clastogènes d'un mélange isotopique donné de l'U.

L'analyse des cellules Mono-MNx peut être utile pour distinguer les agents aneugènes et les agents clastogènes. De plus, l'analyse des cellules Mono-MNx permet d'augmenter la sensibilité du test des MNx (CBMN). En accord avec l'étude précédente réalisée sur fibroblastes embryonnaires de souris, l'UA induit plus de cellules mononucléées avec des MNx (Mono-MNx) que l'UE.

En conclusion, la présence de cellules Mono-MNx dans el CBM N peut être un facteur important qui permet de discriminer les effets induits par l'UA de ceux induits par l'UE.

Cette étude, *in vivo* sur lymphocytes de rats, via le test CBMN a montré que le profil génotoxique de l'U était différent en fonction de la composition isotopique de ce métal. Cette étude a permis de confirmer *in vivo* chez le rat les précédents travaux réalisés sur les fibroblastes embryonnaires de souris C3H10T1/2 (Partie A). En effet, l'augmentation du nombre de micronoyaux dans les cellules binucléées est caractéristique d'une contamination par l'U quel que soit le mélange isotopique considéré. Le dénombrement des cellules binucléées avec un micronoyau permet d'évaluer uniquement la génotoxicité de l'U mais il ne permet pas de discriminer les effets induits par l'UA de ceux induits par l'UE. La numération des cellules BN-PNPs et des cellules Mono-MNx permet d'apporter plus de précision. En effet, l'étude des cellules BN-PNPs et des cellules Mono-MNx est nécessaire pour discerner les effets clastogènes ou aneugènes d'un mélange isotopique donné de l'U. Ces marqueurs de génotoxicité peuvent améliorer le suivi des effets de contaminations internes dans le cadre d'exposition accidentelles.

Partie C. Étude sur
les lymphocytes
humains *in vitro*

Tableau 23. Tableau de synthèse des études réalisées sur les lymphocytes humains *in vitro*

Objectifs	<p>☛ Valider les marqueurs biologiques, permettant de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U, définis <i>in vitro</i> sur fibroblastes embryonnaires de souris et <i>in vivo</i> sur lymphocytes de rat à l'aide du test des micronoyaux.</p>		
Type cellulaire étudié	Lymphocytes humains		
Analyses réalisées	Techniques utilisées	Conditions testées	Réplica
<p>Génotoxicité</p>	<p>Numération des micronoyaux (MNx) avec blocage en cytodièrese :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lymphocytes binucléés avec MNx (BN-MNx) - Lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) - Lymphocytes mononucléés avec des MNx (Mono-MNx) <p>Hybridation <i>in situ</i> de sondes pancentromériques (FISH) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lymphocytes binucléés avec MNx centromères-positifs (BN-MNC+) - Lymphocytes binucléés avec MNx centromères-positifs avec un signal centromérique (BN-MNC1+) - Lymphocytes binucléés avec MNx centromères-positifs avec plusieurs signaux centromériques (BN-MNCx+) <p>- Lymphocytes binucléés avec MNx centromères-négatifs (BN-MNC-)</p>	<p>Contrôle (non exposé)</p> <p>Contrôles positifs (Mitomycine C et Vincristine Sulfate)</p> <p>A1C1 (0,5 µM. 175 Bq/L) A2C1 (0,5 µM. 1750 Bq/L) A3C1 (0,5 µM. 175 00Bq/L) A1C2 (5 µM. 175 Bq/L) A2C2 (5 µM. 1750 Bq/L) A3C2 (5 µM. 17500 Bq/L) A1C3 (50 µM. 175 Bq/L) A2C3 (50 µM. 1750 Bq/L) A3C3 (50 µM. 17500 Bq/L)</p>	<p>10 donneurs (500 lymphocytes binucléés en double)</p>

RESULTATS

Le test de numération des micronoyaux associé à la technique d'hybridation *in situ* fluorescente de sondes pancentromériques a été utilisé *in vitro* sur des lymphocytes humains afin de définir des marqueurs permettant de discriminer les effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'U. Pour cela, l'objectif principal de cette dernière étude était d'évaluer l'influence respective de la concentration molaire en U (effet chimique) et de l'activité volumique en U (effet radiologique) :

- sur la formation de micronoyaux (BN-MNx) dans les cellules binucléées provenant soit de fragments acentriques (événement clastogène : BN-MNC-) soit de chromosomes entiers (événement aneugène : BN-MNC+). Les MNx centromériques (MNC+, contenant des chromosomes entiers) ont été classés en MNx monocentromériques (MNC1+) et en MNx multicentromériques (MNCx+) suivant le nombre de spots fluorescents (correspondant chacun à un centromère donc à un chromosome) au sein de chaque MN.

- sur la formation des cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs),
- et sur la formation des cellules mononucléées avec des MNx (Mono-MNx).

Le nombre d'aberrations chromosomiques a été compté sur les lymphocytes mononucléées, binucléées, trinucleées et quadrinucleées. Seules sont représentées les données sur les cellules mononucléées et, binucléées, les autres valeurs étant négligeables. Le nombre de cellules en apoptose ou en nécrose n'était pas significatif.

I. Étude des anomalies cytogénétiques spontanées via le test CBMN

A partir de 10 échantillons de sang de donneurs « sains » (cf. Matériels et Méthodes. Partie I.3.1 Justification du choix de la population étudiée), nous avons pu définir les **fréquences spontanées** des anomalies cytogénétiques observées avec le test de numération des MNx :

- des lymphocytes binucléés avec des MNx (BN-MNx),
- des lymphocytes binucléés avec des MNx centromères-positifs (BN-MNC+) classés en mono (BN-MNC1+) ou multicentromériques (BN-MNCx+),
- des lymphocytes binucléés avec des MNx centromères-négatifs (BN-MNC-),
- des lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs)

- ainsi que des lymphocytes mononucléés avec des MNx (Mono-MNx).

Le **Tableau 24** présente le nombre total moyen de micronoyaux (MNx), de micronoyaux centromères-positifs (MNC+) classé en monocentromériques (MNC1+) et multicentromériques (MNCx+), de micronoyaux centromères-négatifs (MNC-), de ponts nucléoplasmiques (PNP) dans 1000 cellules binucléées, pour chacun des 10 donneurs testés. Enfin ce Tableau présente le nombre total moyen de micronoyaux (MNx(mono)) dans les cellules mononucléées, pour chacun des 10 donneurs testés.

La fréquence spontanée des cellules binucléées avec des MNx varie de 0,6 % à 1,2 %, avec une valeur moyenne de 0,9 % ($\pm 0,2$).

Les micronoyaux peuvent être soit le témoin d'une instabilité génétique, soit un biomarqueur d'effet mettant en évidence des dommages chromosomiques induits par des agents mutagènes/cancérogènes. L'association de l'hybridation *in situ* de sondes pancentromériques fluorescentes au test des MNx permet de différencier les MNx contenant des fragments chromosomiques acentromériques (cassures chromosomiques) et ceux contenant des chromosomes entiers centromériques (pertes chromosomiques) consécutifs respectivement à des événements clastogènes ou aneugènes. La fréquence spontanée de cellules binucléées avec des MNx centromères-positifs (BN-MNC+) varie de 0,4 % à 0,8 %, avec une valeur moyenne de 0,6 % ($\pm 0,1$). La fréquence spontanée de cellules binucléées avec des MNx centromères-négatifs (BN-MNC-) varie de 0,2 % à 0,6 %, avec une valeur moyenne de 0,3 % ($\pm 0,1$).

Les micronoyaux centromériques résulteraient de diverses altérations des éléments protéiques structurant l'appareil mitotique. Deux mécanismes de formation semblent impliqués : des défauts de migration chromosomique devraient induire très majoritairement des MNC1+ et des anomalies de duplication des centres organisateurs (centrosomes) devraient induire très majoritairement des MNCx+ (Iarmarcovai *et al.*, 2007). La fréquence spontanée des cellules binucléées avec des micronoyaux centromères-positifs contenant un seul signal centromérique (BN-MNC1+) varie de 0,2 % à 0,4 %, avec une valeur moyenne de 0,2 % ($\pm 0,1$). La fréquence spontanée des cellules binucléées avec des micronoyaux centromères-positifs contenant plusieurs signaux centromériques (BN-MNCx+) varie de 0,2 % à 0,6 %, avec une valeur moyenne de 0,4 % ($\pm 0,1$).

Les ponts nucléoplasmiques (PNPs) proviennent de chromosomes dicentriques. La fréquence spontanée de ponts nucléoplasmiques (PNPs) dans les cellules binucléées varie de 0,1 % à 0,3 %, avec une valeur moyenne de 0,2 % ($\pm 0,1$).

Enfin, la fréquence spontanée de micronoyaux dans les cellules mononucléées (MNx(mono)) varie de 1,9 % à 2,4 %, avec une valeur moyenne de 2,2 % ($\pm 0,1$).

Tableau 24. Nombre total moyen spontané des anomalies cytogénétiques observées avec le test de numération des micronoyaux pour chacun des 10 donneurs étudiés

Donneurs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cellules binucléées	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
MNx	6	8	8	10	10	12	8	6	12	12
MNC+	4	6	6	6	8	8	6	4	8	6
MNC1+	2	2	2	2	2	2	2	2	4	2
MNCx+	2	4	4	4	6	6	4	2	4	4
MNC-	2	2	2	4	2	4	2	2	4	6
PNPs	3	1	3	1	2	2	1	2	2	3
Cellules Mononucléées	1924	1996	2084	1028	2056	1934	2064	2066	2092	1942
MNx(mono)	44	42	44	42	48	44	40	46	50	42

MNx : Nombre total moyen de micronoyaux dans 1000 lymphocytes binucléés

MNC+, MNC1+, MNCx+ et MNC- : Contenu centromérique des micronoyaux dans 1000 lymphocytes binucléés

La présence (MNC+) ou l'absence (MNC-) d'ADN centromérique a été évaluée par une hybridation *in situ* avec des sondes d'ADN pancentromériques fluorescentes. Les micronoyaux centromères-positifs (MNC+) sont classés en monocentromériques (MNC1+) et multicentromériques (MNCx+).

PNPs : Nombre total moyen de ponts nucléoplasmiques (PNP) dans 1000 lymphocyte binucléés

MNx(mono) : Nombre total moyen de micronoyaux (MNx) dans les lymphocyte mononucléés

II. Étude des anomalies cytogénétiques après exposition aux témoins génotoxiques via le test CBMN

En parallèle, les fréquences de cellules BN-MNx, de cellules BN-MNC+, de cellules BN-MNC-, de cellules BN-PNPs et de cellules Mono-MNx ont été déterminées après expositions à des agents génotoxiques connus (= contrôles positifs de l'étude). Il s'agit de la Vincristine Sulfate (agent aneugène) et de la Mitomicine C (agent clastogène).

II.1 Fréquence des cellules binucléées avec des micronoyaux (BN-MNx)

La Vincristine Sulfate et la Mitomycine C induisent significativement plus de cellules BN-MNx que le contrôle (fréquence spontanée). En effet, la Vincristine Sulfate induit en moyenne 5 % de cellules BN-MN (environ 5 fois plus que le contrôle), et la Mitomycine C induit en moyenne 3 % de cellules BN-MNx (environ 3 fois plus que le contrôle) (cf. Figure 108).

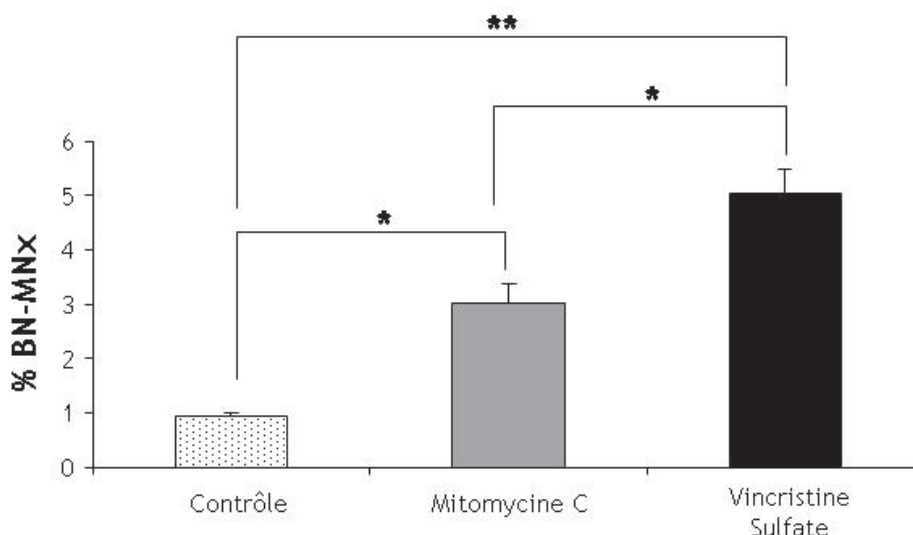


Figure 108. Résultats (moyenne \pm écart type) du test de numération des micronoyaux

Pourcentage de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux (BN-MNx) après exposition aux contrôles génotoxiques (Mitomycine C : barre grise et Vincristine Sulfate : barre noire) ainsi que dans le contrôle (barre à points noirs)

% BN-MNx : % Lymphocytes binucléés avec des micronoyaux

* $P < 0,05$ Différence statistiquement significative entre le contrôle et la Mitomycine C ainsi qu'entre la Mitomycine C et la Vincristine Sulfate (méthode des contrastes)

** $P < 0,01$ Différence statistiquement significative entre le contrôle et la Vincristine Sulfate (méthode des contrastes)

II.2 Contenu centromérique des cellules binucléées avec des MNx

La Vincristine Sulfate induit significativement plus de cellules BN-MNC+ et BN-MNC- que le contrôle (fréquence spontanée) (cf. Figure 109). La Mitomycine C, induit autant de BN-MNC+ que le contrôle, mais significativement plus de cellules BN-MNC- que le contrôle. De plus, la Mitomycine C, connue pour avoir essentiellement un effet clastogène, induit significativement plus de cellules BN-MNC- ($P=0,004$) et moins de cellules BN-MNC+ ($P=0,001$) comparativement à la Vincristine Sulfate, connue pour avoir essentiellement un effet aneugène (cf. Figure 109). La Mitomycine C induit environ 4 fois plus de cellules BN-1MNC- que de cellules BN-1MNC+. En revanche, la Vincristine Sulfate induit environ 2 fois plus de cellules BN-1MNC+ que de cellules BN-1MNC-.

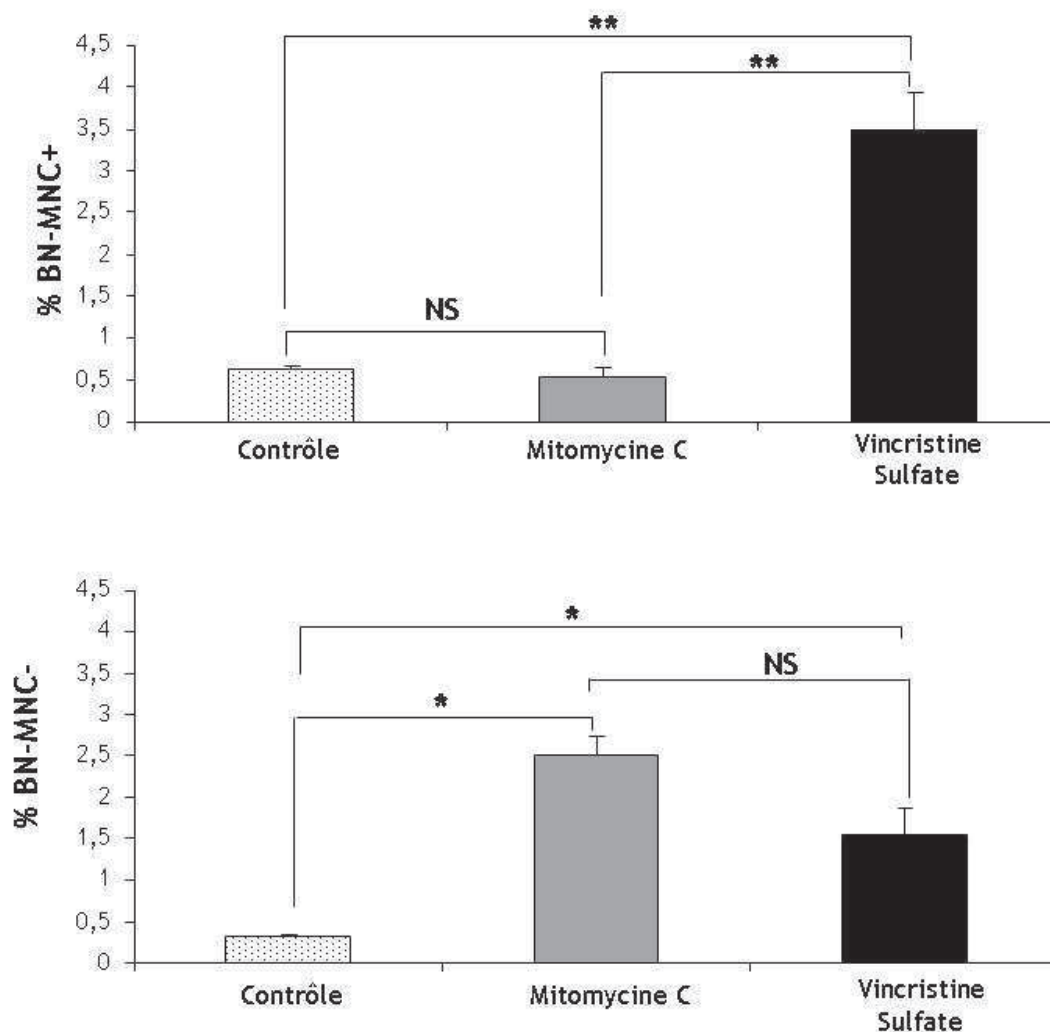


Figure 109. Contenu centromérique des micronoyaux dans les lymphocytes binucléés après exposition aux contrôles génotoxiques (Mitomycine C : barre grise et Vincristine Sulfate : barre noire) ainsi que dans le contrôle (barre à points noirs)

La présence (BN-1MNC+) ou l'absence (BN-1MNC-) d'ADN centromérique a été évaluée par une hybridation *in situ* avec des sondes d'ADN pancentromériques fluorescentes

% BN-MNC+ : % lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-positifs

% BN-MNC- : % lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-négatifs

NS : aucune différence statistiquement significative (méthode des contrastes)

* $P < 0,05$ Différence statistiquement significative entre le contrôle et les contrôles génotoxiques (méthode des contrastes)

** $P < 0,01$ Différence statistiquement significative entre le contrôle et la Vincristine Sulfate ainsi qu'entre la Mitomycine C et la Vincristine Sulfate (méthode des contrastes)

La Figure 110 montre la proportion de cellules BN-MNC+ et de BN-MNC- après exposition à la Mitomycine C et à la Vincristine Sulfate ainsi que dans le contrôle. La production de cellules BN-MNx dans le contrôle est principalement attribuable à une augmentation de la fréquence des cellules BN-MNC+, reflétant une augmentation de perte chromosomique. En effet, 67 % des cellules BN-MNx sont des cellules BN-MNC+.

En revanche, la production de cellules BN-MNx après exposition à la Mitomycine C (connue pour avoir essentiellement un effet clastogène) est principalement attribuable à une augmentation de la

fréquence des cellules BN-MNC- reflétant une augmentation de cassures chromosomiques. En effet, 82 % des cellules BN-MNx sont des cellules BN-MNC- ; ceci confirme l'effet clastogène de la Mitomycine C. Enfin, la production de cellules BN-MNx après exposition la Vincristine Sulfate (connue pour avoir essentiellement un effet aneugène) est principalement attribuable à une augmentation de la fréquence de cellules BN-MNC+ reflétant une augmentation de perte chromosomique. En effet, 70 % des cellules BN-MNx sont des cellules BN-MNC+ ; ceci confirme l'effet aneugène de la Vincristine Sulfate.

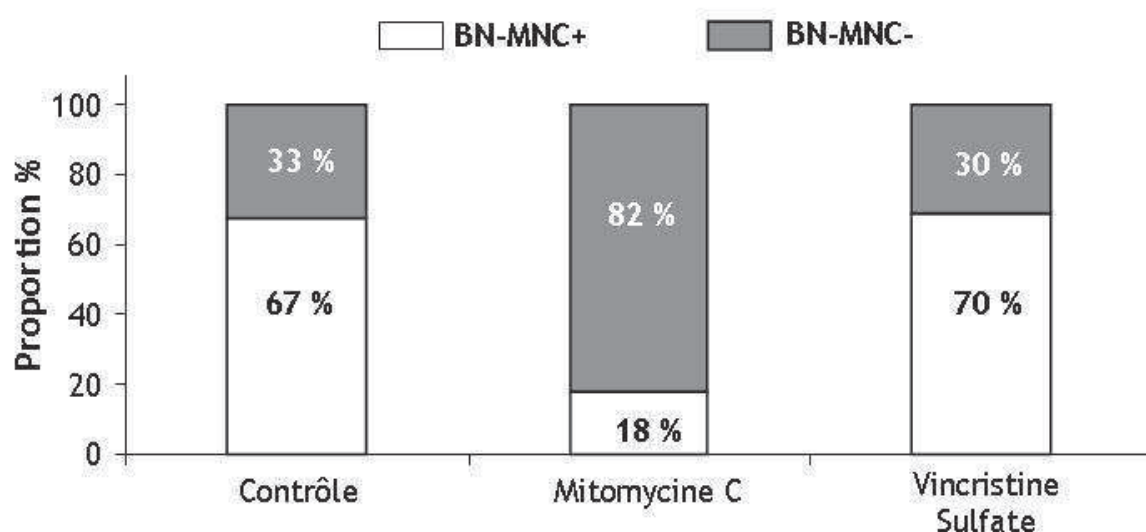


Figure 110. Proportion de cellules BN-MNC+ et BN-MNC- après exposition à la Mitomycine C et à la Vincristine Sulfate ainsi que dans le contrôle

BN-MNC+ : lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-positifs (barre blanche)

BN-MNC- : lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-négatifs (barre grise)

II.3 Évaluation du nombre de signaux centromériques dans les MNx centromères-positifs

La Mitomycine C, induit autant de BN-MNC1+ et de BN-MNCx+ que le contrôle (fréquence spontanée) (cf. Figure 111). En effet la différence entre la Mitomycine C et le contrôle n'est pas statistiquement significative. La Vincristine Sulfate induit significativement plus de cellules BN-MNC1+ et de cellules BN-MNCx+ que le contrôle (fréquence spontanée). En effet, la Vincristine Sulfate induit environ 6 fois plus de cellules BN-MNC1+ et environ 6 fois plus de cellules BN-MNCx+ que le contrôle (1,15 % pour la Vincristine Sulfate vs 0,2 % pour le contrôle pour les cellules BN-MNC1+ ; 2,35 % pour la Vincristine Sulfate vs 0,4 % pour le contrôle pour les cellules BN-MNCx+). Enfin, la Vincristine Sulfate induit significativement plus de cellules BN-MNC1+ et de cellules BN-MNCx+ que la Mitomycine C. En effet, la Vincristine Sulfate induit environ 4 fois plus de cellules BN-MNC1+ et 9 fois plus de cellules BN-MNCx+ que la Mitomycine C.

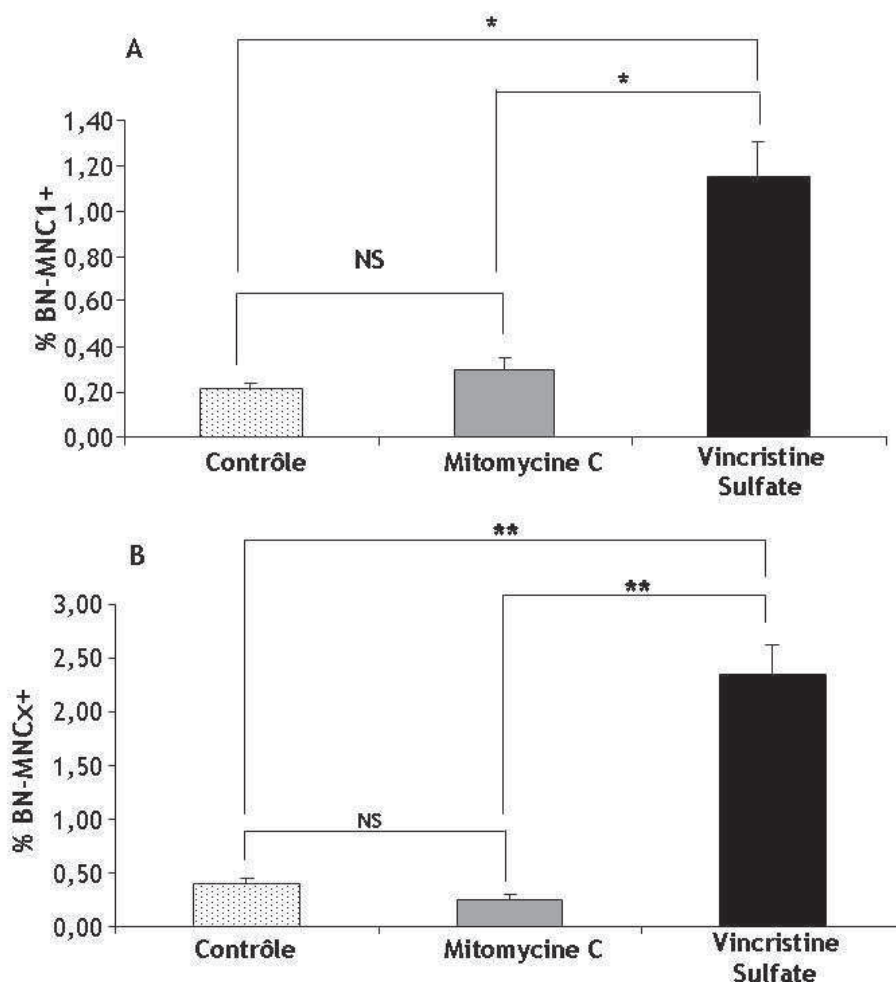


Figure 111. Nombre de signaux centromériques des les micronoyaux centromères-positifs après exposition aux contrôles génotoxiques (Mitomycine C : barre grise et Vincristine Sulfate : barre noire) ainsi que dans le contrôle (barre à points noirs)

La présence d'un signal centromérique (BN-MNC1+) ou de plusieurs signaux centromériques (BN-MNCx+) a été évaluée par une hybridation *in situ* avec des sondes d'ADN pancentromériques fluorescentes

% BN-MNC1+ : % lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-positifs avec un signal centromérique
 % BN-MNCx+ : % lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-positifs avec plusieurs signaux centromériques

NS : aucune différence statistiquement significative (méthode des contrastes)

* $P < 0,05$ Différence statistiquement significative entre les contrôles génotoxiques (méthode des contrastes)

** $P < 0,01$ Différence statistiquement significative entre les contrôles génotoxiques (méthode des contrastes)

II.4 Cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs)

La Figure 112 illustre la proportion de cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) après exposition à la Mitomycine C et à la Vincristine Sulfate (contrôle positifs génotoxiques) ainsi que dans le contrôle (fréquence spontanée).

La fréquence de cellules BN-PNPs induite par la Mitomycine C est significativement supérieure au contrôle. En revanche, la proportion de cellules BN-PNPs après l'exposition à la Vincristine Sulfate est comparable à celle du contrôle. Par ailleurs, la fréquence de cellules BN-PNPs induite par l'agent clastogène, la Mitomycine C, est significativement supérieure à la fréquence de cellules BN-PNPs induite

par l'agent aneugène, la Vincristine Sulfate (2,85 % pour la Mitomycine C vs 0,25 % pour la Vincristine Sulfate).

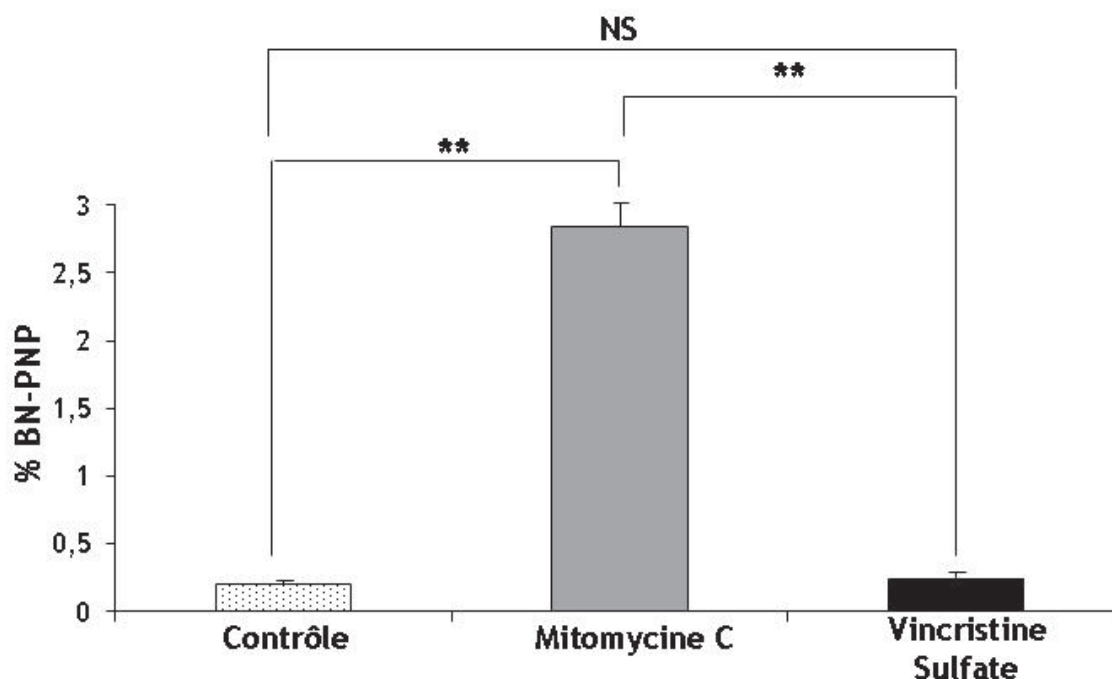


Figure 112. Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) après exposition aux contrôles génotoxiques (Mitomycine C : barre grise et Vincristine Sulfate : barre noire) ainsi que dans le contrôle (barre à points noirs)

% BN-PNP : % lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques

NS : aucune différence statistiquement significative (méthode des contrastes)

** $P < 0,01$ Différence statistiquement significative entre le contrôle et la Mitomycine C ainsi qu'entre la Mitomycine C et la Vincristine Sulfate (méthode des contrastes)

II.5 Cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx)

La Figure 113 illustre la proportion de cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx) après exposition à la Mitomycine C et à la Vincristine Sulfate (contrôle positifs génotoxiques) ainsi que dans le contrôle (fréquence spontanée).

La fréquence de cellules Mono-MNx induite par la Mitomycine C est comparable à celle du contrôle (fréquence spontanée). En revanche, la proportion de cellules Mono-MNx après exposition à la Vincristine Sulfate est significativement supérieure au contrôle. Par ailleurs, la fréquence de cellules Mono-MNx induite par l'agent aneugène, la Vincristine Sulfate, est significativement supérieure à la fréquence de cellules Mono-MNx induite par l'agent clastogène, la Mitomycine C (5,8 % pour la Vincristine Sulfate vs 2,4 % pour la Mitomycine C).

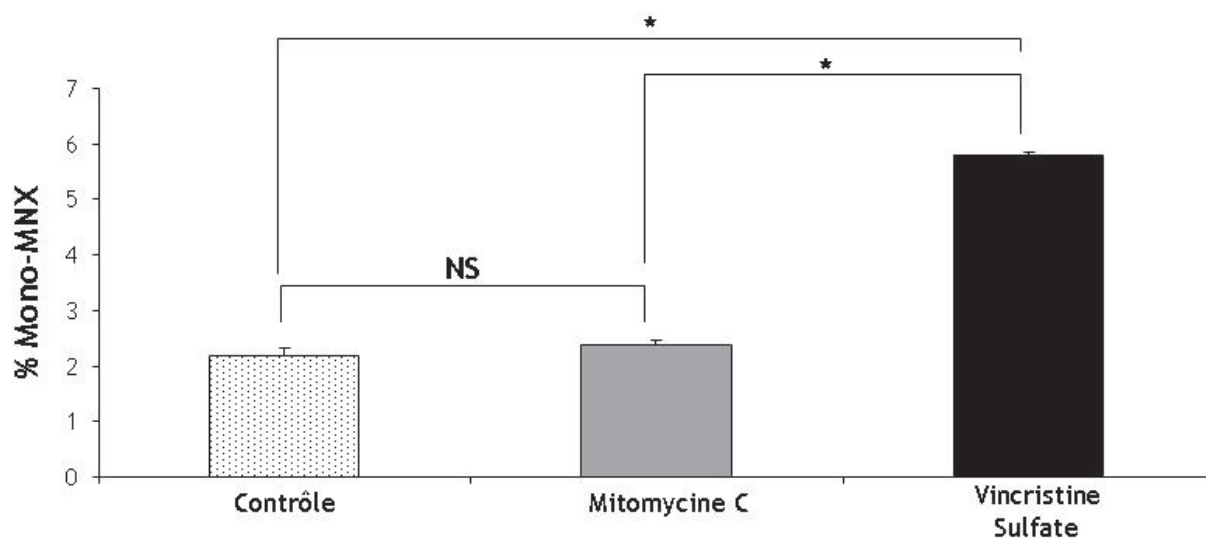


Figure 113. Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes mononucléés avec des micronoyaux (Mono-MNx) après exposition aux contrôles génotoxiques (Mitomycine C : barre grise et Vincristine Sulfate : barre noire) ainsi que dans le contrôle (barre à points noirs)

% Mono-MNx : % lymphocytes binucléés avec des micronoyaux

NS : aucune différence statistiquement significative (méthode des contrastes)

** $P < 0,05$ Différence statistiquement significative entre le contrôle et la Vincristine Sulfate ainsi qu'entre la Mitomycine C et la Vincristine Sulfate (méthode des contrastes)

III. Étude des anomalies cytogénétiques après exposition à différents mélanges isotopiques de l'uranium via le test CBMN

III.1 Les cellules binucléées avec des micronoyaux après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U (BN-MNx)

La Figure 114 illustre la fréquence moyenne des cellules binucléées avec des MNx (BN-MNx) pour chaque condition testée (9 lots expérimentaux et un contrôle) pour un des donneurs étudiés (données similaires pour les 10 donneurs).

L'exposition aux différents mélanges isotopiques de l'U induit la formation de cellules BN-MNx dès la plus faible concentration molaire et activité volumique testées (C1A1) ; augmentation statistiquement significative par rapport au contrôle. Pour chaque concentration molaire testée (C1, C2 et C3), le pourcentage de cellules BN-MNx augmente en fonction de l'activité volumique de l'U. En effet, par exemple pour la concentration C1, le pourcentage à la plus faible activité (A1) est de 2,3 % et atteint 4 % à la plus forte activité testée (A3). Par ailleurs, pour chaque activité (A1, A2 et A3), le pourcentage de cellules BN-MNx n'est pas significativement différent ; on peut cependant noter une légère augmentation en fonction de la concentration molaire en U. En effet, par exemple pour l'activité A2, le pourcentage à la plus faible concentration (C1) est de 3,2 % et il atteint 4,5 % à la plus forte concentration testée (C3).

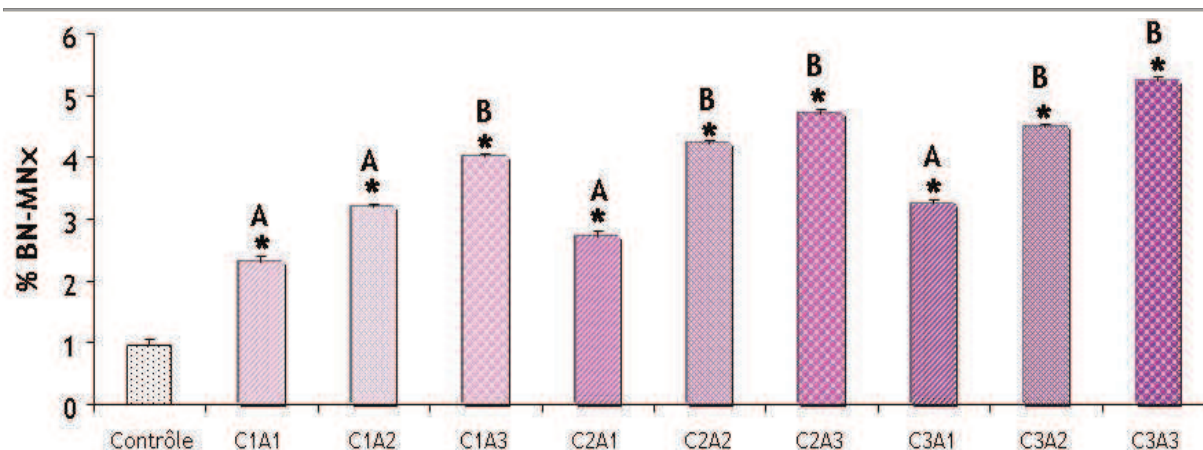


Figure 114. Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux (BN-MNx) après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U (9 conditions expérimentales) ainsi que dans le contrôle

% BN-MNx: % cellules binucléées avec des micronoyaux

NS : aucune différence statistiquement significative ((méthode des contrastes)

* $P < 0,05$ Différence statistiquement significative entre le contrôle et les différents mélanges isotopiques d'U (méthode des contrastes)

A, B : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes entre les mélanges isotopiques d'U ($P < 0,05$)

Le test de numération des MNx, réalisée sur 10 donneurs volontaires, a révélé que la production de MNx dans les cellules binucléées est modulée par la concentration molaire en U ($P < 0,001$) ainsi que par l'activité volumique en U ($P < 0,001$), sans aucune interaction entre ces 2 facteurs (cf. Figure 115). La concentration molaire en U et l'activité volumique en U sont dissociables (pas d'interaction) ; l'un ne dépend pas de l'autre. Les données des 10 patients peuvent par conséquent être regroupées soit en fonction de la concentration molaire en U en 3 sous-groupes (C1, C2 et C3) (cf. Figure 115 A) soit en fonction de l'activité volumique en U en 3 sous-groupes (A1, A2 et A3) (cf. Figure 115 B).

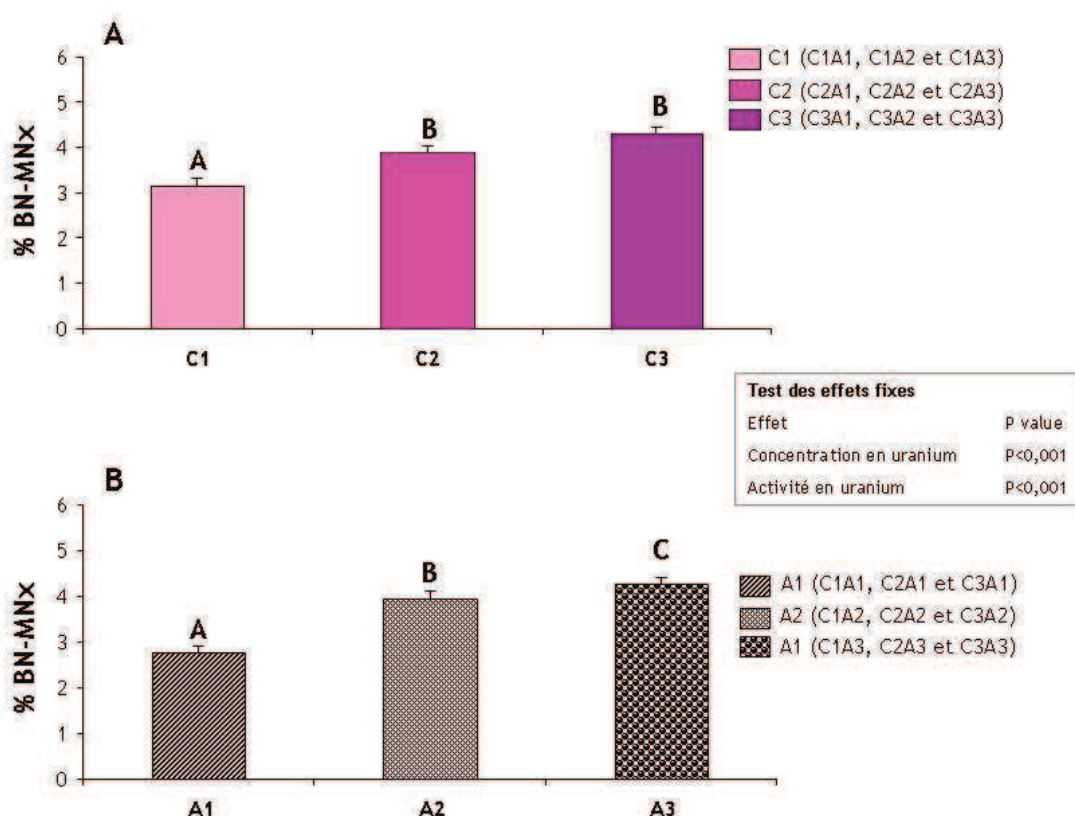


Figure 115. (A) Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux (BN-MNx) en fonction des différentes concentrations molaires testées (C1, C2 et C3) pour les 10 donneurs. (B) Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux (BN-MNx) en fonction des différentes activités volumiques testées (A1, A2 et A3) pour les 10 donneurs
 % BN-MNx : % lymphocytes binucléés avec des micronoyaux
 A, B, C : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes entre les concentrations molaires d’U ou entre les activités volumiques d’U (P<0,05, méthode des contrastes)
 C1 à C3 : Concentration molaire en µM
 A1 à A3 : Activité volumique en Bq/L

Le pourcentage moyen de cellules BN-MNx, pour les 10 donneurs, augmente avec la concentration molaire en U (cf. Figure 115 A. 3,5 % pour C1, 3,9 % pour C2 et 4,3 % pour C3). De plus, Le pourcentage moyen de cellules BN-MNx, pour les 10 donneurs, augmente avec l’activité volumique en U (cf. Figure 115 B. 2,8 % pour A1, 3,9 % pour A2 et 4,3 % pour A3).

En conclusion, la concentration molaire en U et l’activité volumique en U influencent la formation de cellules BN-MNx, sans aucune interaction entre ces 2 facteurs. Par conséquent, quelle que soit la concentration molaire en U ou l’activité volumique en U testée, la production de MNx dans les cellules binucléées sera observée. Seule l’augmentation de la concentration molaire en U ou l’augmentation de l’activité volumique en U modulera la quantité de MNx observée.

III.2 Hybridation *in situ* de sondes pancentromériques (FISH)

III.2.1 Contenu centromérique (avec ou sans centromère)

La Figure 116 illustre la fréquence moyenne des cellules binucléées avec des MNx centromères-positifs (BN-MNC+) pour chaque condition testée (9 lots expérimentaux et un contrôle) pour un des 10 donneurs étudiés (données similaires pour les 10 donneurs). L'exposition aux différents mélanges isotopiques de l'U induit la formation de cellules BN-MNC+ dès la plus faible concentration molaire et activité volumique testées (C1A1) ; cependant cette différence est significativement supérieure au contrôle que pour des concentrations supérieures à C1 (C2 et C3). Pour chaque concentration testée (C1, C2 et C3), le pourcentage de cellules BN-MNC+ est identique quelle que soit l'activité (A1, A2 ou A3). Pour chaque activité (A1, A2 et A3), le pourcentage de cellules BN-MNC+ augmente légèrement en fonction de la concentration molaire en U. En effet, par exemple pour l'activité A2, le pourcentage à la plus faible concentration (C1) est de 1,3 % et il atteint 2,1 % à la plus forte concentration testée (C3). Il faut noter qu'il ne s'agit que d'une légère tendance car les différences ne sont pas statistiquement significatives.

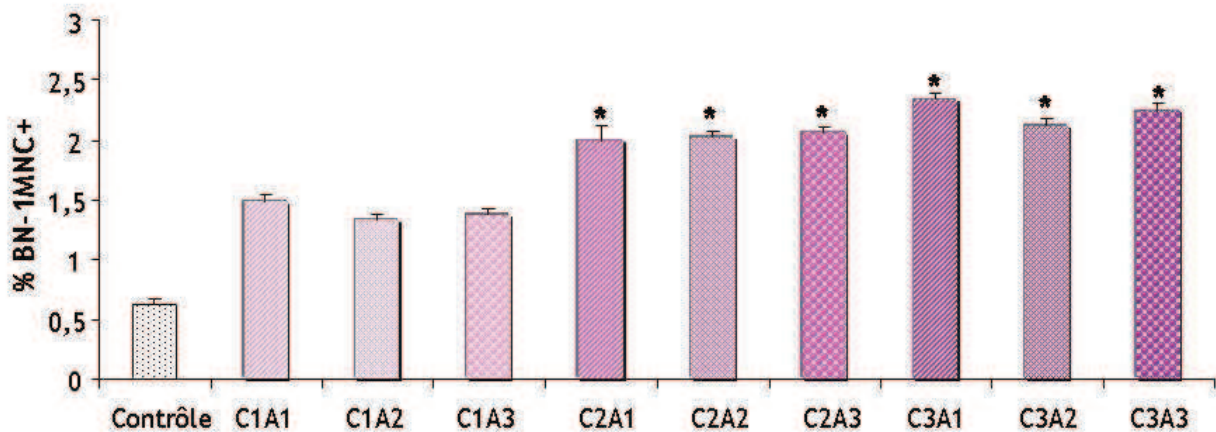


Figure 116. Pourcentage (moyenne \pm écart type) de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-positifs (BN-MNC+) après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U (9 conditions expérimentales) ainsi que dans le contrôle

% BN-MNC+ : % cellules binucléées avec des micronoyaux centromères-positifs

* $P < 0,05$ Différence statistiquement significative entre le contrôle et les différents mélanges isotopiques d'U (méthodes des contrastes)

La Figure 117 illustre la fréquence moyenne des cellules binucléées avec des MNx centromères-négatifs (BN-MNC-) pour chaque condition testée (9 lots expérimentaux et un contrôle) pour un des 10 donneurs étudiés (données similaires pour les 10 donneurs). L'exposition aux différents mélanges isotopiques de l'U induit la formation de cellules BN-MNC- dès la plus faible concentration molaire et activité volumique testées (C1A1). Cette augmentation n'est pas significativement différente du contrôle pour les faibles activités (A1C1, A1C2 et A1C3) ; en revanche l'induction de cellules BN-MNC- est

significativement supérieur au contrôle pour les activités A2 et A3. Pour chaque activité testée (A1, A2 et A3), le pourcentage de cellules BN-MNC- est identique quelle que soit la concentration (C1, C2 ou C3). En revanche pour chaque concentration (C1, C2 et C3), le pourcentage de cellules BN-MNC- augmente légèrement en fonction de l'activité volumique en U. En effet, par exemple pour la concentration C2, le pourcentage à la plus faible activité (A1) est de 0,8 % et atteint 2,7 % à la plus forte activité testée (A3).

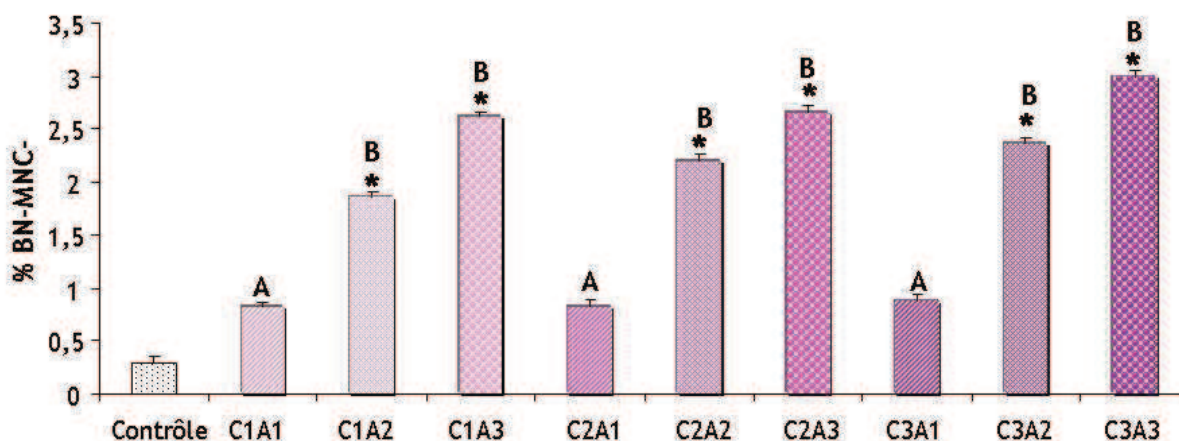


Figure 117. Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-négatifs (BN-MNC-) après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U (9 conditions expérimentales) ainsi que dans le contrôle

% BN-MNC- : % cellules binucléées avec des micronoyaux centromères-négatifs

* $P < 0,05$ Différence statistiquement significative entre le contrôle et les différents mélanges isotopiques d'U (méthodes des contrastes)

A, B : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes entre les mélanges isotopiques d'U ($P < 0,05$)

La Figure 118 illustre la proportion de cellules BN-MNC+ et de BN-MNC- après exposition aux différents mélanges isotopiques de l'U ainsi que dans le contrôle. La production de cellules BN-MNx dans le contrôle est principalement attribuable à une augmentation de la fréquence des cellules BN-1MNC+, reflétant une augmentation de perte chromosomique. En effet, 67 % des cellules BN-MNx sont des cellules BN-MNC+. La production de cellules BN-MNx après exposition aux faibles activités volumiques d'U (à savoir C1A1- C2A1 et C3A1) est principalement attribuable à une augmentation de la fréquence des cellules BN-MNC+ reflétant une augmentation de perte chromosomique. En effet, environ 70 % des cellules BN-MNx sont des cellules BN-MNC+ ; ceci dénote un effet principalement aneugène de l'U pour de faibles activités volumiques. En revanche, la production de cellules BN-MNx après exposition aux plus fortes activités volumiques en U (à savoir C1A2- C2A2- C3A2 et C1A3- C2A3 et C3A3) est principalement attribuable à une augmentation de la fréquence de cellules BN-MNC- reflétant une augmentation de cassures chromosomiques. En effet, 60 % des cellules BN-MNx sont des cellules BN-MNC- ; ceci dénote un effet principalement clastogène de l'U pour de fortes activités volumiques.

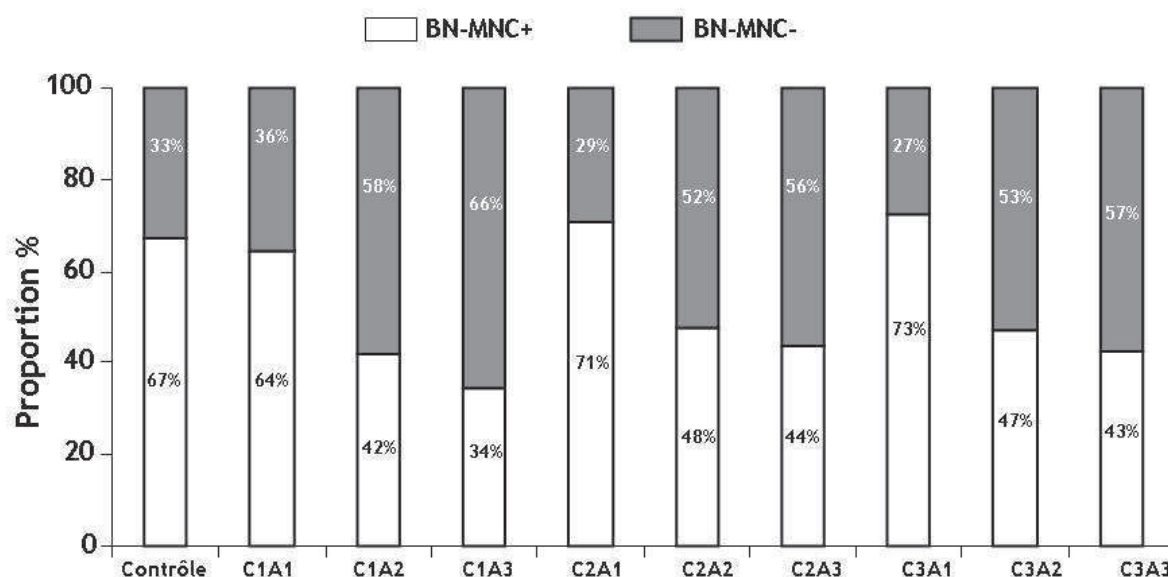


Figure 118. Proportion de lymphocytes BN-MNC+ et BN-MNC- après exposition aux différents mélanges isotopiques de l'U ainsi que dans le contrôle

BN-MNC+ : lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-positifs (barre blanche)

BN-MNC- : lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-négatifs (barre grise)

Le test de numération des MNx, réalisée sur 10 donneurs volontaires, a révélé que la production de cellules BN-MNC+ est influencée uniquement par la concentration molaire en U ($P < 0,001$) (cf. Figure 119 A). En effet, l'activité volumique en U n'influence pas sur la formation des cellules BN-MNC+ ($P = 0,8$) ; aucune interaction n'existe entre la concentration molaire en U et l'activité volumique en U (ces deux facteurs sont bien dissociables, l'un ne dépend pas de l'autre). Les données des 10 donneurs volontaires pour les cellules BN-MNC+ peuvent par conséquent être regroupées en fonction de la concentration molaire en U soit en 3 sous-groupes (C1, C2 et C3) (cf. Figure 119 A).

Le test de numération des MNx, réalisée sur ces 10 individus, a révélé que la production de cellules BN-MNC- est influencée uniquement par l'activité volumique en U ($P < 0,001$) (cf. Figure 119 B). En effet, la concentration molaire en U n'influence pas sur la formation des cellules BN-MNC- ($P = 0,1$) ; aucune interaction n'existe entre la concentration molaire en U et l'activité volumique en U (ces deux facteurs sont bien dissociables, l'un ne dépend pas de l'autre). Les données des 10 patients pour les cellules BN-MNC- peuvent par conséquent être regroupées en fonction de l'activité volumique en U soit en 3 sous-groupes (A1, A2 et A3) (cf. Figure 119 B).

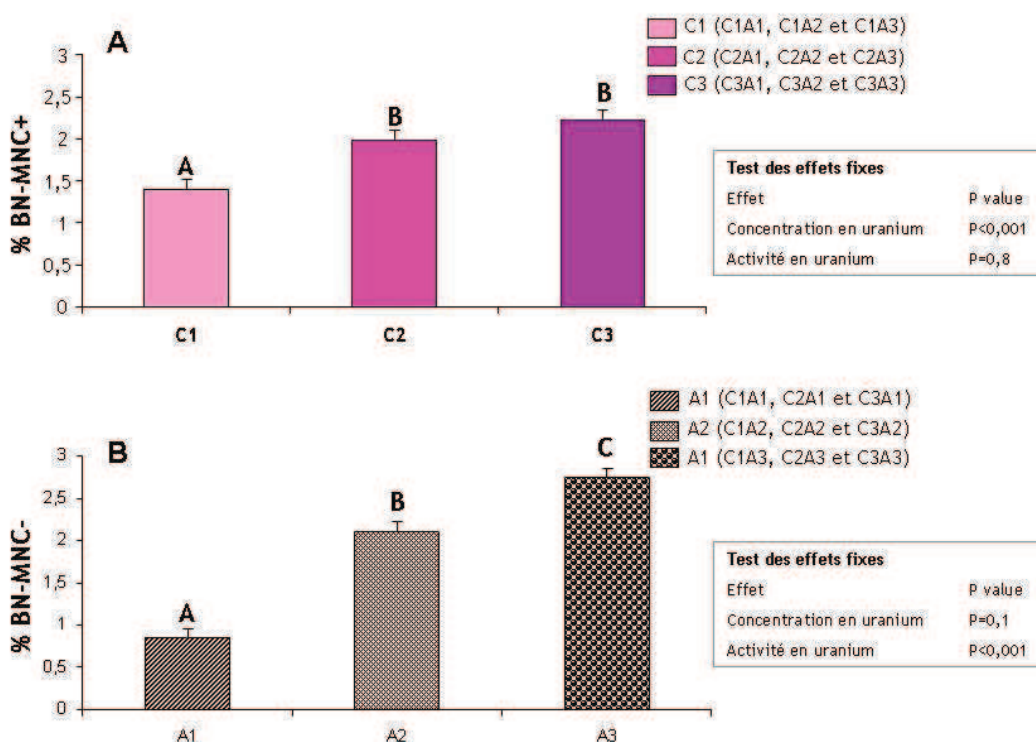


Figure 119. Contenu centromérique des micronoyaux dans les lymphocytes binucléés après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U en fonction des différentes concentrations molaires testées pour les cellules BN-MNC+ (A) et en fonction des différentes activités volumiques testées pour les cellules BN-MNC- (B)

La présence (A: BN-1MNC+) ou l'absence (B: BN-1MNC-) d'ADN centromérique a été évaluée par une hybridation *in situ* avec des sondes d'ADN pancentromériques fluorescentes

% BN-MNC+ : % lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-positifs

% BN-MNC- : % lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-négatifs

A, B, C : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes entre les concentrations molaires d'U ou entre les activités volumiques d'U ($P < 0,05$)

Le pourcentage moyen de cellules BN-MNC+, pour les 10 donneurs, augmente avec la concentration molaire en U (1,4 % pour C1, 2 % pour C2 et 2,2 % pour C3). Le pourcentage de cellules BN-MNC+ est significativement supérieur pour C2 et C3 comparé à C1, en revanche aucune différence significative entre C2 et C3. Par ailleurs, le pourcentage moyen de cellules BN-MNC-, pour les 10 donneurs, augmente avec l'activité volumique en U (0,8 % pour A1, 2,1 % pour A2 et 2,7 % pour A3). Cette différence est statistiquement significative pour les trois activités volumiques testées.

En conclusion, la concentration molaire en U influence la formation de cellules BN-MNC+, alors que l'activité volumique en U influence la formation de cellules BN-MNC-. En effet, plus la concentration molaire en U sera importante et plus la formation de cellules BN-MNC+ sera observée, et plus l'activité volumique en U sera importante plus la formation de cellules BN-MNC- sera observée. En outre, ces résultats montrent que les cellules BN-MNC+ et les cellules BN-MNC- permettent de discriminer les effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'U.

III.2.2 Nombre de signaux centromériques dans les micronoyaux centromères-positifs

La Figure 120 illustre la fréquence moyenne des cellules binucléées avec des micronoyaux centromères-positifs avec un (BN-MNC1+) ou plusieurs signaux centromériques (BN-MNCx+) pour chaque condition testée (9 lots expérimentaux et un contrôle) pour un des 10 donneurs étudiés (données similaires pour les 10 donneurs). L'exposition aux différents mélanges isotopiques de l'U induit la formation de cellules BN-MNC1+ ainsi que de BN-MNCx+. En effet, dès la plus faible concentration molaire et activité volumique testées (C1A1), l'U induit significativement plus de cellules BN-MNC1+ que le contrôle (fréquence spontanée). Ces augmentations ne sont cependant pas statistiquement significativement différentes du contrôle pour les cellules BN-MNCx+. Les fréquences étant relativement faibles (du fait du découpage des cellules BN-MNx en plusieurs catégories : BN-MNC+ en BN-MNC1+ et BN-MNCx+), il est difficile d'avoir un test statistique significatif. On peut toutefois noter une tendance à l'augmentation des cellules BN-MNC1+ et BN-MNCx+ en fonction de la concentration molaire pour chaque activité volumique testée (A1, A2 et A3). En effet, pour les cellules BN-MNC1+ par exemple pour l'activité A3, le pourcentage à la plus faible concentration (C1) est de 0,9 %, il est de 1,1 % pour C2 et atteint 1,3 % à la plus forte concentration testée (C3).

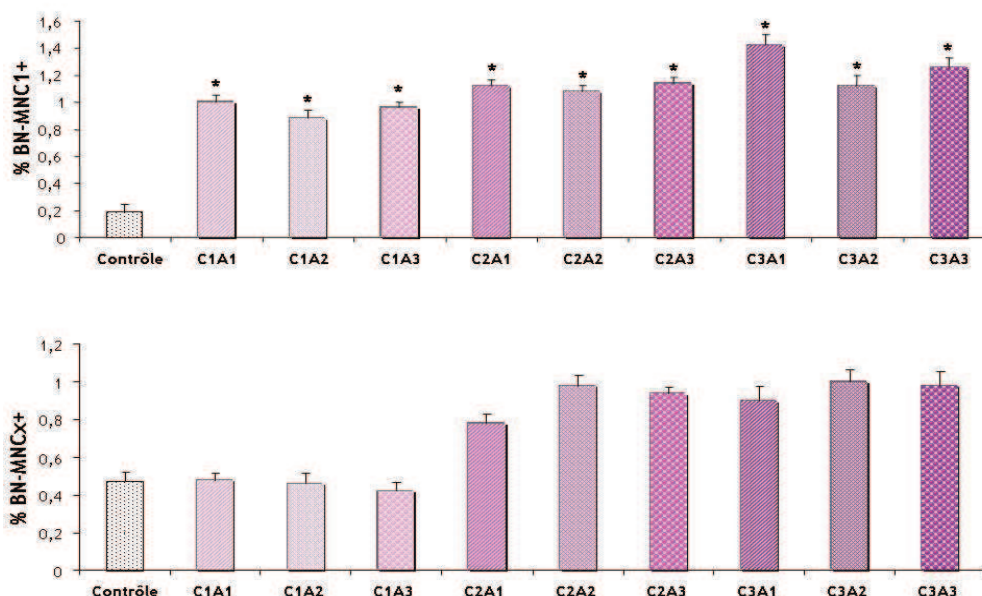


Figure 120. Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-positifs avec un (BN-MNC1+) ou plusieurs (BN-MNCx+) signaux centromériques après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U (9 conditions expérimentales) ainsi que dans le contrôle

% BN-MNC1+ : % lymphocytes binucléés avec micronoyaux centromères-positifs avec un signal centromérique (monocentromérique)

% BN-MNCx+ : % lymphocytes binucléés avec micronoyaux centromères-positifs avec plusieurs signaux centromériques (multicentromérique)

* $P < 0,05$ Différence statistiquement significative entre le contrôle et les différents mélanges isotopiques d'U (méthodes des contrastes)

Le test de numération des MNx, réalisée sur 10 donneurs volontaires, a révélé que la production de cellules BN-MNC1+ est influencée uniquement par la concentration molaire en U ($P=0,03$) (cf. Figure 121 A). En effet, l'activité volumique en U n'influence pas sur la formation des cellules BN-MNC1+ ($P=0,5$) ; aucune interaction n'existe entre la concentration molaire en U et l'activité volumique en U (ces deux facteurs sont bien dissociables, l'un ne dépend pas de l'autre). Les données des 10 patients pour les cellules BN-MNC1+ peuvent par conséquent être regroupées en fonction de la concentration molaire en U soit en 3 sous-groupes (C1, C2 et C3) (cf. Figure 121 A).

Le test de numération des MNx, réalisée sur 10 donneurs volontaires, a révélé que la production de cellules BN-MNCx+ est influencée uniquement par la concentration molaire en U ($P<0,001$) (cf. Figure 121 B). En effet, l'activité volumique en U n'influence pas sur la formation des cellules BN-MNCx+ ($P=0,7$) ; aucune interaction n'existe entre la concentration molaire en U et l'activité volumique en U (ces deux facteurs sont bien dissociables, l'un ne dépend pas de l'autre). Les données des 10 patients pour les cellules BN-MNCx+ peuvent par conséquent être regroupées en fonction de la concentration molaire en U soit en 3 sous-groupes (C1, C2 et C3) (cf. Figure 121 B).

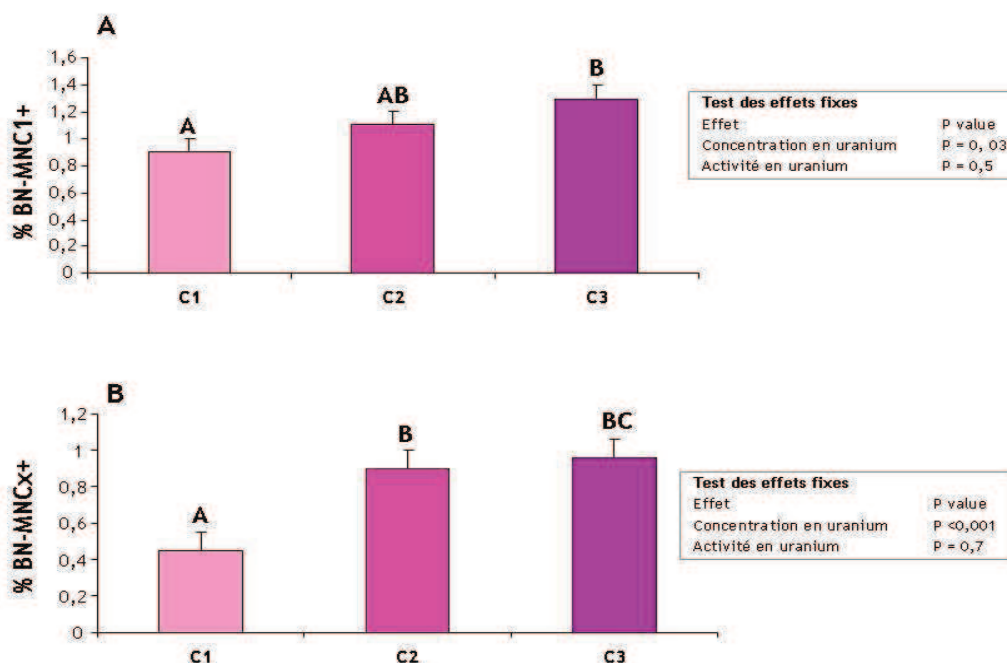


Figure 121. Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des micronoyaux centromères-positifs avec un (BN-MNC1+) ou plusieurs (BN-MNCx+) signaux centromériques après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U en fonction des différentes concentrations molaires testées pour les cellules BN-MNC1+ (A) et les cellules BN-MNCx+ (B)

La présence d'un (A: BN-1MNC1+) ou plusieurs (B: BN-1MNCx+) signaux centromériques a été évaluée par une hybridation *in situ* avec des sondes d'ADN pancentromériques fluorescentes.

% BN-MNC1+ : % lymphocytes binucléés avec micronoyaux centromères-positifs avec un signal centromérique

% BN-MNCx+ : % lymphocytes binucléés avec micronoyaux centromères-positifs avec plusieurs signaux centromériques
 A, B, C : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes entre les concentrations molaires d'U ou entre les activités volumiques d'U ($P<0,05$)

Le pourcentage moyen de cellules BN-MNC1+, pour les 10 donneurs, augmente avec la concentration molaire en U (0,9 % pour C1, 1,1 % pour C2 et 1,3 % pour C3). Le pourcentage de cellules BN-MNC1+ est significativement supérieur pour C3 comparé à C1, en revanche aucune différence significative entre C1 et C2 ainsi qu'entre C2 et C3. Par ailleurs, le pourcentage moyen de cellules BN-MNCx+, pour les 10 donneurs, augmente lui aussi avec concentration molaire en U (0,45 % pour A1, 0,9 % pour A2 et 0,96 % pour A3). Le pourcentage de cellules BN-MNCx+ est significativement supérieur pour C2 et C3 comparé à C1, en revanche aucune différence significative entre C2 et C3.

En conclusion, la concentration molaire en U influence la formation des cellules BN-MNC1+ ainsi que la formation de cellules BN-MNCx+. En effet, plus la concentration molaire en U est importante et plus la formation de cellules BN-MNC1+ et BN-MNCx+ augmente. En outre, ces résultats montrent que les cellules BN-MNC1+ et les cellules BN-MNCx+ sont induites par l'effet chimiotoxique de l'U. Il faut cependant noter que ces événements sont rares du fait du découpage des cellules BN-MNx en de nombreuses sous-classes (tout d'abord en 2 classes : BN-MNC+ et BN-MNC-, la classe BN-MNC+ est elle-même redécoupée en BN-MNC1+ et BN-MNCx+).

III.3 Les cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques

La **Figure 122** illustre la fréquence moyenne des cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) pour chaque condition testée (9 lots expérimentaux et un contrôle) pour un des 10 donneurs étudiés (données similaires pour les 10 donneurs). L'exposition aux différents mélanges isotopiques de l'U induit la formation de cellules BN-PNPs. Cette augmentation n'est pas significativement différente du contrôle pour les faibles activités (A1C1, A1C2 et A1C3) ; en revanche l'induction de cellules BN-PNPs est significativement supérieur au contrôle pour les activités A2 et A3. Pour chaque activité volumique testée (A1, A2 et A3), le pourcentage de cellules BN-PNPs est identique quelle que soit la concentration molaire (C1, C2 ou C3). En revanche pour chaque concentration molaire (C1, C2 et C3), le pourcentage de cellules BN-PNPs augmente en fonction de l'activité volumique en U. En effet, par exemple pour la concentration C2, le pourcentage à la plus faible activité (A1) est 1 % et atteint 4 % à la plus forte activité testée (A3). De plus, pour chacune des concentrations molaires testées, la plus forte activité (A3) induit au moins 4 fois plus de BN-PNPs que la plus faible activité (A1).

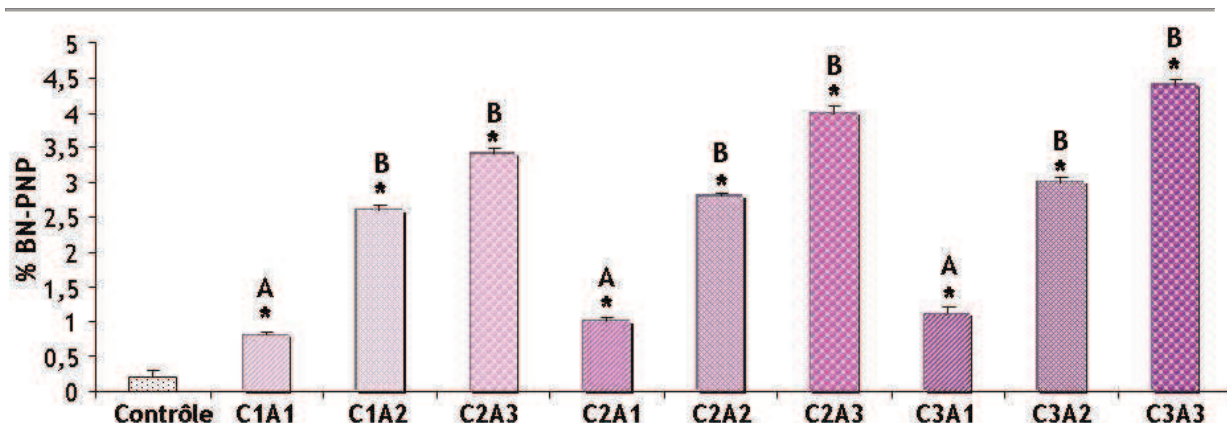


Figure 122. Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) après exposition à différents mélanges isotopiques de l’U (9 conditions expérimentales) ainsi que dans le contrôle

% BN-PNP : % lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques

* $P < 0,05$ Différence statistiquement significative entre le contrôle et les différents mélanges isotopiques d’U (méthode des contrastes)

A, B : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes entre les mélanges isotopiques d’U ($P < 0,05$)

Le test de numération des MNx, réalisée sur 10 donneurs volontaires, a révélé que la production de ponts nucléoplasmiques dans les cellules binucléées est modulée uniquement par l’activité volumique en U ($P < 0,001$) (cf. Figure 123). En effet, la concentration molaire en U n’influence pas la formation des cellules BN-PNPs ($P = 0,7$) ; il n’existe aucune interaction entre la concentration molaire en U et l’activité volumique en U (ces deux facteurs sont bien dissociables, l’un ne dépend pas de l’autre). Les données des 10 patients pour les cellules BN-PNPs peuvent par conséquent être regroupées en fonction de l’activité volumique en U en 3 sous-groupes (A1, A2 et A3) (cf. Figure 123).

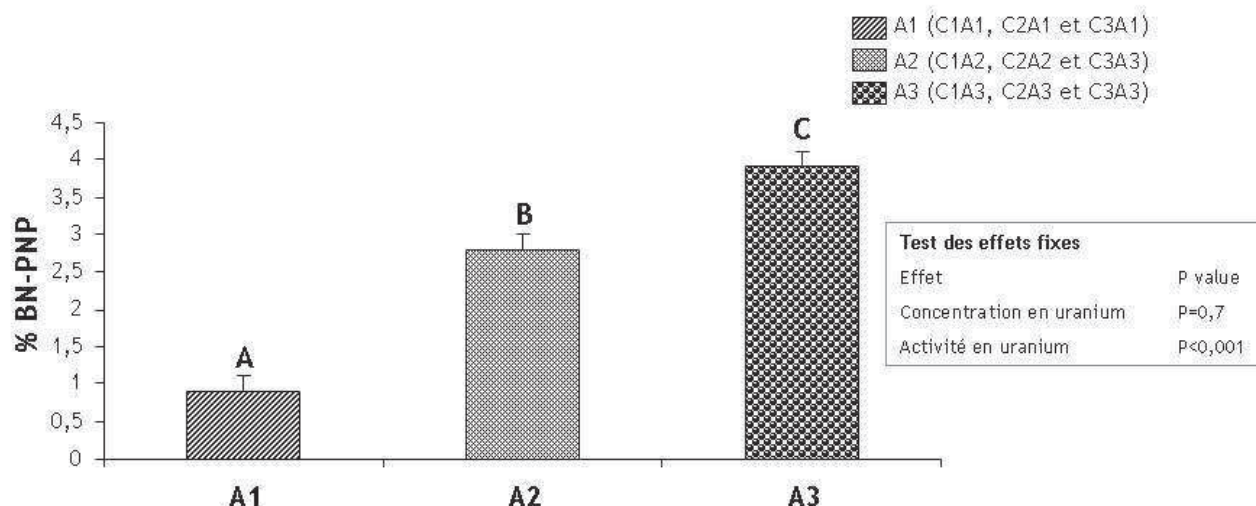


Figure 123. Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) en fonction des différentes activités volumiques testées

% BN-PNP : % lymphocytes binucléés avec des ponts nucléoplasmiques

A, B, C : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes entre les activités volumiques d’U ($P < 0,05$)

Le pourcentage moyen de cellules BN-PNPs, pour les 10 donneurs, augmente avec l'activité volumique en U (0,9 % pour A1, 2,8 % pour A2 et 3,9 % pour A3). Cette augmentation est statistiquement significative pour les trois activités volumiques testées.

En conclusion, l'activité volumique en U influence la formation de cellules BN-PNPs ; en effet plus l'activité volumique en U sera importante et plus la formation de ponts nucléoplasmiques sera observée. En outre, ces résultats montrent que les cellules BN-PNPs sont induites par l'effet radiotoxique de l'U.

III.4 Les cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx)

La Figure 124 illustre la fréquence moyenne des cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx) pour chaque condition testée (9 lots expérimentaux et un contrôle) pour un des 10 donneurs étudiés (données similaires pour les 10 donneurs). L'exposition aux différents mélanges isotopiques de l'U induit la formation de cellules Mono-MNx. Cette différence est significativement différente du contrôle (fréquence spontanée) dès la plus faible concentration molaire et activité volumique testées (C1A1). Pour chaque concentration molaire testée (C1, C2 et C3), le pourcentage de cellules Mono-MNx est identique quelle que soit l'activité (A1, A2 ou A3). De plus, pour chaque activité (A1, A2 et A3) testée, le pourcentage de cellules Mono-MNx est identique quelle que soit la concentration molaire (C1, C2 ou C3). On peut cependant noter une légère tendance à la diminution des cellules Mono-MNx en fonction de la concentration molaire en U (différence non significative). En effet, par exemple pour l'activité A1, le pourcentage à la plus faible concentration (C1) est de 5,4 % et il diminue à 3,6 % à la plus forte concentration testée (C3). De plus, pour chacune des activités volumiques testées, la plus faible concentration (C1) induit au moins 1,5 fois plus de Mono-MNx que la plus forte concentration (C3).

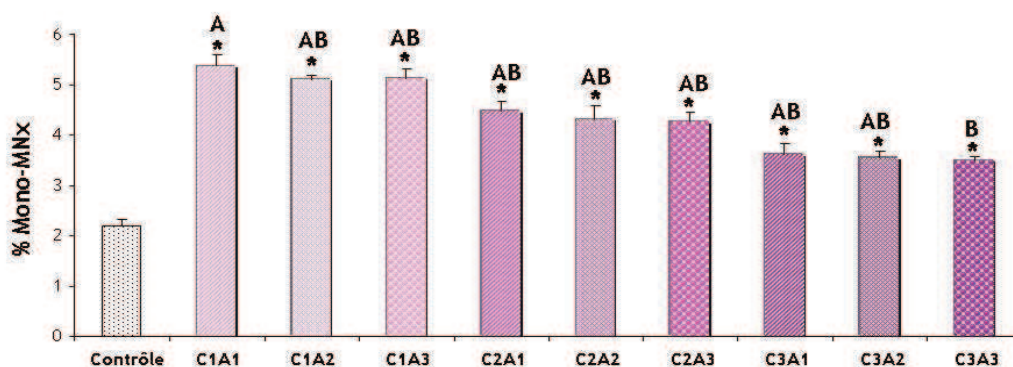


Figure 124. Pourcentage (moyenne ± écart type) de lymphocytes mononucléés avec des micronoyaux (Mono-MNx) après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U (9 conditions expérimentales) ainsi que dans le contrôle

% Mono-MNx : lymphocytes mononucléés avec des micronoyaux

* $P < 0,05$ Différence statistiquement significative entre le contrôle et les différents mélanges isotopiques d'U (Test du Chi2)

A, B : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes entre les mélanges isotopiques d'U ($P < 0,05$)

Le test de numération des MNx, réalisée sur 10 donneurs volontaires, a révélé que la production de micronoyaux dans les cellules mononucléées est modulée uniquement par la concentration molaire en U ($P < 0,001$) (cf. Figure 125). En effet, l'activité volumique en U n'influence pas sur la formation des cellules Mono-MNx ($P = 0,8$) ; aucune interaction n'existe entre la concentration molaire en U et l'activité volumique en U (ces deux facteurs sont bien dissociables, l'un ne dépend pas de l'autre). Les données des 10 individus pour les cellules Mono-MNx peuvent par conséquent être regroupées en fonction de la concentration molaire en U en 3 sous-groupes (C1, C2 et C3) (cf. Figure 125).

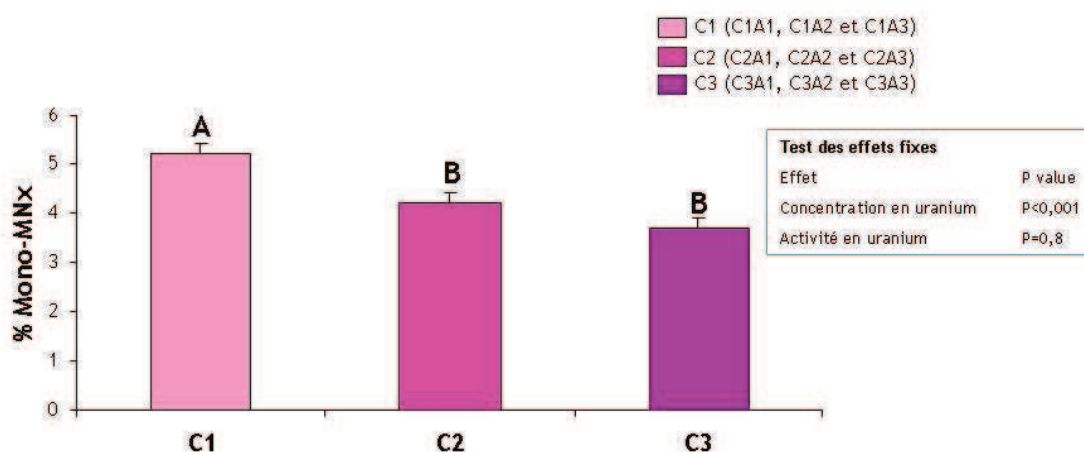


Figure 125. Pourcentage (moyenne \pm écart type) de cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx) en fonction des concentrations molaires testées

% Mono-MNx : % lymphocytes mononucléés avec des micronoyaux

A, B, C : les barres avec une lettre différente sont significativement différentes entre les activités volumiques d'U ($P < 0,05$)

Le pourcentage moyen de cellules Mono-MNx, pour les 10 donneurs, diminue avec la concentration molaire en U (5,2 % pour C1, 4,2 % pour C2 et 3,7 % pour C3). Le pourcentage de cellules Mono-MNx est significativement supérieur pour C1 comparé à C2 et C3 ; en revanche aucune différence significative entre C2 et C3. On peut noter, comparativement avec les autres facteurs étudiés, que le pourcentage de cellules Mono-MNx diminue avec la concentration molaire en U. De plus, aux fortes concentrations molaires le pourcentage de cellules Mono-MNx se rapproche du pourcentage de cellules Mono-MNx du contrôle.

En conclusion, la concentration molaire en U influence la formation de cellules Mono-MNx. En effet plus la concentration molaire en U sera faible et plus la formation de cellules Mono-MNx sera importante. En outre, ces résultats montrent que les cellules Mono-MNx sont induites par l'effet chimique l'U.

Tableau 25. Tableau de synthèse des résultats obtenus sur les lymphocytes humains *in vitro*

Objectifs	<p>➤ Valider les marqueurs biologiques, permettant de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U, définis <i>in vitro</i> sur fibroblastes embryonnaires de souris et <i>in vivo</i> sur lymphocytes de rat à l'aide du test des micronoyaux.</p>			
Type cellulaire étudié	Lymphocytes humains			
Analyses réalisées	Techniques utilisées	Conditions testées et Réplica	Résultats	
<p>Génotoxicité</p>	<p>Numération des micronoyaux (MNx) avec blocage en cytotidérèse + Hybridation <i>in situ</i> de sondes pancentromériques (FISH)</p>	<p><u>Conditions testées :</u> Contrôle (non exposé) A1C1 (0,5 µM. 175 Bq/L) A2C1 (0,5 µM. 1750 Bq/L) A3C1 (0,5 µM. 17500Bq/L) A1C2 (5 µM. 175 Bq/L) A2C2 (5 µM. 1750 Bq/L) A3C2 (5 µM. 17500 Bq/L) A1C3 (50 µM. 175 Bq/L) A2C3 (50 µM. 1750 Bq/L) A3C3 (50 µM. 17500 Bq/L)</p> <p><u>Réplica :</u> 10 donneurs (500 lymphocytes binucléés en double)</p>	<p>BN-MNx Concentration (p<0,001) Activité (p<0,001) ↗ % BN-MNx avec la concentration ou l'activité en U</p>	<p>Marqueur de génotoxicité de l'U</p>
			<p>BN-MNC+ Concentration (p<0,001) Activité (p=0,8) ↗ % BN-MNC+ avec la concentration en U</p>	<p>Marqueur de chimiotoxicité de l'U</p>
			<p>BN-MNC1+ Concentration (p=0,03) Activité (p=0,5) ↗ % BN-MNC1+ avec la concentration en U</p>	<p>Marqueur de chimiotoxicité de l'U</p>
			<p>BN-MNCx+ Concentration (p<0,001) Activité (p=0,7) ↗ % BN-MNCx+ avec la concentration en U</p>	<p>Marqueur de chimiotoxicité de l'U</p>
			<p>BN-MNC- Concentration (p=0,1) Activité (p=0,001) ↗ % BN-MNC- avec l'activité en U</p>	<p>Marqueur de radiotoxicité de l'U</p>
			<p>BN-PNP Concentration (p=0,7) Activité (p<0,001) ↗ % BN-PNP avec l'activité en U</p>	<p>Marqueur de radiotoxicité de l'U</p>
			<p>Mono-MNx Concentration (p<0,001) Activité (p=0,8) ↘ % Mono-MNx avec la concentration en U</p>	<p>Marqueur de chimiotoxicité de l'U</p>

DISCUSSION

Cette étude, réalisée *in vitro* sur lymphocytes humains a comparé les effets génotoxiques de différents mélanges isotopiques de l'U. L'étude des effets génotoxiques des différents mélanges isotopiques de l'U a été réalisée en utilisant le test de numération des micronoyaux (CBMN) couplée à l'hybridation fluorescente *in situ* de sondes pancentromériques sur des lymphocytes humains *in vitro* imitant la contamination interne. Avec cette méthode, les effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'U ont pu être évalués.

La génotoxicité de l'U résulte de la combinaison de ses propriétés chimiques, en tant que métal lourd, et de ses propriétés radiologiques, en tant qu'émetteur de rayonnements ionisants (Lin *et al.*, 1993 ; Miller *et al.*, 1998 et 2003 ; Monleau *et al.*, 2006; Stearns *et al.*, 2005). Actuellement aucune analyse comparative des différents mélanges isotopiques de l'U n'a été réalisée, la proportion d'effets toxiques due soit aux propriétés radiologiques, soit aux propriétés chimiques de l'U n'a pas été évaluée mis à part dans nos précédents travaux (Partie A sur les fibroblastes embryonnaires de souris et Partie B sur les lymphocytes de rat). La comparaison des effets de l'exposition à l'UA et à l'UE a démontré que les changements dans la composition isotopique de l'U, impliquant une augmentation de l'activité spécifique, entraînent une augmentation des effets radiotoxiques et peuvent modifier spécifiquement le taux d'anomalies cytogénétiques visualisées avec le test CBMN. Cependant, lors de nos deux premières études (Partie A et B) en comparant l'UA et l'UE, nous avons fait varier en même temps la concentration molaire en U (représentant l'effet chimique) et l'activité volumique en U (représentant l'effet radiologique) ; nous avons par conséquent pu définir uniquement des marqueurs de radiotoxicité de l'U. C'est pourquoi, un nouveau plan expérimental permettant de dissocier l'effet chimique (concentration molaire) de l'effet radiologique (activité volumique) a été défini dans cette troisième étude. De plus, cette étude sur les lymphocytes humains a pour but de valider chez l'Homme les marqueurs biologiques définis précédemment (Partie A et B) chez les rongeurs avant de les valider sur des cas réels de contamination par l'U. Pour pouvoir dissocier ces deux effets (effet chimique et effet radiologique), trois concentrations molaires différentes ont été choisies avec une seule et même activité volumique fixe et inversement pour trois activités volumiques différentes une seule et même concentration molaire a été fixée. Si les deux effets (concentration molaire pour l'effet chimique et activité volumique pour l'effet radiologique) bougent en même temps, il n'est pas possible de dissocier ces deux effets.

I. Anomalies cytogénétiques spontanées

Cette étude sur les lymphocytes humains, via le test de numération des MNx (CBMN), a permis de définir une fréquence spontanée des anomalies cytogénétique étudiées sur les lymphocytes non contaminés des 10 donneurs testés. Le niveau de base chez les 10 volontaires étudiés est en moyenne de 9 micronoyaux pour 1000 cellules binucléées. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études antérieures, dont la fréquence spontanée de MNx variait entre 6 et 18 MNx pour 1000 cellules binucléées (Fenech and Morley, 1986 ; Livingston *et al.*, 1993 ; Surralles et Natarajan, 1997 ; Sari-Minodier *et al.*, 2002 et 2007). Les valeurs extrêmes observées (de 6 à 12 micronoyaux pour 1000 cellules binucléées) reflètent une très légère variabilité inter-individuelle sur la population relativement homogène choisie. Un certain nombre de facteurs sont connus pour modifier le taux de base des MNx tels l'âge, le sexe ou bien encore la consommation de tabac (Ban *et al.*, 1993 ; Fenech et Morley, 1985). C'est pour ces raisons que nous avons travaillé sur une population homogène (même tranche d'âge, même sexe, non consommateur de tabac, non exposé professionnellement aux rayonnements ionisants...) afin de limiter au maximum l'influence de la variabilité inter-individus sur les marqueurs biologiques étudiés. Tout ceci explique la très légère variabilité inter-individuelle observée.

L'hybridation *in situ* de sondes pancentromériques a permis de détecter la présence (BN-MNC+) ou non (BN-MNC-) de centromères dans les MNx, ainsi que le nombre de centromères au sein des micronoyaux centromères-positifs (BN-MNC1+ et BN-MNCx+). Le niveau de base chez les donneurs étudiés est en moyenne de 6 MNx centromères-positifs et 3 MNx centromères-négatifs pour 1000 cellules binucléées. Dans la population étudiée, la production de MNx est donc principalement attribuable à la présence de micronoyaux centromères-positifs (environ 70 % des MNx). Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études antérieures, dont environ 70 % en moyenne des MNx sont des MNx centromères-positifs dans la population « *contrôle* » (Thierens *et al.*, 2000 ; Sari-Minodier *et al.*, 2002 et 2007 ; Kryscio *et al.*, 2001. cf. [Tableau 26](#)). L'analyse du nombre de centromères dans les lymphocytes binucléés centromères-positifs permet d'apporter une information supplémentaire sur le mécanisme de formation des cellules BN-MNC+. En effet, il semblerait que les MNx centromériques soient consécutifs à diverses altérations des éléments protéiques structurant l'appareil mitotique. Des défauts de migration chromosomique consécutifs à des anomalies tantôt de l'instabilité dynamique des microtubules, c'est-à-dire de l'équilibre entre polymérisation et dépolymérisation des dimères de tubuline α et β , tantôt des kinétochores devraient induire des MNx très majoritairement monocentromériques (MNC1+) alors que des anomalies de

duplication des centrosomes devraient induire des MNx multacentromériques (MNCx+) (Iarmarcovai *et al.*, 2007). Le niveau de base chez les donneurs étudiés est en moyenne de 2 micronoyaux monocentromériques et de 4 micronoyaux multacentromériques pour 1000 cellules binucléées. Dans la population étudiée, la production de micronoyaux centromères-positifs est principalement attribuable à la présence de micronoyaux multacentromériques (environ 70% des cellules BN-MNC+ sont des cellules BN-MNCx+); c'est à dire que des anomalies de duplication des centres organisateurs sont principalement responsables de la formation des micronoyaux centromériques dans la population étudiée. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Baciuchka-Palmaro et ses collaborateurs (2002) ainsi qu'avec les travaux d'Orsière et ses collaborateurs (2006) dans lesquels environ 70 % des micronoyaux centromères-positifs sont multacentromériques dans la population contrôle (cf. Tableau 26).

Tableau 26. Tableau synthétique de diverses études bibliographiques sur le test CBMN avec marquage centromérique

Populations étudiées	Contrôle		BN-MNx (%)	MNC- (%)	MNC+ (%)	MNCx+ (%)	MNC1+ (%)	Références
Personnels hospitaliers exposés à de faibles doses de rayonnements	Contrôle	Lymphocytes humains (<i>in vivo</i>)	1,9	40	60	-	-	Thierens <i>et al.</i> , 2000
Radiographes industriels	Contrôle	Lymphocytes humains (<i>in vivo</i>)	0,7	30	70	-	-	Sari-Minodier <i>et al.</i> , 2002
Mineurs d'uranium	Contrôle	Lymphocytes humains (<i>in vivo</i>)	1,6	24	76			Kryscio <i>et al.</i> , 2001
Personnels hospitaliers exposés à de faibles doses de rayonnements	Contrôle	Lymphocytes humains (<i>in vivo</i>)	1,4	30	70	-	-	Sari-Minodier <i>et al.</i> , 2007
Étude sur l'uranium	Contrôle	Lymphocytes humains (<i>in vitro</i>)	0,9	30	70	67	33	Partie C
Patients cancéreux	Contrôle	Lymphocytes humains (<i>in vivo</i>)	1,1	22,5	77,5	76	24	Baciuchka-Palmaro <i>et al.</i> , 2002
Personnels exposés au Formaldéhyde	Contrôle	Lymphocytes humains (<i>in vivo</i>)	1,4	28	72	70	30	Orsière <i>et al.</i> , 2006

Pourcentage de cellules binucléées avec des MNx (BN-MNx), pourcentage de cellules binucléées avec des MNx centromères-négatifs (MNC-) et positifs (MNC+) ainsi que le pourcentage de cellules binucléées avec des MNx monocentromériques (MNC1+) et multacentromériques (MNCx+) pour des populations contrôles

Comme mentionné précédemment, peu d'études s'intéressent actuellement aux cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs). Cependant Thomas et ses collaborateurs (2003)

ont validé l'utilisation des cellules BN-PNPs comme biomarqueur de lésions de l'ADN ainsi que des réarrangements chromosomiques. En outre, ils ont démontré que la numération des cellules BN-PNPs dans l'analyse CBMN augmente sa sensibilité et sa polyvalence, car non seulement cette numération permet une mesure du réarrangement chromosomique (disponible avec le test « de base » CBMN) mais elle permet aussi de réaliser une distinction entre les agents aneugènes et les agents clastogènes. Le niveau de base chez les donneurs étudiés est en moyenne de 2 ponts nucléoplasmiques pour 1000 cellules binucléées. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par [Thomas et ses collaborateurs \(2003\)](#) dans leur population contrôle. Les valeurs extrêmes observées (de 1 à 3 micronoyaux pour 1000 cellules binucléées) reflètent une quasi-absence de variabilité inter-individuelle. L'absence spontanée de ponts nucléoplasmiques dans la population générale pourrait faire de ce dernier un marqueur de génotoxicité très puissant. En effet, lors d'études d'anomalies cytogénétiques induites par exemple par des rayonnements ionisants connus pour induire des chromosomes dicentriques, les PNPs pourraient être des marqueurs très intéressants.

L'étude des cellules mononucléées avec des MNx (Mono-MNx) constitue un paramètre supplémentaire intéressant dans l'analyse CBMN permettant de différencier les composés aneugènes des composés clastogènes ([Elhajouji et al., 1998](#) ; [Rosefort et al., 2004](#)). Le niveau de base chez les donneurs étudiés est en moyenne de 22 micronoyaux pour 1000 cellules mononucléées.

II. Anomalies cytogénétiques dans les témoins positifs (aneugènes et clastogènes)

L'étude avec les témoins positifs génotoxiques (la Vincristine Sulfate et la Mitomycine C) révèlent la capacité du test des micronoyaux à détecter la présence de lésions génotoxiques dans les lymphocytes humains en culture. En effet, les résultats obtenus avec les deux témoins positifs génotoxiques confirment bien leurs effets aneugènes et clastogènes. Tout d'abord, les résultats de cette étude confirment l'augmentation de micronoyaux après exposition à un agent aneugène, la Vincristine Sulfate, ainsi qu'après exposition à un agent clastogène, la Mitomycine C. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études comparant les effets génotoxiques de composés aneugènes et clastogènes ([Elhajouji et al., 1998](#) ; [Rosefort et al., 2004](#)). L'effet aneugène de la Vincristine Sulfate est confirmé par l'augmentation de cellules BN-MNC+ et de cellules Mono-MNx. En revanche, l'effet clastogène de la Mitomycine C est confirmé par l'augmentation de cellules BN-MNC- et de cellules BN-PNPs. De plus, l'effet clastogène de la Mitomycine C est confirmé par l'augmentation de micronoyaux uniquement dans les cellules binucléées.

III. Anomalies cytogénétiques après exposition à différents mélanges isotopiques de l'uranium

III.1 Cellules binucléées avec des MNx

Cette étude a montré que l'exposition aux différents mélanges isotopiques de l'U induit la formation de cellules binucléées avec des micronoyaux (BN-MNx). Ces résultats confirment des travaux antérieurs démontrant une augmentation des MNx dans des lymphocytes humains, dans des cellules d'ovaires de hamsters chinois (CHO) ainsi que dans des cellules d'ostéoblastes humaines (HOS) après exposition à l'U (Lin *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 2003; Ibrulj *et al.*, 2004; Krunic *et al.*, 2005). La production de cellules BN-MNx est influencée à la fois par la concentration molaire en U et par l'activité volumique en U. Plus la concentration molaire en U ou plus l'activité volumique en U augmente et plus la fréquence de cellules BN-MNx est importante. Par conséquent les cellules BN-MNx ne permettent pas de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U. Une induction de cellules BN-MNx est observée indépendamment du mélange isotopique testé. Seule l'augmentation de la concentration molaire ou de l'activité volumique du mélange isotopique modulera le taux de MNx.

Comme mentionné précédemment, la fréquence spontanée moyenne de cellules BN-MNx est de 0,9 %. Cette fréquence pour les contrôles positifs est très nettement augmentée ; en effet elle est de 3 % et 5 % pour la Mitomycine C et la Vincristine Sulfate, respectivement. La fréquence moyenne observée après contamination par l'U dans notre étude est de l'ordre de 4 %. Cette fréquence se rapproche de celles des contrôles positifs génotoxiques et est significativement supérieure à la fréquence moyenne spontanée. Par conséquent, la fréquence de cellules BN-MNx est un marqueur des effets génotoxiques induit par l'U.

Les résultats observés confirment nos précédents travaux sur les fibroblastes embryonnaires de souris (étude *in vitro*, Partie A) ainsi que sur les lymphocytes de rat (étude *in vivo*, Partie B). En effet, aucune différence significative dans la fréquence de MNx dans les cellules binucléées entre l'UA et l'UE n'est observée. Seule une augmentation en fonction de la concentration molaire en U avait été notée. Avec cette étude, nous pouvons conclure que l'induction de cellules BN-MNx n'est pas impactée uniquement par l'effet chimiotoxique ou uniquement par l'effet radiotoxique de l'U mais bien par l'effet des deux (chimique + radiologique). Par conséquent, les cellules BN-MNx permettent d'étudier de manière globale la génotoxicité d'un mélange isotopique de l'U mais ne permettent pas de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U.

III.2 Contenu centromérique des micronoyaux

L'hybridation fluorescente *in situ* avec des sondes pancentromériques a par la suite été réalisée dans le but de différencier les effets chimiotoxiques de effets radiotoxiques de l'U. En effet, le contenu des micronoyaux, évalué par des sondes d'ADN centromériques, reflète leur origine (Kirsch-Volders *et al.*, 1997 ; Norppa et Falck, 2003). Les micronoyaux avec marquage centromérique (MN centromère-positif : BN-MNC+) sont induits par des agents aneugènes et sont considérés comme contenant des chromosomes entiers. En revanche, les micronoyaux sans marquage centromérique (MN centromère-négatif : BN-MNC-) sont induits par des agents clastogènes et représentent des fragments de chromosomes acentriques.

Notre étude a démontré que la production de cellules BN-MNC+ est modulée par la concentration molaire en U ; l'induction de cellules BN-MNC+ augmente avec la concentration molaire en U. La fréquence spontanée moyenne de cellules BN-MNC+ est de 0,6 %. Cette fréquence pour le contrôle positif aneugène est très nettement supérieure, elle est de 3,5 % ; en revanche après exposition au contrôle positif clastogène la fréquence de cellules BN-MNC+ est identique à la fréquence spontanée. La fréquence moyenne observée après contamination aux différentes concentrations molaires d'U est de l'ordre de 2 % ; en effet elle est de 1,4 % pour la plus faible concentration (C1) et augmente à 2,2 % pour la plus forte concentration (C3). Cette fréquence moyenne après contamination par l'U se rapproche de celle du contrôle positif aneugène et est significativement supérieure à la fréquence moyenne spontanée. Par conséquent, la fréquence de cellules BN-MNC+ semble plutôt être un marqueur des effets aneugènes (dans notre cas des effets chimiotoxiques) induit par l'U.

Les résultats observés dans cette étude permettent de confirmer les précédents résultats obtenus après contamination des fibroblastes embryonnaires de souris par l'UA ou par l'UE (Partie A). En effet, les cellules BN-MNC+ étaient préférentiellement induites par l'UA (80 % des cellules BN-1MN étaient des MNC+). Avec cette première étude nous avons conclu que l'augmentation des cellules BN-MNC+ semblait être principalement liée à l'effet chimique de l'U en tant que métal. En effet, en comparant les concentrations en U avec le type d'U (UA et UE), il n'était pas possible de dissocier les effets chimiotoxiques et radiologiques. Dans notre étude, pour des concentrations inférieures à 0,5 μM , l'U induit en moyenne 70 % de cellules BN-MNC+ ; pour des concentrations supérieures à 0,5 μM , l'U n'en induit que 40 %. Avec la présente étude, nous pouvons désormais affirmer que l'augmentation des cellules BN-MNC+ est liée à l'effet chimique de l'U en tant que métal. La fréquence de cellules BN-MNC+ semble par conséquent être plutôt un marqueur des effets chimiotoxiques de l'U.

En parallèle, notre étude a démontré que la production de micronoyaux monocentromériques (BN-MNC1+) et de micronoyaux multicentromériques (BN-MNCx+) est modulée par la concentration molaire en U. Après exposition aux différents mélanges isotopiques de l'U, la production de micronoyaux centromères-positifs est principalement attribuable à la présence de micronoyaux monocentromériques (plus de 50 % des cellules BN-MNC+ sont des cellules BN-MNC1+ pour chacune des conditions testées. cf. [Tableau 27](#)) ; des défauts de migrations chromosomiques consécutifs à des anomalies de l'instabilité dynamique des microtubules ([Iarmarcovai et al., 2007](#)), c'est-à-dire de l'équilibre entre polymérisation et dépolymérisation des dimères de tubuline α et β ou à des kinétochores seraient principalement à l'origine de la formation des micronoyaux centromériques après exposition à l'U. La production spontanée de micronoyaux centromères-positifs est principalement attribuable à la présence de micronoyaux multicentromériques (plus de 60 % des cellules BN-MNC+ sont des cellules BN-MNCx+). Par conséquent, les défauts de migrations chromosomiques induits par l'U sont différents de ceux induits spontanément. En conclusion, compter le nombre de signaux centromériques des MNx permet d'apporter une information supplémentaire sur le mécanisme de formation des MNx centromériques. Actuellement, peu d'études ont étudié le nombre de signaux fluorescents dans les micronoyaux, il est donc difficile de comparer nos données avec celles de la littérature, qui concernent principalement des études de biosurveillance donc des études sur des lymphocytes de personnes exposées.

La production de cellules BN-MNC- est quand à elle modulée par l'activité volumique en U ; l'induction de cellules BN-MNC- augmente avec l'activité volumique en U. La fréquence de cellules BN-MNC- est de 0,84 % pour la plus faible activité (A1), elle passe à 2,1 % pour l'activité médiane (A2) pour atteindre 2,7 % pour la plus forte activité (A3). La fréquence spontanée moyenne de cellules BN-MNC- dans notre étude est de 0,3 %. Cette fréquence pour les contrôles positifs est très nettement supérieure ; en effet elle est de 2,5 % et 1,5 % pour la Mitomycine C et la Vincristine Sulfate, respectivement. La fréquence après exposition à l'U se rapproche de celle du contrôle positif clastogène et est significativement supérieure à la fréquence spontanée moyenne. De plus, la Mitomycine C (composé clastogène) induit 80 % de cellules BN-MNC- alors que la Vincristine Sulfate (composé aneugène) n'en induit que 30 %. Dans notre étude, pour des activités supérieures à 1 750 Bq/L, l'U induit en moyenne 60 % de cellules BN-MNC-. Par contre, pour des activités inférieures à 1 750 Bq/L ce taux se limite à 30 %. Le taux de BN-MNC- est donc corrélé aux effets radiologiques de l'U.

Les résultats de cette partie de nos travaux nous permettent de confirmer les précédents résultats obtenus après contamination des fibroblastes embryonnaires de souris à l'UA ou à l'UE (Partie A). En effet, les cellules BN-MNC- étaient préférentiellement induites par l'UE (67 % des cellules BN-1MN étaient des MNC-). Suite à ces travaux initiaux, nous avons conclu que l'augmentation des cellules BN-MNC- était peut être en partie due aux effets radiologiques de l'U en tant qu'émetteur de rayonnements α . Cette conclusion était confirmée par la corrélation significative entre les cellules BN-1MNC- et les doses de rayonnements ionisants reçues par les cellules. Avec ces derniers résultats, nous pouvons désormais affirmer que l'augmentation des cellules BN-MNC- est bien corrélée à l'effet radiologique de l'U en tant qu'émetteur de rayonnements α .

Tableau 27. Synthèse du marquage centromérique sur les lymphocytes humains contaminés avec différents mélanges isotopiques de l'U

		BN-MNx (%)	MNC- (%)	MNC+ (%)	MNCx+ (%)	MNC1+ (%)
Uranium	Contrôle	0,9	33	67	66	34
	C1 A1 (0,5 μ M/175 Bq/L)	2,3	36	64	32	68
	C1 A2 (0,5 μ M/1750 Bq/L)	3,2	58	42	34	66
	C1 A3 (0,5 μ M/17500 Bq/L)	4	66	34	30	70
	C2 A1 (5 μ M/175 Bq/L)	2,7	30	70	41	59
	C2 A2 (5 μ M/1750 Bq/L)	4,2	52	48	48	52
	C2 A3 (5 μ M/17500 Bq/L)	4,7	56	44	45	55
	C3 A1 (50 μ M/175 Bq/L)	3,2	28	72	39	61
	C3 A2 (50 μ M/1750 Bq/L)	4,5	53	47	47	53
	C3 A3 (50 μ M/17500 Bq/L)	5,2	57	43	44	56
	Mitomycine C	3	83	17	40	60
	Vincristine Sulfate	5	30	70	67	33

C1 - C2 et C3 : concentration molaire en U (0,5 - 5 et 50 μ M)
 A1 - A2 et A3 : Activité volumique en U (175 - 1750 et 17500 Bq/L)
 BN-MNx : % de cellules binucléées avec des MNx
 MNC- : % de cellules binucléées avec des MN centromères-négatifs
 MNC+ : % de cellules binucléées avec des MN centromères-positifs
 MNCx+ : micronoyaux multacentromériques
 MNC1+ : micronoyaux monocentromériques
 Mitomycine C : contrôle positif clastogène
 Vincristine Sulfate : contrôle positif aneugène

En conclusion, les cellules binucléées après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U sont composées à la fois de cellules BN-MNC+ et de cellules BN-MNC- (confirmation de la Partie A sur les fibroblastes de souris). La numération seule des cellules BN-MNx permet d'observer la génotoxicité globale de l'U mais ne permet pas de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U. Cependant, l'hybridation *in situ* de sondes pancentromériques permet de différencier les effets chimiotoxiques et radiotoxiques d'un mélange isotopique de l'U. En effet, des taux élevés de cellules BN-MNC+ révèlent des effets chimiotoxiques d'un mélange isotopique de l'U, alors que des taux élevés de cellules BN-MNC- sont la conséquence d'effets radiotoxiques de l'U. De plus, après exposition aux

différents mélanges isotopiques de l'U, les lymphocytes présentaient une augmentation significative de la fréquence des micronoyaux monocentromériques (MNC1+) par rapport au contrôle, tandis que la fréquence de micronoyaux multicentromériques (MNCx+) demeurait inchangée. L'analyse séparée des MNx centromériques permet d'accroître les connaissances sur les mécanismes à l'origine des MNx centromériques (donc de l'aneugénèse). Cependant l'objectif principal de l'étude étant de définir des marqueurs permettant de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques, les taux relativement peu importants de micronoyaux mono- et multicentromériques freinent leur utilisation en tant biomarqueurs.

L'objectif de ces travaux étaient d'identifier des marqueurs biologiques permettant de discriminer les effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'U, qui pourraient être utilisés afin d'améliorer le suivi de personnes victimes d'une contamination interne. Les cellules BN-MNC- reflétant le niveau des effets radiotoxiques de l'U et les cellules BN-MNC+ reflétant le niveau des effets chimiotoxiques de l'U, il serait intéressant de définir un calcul à partir de ces 2 types de dommages permettant d'évaluer les effets induits par l'U : stress plutôt chimique ou stress plutôt radiologique. Pour cela, nous avons défini le rapport MNC-/MNC+ (cf. [Tableau 28](#)).

Tableau 28. Synthèse du marquage centromérique sur les fibroblastes de souris et sur les lymphocytes humains contaminés avec différents mélanges isotopiques de l'U

				BN-MNC- (%)	BN-MNC+ (%)	Ratio MNC- /MNC+	
UA	5 µM	Faibles activités spécifiques	Fibroblastes de souris (<i>in vitro</i>)	0,3	1,2	0,3	
	50 µM			0,3	1,5	0,2	
	500 µM			1	2,8	0,3	
UE	5 µM	Plus fortes activités spécifiques		1	0,5	2	
	50 µM			1,5	0,7	2,1	
	500 µM			2,5	1,5	1,7	
	Mitomycine C	Clastogène			2,6	0,8	3,3
	Vincristine Sulfate	aneugène			1,4	3,4	0,4
U	C1 A1 (0,5 µM/175 Bq/L)	Faibles activités spécifiques		Lymphocytes humains (<i>in vitro</i>)	0,8	1,5	0,5
	C2 A1 (5 µM/175 Bq/L)		0,8		2	0,4	
	C3 A1 (50 µM/175 Bq/L)		0,9		2,3	0,4	
	C1 A2 (0,5 µM/1750 Bq/L)	Plus fortes activités spécifiques	1,9		1,3	1,5	
	C2 A2 (5 µM/1750 Bq/L)		2,2		2	1,1	
	C3 A2 (50 µM/1750 Bq/L)		2,4		2,1	1,1	
	C1 A3 (0,5 µM/17500 Bq/L)	2,6	1,4		1,9		
	C2 A3 (5 µM/17500 Bq/L)	2,7	2,1		1,3		
	C3 A3 (50 µM/17500 Bq/L)	3	2,2		1,4		
		Mitomycine C	Clastogène			2,5	0,5
	Vincristine Sulfate	Aneugène		1,6	3,5	0,5	

UA : Uranium Appauvri, UE : Uranium Enrichi

C1 - C2 et C3 : concentration molaire en U (0,5 - 5 et 50 µM),

A1 - A2 et A3 : Activité volumique en U (175 - 1750 et 17500 Bq/L)

BN-MNC- : % de lymphocytes binucléés avec des MNx centromères-négatifs

BN-MNC+ : % de lymphocytes binucléés avec des MNx centromères-positifs

Mitomycine C : contrôle positif clastogène, Vincristine Sulfate : contrôle positif aneugène

En déterminant ce rapport, il est possible de définir un composé uranifère avec un faible stress radiologique ainsi qu'un composé avec un fort stress radiologique. En effet, dans nos études les mélanges uranifères avec une faible activité spécifique (stress chimique dominant) ont un rapport moyen MNC-/MNC+ proche de 0,4. En revanche, les mélanges uranifères avec une forte activité spécifique (stress radiologique dominant) ont un rapport moyen MNC-/MNC+ supérieur à 1. Un ratio compris entre 0,3 et 0,5 pourrait indiquer que la contamination a été réalisée avec un composé uranifère avec un fort potentiel chimiotoxique. Alors qu'à l'opposé un rapport compris entre 1,1 et 5 pourrait indiquer que la contamination a été réalisée avec un composé uranifère avec un fort potentiel radiologique. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires pour mieux définir ces seuils.

III.3 Autres anomalies cytogénétiques observées avec le test CBMN

Avec le test de numération des MNx, d'autres anomalies cytogénétiques ont pu être observées et étudiées : les cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) et les cellules mononucléées avec des MNx (Mono-MNx). Dans la suite de l'étude, nous nous sommes donc intéressés à ces deux types d'anomalies cytogénétiques.

III.3.1 Cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs)

Comme mentionné à plusieurs reprises au cours de ce travail, l'étude des ponts nucléoplasmiques (PNPs) n'est encore que peu utilisée dans le cadre du test de numération des MNx. Les PNPs proviennent de chromosomes dicentriques ; en effet ils se produisent lorsque les centromères de chromosomes dicentriques sont tirés aux pôles opposés de la cellule lors de l'anaphase. Sachant que les chromosomes dicentriques sont des indicateurs couramment utilisés en dosimétrie biologique, nous nous sommes intéressés logiquement à l'étude des PNPs. En effet, la fréquence spontanée de cellules BN-PNPs (0,2 % en moyenne) observée dans la population générale étant très faible (Thomas *et al.*, 2003 ; cf. données obtenues pour la population contrôle). Les PNPs pourraient devenir un marqueur de radiotoxicité après exposition à des rayonnements (sachant que les chromosomes dicentriques sont principalement radio-induits). La production de cellules BN-PNPs après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U est modulée par l'activité volumique en U. La fréquence moyenne de ponts nucléoplasmiques après exposition à l'U dans notre étude est de 2,5 %. De plus, l'induction de cellules BN-PNPs augmente significativement avec l'activité volumique en U ; à la plus faible activité testée (A1) le pourcentage de cellules BN-PNPs est en moyenne de 1 % pour atteindre une moyenne de 4 % à la plus forte activité testée (A3). L'importante

différence avec la fréquence spontanée devrait faire des ponts nucléoplasmiques un biomarqueur puissant des effets génotoxiques de l'U. Les résultats observés confirment des travaux antérieurs qui avaient montré une augmentation des chromosomes dicentriques après exposition à l'U ainsi qu'après exposition à des rayonnements α (Miller *et al.*, 2002b ; Greinert *et al.*, 1999 ; Plan *et al.*, 2005 ; Stephan *et al.*, 2005). Cette dernière partie de l'étude confirme nos précédents résultats obtenus après contamination par l'UA ou par l'UE. En effet, les fibroblastes de souris ou lymphocytes de rat BN-PNPs étaient préférentiellement induits par l'UE. Par conséquent les cellules BN-PNPs pourraient être un facteur supplémentaire permettant de discriminer les effets induits par l'UA de ceux induits par l'UE indépendamment des concentrations testées. De plus, il existe une corrélation significative entre les cellules BN-PNPs et les doses de rayonnements ionisants reçues par les cellules. La présence de cellules BN-PNPs semble par conséquent refléter les effets clastogènes de l'U qui augmentent avec l'enrichissement en ^{235}U . Avec la présente étude, nous pouvons désormais affirmer que l'augmentation des cellules BN-PNPs est liée à l'effet radiologique de l'U en tant qu'émetteur de rayonnements α . Thomas et ses collaborateurs (2003) ont suggéré que le ratio PNP/MN pourrait être un marqueur essentiel pour évaluer les effets toxiques des composés testés. Une synthèse des études concernant la numération des ponts nucléoplasmiques et des micronoyaux est incluse dans le [Tableau 29](#). Le ratio PNP/MN après exposition à des rayons γ est proche de 0,8 (Thomas *et al.*, 2003) définissant par conséquent les rayonnements γ comme un agent principalement clastogène. Alors qu'après exposition à de l' H_2O_2 ou à de la Xanthine Oxydase le ratio PNP/MN est proche de 0 (Umegaki *et al.*, 2000), définissant ainsi ces deux composés comme des agents principalement aneugènes. Dans nos études précédentes (Partie A et Partie B), l'UA était identifié comme un agent principalement aneugène (un ratio proche de 0,2) alors que l'UE était identifié comme un agent principalement clastogène (un ratio proche de 0,6 pour la Partie A et de 1,7 pour la Partie B). Dans la présente étude, le ratio moyen PNP/MN aux faibles activités volumiques (≤ 175 Bq/L) est proche de 0,3 dénotant principalement un effet aneugène de l'U. En revanche, pour les deux autres activités volumiques (1750 Bq/L et 17500 Bq/L) le ratio moyen PNP/MN est proche de 0,8, dénotant principalement un effet clastogène de l'U. De plus, le ratio pour la Vincristine Sulfate est de 0 (= 0,05) alors qu'il est de 1 pour la Mitomycine C. En conclusion, les cellules BN-PNPs sont principalement dues aux effets radiologiques de l'U.

Tableau 29. Synthèse bibliographique de données sur la numération de ponts nucléoplasmiques (PNP)

Composés testés	Conditions	Types cellulaires	% MNx	% PNP	Ratio PNP/MN	Aneugène ou clastogène ?	Références
Rayons γ	1 Gy	Lymphocytes humains (<i>in vitro</i>)	5,5	4,7	0,85	Clastogène	Thomas <i>et al.</i> , 2003
	2 Gy		13,17	12,7	0,96		
	4 Gy		68	33,13	0,48		
	Moyenne				0,77		
H_2O_2	3 μM	WIL2-NS (<i>in vitro</i>)	0,86	0,03	0,04	Aneugène	Umegaki <i>et al.</i> , 2000
	10 μM		2,63	0,09	0,03		
	20 μM		8,21	0,57	0,07		
	30 μM		19,64	0,79	0,04		
	Moyenne				0,04		
xanthine oxydase (XO)	0,3 μM	WIL2-NS (<i>in vitro</i>)	0,91	0,03	0,03	Aneugène	Umegaki <i>et al.</i> , 2000
	1 μM		2,23	0,32	0,1		
	3 μM		13,51	0,56	0,04		
	12,5 μM		33,98	0,82	0,02		
	Moyenne				0,06		
UA	5 μM	Fibroblastes embryonnaires de souris C3H10T1/2 (<i>in vitro</i>)	1,5	0,3	0,2	Aneugène	Darolles <i>et al.</i> , 2009 (Partie A)
	50 μM		1,8	0,3	0,2		
	500 μM		3,8	0,9	0,2		
	Moyenne				0,2		
UE	5 μM	Fibroblastes embryonnaires de souris C3H10T1/2 (<i>in vitro</i>)	1,5	0,9	0,6	Aneugène	Darolles <i>et al.</i> , 2009 (Partie A)
	50 μM		2,2	1,4	0,6		
	500 μM		3,8	1,9	0,5		
UA	1,5 mg/Kg	Lymphocytes de rat (<i>in vivo</i>)	17,2	2,2	0,1	Clastogène	Partie B
	1,5 mg/Kg		14,1	24,1	1,7		
Uranium	C1 A1	Lymphocytes humains (<i>in vitro</i>)	2,3	0,8	0,3	Aneugène	Partie C
	C1 A2		3,2	2,6	0,8		
	C1 A3		4	3,4	0,9		
	C2 A1		2,7	1	0,4		
	C2 A2		4,2	2,8	0,7		
	C2 A3		4,7	4	0,9		
	C3 A1		3,2	1,1	0,3		
	C3 A2		4,5	3	0,7		
	C3 A3		5,2	4,4	0,8		
	Mitomycine C		3	2,85	1		
Vincristine Sulfate	5	0,25	0,05				

III.3.2 Cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx)

De récentes études ont démontré que les composés aneugènes, et non les composés clastogènes, induisent des micronoyaux dans les cellules mononucléées (Elhajouji *et al.*, 1998 ; Rosefort *et al.*, 2004). En accord avec ces études, nos résultats ont montré que la Mitomycine C (agent clastogène) n'a pas augmenté les fréquences de MNx dans les cellules mononucléées, alors que la Vincristine Sulfate (agent aneugène) a induit une augmentation des MNx dans les cellules mononucléées. La production de cellules Mono-MNx après exposition à différents mélanges isotopiques de l'U est principalement modulée par la concentration molaire en U. Contrairement à d'autres paramètres cytogénétiques étudiés, le pourcentage de cellules Mono-MNx diminue avec l'augmentation de la concentration en U ainsi qu'avec l'augmentation des doses de rayonnements ionisants reçues et donc avec une augmentation des effets clastogènes. Ces résultats permettent de confirmer nos travaux précédents réalisés sur fibroblastes embryonnaires de souris (Partie A) et lymphocytes de rat (Partie B). En effet, la fréquence de cellules Mono-MNx diminue voire disparaît (fréquence identique au contrôle non contaminé) quand il y'a un effet radiotoxique important. Avec cette étude sur les lymphocytes humains, en dépit de la méconnaissance des mécanismes mis en œuvre, nous pouvons désormais proposer que l'induction des cellules Mono-MNx est corrélée à l'effet chimiotoxique de l'U en tant que métal lourd.

L'analyse concomitante des PNPs et des cellules mononucléées avec des MNx doit permettre de discriminer l'effet chimiotoxique de l'effet radiotoxique d'un mélange isotopique donné de l'U.

Conclusion et perspectives de cette étude

Cette étude de contamination *in vitro* de lymphocytes humains avec différents mélanges isotopiques de l'U a permis de confirmer que le profil génotoxique de l'U est lié à sa composition isotopique et donc à son activité spécifique. Avec la numération des MNx dans les cellules binucléées, un effet génotoxique de l'U est observé. L'augmentation de MNx dans les cellules binucléées est caractéristique d'une contamination par l'U quel que soit le mélange isotopique considéré. En revanche, l'étude seule des MNx ne permet pas de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U. La numération du contenu des micronoyaux à l'aide de l'hybridation *in situ* de sondes pancentromériques (micronoyaux centromériques (BN-MNC+) et acentromériques (BN-MNC-)), des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) ainsi que des cellules mononucléées avec des MNx (Mono-MNx) permet de faire cette discrimination. En effet, la détermination de la fréquence des cellules BN-1MNC- et de la fréquence des cellules BN-PNPs est nécessaire pour refléter les effets radiotoxiques d'un mélange

isotopique donné de l'U. Alors que la détermination de la fréquence des cellules BN-1MNC+ et de la fréquence des cellules Mono-MNx est nécessaire pour refléter les effets chimiotoxiques d'un mélange isotopique d'U.

L'association de ces différents biomarqueurs de génotoxicité devrait permettre de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U. Ces marqueurs biologiques pourraient compléter les marqueurs classiques de dosimétrie pour évaluer les conséquences de la contamination interne à l'U.

Ces résultats prometteurs sont cependant préliminaires et doivent être validés. Pour cela, un screening sur une population contrôle assez variée (âge, sexe, mode de vie ...) devrait permettre d'évaluer les variations inter-individuelles sur une population homogène. Par la suite, une étude sur des prélèvements sanguins sur des personnes contaminées accidentellement par l'U pourra être réalisée pour évaluer les quatre biomarqueurs. Les effets observés *in vitro* ne sont pas retranscrits à l'identique *in vivo*. Il existe, entre autres, deux différences fondamentales qui sont les niveaux et les durées d'exposition. Finalement, d'autres agents génotoxiques issus de mélanges complexes et présents dans l'environnement professionnel pourraient participer aux variations de fréquences de lymphocytes micronucléés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES



I. Synthèse des effets génotoxiques induits par l'uranium

La toxicité de l'U a été étudiée *in vitro* et *in vivo* sur de nombreux modèles cellulaires après différents mode de contamination (inhalation, ingestion ou passage percutané). Cette toxicité résulte de la combinaison de ses propriétés chimiques, en tant que métal lourd, et de ses propriétés radiologiques en tant qu'émetteur de rayonnements ionisants (α) (Priest, 2001). Les effets biologiques de ce radionucléide ont été démontrés dans divers organes comme les os, les reins, le foie, le cerveau, les poumons, les intestins et le système reproducteur (Ballou *et al.*, 1986 ; Dublineau *et al.*, 2007 ; Grignard *et al.*, 2008 ; Houpert *et al.*, 2005 ; Kathren et Moore, 1986 ; Kurttio *et al.*, 2002 et 2005; Leggett, 1989 ; Lestaevel *et al.*, 2005 et 2009 ; McClain *et al.*, 2001 ; Souidi *et al.*, 2005). Au niveau moléculaire, l'U est connu pour induire des lésions de l'ADN *in vitro* dans une lignée de cellules ovariennes de hamster chinois et une lignée mutée (CHO et CHO EM9 ; Lin *et al.*, 1993, Stearns *et al.*, 2005), dans des cellules d'ostéoblastes humains (Miller *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2002c), dans des cellules proximales rénales de rat (NRK-52^E) (Thiebault *et al.*, 2007) et *in vivo* dans des cellules du poumon chez le rat après inhalation d'UA (Monleau *et al.*, 2006). Les effets génotoxiques incluent la formation de micronoyaux, d'adduits de l'ADN, d'échange de chromatides sœurs, d'aberrations chromosomiques, ainsi que des cassures double brin. Cependant à partir de toutes ces études, il est impossible de déterminer si les effets biologiques observés sont dus à la toxicité chimique (métal lourd) et/ou à la toxicité radiologique de l'U (émetteur de rayonnements α). L'objectif principal de notre étude était d'identifier des marqueurs biologiques permettant de discriminer les effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'U dans le but d'être utilisés en santé humaine afin d'améliorer le suivi de personnes qui ont subi une contamination interne par l'U. Pour répondre à cet objectif, nous avons comparé les effets génotoxiques de différents mélanges isotopiques de l'U plutôt à caractère chimique dominant (avec une faible activité spécifique) ou bien plutôt à caractère radiologique dominant (avec une forte activité spécifique). Jusqu'à présent aucune étude n'a réalisé d'analyse comparative des différents mélanges isotopiques de l'U.

I.1 Effets génotoxiques induits par l'uranium observés au cours de ces travaux

L'exposition à l'U (dans nos conditions expérimentales) s'est avérée non cytotoxique pour toutes les concentrations testées. Concernant la génotoxicité de l'U, nos résultats montrent cependant que l'U est capable d'induire *in vitro* différentes altérations du matériel génétique telles que des lésions primaires (cassures simple brin, double brin, bases modifiées...) mais aussi des mutations chromosomiques

(micronoyaux centromériques et acentromériques, ponts nucléoplasmiques) de l'ADN. Les différentes études réalisées convergent toutes vers la même conclusion générale à savoir que le profil génotoxique de l'U est lié à sa composition isotopique. En effet, des composés uranifères avec une forte activité spécifique et une faible activité spécifique induisent des dommages qui diffèrent qualitativement et quantitativement (cf. Figure 126).

L'U induit des dommages liés à sa qualité de métal et/ou à sa qualité de rayonnements ionisants (α). L'U, quel que soit le mélange isotopique, induit la production d'EROs. Cette augmentation de production d'EROs serait directement liée à la génération de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton et pourrait induire des dommages de l'ADN tels que des lésions simple brin ou des bases modifiées. En effet, le test des comètes a démontré que l'U, quel que soit le mélange isotopique, induit des dommages de l'ADN notamment des cassures simple brin. De plus, les cellules exposées à l'U semblent utiliser le mécanisme de réparation des dommages par excision de base (BER) pour réparer les dommages de l'ADN ; signe qu'il y'a eu entre autres des bases modifiées. L'ensemble de ces dommages semblent être induits par l'effet chimique de l'U (en tant que métal).

Par ailleurs, les rayonnements ionisants tels que ceux émis par l'U sont connus pour induire des anomalies au niveau de l'ADN, de manière directe ou indirecte. Le marquage de l'histone γ -H2AX a démontré que l'augmentation de l'effet radiologique de l'U induit une augmentation des cassures double brin de l'ADN. Les cassures double brin sont par conséquent spécifiques de l'effet radiologique de l'U. Ces résultats sont confirmés par la mise en œuvre des mécanismes de réparation par recombinaison homologe (HR) et par raboutage (V(D)J) après exposition à l'U. Par ailleurs, avec l'augmentation de l'effet radiologique de l'U, une nette augmentation de la production d'EROs est observée. Les radicaux libres formés en plus grand nombre après exposition à des mélanges uranifères avec une forte activité spécifique pourraient être formés lors de la radiolyse de l'eau ou induits par les effets de voisinage.

En résumé, l'U pourrait induire la production d'EROs lors de la réaction de Fenton et ces radicaux seraient responsables de la formation de lésions simple brin et de bases modifiées pour de faibles activités spécifiques. Tous ces dommages seraient la conséquence de l'effet chimiotoxique de l'U en tant que métal lourd. En revanche pour de fortes activités spécifiques, l'U induiraient principalement des cassures double et simple brin ainsi que des EROs mais ces dommages seraient la conséquence de l'effet radiotoxique de l'U en tant qu'émetteur de rayonnements ionisants (α).

Nos travaux ont démontré que la contamination par l'U induit diverses lésions primaires de l'ADN (cassure simple brin, cassure double brin, bases modifiées). Ces dernières peuvent être réparées de façon

fidèle et dans ce cas, la cellule poursuit son cycle de division normalement. Cependant, parfois la réparation peut être absente ou incomplète (réparation fautive), dans ce cas l'apparition de mutations ou de dommages chromosomiques tels que les micronoyaux, reflets d'une instabilité génomique peuvent être observés. Si la nature et le nombre de lésions deviennent critiques pour la survie de la cellule, cette dernière peut mourir par nécrose ou apoptose.

L'étude de numération des MNx réalisée sur les trois modèles cellulaires (fibroblastes de souris, lymphocytes de rats et lymphocytes humains) a montré que les cellules binucléées avec des MNx pourraient être un marqueur global de la génotoxicité de l'U. La fréquence de cellules binucléées avec des micronoyaux centromères-négatifs (BN-1MNC-) et la fréquence de cellules binucléées avec des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) semblent être de bons marqueurs de l'effet radiotoxique de l'U. A contrario, la fréquence de cellules binucléées avec des micronoyaux centromères-positifs (BN-1MNC+) et la fréquence des cellules mononucléées avec des micronoyaux (Mono-MNx) semblent être de bons marqueurs de l'effet chimiotoxique de l'U. L'ensemble des anomalies cytogénétiques (BN-MNC+, Mono-MN, BN-MNC- et BN-PNPs) observées avec le test CBMN doit donc être quantifié pour évaluer distinctement les effets chimiotoxiques et radiotoxiques d'un mélange isotopique donné de l'U (cf. [Figure 126](#)) et l'utilisation de ces paramètres développe d'autant la puissance de détection du test CBMN.

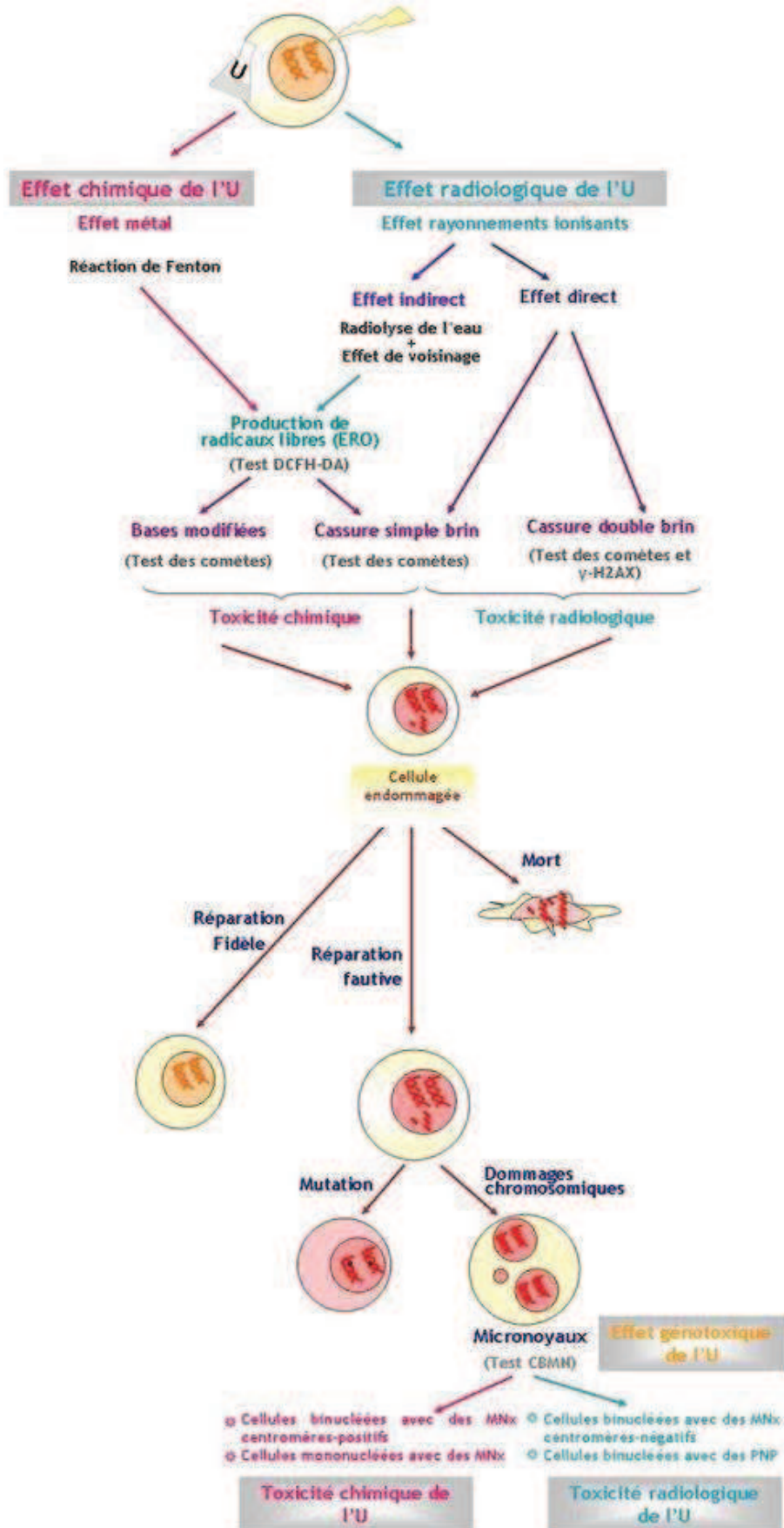


Figure 126. Schéma synthétisant les dommages induits par l'U visualisés lors de nos études

1.2 Perspectives d'études pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors d'une contamination à l'uranium

Des études complémentaires sur les dommages génotoxiques induits par l'U sont nécessaires pour mieux comprendre et interpréter les mécanismes mis en jeu lors d'une contamination par l'U. En effet, l'induction de différents types de lésions de l'ADN permet de supposer que plusieurs mécanismes sont impliqués dans ces dommages.

L'oxydation de certaines bases azotées de l'ADN peut être une conséquence d'un stress oxydant au niveau cellulaire. Or, en introduisant une étape enzymatique supplémentaire dans le test des comètes, il est possible de révéler la présence de certaines bases modifiées (comme 8-oxo-dG). Il serait par conséquent intéressant de profiter de cette opportunité pour tenter d'établir un lien direct entre stress oxydant et génotoxicité. En effet, nos études ont démontré que les cellules exposées à l'U utilisaient la BER pour réparer les dommages. Pour cela, une version modifiée de l'essai des comètes (ajout d'une étape d'incubation en présence d'une glycosylase ou d'une endonucléase) pourraient par exemple être réalisées. L'action des enzymes telles que la formamidopyrimidine [fapy]-DNA glycosylase (Fpg), hOGG1 et l'endonucléase III (EndoIII) conduit alors à la conversion des sites porteurs d'une base oxydée en cassures, ces cassures surnuméraires sont alors détectées par le test des comètes. De plus, l'utilisation du test des comètes en condition neutre pourrait permettre de quantifier spécifiquement les cassures double brin de l'ADN et pourrait confirmer les premiers résultats obtenus avec le marquage par immunofluorescence de l'histone γ -H2AX.

Par ailleurs, le marquage et la numération centromérique augmente la sensibilité du test CBMN. L'analyse séparée des MNx centromériques permet également de préciser la nature des mécanismes à l'origine des MNx centromériques (donc de l'aneugénèse) qui sont principalement induits par l'effet chimique de l'U. Cependant, l'objectif principal de l'étude étant de définir des marqueurs permettant de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques, la faible proportion de micronoyaux mono- et multicentromériques proscrit leur utilisation comme biomarqueurs pertinents. La réalisation de techniques d'hybridation *in situ* fluorescente et d'immuno-histochimie pourrait toutefois permettre de mieux caractériser par exemple l'implication d'anomalies du centrosome dans la genèse des MNCx+ et, de ce fait, d'éclaircir au niveau mécanistique les effets génotoxiques de l'U.

Actuellement, les modulations des dommages chromosomiques (notamment la fréquence ou le contenu centromérique des MNx), consécutifs à des expositions professionnelles par des agents génotoxiques par le polymorphisme génétique des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques

(activation ou détoxification) ainsi que dans la réparation des lésions de l'ADN, sont de plus en plus étudiées. Le polymorphisme génétique correspond à l'existence de variations de la séquence de l'ADN à un locus donné. Ces variations peuvent siéger dans des exons et éventuellement modifier la transcription du gène. Elles sont donc susceptibles de moduler l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques ou dans la réparation des lésions de l'ADN, mais n'ont pas de conséquence pathologique du fait d'une dysfonction du gène ou de la protéine, ce qui les différencie des mutations à proprement parler. Or, l'U induit diverses lésions de l'ADN qui sont spécifiques de l'effet chimique (MNx centromériques) ou spécifiques de l'effet radiologique (ponts nucléoplasmiques, MNx acentromériques ou bien encore cassures double brin). Il pourrait être intéressant d'étudier l'influence des polymorphismes génétiques de certains gènes critiques comme XRCC1 (impliqué dans la BER), XRCC3 ou RAD51 (impliqués dans la HR) sur la fréquence d'apparition des ponts nucléoplasmiques ou des MNx acentromériques sur lymphocytes périphériques de personnes exposées à l'U par exemple ; mais aussi l'influence de polymorphismes génétiques de GSTT1, GSTM1 sur la fréquence d'apparition des MNx. Les GST sont une famille importante d'isoenzymes (α , μ , π et θ) impliquées dans la phase de détoxification de nombreux agents cancérigènes ; ils sont également impliqués dans la transformation de radicaux libres. Des études ont montré que des personnes sans GSTT1 avaient des fréquences de MNx moins élevées que ceux qui possédaient l'allèle sauvage (Kirsch-Volders *et al.*, 2006). Il a également été démontré que les personnes GSTM1 non mutés présentaient des fréquences de MNx acentromériques plus élevées comparées à des individus sans GSTM1, le polymorphisme génétique pouvant également influencer un mécanisme spécifique de formation des MNx et donc le contenu centromérique des MNx (Iarmarcovai *et al.*, 2006). Une analyse combinée des polymorphismes génétiques et du contenu centromérique ou de la présence de PNPs pourraient mieux préciser l'impact de ces polymorphismes sur la nature et l'importance des anomalies observées après contamination par l'U. L'association du polymorphisme génétique avec des indicateurs spécifiques d'un stress radiologique (tels que les PNPs ou les MNC-) pourrait former un biomarqueur puissant permettant une meilleure interprétation des effets de l'U.

Les échanges de chromatides sœurs (SCE) se produisent lorsque la fourche de réplication de l'ADN se bloque en phase S. Ces arrêts peuvent être causés par la présence d'adduits à l'ADN, de bases modifiées (telles les 8-oxo-désoxyguanosines), de cassures simple brin ou double brin à l'ADN. Afin d'annuler ces blocages, le système de réparation par recombinaison homologue est activé et la réparation s'effectue à l'aide de la chromatide-sœur déjà répliquée (Delacote et Lopez, 2008). En effet, la formation des SCE est corrélée avec la recombinaison homologue. Nos travaux ont démontré que l'U induit des

cassures double brin de l'ADN et que les cellules les réparent en partie grâce au mécanisme de recombinaison homologue. Les mécanismes génotoxiques induits lors d'une contamination par l'U peuvent donc être précisés en associant des tests de mise en évidence des lésions primaires de l'ADN, tels que le test des comètes en condition neutre (pour évaluer des cassures double brin) ou en associant des enzymes (pour évaluer des modifications de bases) et des tests de mutations chromosomiques, tels que le test des échanges entre chromatides sœurs.

II. Le test CBMN bien adapté pour définir des marqueurs biologiques de contamination à l'uranium

Dans le cas d'expositions accidentelles par l'U, il est essentiel de définir la dose reçue par chaque individu et il est intéressant en parallèle de pouvoir quantifier les effets génotoxiques de cette exposition. Pour atteindre cet objectif, il semble important de développer un ou plusieurs marqueurs biologiques fiables qui pourraient être appliqués d'une façon non invasive et qui pourraient estimer les effets génotoxiques en fonction de la dose reçue par l'individu. Un tel outil dans le cas d'une contamination interne par l'U peut être utile pour quantifier la contamination par un mélange isotopique de l'U en fonction de son enrichissement en ^{235}U ; c'est-à-dire savoir si les sujets ont été contaminés par un mélange uranifère plutôt avec une faible activité spécifique (avec un stress chimique dominant) ou plutôt par un mélange avec une forte activité spécifique (avec un stress radiologique dominant). Ces biomarqueurs permettraient donc d'adapter les soins médicaux d'urgence mais aussi de rassurer l'individu pour une faible exposition.

En utilisant une analyse en métaphase classique, il est possible de mesurer la dose de rayonnements ionisants en déterminant la fréquence de fragments chromosomiques acentrique et de chromosomes dicentriques qui sont le résultat d'une mauvaise réparation des cassures double brin de l'ADN (AIEA, 2001). Les cellules avec de telles lésions peuvent progresser à travers le cycle de division cellulaire ; cependant les chromosomes acentriques ne sont pas intégrés dans les noyaux des cellules filles pendant la division cellulaire. Ils sont enveloppés dans une membrane nucléaire et apparaissent comme de petits noyaux, appelés **micronoyaux**, dans le cytoplasme en dehors des noyaux principaux (Countryman et Heddle, 1976). Le test de numération des micronoyaux avec blocage en cytodiérèse a été adopté au niveau international par l'Agence internationale de l'énergie atomique (IAEA) pour la biodosimétrie des rayonnements ionisants. Ce test est aussi utilisable pour tester *in vitro* des produits issus de l'industrie

pharmaceutique. Enfin, ce test a sa place dans les études d'épidémiologie moléculaire concernant la toxicologie génétique environnementale (IAEA 2001; Decordier et Kirsch-Volders 2006; Kirsch-Volders *et al.*, 2003; Fenech *et al.*, 2005, 2007).

Comparé à la numération des chromosomes dicentriques, qui est la technique standard en dosimétrie biologique (IAEA, 2001), la simplicité et la rapidité de numération des MNx rendent cette technique très intéressante pour évaluer par exemple à grande échelle des dommages génétiques chez les travailleurs exposés aux rayonnements ou bien pour un tri rapide de la population lors d'expositions accidentelles à des radiations de grande ampleur. De plus, ce test possède les caractéristiques requises de sensibilité, spécificité, transportabilité et reproductibilité pour être un bon marqueur de dosimétrie biologique efficace après exposition aux rayonnements ionisants (Fenech et Morley, 1985, 1986 ; Fenech, 2007) et dans notre cas après exposition à l'U. Un autre avantage du test CBMN (comparé à l'analyse des métaphases) est la facilité d'obtention et de numération des micronoyaux ainsi que le pourcentage élevé de cellules binucléées obtenu avec le blocage en cytodièrese. Il est ainsi possible d'évaluer des milliers de cellules. Ces caractéristiques sont nécessaires pour avoir une puissance statistique suffisante pour détecter de petits effets.

II.1 Marqueurs de chimiotoxicité et de radiotoxicité de l'uranium définis lors de nos travaux

Les résultats obtenus avec le test CBMN sur les trois modèles cellulaires (fibroblastes de souris, lymphocytes de rat et lymphocytes humains) aboutissent aux mêmes conclusions.

En effet, ces études ont permis de démontrer que le profil génotoxique de l'U est lié à sa composition isotopique et donc à son activité spécifique. Avec la numération des MNx dans les cellules binucléées, la génotoxicité globale de l'U peut être rapidement évaluée. En effet, l'augmentation de MNx dans les cellules binucléées est une des caractéristiques d'une contamination par l'U quel que soit le mélange isotopique considéré. En revanche, l'évaluation seule des taux de MNx dans les lymphocytes ne permet pas de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U. La numération du contenu des MNx à l'aide de l'hybridation *in situ* de sondes pancentromériques (MNx centromériques (BN-MNC+) et acentromériques (BN-MNC-)), des ponts nucléoplasmiques (BN-PNPs) ainsi que des cellules mononucléées avec des MNx (Mono-MNx) augmente la sensibilité du test. En effet, la détermination de la fréquence des cellules BN-1MNC- et des cellules BN-PNPs reflètent les effets radiotoxiques d'un mélange isotopique donné de l'U. Alors que la détermination de la fréquence des cellules BN-1MNC+ et des cellules Mono-MNx reflètent les effets chimiotoxiques d'un mélange isotopique donné de l'U.

Le test CBMN est reproductible quel que soit le type cellulaire utilisé (fibroblastes et lymphocytes) et quel que soit le mode de contamination réalisé (*in vitro* ou *in vivo*). Le test CBMN permet d'étudier différentes anomalies cytogénétiques qui différencient les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U. L'utilisation de ce test semble bien appropriée pour répondre à notre problématique. En effet, en pratique l'analyse d'une seule lame permet d'étudier différents marqueurs sans augmenter significativement le temps d'analyse.

La sensibilité du test de numération des MNx est de 0,2 Gy (irradiation externe homogène). Notre étude a été réalisée *in vitro* avec des doses environ 200 fois plus faibles (de l'ordre du mGy) pour les plus fortes doses et *in vivo* avec des doses 50 fois plus faibles pour les plus fortes doses. En effet, les doses reçues par les cellules lors de nos travaux se situent entre le μ Gray et le mGray ; ces doses sont nettement en dessous de la dose qu'un travailleur pourrait accidentellement recevoir. Même si les effets observés *in vitro et in vivo* ne sont pas forcément retranscrits à l'identique *ex vivo* ; en effet il existe entre autres des différences fondamentales en terme de doses et de durées d'exposition. Les effets observés avec de faibles doses *in vitro et in vivo* laisse espérer l'observation d'anomalies cytogénétiques *ex vivo* chez des travailleurs contaminés par l'U. Les valeurs normales et accidentelles devront être mieux précisées dans des études supplémentaires.

II.2 Proposition d'indicateurs de l'effet chimiotoxique ou radiotoxique de l'uranium

Au niveau pratique pour le suivi des travailleurs contaminés par un composé uranifère, deux indicateurs pourraient être proposés (en plus des marqueurs chimiotoxiques et radiotoxiques définis précédemment) permettant de définir si un individu a été contaminée plutôt par un composé uranifère avec un fort potentiel chimique ou plutôt par un composé uranifère avec un fort potentiel radiologique. Il faut bien préciser que la détermination de ces indicateurs constitue une simple réflexion pour le futur.

Le test CBMN a permis de démontrer que les ponts nucléoplasmiques et les micronoyaux centromères négatifs sont spécifiques de l'effet radiologique de l'U. Ces deux facteurs ont été choisis pour définir d'éventuels « indicateurs » de contamination par l'U. Les rapports PNP/MN et MNC-/MNC+ pourraient être des indicateurs utiles pour évaluer les effets génotoxiques (chimiotoxique ou radiotoxique) des composés uranifères testés.

Dans notre étude, limitée à 10 individus, nous avons remarqué qu'un rapport PNP/MN compris entre 0,3 et 0,4 est caractéristique des effets génotoxiques de composés uranifères avec un fort potentiel

chimiotoxique. En revanche, un rapport PNP/MN compris entre 0,7 et 0,9 est caractéristique des effets génotoxiques d'un composé uranifère avec un fort potentiel radiotoxique (cf. [Tableau 30](#)).

De plus, un rapport MNC-/MNC+ compris entre 0,4 et 0,5 est caractéristique des effets génotoxiques de composés uranifères avec un fort potentiel chimiotoxique. En revanche, un rapport MNC-/MNC+ compris entre 1,1 et 1,9 est caractéristique des effets génotoxiques d'un composé uranifère avec un fort potentiel radiotoxique (cf. [Tableau 30](#)).

L'association de ces deux indicateurs pourrait permettre aux médecins d'adapter le traitement d'un individu exposé en identifiant rapidement la source de la contamination (des composés uranifères ayant de faibles ou de fortes activités spécifiques).

Il faut tout de même rappeler qu'un certain nombre de facteurs sont connus pour induire une variabilité inter-individuelle sur les MNx tels que l'âge, le sexe, la consommation de tabac, les habitudes de vie ([Ban et al., 1993](#) ; [Fenech et Morley, 1985](#)). De plus, d'autres agents génotoxiques issus de mélanges complexes et présents dans l'environnement professionnel peuvent participer aux variations de fréquences de lymphocytes micronucléés. Tous ces paramètres sont aussi à prendre en compte lors des diverses analyses.

[Tableau 30](#). Bornes des indicateurs utilisables pour définir une toxicité chimique ou une toxicité radiologique de l'U

	PNP/MN	MNC-/MNC+	
U faible activité spécifique	0,3 - 0,4	0,4 - 0,5	Effet chimique
U forte activité spécifique	0,7 - 0,9	1,1 - 1,9	Effet radiologique

L'identification de ces deux indicateurs a été réalisée uniquement sur 10 individus. Il ne s'agit d'une étape de réflexion préliminaire pour une éventuelle utilisation dans le futur. Ces résultats devront être vérifiés et précisés dans des études supplémentaires.

II.3 Perspectives de développement

Les travaux réalisés au cours de cette thèse représentent des travaux préliminaires pour tenter de définir des marqueurs ou des indicateurs quantifiables qui peuvent compléter le calcul de dose qui est la seule mesure réalisée actuellement. Un certain nombre d'études vont être nécessaires pour valider les

biomarqueurs définis avec le test CBMN avant de pouvoir un jour les appliquer en surveillance des travailleurs après contamination à l'U.

Il va être primordial dans un premier temps de valider les biomarqueurs de l'effet radiologique de l'U en vérifiant sur une population importante les valeurs spontanées de ces deux marqueurs (PNPs et MNC-). En effet, un certain nombre de facteurs (âge, sexe, mode de vie...) sont connus pour faire varier le taux de MNx spontané. Nous avons montré que les PNPs et les MNC- sont spécifiques des effets radiologiques de l'U ; de plus des études ont montré leurs très faibles fréquences spontanées (Sari-Minodier *et al.*, 2002 et 2007 ; Kryscio *et al.*, 2001 ; Baciuchka-Palmaro *et al.*, 2002 ; Thomas *et al.*, 2003). Nous ne devrions quasiment pas en retrouver dans la population « contrôle ». Cette étude de screening sur des lymphocytes de la population (homme, femme, toutes tranches d'âge, diverses activités professionnelles...) représente une charge de travail importante mais essentielle pour la validation de ces biomarqueurs.

Durant nos travaux, les doses reçues par les cellules se sont situées entre le μ Gray et le mGray. Ces doses sont nettement en dessous de la dose qu'un travailleur pourrait éventuellement recevoir. Un des objectifs importants pour la suite de ce travail est par conséquent de valider les marqueurs et les indicateurs définis dans cette étude préliminaire sur des cas réels de contamination par l'U. Des effets observés *in vitro* ne sont pas forcément retranscrits à l'identique *in vivo*. En effet, il existe entre autres des différences fondamentales pour les doses et les durées d'exposition. Par conséquent, les bornes minimales et maximales des indicateurs devront très certainement être ajustées.

Les contaminations par l'U sont relativement rares mais il serait intéressant de réaliser ces études sur un nombre important de personnes contaminées à différentes doses afin de réaliser une courbe de référence dose-réponse sur laquelle les médecins pourraient s'appuyer en plus des indicateurs définis.

Il pourrait être intéressant de réaliser une étude sur des métaux lourds (ou faire une analyse cumulée en se basant sur les données de la littérature) afin d'obtenir des points de comparaison pour le côté plutôt chimique de l'U (en tant que métal génotoxique).

Les deux indicateurs : PNP/MN et MNC-/MNC+ sont déterminés différemment. Le premier rapport PNP/MN peut être évalué lors du test CBMN classique. Le deuxième rapport MNC-/MNC+ nécessite la réalisation d'une hybridation *in situ* de sondes pancentromériques qui demande une journée de plus pour obtenir des résultats. Il est par conséquent essentiel d'évaluer sur les études de cas réels si le premier rapport PNP/MN ne suffit pas à lui seul pour discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques

du mélange uranifère contaminant. Dans ce cas, le deuxième rapport MNC-/MNC+ peut se mesurer en seconde intention lors de cas douteux.

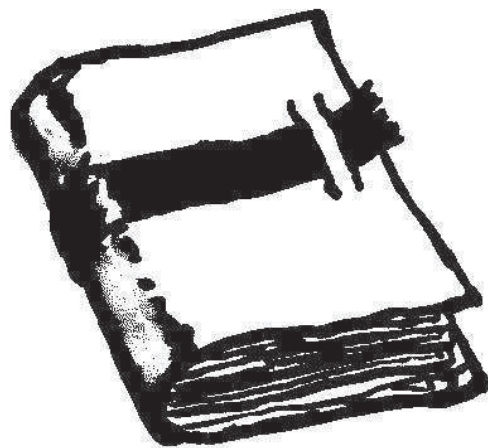
Actuellement des systèmes d'analyse MNx automatisée existent tels que celui de IMSTAR (Paris, France) ou de Metasystems (GmbH Altlussheim, Germany). Ces deux systèmes d'analyse ont été validés pour la numération des MNx en utilisant ou pas la microscopie en fluorescence (Varga *et al.*, 2004 ; Decordier *et al.*, 2008) ; cependant il faut préciser qu'aucun système existe actuellement pour la numération automatisée des PNPs. Une automatisation de l'analyse peut donner des résultats reproductibles, fiables et rapides.

Enfin, dans l'idéal, il serait très intéressant de miniaturiser cette technique ; c'est à dire ne prélever que quelques microlitres de sang (une goutte de sang par exemple) pour rendre la technique la moins invasive possible.

De nombreuses études ont démontré l'efficacité du test CBMN lors de suivi biodosimétrique après exposition à des rayonnements ionisants (Fenech, 2010). Le marquage centromérique et l'analyse des ponts nucléoplasmiques augmentent de manière significative la sensibilité de ce test. Les marqueurs biologiques définis lors de notre étude pourraient compléter les marqueurs classiques de dosimétrie pour évaluer les conséquences de la contamination interne à l'U.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



A

- Aardema, M.J., Albertini, S., Arni, P., Henderson, L.M., Kirsch-Volders, M., Mackay, J.M., Sarrif, A.M., Stringer, D.A., Taalman, R.D., 1998. Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutat Res* 410, 3-79.
- Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., Stark, G.R., 1995. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8493-8497.
- Ahnstrom, G., Ehrenberg, L., 1980. The nature of the target in the biological action of ionizing radiations. *Advances in biological and medical physics* 17, 129-172.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *International Programme on Chemical Safety. Mutat Res* 463, 111-172.
- Amundson, S.A., Myers, T.G., Fornace, A.J., Jr., 1998. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 17, 3287-3299.
- Anderson, D., Yu, T.W., McGregor, D.B., 1998. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis* 13, 539-555.
- Ansoborlo, E., Moulin, V., Cossonnet, C., Bion, L., Ménétrier, F., Doizi, D., Moulin, C., Machuron-Mandard, X., Henner, P., 2002. La spéciation de l'uranium dans le domaine de la toxicologie nucléaire : milieux environnementaux et biologiques. *GT 32 Spéciation. Note technique CEA/DEN/DRCP/CETAMA/2002/004*: 53.
- Archer, V.E., Renzetti, A.D., Doggett, R.S., Jarvis, J.Q., Colby, T.V., 1998. Chronic diffuse interstitial fibrosis of the lung in uranium miners. *J Occup Environ Med* 40, 460-474.
- Arfsten, D.P., Bekkedal, M., Wilfong, E.R., Rossi, J., 3rd, Grasman, K.A., Healey, L.B., Rutkiewicz, J.M., Johnson, E.W., Thitoff, A.R., Jung, A.E., Lohrke, S.R., Schaeffer, D.J., Still, K.R., 2005. Study of the reproductive effects in rats surgically implanted with depleted uranium for up to 90 days. *J Toxicol Environ Health A* 68, 967-997.
- Arfsten, D.P., Schaeffer, D.J., Johnson, E.W., Robert Cunningham, J., Still, K.R., Wilfong, E.R., 2006. Evaluation of the effect of implanted depleted uranium on male reproductive success, sperm concentration, and sperm velocity. *Environ Res* 100, 205-215.
- Arfsten, D.P., Still, K.R., Ritchie, G.D., 2001. A review of the effects of uranium and depleted uranium exposure on reproduction and fetal development. *Toxicol Ind Health* 17, 180-191.
- 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, 80-87.
- ASN, 2008. Guide national : Intervention médicale en cas d'évènement nucléaire ou radiologique. V3.6.
- ATSDR, 1999. Toxicological profile for uranium. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of health and human services.
- Averbeck, D., 2000. Mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis in higher eukaryotes. *Cancer Radiother* 4, 335-354.
- Azzam, E.I., de Toledo, S.M., Gooding, T., Little, J.B., 1998. Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat Res* 150, 497-504.
- Azzam, E.I., de Toledo, S.M., Little, J.B., 2001. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha -particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 473-478.
- Azzam, E.I., de Toledo, S.M., Pykett, M.J., Nagasawa, H., Little, J.B., 1997. CDC2 is down-regulated by ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Cell Growth Differ* 8, 1161-1169.
- Azzam, E.I., de Toledo, S.M., Waker, A.J., Little, J.B., 2000. High and low fluences of alpha-particles induce a G1 checkpoint in human diploid fibroblasts. *Cancer Res* 60, 2623-2631.

B

- Baciuchka-Palmaro, M., Orsiere, T., Duffaud, F., Sari-Minodier, I., Pompili, J., Bellon, L., De Meo, M., Digue, L., Favre, R., Botta, A., 2002. Acentromeric micronuclei are increased in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients. *Mutat Res* 520, 189-198.

- Bailey, M.R., Beral, V., Clayton, D.B., Darby, S.C., Goodhead, D.T., Hendry, J., Marsh, C., Murray, V., Smith, B., Spratt, B., Stoneham, M., Al-Bader, S., Collins, P., Green, N., Scott, M., Wilkins, M., 2002. The health effects of depleted uranium munitions: A summary. *Journal of Radiological Protection* 22, 131-139.
- Ballou, J.E., Gies, R.A., Case, A.C., Haggard, D.L., Buschbom, R.L., Ryan, J.L., 1986. Deposition and early disposition of inhaled $^{233}\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ and $^{232}\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ in the rat. *Health Phys* 51, 755-771.
- Ban, S., Cologne, J.B., Fujita, S., Awa, A.A., 1993. Radiosensitivity of atomic bomb survivors as determined with a micronucleus assay. *Radiat Res* 134, 170-178.
- Banday, A.A., Priyamvada, S., Farooq, N., Yusufi, A.N., Khan, F., 2008. Effect of uranyl nitrate on enzymes of carbohydrate metabolism and brush border membrane in different kidney tissues. *Food Chem Toxicol* 46, 2080-2088.
- Barber, D.S., Ehrich, M.F., Jortner, B.S., 2005. The effect of stress on the temporal and regional distribution of uranium in rat brain after acute uranyl acetate exposure. *J Toxicol Environ Health A* 68, 99-111.
- Barillet, F., Arranz, J.J., Carta, A., 2005. Mapping quantitative trait loci for milk production and genetic polymorphisms of milk proteins in dairy sheep. *Genet Sel Evol* 37 Suppl 1, S109-123.
- Barillet, S., Adam, C., Palluel, O., Devaux, A., 2007. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in Danio rerio exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environ Toxicol Chem* 26, 497-505.
- Bartek, J., Lukas, J., 2001. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13, 738-747.
- Bartek, M.J., LaBudde, J.A., Maibach, H.I., 1972. Skin permeability in vivo: comparison in rat, rabbit, pig and man. *J Invest Dermatol* 58, 114-123.
- Bauer, E., Recknagel, R.D., Fiedler, U., Wollweber, L., Bock, C., Greulich, K.O., 1998. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (χ^2) not a gaussian distribution. *Mutat Res* 398, 101-110.
- Baysson, H., Tirmarche, M., Tymen, G., Gouva, S., Caillaud, D., Artus, J.C., Vergnenegre, A., Ducloy, F., Laurier, D., 2004. Indoor radon and lung cancer in France. *Epidemiology* 15, 709-716.
- Belyakov, O.V., Malcolmson, A.M., Folkard, M., Prise, K.M., Michael, B.D., 2001. Direct evidence for a bystander effect of ionizing radiation in primary human fibroblasts. *Br J Cancer* 84, 674-679.
- Bérard, P., Quesne, B., Auriol, B., Chalabreysse, 1994. Cutaneous contamination after a uranyl nitrate skin burn: Incident report. *Radiation Protection Dosimetry* 53, 269-272.
- Berger, M.J., Coursey, J.S., Zucker, M.A., Chang, J., 2005. ESTAR, PSTAR, and ASTAR: Computer Programs for Calculating Stopping-Power and Range Tables for Electrons, Protons, and Helium Ions (version 1.2.3). National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD.
- Berradi, H., Bertho, J.M., Dudoignon, N., Mazur, A., Grandcolas, L., Baudelin, C., Grison, S., Voisin, P., Gourmelon, P., Dublineau, I., 2008. Renal anemia induced by chronic ingestion of depleted uranium in rats. *Toxicol Sci* 103, 397-408.
- Berry, J.P., Zhang, L., Galle, P., Ansoborlo, E., Henge-Napoli, M.H., Donnadiou-Claraz, M., 1997. Role of alveolar macrophage lysosomes in metal detoxification. *Microsc Res Tech* 36, 313-323.
- Bhattacharyya, M.H., Breitenstein, B.D., Métivier, H., Muggenburg, B.A., Stradling, G.N., Volf, V., 1995. Traitement de la contamination accidentelle des travailleurs. IPSN.
- Bishayee, A., Hill, H.Z., Stein, D., Rao, D.V., Howell, R.W., 2001. Free radical-initiated and gap junction-mediated bystander effect due to nonuniform distribution of incorporated radioactivity in a three-dimensional tissue culture model. *Radiat Res* 155, 335-344.
- Black, A.R., Azizkhan-Clifford, J., 1999. Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene* 237, 281-302.
- Blakely, E.A., Kronenberg, A., 1998. Heavy-ion radiobiology: new approaches to delineate mechanisms underlying enhanced biological effectiveness. *Radiat Res* 150, S126-145.
- Blakely, W.F., Fuciarelli, A.F., Wegher, B.J., Dizdaroglu, M., 1990. Hydrogen peroxide-induced base damage in deoxyribonucleic acid. *Radiat Res* 121, 338-343.
- Blanchin, N., Desloires, S., Grappin, L., Guillermin, A., Lafon, P., Miele, A., 2004. Protocoles de prise en charge des incidents d'expositions internes au plutonium dans un service médical d'installation nucléaire de base : élaboration - mise en place - évaluation - validation de 1996 à 2002. *Radioprotection* 39, 59-75.
- Bleise, A., Danesi, P.R., Burkart, W., 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J Environ Radioact* 64, 93-112.
- Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Barale, R., Casalone, R., Dalpra, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lamberti, L., Lando, C., Migliore, L., Padovani, P., Pasquini, R., Puntoni, R., Sbrana, I., Stella, M., Bonassi, S., 1997. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6, 249-256.

- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A., Zijno, A., 2001. HUman MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen* 37, 31-45.
- Bosi, A., Olivieri, G., 1989. Variability of the adaptive response to ionizing radiations in humans. *Mutat Res* 211, 13-17.
- Bosque, M.A., Domingo, J.L., Llobet, J.M., Corbella, J., 1993. Embryotoxicity and teratogenicity of uranium in mice following subcutaneous administration of uranyl acetate. *Biol Trace Elem Res* 36, 109-118.
- Bosshard, E., Zimmerli, B., Schlatter, C., 1992. Uranium in the diet: Risk assessment of its nephroand radiotoxicity. *Chemosphere* 24, 309-322.
- Bouffler, S.D., Blasco, M.A., Cox, R., Smith, P.J., 2001. Telomeric sequences, radiation sensitivity and genomic instability. *Int J Radiat Biol* 77, 995-1005.
- Brandom, W.F., Saccomanno, G., Archer, V.E., Archer, P.G., Coors, M.E., 1972. Chromosome aberrations in uranium miners occupationally exposed to 222 radon. *Radiat Res* 52, 204-215.
- Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S., Speit, G., 2005. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20, 245-254.
- Brenner, D.J., Ward, J.F., 1992. Constraints on energy deposition and target size of multiply damaged sites associated with DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* 61, 737-748.
- Brenner, D.J., Little, J.B., Sachs, R.K., 2001. The bystander effect in radiation oncogenesis: II. A quantitative model. *Radiat Res* 155, 402-408.
- Brooks, A.L., Khan, M.A., Duncan, A., Buschbom, R.L., Jostes, R.F., Cross, F.T., 1994. Effectiveness of radon relative to acute ⁶⁰Co gamma-rays for induction of micronuclei in vitro and in vivo. *Int J Radiat Biol* 66, 801-808.
- Brown, E.J., Baltimore, D., 2003. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev* 17, 615-628.
- Bulman, R.A., 1980. Uranium uptake into the rat liver: effect of thioacetamide and lipophilic glycerophosphate upon hepatic uptake. *Int J Nucl Med Biol* 7, 295-298.
- Burlinson, B., Tice, R.R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S.Y., Collins, A.R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T.S., Nakajima, M., Sasaki, Y.F., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., Hartmann, A., 2007. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res* 627, 31-35.
- Burma, S., Chen, B.P., Chen, D.J., 2006. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* 5, 1042-1048.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., Chen, D.J., 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276, 42462-42467.
- Bussy, C., Lestaevél, P., Dhieux, B., Amourette, C., Paquet, F., Gourmelon, P., Houpert, P., 2006. Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *Neurotoxicology* 27, 245-252.

C

- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., Ravanat, J.L., 2003. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 531, 5-23.
- Cai, L., Liu, S.Z., 1991. [Cytogenetic adaptive response induced by low dose radiation]. *Yi Chuan Xue Bao* 18, 109-114.
- Calini, V., Urani, C., Camatini, M., 2002. Comet assay evaluation of DNA single- and double-strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells. *Cell Biol Toxicol* 18, 369-379.
- Calini, V., Urani, C., Camatini, M., 2003. Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicol In Vitro* 17, 561-566.
- Calmet, D., Flûry-Hérard, A., Jimonet, C., 2003. Toxicologie radiologique et chimique, Clefs CEA.
- Cantaluppi, C., Degetto, S., 2000. Civilian and military uses of depleted uranium: environmental and health problems. *Ann Chim* 90, 665-676.
- Cardis, E., Vrijheid, M., Blettner, M., Gilbert, E., Hakama, M., Hill, C., Howe, G., Kaldor, J., Muirhead, C.R., Schubauer-Berigan, M., Yoshimura, T., Bermann, F., Cowper, G., Fix, J., Hacker, C., Heinmiller, B., Marshall, M., Thierry-Chef, I., Utterback, D., Ahn, Y.O., Amorós, E., Ashmore, P.,

- Auvinen, A., Bae, J.M., Solano, J.B., Biau, A., Combalot, E., Deboodt, P., Diez Sacristan, A., Eklof, M., Engels, H., Engholm, G., Gulis, G., Habib, R., Holan, K., Hyvonen, H., Kerekes, A., Kurtinaitis, J., Malaker, H., Martuzzi, M., Mastauskas, A., Monnet, A., Moser, M., Pearce, M.S., Richardson, D.B., Rodriguez-Artalejo, F., Rogel, A., Tardy, H., Telle-Lamberton, M., Turai, I., Usel, M., Veress, K., 2005. Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries. *BMJ* 331, 77.
- 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, 446-452.
- Castelli, E., Hrelia, P., Maffei, F., Fimognari, C., Foschi, F.G., Caputo, F., Cantelli-Forti, G., Stefanini, G.F., Gasbarrini, G., 1999. Indicators of genetic damage in alcoholics: reversibility after alcohol abstinence. *Hepatology* 46, 1664-1668.
- CEA2, L'homme et les rayonnements - livret CEA jeunes [online]. Available at: http://www.cea.fr/jeunes/themes/la_radioactivite/l_homme_et_les_rayonnements
- CEA, 2008. Energy Handbook : Mémento sur l'énergie.
- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1999. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401, 616-620.
- Chang, M.C., Chan, C.P., Wang, Y.J., Lee, P.H., Chen, L.I., Tsai, Y.L., Lin, B.R., Wang, Y.L., Jeng, J.H., 2007. Induction of necrosis and apoptosis to KB cancer cells by sanguinarine is associated with reactive oxygen species production and mitochondrial membrane depolarization. *Toxicol Appl Pharmacol* 218, 143-151.
- Chazel, V., Ansoborlo, E., 1999. Evaluation du risque d'exposition des travailleurs aux composés uranifères de l'usine de Comurhex de Pierrelatte. Rapport IPSN SDOS/99-22.
- Chazel, V., Houpert, P., Ansoborlo, E., 1997. Evaluation du risque d'exposition des travailleurs aux composés uranifères dans l'atelier TU2 de l'usine de Cogéma de Pierrelatte. Rapport IPSN SDOS/97-356.
- Chazel, V., Houpert, P., Ansoborlo, E., 1999. Evaluation du risque d'exposition des travailleurs aux composés uranifères dans l'atelier TU5 de conversion des nitrates de Cogéma Pierrelatte. Rapport IPSN SDOS/99-11.
- Chazel, V., Houpert, P., Ansoborlo, E., Henge-Napoli, M.H., Paquet, F., 2000. Variation of solubility, biokinetics and dose coefficient of industrial uranium oxides according to specific surface area. *Radiat Prot Dosimetry* 88, 223-231.
- Chazel, V., Tournonias, E., 2004. Caractérisation physico-chimique et solubilité in vitro de concentrés miniers uranifères de l'usine Comurhex de Malvesi - Etude dosimétrique prédictive. Rapport IRSN SRBE/2004-823.
- Checkoway, H., Pearce, N., Crawford-Brown, D.J., Cragle, D.L., 1988. Radiation doses and cause-specific mortality among workers at a nuclear materials fabrication plant. *American journal of epidemiology* 127, 255-266.
- Chen, Y., Sanchez, Y., 2004. Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair (Amst)* 3, 1025-1032.
- Chevari, S., Likhner, D., 1968. Complex formation of natural uranium in blood. *Med Radiol (Mosk)* 13, 53-57.
- Cimini, D., Degrossi, F., 2005. Aneuploidy: a matter of bad connections. *Trends Cell Biol* 15, 442-451.
- CIPR, 1959. Permissible dose for Internal Radiation. Publication 2.
- CIPR, 1983. Radionuclide transformations, energy and intensity of emissions. Publication 38.
- CIPR, 1990. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. . Publication 60; Vol 21, 1-3.
- CIPR, 1994. Human respiratory tract: model for radiological protection: Part 3, ingestion doses coefficients. Pergamon Press (Oxford). Publication 66; Vol 24 n° 1-3.
- CIPR, 1995. Age dependent doses to members of the public from intake of radionuclides, Part 3, ingestion dose coefficients, chap.5 Uranium. Pergamon Press (Oxford). Publication 69
- CIPR, 1997a. General principles for the radiation protection of workers. Publication 75, Vol 27, 1.
- CIPR, 1997b. Individual monitoring for internal exposure of workers. Publication 78, Vol 27, 3-4
- CIPR, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Publication 103, Vol 37, 1-332
- Clare, M.G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V., Lorge, E., 2006. SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test II. Using human lymphocytes. *Mutat Res* 607, 37-60.
- Cleaver, J.E., 2005. Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* 5, 564-573.

- Clutton, S.M., Townsend, K.M., Goodhead, D.T., Ansell, J.D., Wright, E.G., 1996. Differentiation and delayed cell death in embryonal stem cells exposed to low doses of ionising radiation. *Cell Death Differ* 3, 141-148.
- Coates, P.J., Lorimore, S.A., Wright, E.G., 2004. Damaging and protective cell signalling in the untargeted effects of ionizing radiation. *Mutat Res* 568, 5-20.
- Coen, N., Mothersill, C., Kadhim, M., Wright, E.G., 2001. Heavy metals of relevance to human health induce genomic instability. *J Pathol* 195, 293-299.
- Coleman, W.B., Grisham, J.W., Smith, G.J., 1994. Morphologic transformation of the C3H 10T1/2 cell line is accompanied by altered expression of the p53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* 15, 145-152.
- Colle, C., Garnier-Laplace, J., Roussel-Debet, S., 2001. Comportement de l'uranium dans l'environnement. L'uranium de l'environnement à l'Homme: Collection IPSN: Les Ulis. EDP Science (Chapitre 6), 187-212.
- Collins, A.R., 2002. The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol* 203, 163-177.
- Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26, 249-261.
- Cooley, H.M., Klaverkamp, J.F., 2000. Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat Toxicol* 48, 477-494.
- Cooper, J.R., Stradling, G.N., Smith, H., Ham, S.E., 1982. The behaviour of uranium-233 oxide and uranyl-233 nitrate in rats. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 41, 421-433.
- Cortes, F., Dominguez, I., Pintero, J., Mateos, J.C., 1990. Adaptive response in human lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide before irradiation with X-rays. *Mutagenesis* 5, 555-557.
- Cothern, C.R., Lappenbusch, W.L., 1983. Occurrence of uranium in drinking water in the U.S. *Health Phys* 45, 89-99.
- Cothern, C.R., Lappenbusch, W.L., Cotruvo, J.A., 1983. Health effects guidance for uranium in drinking water. *Health Phys* 44 Suppl 1, 377-384.
- Countryman, P.I., Heddle, J.A., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 41, 321-332.
- 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.
- Critchlow, S.E., Bowater, R.P., Jackson, S.P., 1997. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol* 7, 588-598.
- Cross, F.T., Palmer, R.F., Busch, R.H., Filipy, R.E., Stuart, B.O., 1981. Development of lesions in Syrian golden hamsters following exposure to radon daughters and uranium ore dust. *Health Phys* 41, 135-153.
- Cummins, R.J., Mothersill, C., Seymour, C.B., Johns, H., Joiner, M.C., 1999. The effect of microcolony size, at time of irradiation, on colony forming ability. *Int J Radiat Biol* 75, 225-232.

D

- D'Assoro, A.B., Lingle, W.L., Salisbury, J.L., 2002. Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* 21, 6146-6153.
- Darroudi, F., Meijers, C.M., Hadjidekova, V., Natarajan, A.T., 1996. Detection of aneugenic and clastogenic potential of X-rays, directly and indirectly acting chemicals in human hepatoma (Hep G2) and peripheral blood lymphocytes, using the micronucleus assay and fluorescent in situ hybridization with a DNA centromeric probe. *Mutagenesis* 11, 425-433.
- De Boeck, M., Lison, D., Kirsch-Volders, M., 1998. Evaluation of the in vitro direct and indirect genotoxic effects of cobalt compounds using the alkaline comet assay. Influence of interdonor and interexperimental variability. *Carcinogenesis* 19, 2021-2029.
- De Meo, M., Laget, M., Castegnaro, M., Dumenil, G., 1991. Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. *Mutat Res* 260, 295-306.
- de Rey, B.M., Lanfranchi, H.E., Cabrini, R.L., 1983. Percutaneous absorption of uranium compounds. *Environ Res* 30, 480-491.
- Decordier, I., Dillen, L., Cundari, E., Kirsch-Volders, M., 2002. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. *Mutagenesis* 17, 337-344.
- Delacroix, D., Guerre, J.P., Leblanc, P., 2006. Guide pratique Radionucléides et Radioprotection. EDP Sciences & Commissariat à l'Energie Atomique.

- DeMarini, D.M., 2004. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res* 567, 447-474.
- Denison, F.H., 2004. Uranium VI speciation: modelling, uncertainty and relevance to bioavailability models. application to uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve. Doctorat de l'Université de Provence Aix Marseille I, Marseille.
- Depledge, M.H., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools., *Nondestructive biomarkers in vertebrates: Boca Raton M C Fossi, and C Leonzio editions*, 261-285.
- Diamond, G.L., Morrow, P.E., Panner, B.J., Gelein, R.M., Baggs, R.B., 1989. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam Appl Toxicol* 13, 65-78.
- Diaz Sylvester, P.L., Lopez, R., Ubios, A.M., Cabrini, R.L., 2002. Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation. *Arch Environ Health* 57, 320-325.
- Digue, L., Orsiere, T., Baciuchka-Palmaro, M., Duffaud, F., Pompili, J., Favre, R., Botta, A., 2002. [Interest of studying the in vitro genotoxicity of an antineoplastic drug on healthy human cells: paclitaxel example]. *Bull Cancer* 89, 887-892.
- Dizdaroglu, M., Gajewski, E., 1989. Structure and mechanism of hydroxyl radical-induced formation of a DNA-protein cross-link involving thymine and lysine in nucleohistone. *Cancer Res* 49, 3463-3467.
- Domingo, J.L., 2001. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. *Reprod Toxicol* 15, 603-609.
- Domingo, J.L., Llobet, J.M., Tomas, J.M., Corbella, J., 1987. Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 39, 168-174.
- Domingo, J.L., Ortega, A., Paternain, J.L., Corbella, J., 1989a. Evaluation of the perinatal and postnatal effects of uranium in mice upon oral administration. *Arch Environ Health* 44, 395-398.
- Domingo, J.L., Paternain, J.L., Llobet, J.M., Corbella, J., 1989b. The developmental toxicity of uranium in mice. *Toxicology* 55, 143-152.
- 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, 454-464.
- Dounce, A.L., Roberts, E., Wills, J., 1949. Catalasuria as a sensitive test for uranium poisoning. In Voegtlin C, Hodge HC, eds *Pharmacology and toxicology of uranium compounds vol I* Mc Graw-Hill, New York; 889-950.
- Doyle, P., Maconochie, N., Roman, E., Davies, G., Smith, P.G., Beral, V., 2000. Fetal death and congenital malformation in babies born to nuclear industry employees: report from the nuclear industry family study. *Lancet* 356, 1293-1299.
- Duez, P., Dehon, G., Kumps, A., Dubois, J., 2003. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* 18, 159-166.
- Dunnick, J.K., Elwell, M.R., Radovsky, A.E., Benson, J.M., Hahn, F.F., Nikula, K.J., Barr, E.B., Hobbs, C.H., 1995. Comparative carcinogenic effects of nickel subsulfide, nickel oxide, or nickel sulfate hexahydrate chronic exposures in the lung. *Cancer Res* 55, 5251-5256.
- Dupree, E.A., Cragle, D.L., McLain, R.W., Crawford-Brown, D.J., Teta, M.J., 1987. Mortality among workers at a uranium processing facility, the Linde Air Products Company Ceramics Plant, 1943-1949. *Scand J Work Environ Health* 13, 100-107.
- Durakovic, A., 1999. Medical effects of internal contamination with uranium. *Croat Med J* 40, 49-66.
- Durbin, P.W., 1984. Metabolic model for uranium. *Biokinetics and Analysis of Uranium in Man*.
- Durbin, P.W., Wrenn, M.E., 1976. Metabolism and effects of uranium in animals. *Conference on occupational health: experience with uranium*, 68-129.
- Dygert, H.P., 1949. L'uranium. *Pharmacology and Toxicology of Uranium compounds*. EDP Sciences & Commissariat à l'Energie Atomique.

E

- Eastmond, D.A., Schuler, M., Rupa, D.S., 1995. Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mutat Res* 348, 153-162.
- EDP Sciences, 2001. L'Uranium : de l'environnement à l'Homme. Coordinateur: Métivier, H., Les Ulis.
- el-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietsenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., et al., 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54, 1169-1174.

- Elhajouji, A., Cunha, M., Kirsch-Volders, M., 1998. Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis* 13, 193-198.
- Ervanne, H., 2004. Oxidation state analysis of uranium with emphasis on chemical speciation in geological media: Thesis, University of Helsinki.

F

- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339, 37-59.
- Favaudon, V., 2000. Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death. *Cancer Radiother* 4, 355-368.
- Feinendegen, L.E., 1999. The role of adaptive responses following exposure to ionizing radiation. *Hum Exp Toxicol* 18, 426-432.
- Fenech, M., 1998. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat Res* 404, 155-165.
- Fenech, M., 1999. Micronucleus frequency in human lymphocytes is related to plasma vitamin B12 and homocysteine. *Mutat Res* 428, 299-304.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455, 81-95.
- Fenech, M., 2005a. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods Mol Med* 111, 3-32.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 534, 65-75.
- Fenech, M., 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 600, 58-66.
- Fenech, M., Baghurst, P., Luderer, W., Turner, J., Record, S., Ceppi, M., Bonassi, S., 2005b. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability--results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis* 26, 991-999.
- Fenech, M., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmuller, S., Holland, N., 2007. Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells--a Human Micronucleus (HUMN) project (www.humn.org) initiative commencing in 2007. *Mutagenesis* 22, 3-4.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147, 29-36.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res* 161, 193-198.
- Fenech, M., Perepetskaya, G., Mikhalevich, L., 1997. A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations--experiences from the Chernobyl catastrophe. *Environ Mol Mutagen* 30, 112-118.
- Fenech, M., 2010. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys* 98, 234-243.
- Ferguson, L.R., Morcombe, P., Triggs, C.N., 1993. The size of cytokinesis-blocked micronuclei in human peripheral blood lymphocytes as a measure of aneuploidy induction by Set A compounds in the EEC trial. *Mutat Res* 287, 101-112.
- Feugier, A., Frelon, S., Gourmelon, P., Claraz, M., 2008. Alteration of mouse oocyte quality after a subchronic exposure to depleted Uranium. *Reprod Toxicol* 26, 273-277.
- Fisenne, I.M., Perry, P.M., Decker, K.M., Keller, H.W., 1987. The daily intake of ^{234,235,238}U, ^{228,230,232}Th and ^{226,228}Ra by New York City residents. *Health Phys* 53, 357-363.
- Fitsanakis, V.A., Erikson, K.M., Garcia, S.J., Evje, L., Syversen, T., Aschner, M., 2006. Brain accumulation of depleted uranium in rats following 3- or 6-month treatment with implanted depleted uranium pellets. *Biol Trace Elem Res* 111, 185-197.
- Fletcher, L., Muschel, R.J., 2006. The centrosome and the DNA damage induced checkpoint. *Cancer Lett* 243, 1-8.
- Fox, J.C., Prise, K.M., 1992. DNA lesions: linear energy transfer and radiosensitive mutants. *BJR Suppl* 24, 48-52.
- Frankenberg-Schwager, M., Frankenberg, D., 1990. DNA double-strand breaks: their repair and relationship to cell killing in yeast. *Int J Radiat Biol* 58, 569-575.

- Friedberg, E.C., Bardwell, A.J., Bardwell, L., Feaver, W.J., Kornberg, R.D., Svejstrup, J.Q., Tomkinson, A.E., Wang, Z., 1995. Nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: its relationship to specialized mitotic recombination and RNA polymerase II basal transcription. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 347, 63-68.
- Fukasawa, K., 2005. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett* 230, 6-19.

9

- Gadbois, D.M., Crissman, H.A., Nastasi, A., Habbersett, R., Wang, S.K., Chen, D., Lehnert, B.E., 1996. Alterations in the progression of cells through the cell cycle after exposure to alpha particles or gamma rays. *Radiat Res* 146, 414-424.
- Galle, P., 1997. *Toxiques nucléaires*. 2 ed. Paris: Masson.
- Garaj-Vrhovac, V., Kopjar, N., 2003. The alkaline Comet assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation. *Mutagenesis* 18, 265-271.
- Garaj-Vrhovac, V., Kopjar, N., 2005. Investigation into possible DNA damaging effects of ultrasound in occupationally exposed medical personnel--the alkaline comet assay study. *J Appl Toxicol* 25, 184-192.
- Garaj-Vrhovac, V., Kopjar, N., Razem, D., Vekic, B., Miljanic, S., Ranogajec-Komor, M., 2002. Application of the alkaline comet assay in biodosimetry: assessment of in vivo DNA damage in human peripheral leukocytes after a gamma radiation incident. *Radiat Prot Dosimetry* 98, 407-416.
- Gerber, G.B., Thomas, R.G., 1992. Internal radionuclide contamination guidebook. *Radiation Protection Dosimetry* 41, 1-49.
- Ghiassi-nejad, M., Mortazavi, S.M., Cameron, J.R., Niroomand-rad, A., Karam, P.A., 2002. Very high background radiation areas of Ramsar, Iran: preliminary biological studies. *Health Phys* 82, 87-93.
- Gilman, A.P., Moss, M.A., Villeneuve, D.C., Secours, V.E., Yagminas, A.P., Tracy, B.L., Quinn, J.M., Long, G., Valli, V.E., 1998a. Uranyl nitrate: 91-day exposure and recovery studies in the male New Zealand white rabbit. *Toxicol Sci* 41, 138-151.
- Gilman, A.P., Villeneuve, D.C., Secours, V.E., Yagminas, A.P., Tracy, B.L., Quinn, J.M., Valli, V.E., Moss, M.A., 1998b. Uranyl nitrate: 91-day toxicity studies in the New Zealand white rabbit. *Toxicol Sci* 41, 129-137.
- 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., 1998c. Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci* 41, 117-128.
- Gisselsson, D., Bjork, J., Hoglund, M., Mertens, F., Dal Cin, P., Akerman, M., Mandahl, N., 2001. Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. *Am J Pathol* 158, 199-206.
- Goodhead, D.T., 1993. Biological effects of high energy radiations. *Radiation Protection Dosimetry* 48, 111-114.
- Goodhead, D.T., 1994. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol* 65, 7-17.
- Goodhead, D.T., 1999. Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations. *J Radiat Res (Tokyo)* 40 Suppl, 1-13.
- Goodhead, D.T., Nikjoo, H., 1989. Track structure analysis of ultrasoft X-rays compared to high- and low-LET radiations. *Int J Radiat Biol* 55, 513-529.
- Grawunder, U., Zimmer, D., Leiber, M.R., 1998. DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains. *Curr Biol* 8, 873-876.
- Greinert, R., Thieke, C., Detzler, E., Boguhn, O., Frankenberg, D., Harder, D., 1999. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by 3.45 MeV alpha particles analyzed by premature chromosome condensation. *Radiat Res* 152, 412-420.
- Grosovsky, A.J., 1999. Radiation-induced mutations in unirradiated DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5346-5347.
- Groth, A., Lukas, J., Nigg, E.A., Sillje, H.H., Wernstedt, C., Bartek, J., Hansen, K., 2003. Human Toslled like kinases are targeted by an ATM- and Chk1-dependent DNA damage checkpoint. *EMBO J* 22, 1676-1687.
- Gueguen, Y., Grandcolas, L., Baudelin, C., Grison, S., Tissandie, E., Jourdain, J.R., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Souidi, M., 2007. Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium. *Toxicology* 229, 62-72.
- Gueguen, Y., Souidi, M., Baudelin, C., Dudoignon, N., Grison, S., Dublineau, I., Marquette, C., Voisin, P., Gourmelon, P., Aigueperse, J., 2006. Short-term hepatic effects of depleted uranium on

- xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch Toxicol* 80, 187-195.
- Guglielmotti, M.B., Ubios, A.M., de Rey, B.M., Cabrini, R.L., 1984. Effects of acute intoxication with uranyl nitrate on bone formation. *Experientia* 40, 474-476.
- Gwiazda, R.H., Squibb, K., McDiarmid, M., Smith, D., 2004. Detection of depleted uranium in urine of veterans from the 1991 Gulf War. *Health Phys* 86, 12-18.

H

- Hahn, F.F., Guilmette, R.A., Hoover, M.D., 2002. Implanted depleted uranium fragments cause soft tissue sarcomas in the muscles of rats. *Environ Health Perspect* 110, 51-59.
- Hamilton, E.I., 1971. The concentration and distribution of uranium in human skeletal tissues. *Calcif Tissue Res* 7, 150-162.
- Hamilton, E.I., 1972. The concentration of uranium in man and his diet. *Health Phys* 22, 149-153.
- Hamilton, M.M., Ejnik, J.W., Carmichael, A.J., 1997. Uranium reactions with hydrogen peroxide studied by EPR-spin trapping with DMPO, *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions* 12, 2491-2494.
- Hao, Y., Li, R., Leng, Y., Ren, J., Liu, J., Ai, G., Xu, H., Su, Y., Cheng, T., 2009. A study assessing the genotoxicity in rats after chronic oral exposure to a low dose of depleted uranium. *J Radiat Res (Tokyo)* 50, 521-528.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R., 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 18, 45-51.
- Hartmann, A., Schumacher, M., Plappert-Helbig, U., Lowe, P., Suter, W., Mueller, L., 2004. Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis* 19, 51-59.
- Hartsock, W.J., Cohen, J.D., Segal, D.J., 2007. Uranyl acetate as a direct inhibitor of DNA-binding proteins. *Chem Res Toxicol* 20, 784-789.
- Hartwell, L.H., Weinert, T.A., 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.
- Hartwig, A., 1995. Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals* 8, 3-11.
- Henge-Napoli, M.H., Ansoborlo, E., Claraz, M., Berry, J.P., Cheynet, M.C., 1996. Role of alveolar macrophages in the dissolution of two different industrial uranium oxides. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 42, 413-420.
- Hengé-Napoli, M.H., Ansoborlo, E., Houpert, P., Mirto, H., Paquet, F., Burgada, R., Hodgson, S., Stradling, G.N., 1998. Progress and trends in in vivo chelation of uranium. *Radiation Protection Dosimetry* 79, 449-452.
- Hengé-Napoli, M.H., L'azou, B., Bérard, P., 2001. Toxicité de l'uranium. L'uranium de l'environnement à l'Homme: Collection IPSN: Les Ulis, EDP Science (Chapitre 8), 239-260.
- Hickman, A.W., Jaramillo, R.J., Lechner, J.F., Johnson, N.F., 1994. Alpha-particle-induced p53 protein expression in a rat lung epithelial cell strain. *Cancer Res* 54, 5797-5800.
- Hoeijmakers, J.H., 2001. DNA repair mechanisms. *Maturitas* 38, 17-22; discussion 22-13.
- Hoffmann, W., Schmitz-Feuerhake, I., 1999. How radiation-specific is the dicentric assay? *J Expo Anal Environ Epidemiol* 9, 113-133.
- Holley, W.R., Chatterjee, A., 1996. Clusters of DNA induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. I. Theoretical modeling. *Radiat Res* 145, 188-199.
- Holmes, A.L., Wise, S.S., Sandwick, S.J., Lingle, W.L., Negron, V.C., Thompson, W.D., Wise, J.P., Sr., 2006. Chronic exposure to lead chromate causes centrosome abnormalities and aneuploidy in human lung cells. *Cancer Res* 66, 4041-4048.
- Hornung, R.W., 2001. Health effects in underground uranium miners. *Occup Med* 16, 331-344.
- Hornung, R.W., Deddens, J., Roscoe, R., 1995. Modifiers of exposure-response estimates for lung cancer among miners exposed to radon progeny. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 2, 49-53.
- Hornung, R.W., Deddens, J.A., Roscoe, R.J., 1998. Modifiers of lung cancer risk in uranium miners from the Colorado Plateau. *Health Phys* 74, 12-21.
- Houpert, P., Frelon, S., Monleau, M., Bussy, C., Chazel, V., Paquet, F., 2007. Heterogeneous accumulation of uranium in the brain of rats. *Radiat Prot Dosimetry* 127, 86-89.
- 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, 1015-1020.
- Houpert, P., Muller, D., Chazel, V., Claraz, M., Paquet, F., 2003. Effect of DTPA on the nephrotoxicity induced by uranium in the rat. *Radiat Prot Dosimetry* 105, 517-520.

- Howland, J.W., 1948. Comprehensive summary of the pharmacology and toxicology of uranium compounds; studies on human exposures to uranium compounds. *Atomic energy in biophysics, biology and medicine* 1, 174.
- Hu, Q.Y., Zhu, S.P., 1990. Induction of chromosomal aberrations in male mouse germ cells by uranyl fluoride containing enriched uranium. *Mutat Res* 244, 209-214.
- Humm, J.L., 1987. A microdosimetric model of astatine-211 labeled antibodies for radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 13, 1767-1773.
- Huxley, H.E., Zubay, G., 1961. Preferential staining of nucleic acid-containing structures for electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol* 11, 273-296.

- IARC, 2001. Ionizing radiation, Part 2, Some internally deposited radionuclides. In: IARC Press (Ed.) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Vol 78. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, p. 595.
- IARC, 2006. (International Agency for Research on cancer). <http://monographs.iarc.fr/>.
- Iarmarcovai, G., Botta, A., Orsiere, T., 2006. Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. *Toxicol Lett* 166, 1-10.
- Iarmarcovai, G., Botta, A., Orsiere, T., 2007. Changes in chromosome number, genetic instability, and occupational exposures. *Bull Cancer* 94, 381-388.
- Ibrulj, S., Kronic-Haveric, A., Haveric, S., Pojskic, N., Hadziselimovic, R., 2004. Micronuclei occurrence in population exposed to depleted uranium and control human group in correlation with sex, age and smoking habit. *Med Arh* 58, 335-338.
- Iliakis, G., 1991. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays* 13, 641-648.
- Innocente, S.A., Abrahamson, J.L., Cogswell, J.P., Lee, J.M., 1999. p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2147-2152.
- Irwin, R.J., VanMouwerik, M., Stevens, L., 1997. Environmental contaminants encyclopedia : uranium entry, Fort Collins, Colorado, National Park Service, Water Resources Division. 65.
- Iyer, R., Lehnert, B.E., Svensson, R., 2000. Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles. *Cancer Res* 60, 1290-1298.

- Jayaraman, J., Prives, C., 1995. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminus. *Cell* 81, 1021-1029.
- Jean, S., De Meo, M., Sabatier, A.S., Laget, M., Hubaud, J.C., Verrando, P., Dumenil, G., 2001. Evaluation of sunscreen protection in human melanocytes exposed to UVA or UVB irradiation using the alkaline comet assay. *Photochem Photobiol* 74, 417-423.
- Jelka, S., Milica, K.F., Dragana, P., 2005. A study on oxidative stress and peripheral blood parameters of cows bred in the area exposed to depleted uranium ammunition. *Acta Veterinaria* 55, 269-278.
- Jones, P.W., Taylor, D.M., Webb, L.M., Williams, D.R., 2002. Computer modelling of the chemical speciation of caesium, uranium(VI) and neptunium(V) in human duodenal fluids under fasting conditions. *Appl Radiat Isot* 57, 159-165.

- Kalinich, J.F., Ramakrishnan, N., Villa, V., McClain, D.E., 2002. Depleted uranium-uranyl chloride induces apoptosis in mouse J774 macrophages. *Toxicology* 179, 105-114.
- Karpas, Z., Lorber, A., Elish, E., Kol, R., Roiz, Y., Marko, R., Katorza, E., Halicz, L., Riondato, J., Vanhaecke, F., Moens, L., 1998. Uptake of ingested uranium after low "acute intake". *Health Phys* 74, 337-345.
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W., 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51, 6304-6311.

- Kathren, R.L., Burklin, R.K., 2008a. Acute chemical toxicity of uranium. *Health Phys* 94, 170-179.
- Kathren, R.L., Burklin, R.K., 2008b. Proposed standards for acute exposure to low enrichment uranium for compliance with 10 CFR 70.61. *Health Phys* 95 Suppl 2, S122-127.
- Kathren, R.L., McInroy, J.F., Moore, R.H., Dietert, S.E., 1989. Uranium in the tissues of an occupationally exposed individual. *Health Phys* 57, 17-21.
- Kathren, R.L., Moore, R.H., 1986. Acute accidental inhalation of U: a 38-year follow-up. *Health Phys* 51, 609-619.
- Kawanishi, S., Hiraku, Y., Oikawa, S., 2001. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res* 488, 65-76.
- Kehrer, J.P., 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23, 21-48.
- Kirsch-Volders, M., De Boeck, M., Lison, D., 2002. Génotoxicité et activité professionnelle. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Toxicologie-Pathologie professionnelle.*
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P., 1997. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res* 392, 19-30.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res* 540, 153-163.
- Kronic, A., Haveric, S., Ibrulj, S., 2005. Micronuclei frequencies in peripheral blood lymphocytes of individuals exposed to depleted uranium. *Arh Hig Rada Toksikol* 56, 227-232.
- Kryscio, A., Ulrich Muller, W.U., Wojcik, A., Kotschy, N., Grobelny, S., Streffer, C., 2001. A cytogenetic analysis of the long-term effect of uranium mining on peripheral lymphocytes using the micronucleus-centromere assay. *Int J Radiat Biol* 77, 1087-1093.
- Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V., Kastan, M.B., 1992. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7491-7495.
- Kundt, M., Ubios, A.M., Cabrini, R.L., 2000. Effects of uranium poisoning on cultured preimplantation embryos. *Biol Trace Elem Res* 75, 235-244.
- Kurttio, P., Auvinen, A., Salonen, L., Saha, H., Pekkanen, J., Makelainen, I., Vaisanen, S.B., Penttila, I.M., Komulainen, H., 2002. Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 110, 337-342.
- Kurttio, P., Komulainen, H., Leino, A., Salonen, L., Auvinen, A., Saha, H., 2005. Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 113, 68-72.

↳

- La Touche, Y.D., Willis, D.L., Dawydiak, O.I., 1987. Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health Phys* 53, 147-162.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. *Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux.* Masson edition, 1-10.
- Laroche, P., Gérasimo, P., Tréguier, J., 2003. Risques liés à l'uranium appauvri en isotope 235. *Encyclopédie médico-chirurgicale Toxicologie, pathologie professionnelle, Editions scientifiques et médicales Elsevier, 16-008-U-020 vol.*
- Laurier, D., Valenty, M., Tirmarche, M., 2001. Radon exposure and the risk of leukemia: a review of epidemiological studies. *Health Phys* 81, 272-288.
- Le Guen, B., Bérard, P., 1998. Toxicologie-Pathologie professionnelle. *Encyclopédie médico-chirurgicale. Toxicologie, pathologie professionnelle. Vol. 1-6.*
- Le, X.C., Xing, J.Z., Lee, J., Leadon, S.A., Weinfeld, M., 1998. Inducible repair of thymine glycol detected by an ultrasensitive assay for DNA damage. *Science* 280, 1066-1069.
- Leach, L.J., Maynard, E.A., Hodge, H.C., Scott, J.K., Yuile, C.L., Sylvester, G.E., Wilson, H.B., 1970. A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO₂) dust. I. Retention and biologic effect in the monkey, dog and rat. *Health Phys* 18, 599-612.
- Leach, L.J., Yuile, C.L., Hodge, H.C., Sylvester, G.E., Wilson, H.B., 1973. A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO₂) dust. II. Postexposure retention and biologic effects in the monkey, dog and rat. *Health Phys* 25, 239-258.
- Leach, N.T., Jackson-Cook, C., 2004. Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei? *Mutat Res* 554, 89-94.
- Leggett, R.W., 1989. The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys* 57, 365-383.

- Leggett, R.W., 1994. Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium. *Health Phys* 67, 589-610.
- Lehnert, A., Dorr, W., Lessmann, E., Pawelke, J., 2008. RBE of 10 kV X rays determined for the human mammary epithelial cell line MCF-12A. *Radiat Res* 169, 330-336.
- Lehnert, A., Lessmann, E., Pawelke, J., Dorr, W., 2006. RBE of 25 kV X-rays for the survival and induction of micronuclei in the human mammary epithelial cell line MCF-12A. *Radiat Environ Biophys* 45, 253-260.
- Lehnert, B.E., Goodwin, E.H., 1997a. A new mechanism for DNA alterations induced by alpha particles such as those emitted by radon and radon progeny. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 5, 1095-1101.
- Lehnert, B.E., Goodwin, E.H., Deshpande, A., 1997b. Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. *Cancer Res* 57, 2164-2171.
- Lemercier, V., Millot, X., Ansoborlo, E., Menetrier, F., Flury-Herard, A., Rousselle, C., Scherrmann, J.M., 2003. Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiat Prot Dosimetry* 105, 243-245.
- Leonard, B.E., 2008. A composite microdose Adaptive Response (AR) and Bystander Effect (BE) model-application to low LET and high LET AR and BE data. *Int J Radiat Biol* 84, 681-701.
- Lestaevel, P., Houpert, P., Bussy, C., Dhieux, B., Gourmelon, P., Paquet, F., 2005. The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 212, 219-226.
- Li, R., Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., Stillman, B., 1994. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371, 534-537.
- Liang, F., Han, M., Romanienko, P.J., Jasin, M., 1998. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5172-5177.
- Lin, R.H., Wu, L.J., Lee, C.H., Lin-Shiau, S.Y., 1993. Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 319, 197-203.
- Lingle, W.L., Lutz, W.H., Ingle, J.N., Maihle, N.J., Salisbury, J.L., 1998. Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2950-2955.
- Little, M.P., 2002. Comments on the paper: Microsatellite instability in acute myelocytic leukaemia developed from A-bomb survivors. *Int J Radiat Biol* 78, 441-443.
- Livingston, G.K., Foster, A.E., Elson, H.R., 1993. Effect of in vivo exposure to iodine-131 on the frequency and persistence of micronuclei in human lymphocytes. *Journal of toxicology and environmental health* 40, 367-375.
- Lizon, C., Fritsch, P., 1999. Chemical toxicity of some actinides and lanthanides towards alveolar macrophages: an in vitro study. *Int J Radiat Biol* 75, 1459-1471.
- Llobet, J.M., Sirvent, J.J., Ortega, A., Domingo, J.L., 1991. Influence of chronic exposure to uranium on male reproduction in mice. *Fundam Appl Toxicol* 16, 821-829.
- Lopez, R., Diaz Sylvester, P.L., Ubios, A.M., Cabrini, R.L., 2000. Percutaneous toxicity of uranyl nitrate: its effect in terms of exposure area and time. *Health Phys* 78, 434-437.
- Lorimore, S.A., Kadhim, M.A., Pocock, D.A., Papworth, D., Stevens, D.L., Goodhead, D.T., Wright, E.G., 1998. Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after alpha-particle irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5730-5733.



- MacDonald, D., Boulton, E., Pocock, D., Goodhead, D., Kadhim, M., Plumb, M., 2001. Evidence of genetic instability in 3 Gy X-ray-induced mouse leukaemias and 3 Gy X-irradiated haemopoietic stem cells. *Int J Radiat Biol* 77, 1023-1031.
- Madic, C., Genet, M., 2001. Propriétés physiques et chimiques de l'uranium. L'uranium de l'environnement à l'Homme: Collection IPSN: Les Ulis. EDP Science (Chapitre 2), 43-82.
- Maffei, F., Fimognari, C., Castelli, E., Stefanini, G.F., Forti, G.C., Hrelia, P., 2000. Increased cytogenetic damage detected by FISH analysis on micronuclei in peripheral lymphocytes from alcoholics. *Mutagenesis* 15, 517-523.
- Maffei, F., Forti, G.C., Castelli, E., Stefanini, G.F., Mattioli, S., Hrelia, P., 2002. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutat Res* 514, 49-58.
- Martin, F., Earl, R., Tawn, E.J., 1991. A cytogenetic study of men occupationally exposed to uranium. *British journal of industrial medicine* 48, 98-102.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 88, 1515-1531.

- Maurisse, R., 2003. Etude des triple-hélices et de leur utilisation pour développer une nouvelle approche de ciblage de gène, Université Paris VII.
- Maynard, E.A., Downs, W.L., Hodge, H.C., 1953. Oral toxicity of uranium compounds. *Pharmacology and toxicology of uranium compounds: New-York*, 1121-1369.
- Maynard, E.A., Randall, C., et al., 1949. Effects of feeding uranium nitrate hexahydrate in the diets of breeding white rats. *J Pharmacol Exp Ther* 95 P, 421-428.
- McClain, D.E., Benson, K.A., Dalton, T.K., Ejnik, J., Emond, C.A., Hodge, S.J., Kalinich, J.F., Landauer, M.A., Miller, A.C., Pellmar, T.C., Stewart, M.D., Villa, V., Xu, J., 2001. Biological effects of embedded depleted uranium (DU): summary of armed forces radiobiology research institute research. *Sci Total Environ* 274, 115-118.
- McDiarmid, M.A., Engelhardt, S., Oliver, M., Gucer, P., Wilson, P.D., Kane, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Handwerger, B., Albertini, R.J., Jacobson-Kram, D., Thorne, C.D., Squibb, K.S., 2004. Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans: a 10-year follow-up. *J Toxicol Environ Health A* 67, 277-296.
- McDiarmid, M.A., Engelhardt, S.M., Oliver, M., Gucer, P., Wilson, P.D., Kane, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Albertini, R.J., Gudi, R., Jacobson-Kram, D., Thorne, C.D., Squibb, K.S., 2006. Biological monitoring and surveillance results of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium. *Int Arch Occup Environ Health* 79, 11-21.
- McDiarmid, M.A., Keogh, J.P., Hooper, F.J., McPhaul, K., Squibb, K., Kane, R., DiPino, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Hamilton, M., Jacobson-Kram, D., Burrows, B., Walsh, M., 2000. Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans. *Environ Res* 82, 168-180.
- McDiarmid, M.A., Squibb, K., Engelhardt, S., Oliver, M., Gucer, P., Wilson, P.D., Kane, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Jacobson-Kram, D., 2001. Surveillance of depleted uranium exposed Gulf War veterans: health effects observed in an enlarged "friendly fire" cohort. *J Occup Environ Med* 43, 991-1000.
- McGeoghegan, D., Binks, K., 2000. The mortality and cancer morbidity experience of workers at the Springfields uranium production facility, 1946-95. *J Radiol Prot* 20, 111-137.
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P., Collins, A., 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res* 288, 47-63.
- McKinnon, P.J., 2004. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep* 5, 772-776.
- McQueney, M.S., Markham, G.D., 1995. Investigation of monovalent cation activation of S-adenosylmethionine synthetase using mutagenesis and uranyl inhibition. *J Biol Chem* 270, 18277-18284.
- Meszaros, G., Bognar, G., Koteles, G.J., 2004. Long-term persistence of chromosome aberrations in uranium miners. *Journal of occupational health* 46, 310-315.
- Métivier, H., Ansoborlo, E., Chazel, V., Gérosimo, P., 2001. L'Uranium dans l'environnement à l'homme : Biocinétique et dosimétrie des expositions à l'uranium. *EDP Sciences & Commissariat à l'Energie Atomique*, 7: 213-238.
- Migliore, L., Cocchi, L., Scarpato, R., 1996. Detection of the centromere in micronuclei by fluorescence in situ hybridization: its application to the human lymphocyte micronucleus assay after treatment with four suspected aneugens. *Mutagenesis* 11, 285-290.
- Miller, A.C., Blakely, W.F., Livengood, D., Whittaker, T., Xu, J., Ejnik, J.W., Hamilton, M.M., Parlette, E., John, T.S., Gerstenberg, H.M., Hsu, H., 1998a. Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride. *Environ Health Perspect* 106, 465-471.
- Miller, A.C., 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, 247-259.
- Miller, A.C., Fuciarelli, A.F., Jackson, W.E., Ejnik, E.J., Emond, C., Strocko, S., Hogan, J., Page, N., Pellmar, T., 1998b. Urinary and serum mutagenicity studies with rats implanted with depleted uranium or tantalum pellets. *Mutagenesis* 13, 643-648.
- Miller, A.C., Stewart, M., Brooks, K., Shi, L., Page, N., 2002a. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *J Inorg Biochem* 91, 246-252.
- Miller, A.C., Xu, J., Stewart, M., Brooks, K., Hodge, S., Shi, L., Page, N., McClain, D., 2002b. Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints. *Radiat Prot Dosimetry* 99, 275-278.
- Miller, A.C., 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.

- Mirto, H., Barrouillet, M.P., Henge-Napoli, M.H., Ansoborlo, E., Fournier, M., Cambar, J., 1999a. Influence of uranium(VI) speciation for the evaluation of in vitro uranium cytotoxicity on LLC-PK1 cells. *Hum Exp Toxicol* 18, 180-187.
- Mirto, H., Henge-Napoli, M.H., Gibert, R., Ansoborlo, E., Fournier, M., Cambar, J., 1999b. Intracellular behaviour of uranium(VI) on renal epithelial cell in culture (LLC-PK1): influence of uranium speciation. *Toxicol Lett* 104, 249-256.
- Mitchel, R.E., Jackson, J.S., Heinmiller, B., 1999. Inhaled uranium ore dust and lung cancer risk in rats. *Health Phys* 76, 145-155.
- Mitchell, S.A., Marino, S.A., Brenner, D.J., Hall, E.J., 2004. Bystander effect and adaptive response in C3H 10T(1/2) cells. *Int J Radiat Biol* 80, 465-472.
- Mollegaard, N.E., Murchie, A.I., Lilley, D.M., Nielsen, P.E., 1994. Uranyl photoprobing of a four-way DNA junction: evidence for specific metal ion binding. *EMBO J* 13, 1508-1513.
- Monleau, M., Bussy, C., Lestaevel, P., Houpert, P., Paquet, F., Chazel, V., 2005. Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations. *Neurosci Lett* 390, 31-36.
- Monleau, M., De Meo, M., Frelon, S., Paquet, F., Donnadiou-Claraz, M., Dumenil, G., Chazel, V., 2006a. Distribution and genotoxic effects after successive exposure to different uranium oxide particles inhaled by rats. *Inhal Toxicol* 18, 885-894.
- Monleau, M., De Meo, M., Paquet, F., Chazel, V., Dumenil, G., Donnadiou-Claraz, M., 2006b. Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicol Sci* 89, 287-295.
- Morris, K.J., Townsend, K.M., Batchelor, A.L., 1989. Studies of alveolar cell morphometry and mass clearance in the rat lung following inhalation of an enriched uranium dioxide aerosol. *Radiat Environ Biophys* 28, 141-154.
- Morrow, P., Gelein, R., Beiter, H., Scott, J., Picano, J., Yuile, C., 1982. Inhalation and intravenous studies of UF₆/UO₂F₂ in dogs. *Health Phys* 43, 859-873.
- Morrow, P.E., Gibb, F.R., Beiter, H.D., 1972. Inhalation studies of uranium trioxide. *Health Phys* 23, 273-280.
- Morrow, P.E., Gibb, F.R., Leach, L.J., 1966. The clearance of uranium dioxide dust from the lungs following single and multiple inhalation exposures. *Health Phys* 12, 1217-1223.
- Mothersill, C., Rea, D., Wright, E.G., Lorimore, S.A., Murphy, D., Seymour, C.B., O'Malley, K., 2001. Individual variation in the production of a 'bystander signal' following irradiation of primary cultures of normal human urothelium. *Carcinogenesis* 22, 1465-1471.
- Mothersill, C., Seymour, C., 1997. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int J Radiat Biol* 71, 421-427.
- Mothersill, C., Seymour, C.B., 2004. Radiation-induced bystander effects--implications for cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 158-164.
- Mould, R.F., 2001. Depleted uranium and radiation-induced lung cancer and leukaemia. *Br J Radiol* 74, 677-683.
- Moustacchi, E., 2000. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat Res* 464, 35-40.
- Mustonen, R., Bouvier, G., Wolber, G., Stohr, M., Peschke, P., Bartsch, H., 1999. A comparison of gamma and neutron irradiation on Raji cells: effects on DNA damage, repair, cell cycle distribution and lethality. *Mutat Res* 429, 169-179.

N

- Nackerdien, Z., Rao, G., Cacciuttolo, M.A., Gajewski, E., Dizdaroglu, M., 1991. Chemical nature of DNA-protein cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions. *Biochemistry* 30, 4873-4879.
- Nagasawa, H., Keng, P., Harley, R., Dahlberg, W., Little, J.B., 1994. Relationship between gamma-ray-induced G₂/M delay and cellular radiosensitivity. *Int J Radiat Biol* 66, 373-379.
- Nagasawa, H., Little, J.B., 1992. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res* 52, 6394-6396.
- Nagasawa, H., Little, J.B., 1999. Unexpected sensitivity to the induction of mutations by very low doses of alpha-particle radiation: evidence for a bystander effect. *Radiat Res* 152, 552-557.
- Narayanan, P.K., Goodwin, E.H., Lehnert, B.E., 1997. Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res* 57, 3963-3971.
- Nathanson, J.A., Bloom, F.E., 1976. Heavy metals and adenosine cyclic 3',5'-monophosphate metabolism: possible relevance to heavy metal toxicity. *Mol Pharmacol* 12, 390-398.

- NCRP, 2007. Development of a biokinetic model for radionuclide-contaminated wounds and procedures for their assessment, dosimetry and treatment. National Council on Radiation Protection and Measurements.
- Nechay, B.R., Thompson, J.D., Saunders, J.P., 1980. Inhibition by uranyl nitrate of adenosine triphosphatases derived from animal and human tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 53, 410-419.
- Nelson, J.M., Brooks, A.L., Metting, N.F., Khan, M.A., Buschbom, R.L., Duncan, A., Miick, R., Braby, L.A., 1996. Clastogenic effects of defined numbers of 3.2 MeV alpha particles on individual CHO-K1 cells. *Radiat Res* 145, 568-574.
- Nelson, W.G., Kastan, M.B., 1994. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* 14, 1815-1823.
- Nigg, E.A., 2002. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* 2, 815-825.
- Niida, H., Nakanishi, M., 2006. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 21, 3-9.
- Norppa, H., Falck, G.C., 2003. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18, 221-233.
- Norppa, H., Renzi, L., Lindholm, C., 1993. Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization. *Mutagenesis* 8, 519-525.

O

- OCDE, 2007. OECD Guideline for Testing of Chemicals. No. 487. In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (MNvit).
- Odagiri, Y., Uchida, H., Shibazaki, S., 1997. Interindividual variation in cytogenetic response to X-ray and colchicine measured with the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res* 381, 1-13.
- Oleinick, N.L., Chiu, S.M., Ramakrishnan, N., Xue, L.Y., 1987. The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Br J Cancer Suppl* 8, 135-140.
- Olive, P.L., 1999. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol* 75, 395-405.
- Olive, P.L., 2002. The comet assay. An overview of techniques. *Methods Mol Biol* 203, 179-194.
- Olive, P.L., Banath, J.P., Durand, R.E., 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* 122, 86-94.
- Olive, P.L., Wlodek, D., Banath, J.P., 1991. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res* 51, 4671-4676.
- Olivieri, G., Bodycote, J., Wolff, S., 1984. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 223, 594-597.
- Orsière, T., De Méo, M., 2005. Génotoxicité et Mutagenèse. Dans *Toxicologie* (A. Viala, A. Botta, Eds). Éditions Lavoisier, 25-46.
- Orsière, T., De Meo, M., Sari-Minodier, I., Botta, A., 2000. Contribution des tests à court terme dans l'évaluation du potentiel cancérigène d'une substance ou d'un mélange de substances. *Les cancers professionnels Tome I* (J.C. Pairon, P. Brochard, J.P. Le Bourgeois, P. Ruffié, Eds), 141-157.
- Orsière, T., Sari-Minodier, I., Decome, L., Botta, C., Iarmarcovai, G., Botta, A., 2005. De la génotoxicologie à la biosurveillance: 28èmes journées nationales de santé au travail dans le BTP : Cancérogènes et BTP, 25-28.
- Orsière, T., Sari-Minodier, I., Iarmarcovai, G., Botta, A., 2006. Genotoxic risk assessment of pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde by use of personal air sampling and analysis of DNA damage in peripheral lymphocytes. *Mutat Res* 605, 30-41.
- Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123, 291-298.

P

- Pampfer, S., Streffer, C., 1989. Increased chromosome aberration levels in cells from mouse fetuses after zygote X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 55, 85-92.
- Paquet, F., Houpert, P., Blanchardon, E., Delissen, O., Maubert, C., Dhieux, B., Moreels, A.M., Frelon, S., Gourmelon, P., 2006. Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys* 90, 139-147.

- Parry, J.M., 1998. Detecting chemical aneuploids: a commentary to 'Aneuploidy: a report of an ECETOC task force'. *Mutat Res* 410, 117-120.
- 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, 126-133.
- Paternain, J.L., Domingo, J.L., Ortega, A., Llobet, J.M., 1989. The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicol Environ Saf* 17, 291-296.
- Pellegata, N.S., Antoniono, R.J., Redpath, J.L., Stanbridge, E.J., 1996. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15209-15214.
- Pellmar, T.C., Fuciarelli, A.F., Ejniak, J.W., Hamilton, M., Hogan, J., Strocko, S., Emond, C., Mottaz, H.M., Landauer, M.R., 1999a. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci* 49, 29-39.
- Pellmar, T.C., Keyser, D.O., Emery, C., Hogan, J.B., 1999b. Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments. *Neurotoxicology* 20, 785-792.
- Perera, F.P., and Weinstein I.B., 2000. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 21: 517-24.
- Periyakaruppan, A., Kumar, F., Sarkar, S., Sharma, C.S., Ramesh, G.T., 2007. Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells. *Arch Toxicol* 81, 389-395.
- Petitot, F., Frelon, S., Moreels, A.M., Claraz, M., Delissen, O., Tournalias, E., Dhieux, B., Maubert, C., Paquet, F., 2007a. Incorporation and distribution of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Health Phys* 92, 464-474.
- Petitot, F., Gautier, C., Moreels, A.M., Frelon, S., Paquet, F., 2007b. Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Radiat Prot Dosimetry* 127, 125-130.
- Petitot, F., Moreels, A.M., 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, 133-139.
- Piechowski, J., Menoux, B., Miele, A., Grappin, L., Guillermin, A., Fottorino, R., Ruffin, M., 2003. Implication du médecin du travail et de l'expert dans la gestion et la dosimétrie d'un incident de contamination : exemple d'une plaie contaminée par le plutonium. *Radioprotection*, 38: 29-50.
- Piwnica-Worms, H., 1999. Cell cycle. *Fools rush in. Nature* 401, 535, 537.
- Plan, Y., Hlatky, L., Hahnfeldt, P., Sachs, R., Loucas, B., Cornforth, M., 2005. Full-color painting reveals an excess of radiation-induced dicentrics involving homologous chromosomes. *Int J Radiat Biol* 81, 613-620.
- Popp, W., Plappert, U., Muller, W.U., Rehn, B., Schneider, J., Braun, A., Bauer, P.C., Vahrenholz, C., Presek, P., Brauksiepe, A., Enderle, G., Wust, T., Bruch, J., Fliedner, T.M., Konietzko, N., Streffer, C., Weitowitz, H.J., Norporth, K., 2000. Biomarkers of genetic damage and inflammation in blood and bronchoalveolar lavage fluid among former German uranium miners: a pilot study. *Radiat Environ Biophys* 39, 275-282.
- Pouget, J.P., 2000. Effet du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire : mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées: Thèse Université Paris XI, Paris.
- Pourahmad, J., Ghashang, M., Ettehad, H.A., Ghalandari, R., 2006. A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity. *Environ Toxicol* 21, 349-354.
- Prabhavathi, P.A., Fatima, S.K., Padmavathi, P., Kumari, C.K., Reddy, P.P., 1995. Sister-chromatid exchanges in nuclear fuel workers. *Mutat Res* 347, 31-35.
- Prabhavathi, P.A., Fatima, S.K., Rao, M.S., Reddy, P.P., 2000. Analysis of chromosomal aberration frequencies in the peripheral blood lymphocytes of smokers exposed to uranyl compounds. *Mutat Res* 466, 37-41.
- Priest, N.D., 2001. Toxicity of depleted uranium. *Lancet* 357, 244-246.
- Prise, K.M., 1994. Use of radiation quality as a probe for DNA lesion complexity. *Int J Radiat Biol* 65, 43-48.
- Prise, K.M., Ahnstrom, G., Belli, M., Carlsson, J., Frankenberg, D., Kiefer, J., Loblrich, M., Michael, B.D., Nygren, J., Simone, G., Stenerlow, B., 1998a. A review of dsb induction data for varying quality radiations. *Int J Radiat Biol* 74, 173-184.
- Prise, K.M., Belyakov, O.V., Folkard, M., Michael, B.D., 1998b. Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *Int J Radiat Biol* 74, 793-798.

- Racine, R., Gueguen, Y., Gourmelon, P., Veysiere, G., 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.
- Radford, I.R., 1986. Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 49, 611-620.
- Ramirez, M.J., Surralles, J., Puerto, S., Creus, A., Marcos, R., 1997. Aneugenic activity in human cultured lymphocytes. An overall study with colchicine using the micronucleus assay and fluorescence in situ hybridization techniques. *Mutagenesis* 12, 405-410.
- Reliene, R., Schiestl, R.H., 2003. Mouse models for induced genetic instability at endogenous loci. *Oncogene* 22, 7000-7010.
- Reznikoff, C.A., Bertram, J.S., Brankow, D.W., Heidelberger, C., 1973. Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division. *Cancer Res* 33, 3239-3249.
- Ribera, D., Labrot, F., Tisnerat, G., Narbonne, J.F., 1996. Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects. *Rev Environ Contam Toxicol* 146, 53-89.
- Ritz, B., 1999. Radiation exposure and cancer mortality in uranium processing workers. *Epidemiology* 10, 531-538.
- Ritz, B., Morgenstern, H., Crawford-Brown, D., Young, B., 2000. The effects of internal radiation exposure on cancer mortality in nuclear workers at Rocketdyne/Atomics International. *Environ Health Perspect* 108, 743-751.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., Bonner, W.M., 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146, 905-916.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., Bonner, W.M., 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.
- Rogel, A., Carre, N., Amoros, E., Bonnet-Belfais, M., Goldberg, M., Imbernon, E., Calvez, T., Hill, C., 2005. Mortality of workers exposed to ionizing radiation at the French National Electricity Company. *Am J Ind Med* 47, 72-82.
- Roscoe, R.J., 1997. An update of mortality from all causes among white uranium miners from the Colorado Plateau Study Group. *Am J Ind Med* 31, 211-222.
- Rosefort, C., Fauth, E., Zankl, H., 2004. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis* 19, 277-284.
- Ross, G.M., Eady, J.J., Mithal, N.P., Bush, C., Steel, G.G., Jeggo, P.A., McMillan, T.J., 1995. DNA strand break rejoining defect in *xrs-6* is complemented by transfection with the human Ku80 gene. *Cancer Res* 55, 1235-1238.
- Rosler, U., Hornhardt, S., Seidl, C., Muller-Laue, E., Walsh, L., Panzer, W., Schmid, E., Senekowitsch-Schmidtke, R., Gomolka, M., 2006. The sensitivity of the alkaline comet assay in detecting DNA lesions induced by X rays, gamma rays and alpha particles. *Radiat Prot Dosimetry* 122, 154-159.
- Rothkamm, K., Lohrich, M., 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5057-5062.
- Rouyer, V., 2001. L'uranium, matière fissile et risque de criticité. L'uranium de l'environnement à l'Homme: Collection IPSN: Les Ulis. EDP Science (Chapitre 4), 115-144.
- Russo, A., Priante, G., Tommasi, A.M., 1996. PRINS localization of centromeres and telomeres in micronuclei indicates that in mouse splenocytes chromatid non-disjunction is a major mechanism of aneuploidy. *Mutat Res* 372, 173-180.
- Rydberg, B., Johanson, K.J., 1978. Estimation of single strand breaks in mammalian cells. *DNA Repair Mechanisms*, 465-468.



- Salnikow, K., Zhitkovich, A., 2008. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem Res Toxicol* 21, 28-44.
- Sankaranarayanan, K., von Duyn, A., Loos, M.J., Natarajan, A.T., 1989. Adaptive response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes or X-rays. *Mutat Res* 211, 7-12.
- Sarasin, A., Stry, A., 1997. Human cancer and DNA repair-deficient diseases. *Cancer Detect Prev* 21, 406-411.
- Sari-Minodier, I., Orsiere, T., Auquier, P., Martin, F., Botta, A., 2007. Cytogenetic monitoring by use of the micronucleus assay among hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation. *Mutat Res* 629, 111-121.

- Sari-Minodier, I., Orsiere, T., Bellon, L., Pompili, J., Sapin, C., Botta, A., 2002. Cytogenetic monitoring of industrial radiographers using the micronucleus assay. *Mutat Res* 521, 37-46.
- Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S., 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res* 519, 103-119.
- Sato, K., Hayami, R., Wu, W., Nishikawa, T., Nishikawa, H., Okuda, Y., Ogata, H., Fukuda, M., Ohta, T., 2004. Nucleophosmin/B23 is a candidate substrate for the BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 279, 30919-30922.
- Saunders, W.S., Shuster, M., Huang, X., Gharaibeh, B., Enyenihi, A.H., Petersen, I., Gollin, S.M., 2000. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 303-308.
- Savio, M., Stivala, L.A., Scovassi, A.I., Bianchi, L., Prosperi, E., 1996. p21waf1/cip1 protein associates with the detergent-insoluble form of PCNA concomitantly with disassembly of PCNA at nucleotide excision repair sites. *Oncogene* 13, 1591-1598.
- Scarpato, R., Landini, E., Migliore, L., 1996. Acrocentric chromosome frequency in spontaneous human lymphocyte micronuclei, evaluated by dual-colour hybridization, is neither sex- nor age-related. *Mutat Res* 372, 195-204.
- Schins, R.P., 2002. Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhal Toxicol* 14, 57-78.
- Schins, R.P., Borm, P.J., 1999. Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Ann Occup Hyg* 43, 7-33.
- Scholz, M., Kraft-Weyrather, W., Ritter, S., Kraft, G., 1994. Cell cycle delays induced by heavy ion irradiation of synchronous mammalian cells. *Int J Radiat Biol* 66, 59-75.
- Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P., Panyutin, I.G., Bonner, W.M., 2002. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* 158, 486-492.
- Seoane, A.I., Dulout, F.N., 2001. Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mutat Res* 490, 99-106.
- Shadley, J.D., Wolff, S., 1987. Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis* 2, 95-96.
- Shugart, L.R., McCarthy, J.F., Halbrook, R.S., 1992. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Anal* 12, 353-360.
- Siddiqi, M.A., Bothe, E., 1987. Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration. *Radiat Res* 112, 449-463.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.
- Song, E.Y., Rizvi, S.M., Qu, C.F., Raja, C., Yuen, J., Li, Y., Morgenstern, A., Apostolidis, C., Allen, B.J., 2008. The cytokinesis-block micronucleus assay as a biological dosimeter for targeted alpha therapy. *Phys Med Biol* 53, 319-328.
- Sonoda, E., Matsusaka, T., Morrison, C., Vagnarelli, P., Hoshi, O., Ushiki, T., Nojima, K., Fukagawa, T., Waizenegger, I.C., Peters, J.M., Earnshaw, W.C., Takeda, S., 2001. Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. *Dev Cell* 1, 759-770.
- Souidi, M., Gueguen, Y., Linard, C., Dudoignon, N., Grison, S., Baudelin, C., Marquette, C., Gourmelon, P., Aigueperse, J., Dublineau, I., 2005. In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* 214, 113-122.
- Souidi, M., Tissandie, E., Racine, R., Ben Soussan, H., Rouas, C., Grignard, E., Dublineau, I., Gourmelon, P., Lestaavel, P., Gueguen, Y., 2009. [Uranium: properties and biological effects after internal contamination]. *Ann Biol Clin (Paris)* 67, 23-38.
- Speit, G., Hartmann, A., 2005. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol* 291, 85-95.
- Squibb, K.S., Leggett, R.W., McDiarmid, M.A., 2005. Prediction of renal concentrations of depleted uranium and radiation dose in Gulf War veterans with embedded shrapnel. *Health Phys* 89, 267-273.
- Squibb, K.S., McDiarmid, M.A., 2006. Depleted uranium exposure and health effects in Gulf War veterans. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 361, 639-648.
- Stearns, D.M., Yazzie, M., Bradley, A.S., Coryell, V.H., Shelley, J.T., Ashby, A., Asplund, C.S., Lantz, R.C., 2005. Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis* 20, 417-423.
- Stephan, G., Kampen, W.U., Nosske, D., Roos, H., 2005. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of patients treated with radium-224 for ankylosing spondylitis. *Radiat Environ Biophys* 44, 23-28.

- Stiff, T., Walker, S.A., Cerosaletti, K., Goodarzi, A.A., Petermann, E., Concannon, P., O'Driscoll, M., Jeggo, P.A., 2006. ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J* 25, 5775-5782.
- Sunavala-Dossabhoy, G., Balakrishnan, S.K., Sen, S., Nuthalapaty, S., De Benedetti, A., 2005. The radioresistance kinase TLK1B protects the cells by promoting repair of double strand breaks. *BMC Mol Biol* 6, 19.
- Surrallès, J., Natarajan, A.T., 1997. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat Res* 392, 165-174.
- Surrallès, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos, R., 1995. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 341, 169-184.

T

- Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., Takeda, S., 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 17, 5497-5508.
- Taqi Khan, M.M., Martell, A.E., 1969. Kinetics of metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid. IV. Uranyl ion catalyzed oxidation. *J Am Chem Soc* 91, 4668-4672.
- Tasat, D.R., de Rey, B.M., 1987. Cytotoxic effect of uranium dioxide on rat alveolar macrophages. *Environ Res* 44, 71-81.
- Taulan, M., Paquet, F., Maubert, C., Delissen, O., Demaille, J., Romey, M.C., 2004. Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environ Health Perspect* 112, 1628-1635.
- Telle-Lamberton, M., Bergot, D., Gagneau, M., Samson, E., Giraud, J.M., Neron, M.O., Hubert, P., 2004. Cancer mortality among French Atomic Energy Commission workers. *Am J Ind Med* 45, 34-44.
- Teyssier, F., Bay, J.O., Dionet, C., Verrelle, P., 1999. [Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation]. *Bull Cancer* 86, 345-357.
- Thiebault, C., Carriere, M., Milgram, S., Simon, A., Avoscan, L., Guget, B., 2007. Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicol Sci* 98, 479-487.
- Thierens, H., De Ruyck, K., Vral, A., de Gelder, V., Whitehouse, C.A., Tawn, E.J., Boesman, I., 2005. Cytogenetic biodosimetry of an accidental exposure of a radiological worker using multiple assays. *Radiat Prot Dosimetry* 113, 408-414.
- Thierens, H., Vral, A., Barbe, M., Aousalah, B., De Ridder, L., 1999. A cytogenetic study of nuclear power plant workers using the micronucleus-centromere assay. *Mutat Res* 445, 105-111.
- Thierens, H., Vral, A., Barbe, M., Meijlaers, M., Baeyens, A., Ridder, L.D., 2002. Chromosomal radiosensitivity study of temporary nuclear workers and the support of the adaptive response induced by occupational exposure. *Int J Radiat Biol* 78, 1117-1126.
- Thierens, H., Vral, A., Morthier, R., Aousalah, B., De Ridder, L., 2000. Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagenesis* 15, 245-249.
- Thomas, P., Umegaki, K., Fenech, M., 2003. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* 18, 187-194.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206-221.
- Tiku, A.B., Kale, R.K., 2004. Adaptive response and split-dose effect of radiation on the survival of mice. *J Biosci* 29, 111-117.
- Tinwell, H., Ashby, J., 1991. Micronucleus morphology as a means to distinguish aneugens and clastogens in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutagenesis* 6, 193-198.
- Tirmarche, M., Baysson, H., Telle-Lamberton, M., 2004. [Uranium exposure and cancer risk: a review of epidemiological studies]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 52, 81-90.
- Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, 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. *Biochimica et biophysica acta* 1770, 266-272.
- Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J.M., Paquet, F., Aigueperse, J., Souidi, M., 2006. Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Arch Toxicol* 80, 473-480.

- Tokarskaya, Z.B., Okladnikova, N.D., Belyaeva, Z.D., Drozhko, E.G., 1997. Multifactorial analysis of lung cancer dose-response relationships for workers at the Mayak nuclear enterprise. *Health Phys* 73, 899-905.
- Touil, N., Aka, P.V., Buchet, J.P., Thierens, H., Kirsch-Volders, M., 2002. Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionizing radiation using biomarkers for DNA damage and repair. *Mutagenesis* 17, 223-232.
- Tournier, B.B., Frelon, S., Turlonias, 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.
- Tubiana, M., Dutreix, M., Wambersie, A., 1986. Effets des rayonnements sur les molécules d'ADN et les chromosomes. *Radiobiologie*, 33-71.
- 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, 1417-1424.

U

- Ubios, A.M., Guglielmotti, M.B., Steimetz, T., Cabrini, R.L., 1991. Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ Res* 54, 17-23.
- Ubios, A.M., Marzorati, M., Cabrini, R.L., 1997. Skin alterations induced by long-term exposure to uranium and their effect on permeability. *Health Phys* 72, 713-715.
- Uijt de Haag, P.A., Smetsers, R.C., Witlox, H.W., Krus, H.W., Eisenga, A.H., 2000. Evaluating the risk from depleted uranium after the Boeing 747-258F crash in Amsterdam, 1992. *Journal of hazardous materials* 76, 39-58.
- Umegaki, K., Fenech, M., 2000. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis* 15, 261-269.
- UNEP, 2002. Depleted Uranium in Serbia & Montenegro: Post-Conflict Assessment in the Federal Republic of Yugoslavia. United Nations Environment Program (UNEP) Geneva.
- UNEP, 2003. Depleted Uranium in Bosnia & Herzegovina : Post-Conflict Environmental Assessment. United Nations Environment Program (UNEP) Geneva.
- UNSCEAR, 2000. Vol. II: Effects. In: Nations, U. (Ed.) Sources and effects of ionizing radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, New York, USA, p. 580.
- Uphoff, C.C., Gignac, S.M., Drexler, H.G., 1992. Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines. II. Elimination with various antibiotics. *J Immunol Methods* 149, 55-62.

V

- Vacquier, B., Rogel, A., Leuraud, K., Caer, S., Acker, A., Laurier, D., 2009. Radon-associated lung cancer risk among French uranium miners: modifying factors of the exposure-risk relationship. *Radiat Environ Biophys* 48, 1-9.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H., Kanaar, R., 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2, 196-206.
- Viala, M., 2001. Utilisation industrielle de l'uranium. L'uranium de l'environnement à l'Homme: Collection IPSN: Les Ulis. EDP Science (Chapitre 3), 83-114.
- Vidaud, C., Dedieu, A., Basset, C., Plantevin, S., Dany, I., Pible, O., Quemeneur, E., 2005. Screening of human serum proteins for uranium binding. *Chem Res Toxicol* 18, 946-953.
- von Sonntag, C., 1987. The chemical basis of radiation biology: New York, Taylor & Francis, 117-166 and 221-294.

W

- Wakata, A., Sasaki, M.S., 1987. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutat Res* 190, 51-57.
- Ward, J.F., 1985. Biochemistry of DNA lesions. *Radiat Res Suppl* 8, S103-111.
- WHO, 1993. Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155 -Biomarkers and risk assessment: Concepts and principles.
- WHO, 2001. Depleted uranium: Sources, exposure and health effects.
- WHO, 2004. Guidelines for drinking water quality, third edition. Chap. 9: radiological quality of drinking water. In Guidelines for drinking water quality World Health Organization, 197-209.
- WHO, 2006. Guidelines for drinking-water quality: incorporation first addendum. Vol. 1, Recommendations, 3rd ed.
- Wiklund, S.J., Agurell, E., 2003. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis* 18, 167-175.
- Wilson, D.M., 3rd, Barsky, D., 2001. The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res* 485, 283-307.
- Wrenn, M.E., 1994. A comprehensive metabolic model for uranium metabolism and dosimetry based on human and animal data. *Radiat Prot Dosimetry*. 53:255-258.
- Wrenn, M.E., Durbin, P.W., Howard, B., Lipsztein, J., Rundo, J., Still, E.T., Willis, D.L., 1985. Metabolism of ingested U and Ra. *Health Phys* 48, 601-633.
- Wrenn, M.E., Durbin, P.W., Willis, D.L., 1987. The potential toxicity of uranium in water, *Journal of the American Water Works Association*, 79 (4): 177.
- Wu, L.J., Randers-Pehrson, G., Xu, A., Waldren, C.A., Geard, C.R., Yu, Z., Hei, T.K., 1999. Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4959-4964.

X

- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D., 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.

Y

- Yamada, Y., Oghiso, Y., Enomoto, H., Ishigure, N., 2002. Induction of micronuclei in a rat alveolar epithelial cell line by alpha particle irradiation. *Radiat Prot Dosimetry* 99, 219-222.
- Yamamoto, K.I., Kikuchi, Y., 1980. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res* 71, 127-131.
- Yang, Z.H., Fan, B.X., Lu, Y., Cao, Z.S., Yu, S., Fan, F.Y., Zhu, M.X., 2002. [Malignant transformation of human bronchial epithelial cell (BEAS-2B) induced by depleted uranium]. *Ai Zheng* 21, 944-948.
- Yazzie, M., Gamble, S.L., Civitello, E.R., Stearns, D.M., 2003. Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chem Res Toxicol* 16, 524-530.

Z

- Zaire, R., Notter, M., Riedel, W., Thiel, E., 1997. Unexpected rates of chromosomal instabilities and alterations of hormone levels in Namibian uranium miners. *Radiat Res* 147, 579-584.
- Zhou, B.B., and Elledge S.J., 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408 : 433-9.
- Zhou, J., Liu, W., Sun, L., Sun, H., Tang, Y., 2000. Multiple defects of cell cycle checkpoints in U937-ASPI3K, an U937 cell mutant stably expressing anti-sense ATM gene cDNA. *J Tongji Med Univ* 20, 273-276.
- Zhu, G., Xiang, X., Chen, X., Wang, L., Hu, H., Weng, S., 2009. Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats. *Arch Toxicol* 83, 37-46.

GLOSSAIRE



A

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

Actinides : Famille d'éléments chimiques plus lourds que l'Actinium (numéro atomique 89). Quatre actinides existent à l'état naturel : l'Actinium (89), le Thorium (90), le Protactinium (91) et l'Uranium (92).

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

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

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

Atome : c'est la plus petite partie d'un corps simple pouvant se combiner chimiquement avec une autre. Il est généralement constitué d'un noyau composé de protons et de neutrons autour desquels orbitent des électrons. Sa taille caractéristique est de l'ordre du dixième de nanomètre (nm), soit 10-10 m.

B

Becquerel (symbole : Bq) : unité dérivée du Système international (SI) pour l'activité d'un radionucléide et correspond à une désintégration par seconde.

Biomarqueur : Indicateur signalant un événement dans un système biologique ou un échantillon et fournissant une mesure de l'exposition, de l'effet, ou de la susceptibilité. Un tel indicateur peut être de nature chimique, biochimique, physiologique, comportementale ou toute autre altération au sein d'un organisme.

Biomarqueur d'exposition : Biomarqueur qui relie l'exposition à un xénobiotique aux concentrations de cette substance ou de ces métabolites effectivement présentes dans l'organisme. Il est généralement mesuré dans le sang ou les excréta.

Biomarqueur d'effet : Biomarqueur qui sert à évaluer un changement biologique ou biochimique dans les cellules ou les tissus cibles résultant de l'action d'un polluant, ce changement constituant une étape dans le processus pathologique menant à la maladie. Ce type de biomarqueur vise à identifier une manifestation d'effets néfastes pour la santé.

Biomarqueur de susceptibilité : Biomarqueur qui indique une capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre à l'exposition à une substance spécifique.

C

CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation Index) : Index de prolifération calculé avec la formule suivante :

$$CBPI = [\text{Mono} + 2 \cdot \text{Bi} + 3 \cdot (\text{Tri} + \text{Tétra})] / N$$

Avec Mono : nombre de cellules mononucléées

Bi : nombre de cellules binucléées

Tri : nombre de cellules trinucléées

Tétra : nombre de cellules tétranucléées

N : nombre total de cellules comptabilisées

Cellules somatiques : cellules autres que spermatozoïde ou ovule.

Clastogène (événement) : altération de la structure des chromosomes.

Cytotoxicité : phénomène de destruction cellulaire.

D

Désintégration radioactive : Réduction progressive du nombre d'atomes instables (radionucléides) d'une substance causée par la désintégration spontanée des noyaux ou leur transformation en atomes différents, accompagnée de l'émission de particules et (ou) de photons.

Dose : la notion de dose utilisée pour quantifier l'effet des rayonnements ionisants recouvre trois grandeurs différentes :

→ **Dose absorbée** : lorsqu'un rayonnement pénètre la matière, il interagit avec elle et lui transfère de l'énergie. La dose absorbée par la matière caractérise ce transfert d'énergie. Elle correspond donc à la quantité d'énergie absorbée en un point par unité de masse de matière (inerte ou vivante). C'est une grandeur directement mesurable et s'exprime en grays (Gy) ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$).

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

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

E

Équivalent de dose engagée : L'équivalent de dose engagée est l'équivalent de dose efficace reçue au cours des 50 ans suivant l'incorporation d'un radionucléide. L'équivalent de dose efficace est le paramètre permettant de quantifier le risque accru, du fait d'une exposition à des rayonnements ionisants, essentiellement mesuré par l'excès du nombre de cancers mortels ou de maladies héréditaires.

Espèces réactives de l'oxygène (ERO) : Intermédiaires réactifs du métabolisme de l'oxygène, radicalaires ou non-radicalaires (par exemple le peroxyde d'hydrogène H₂O₂).

F

Fissile : Se dit d'un nucléide dont les noyaux sont susceptibles de subir une fission sous l'effet de neutrons de toutes énergies, aussi faibles soient-elles. La fission fait référence à la division d'un noyau lourd en deux fragments dont les masses sont du même ordre de grandeur, qui s'accompagne de l'émission de neutrons, de rayons γ et d'une quantité d'énergie élevée.

G

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

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

Groupe VI (classification de Mendeleïev) : Le groupe 6 du tableau périodique des éléments contient les éléments chimiques suivant: chrome (Cr), molybdène (Mo), Tungstène (W), seaborgium (Sg), néodyme (Nd) et uranium (U). Le nom "groupe 6" est le nouveau nom UICPA pour ce groupe. Il était connu avant sous le nom "groupe VIA" dans le système européen ou groupe "VIB" dans le système américain.

H

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

I

Isotopes : Nucléides ayant le même nombre de protons au sein de leur noyau et, de ce fait, le même numéro atomique mais ayant un nombre de neutrons différents et donc une masse atomique différente. Par exemple, les isotopes 235 et 238 de l'uranium possèdent le même nombre d'électrons et le même nombre de protons (92), mais 143 neutrons pour l'isotope 235 et 146 pour l'uranium 238. Les isotopes d'un même élément se comportent de manière identique d'un point de vue chimique et possèdent des propriétés physiques comparables (point de fusion, point d'ébullition, volatilité) excepté concernant leurs caractéristiques radioactives (période radioactive, activité spécifique, mode de décroissance, etc.) qui sont spécifiques d'un isotope donné.

L

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

M

Métaux lourds : La notion de métaux lourds est actuellement une notion relativement floue, sans définition scientifique, technique ou juridique qui soit unanimement reconnue. Certains auteurs indiquent ainsi que "l'appellation métaux lourds est cependant une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni application juridique". Dans le cadre de ce glossaire, nous retiendrons donc la définition proposée par Ramade (1998) selon laquelle cette expression désigne l'ensemble des métaux toxiques de forte masse atomique (plomb, mercure, zinc, cadmium, etc.).

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

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

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

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

N

Nucléide (du latin: nucleus) : c'est un type de noyau atomique caractérisé par le nombre de protons et de neutrons qu'il contient.

Neutron : Particule subatomique. Comme son nom l'indique, le neutron est neutre et n'a donc pas de charge électrique (ni positive, ni négative). Les neutrons, avec les protons, sont les constituants du noyau de l'atome. Pour un atome, on note Z le nombre de protons (que l'on appelle nombre atomique ou numéro atomique), A le nombre de protons + neutrons. Le nombre de neutrons est donc N ou A-Z.

P

Période radioactive (ou de demi-vie) : temps au bout duquel la moitié des atomes radioactifs initialement présents a disparu par transformation spontanée.

Proton : Particule constitutive du noyau atomique, de charge électrique positive égale numérique à celle de l'électron, mais de masse 1840 fois plus grande (voisine de celle du neutron).

R

Radioactivité : Propriété de certains éléments chimiques dont les noyaux se désintègrent spontanément pour former d'autres éléments en émettant des rayonnements ionisants.

Radionucléide (synonyme radioélément, radioisotope) : Élément chimique possédant une radioactivité naturelle ou artificielle. Les radioéléments existent soit à l'état naturel soit sont fabriqués artificiellement et obtenu après bombardement de noyaux atomiques stables par des faisceaux de particules. Les noyaux en se désintégrant vont émettre soit un rayonnement électromagnétique (rayons gamma, rayons X) soit un rayonnement constitué de particules (particules alpha, électrons) soit les deux en même temps.

Rayonnement alpha (α) : Emission de particules alpha (noyaux d'hélium 4, fortement ionisant mais très peu pénétrant) à partir du noyau d'un atome instable (radionucléide). Les particules ne transfèrent leur énergie que sur une très courte distance et ne pouvant pénétrer la couche externe de la peau, le rayonnement alpha constitue un danger d'irradiation interne.

Rayonnement bêta (β) : Emission d'électrons ou de positrons à partir du noyau d'un atome instable (radionucléide). Les particules bêta peuvent pénétrer un ou deux cm de tissus biologiques. Elles constituent un danger d'irradiation interne et externe.

Rayonnement gamma (γ) : Emission de photons (rayonnement électromagnétique), porteurs d'énergie mais sans charge, par un atome instable (radionucléide). Le rayonnement gamma est le plus pénétrant des rayonnements.

Rayonnements ionisants : Rayonnements électromagnétiques ou particuliers possédant une énergie associée supérieure à 10 électron-volt (eV). En-deçà de cette valeur en énergie, les radiations sont dites

“non ionisantes” et on y classe notamment les rayonnements ultraviolets ou encore les champs électromagnétiques de très basse fréquence.

Réaction de fission nucléaire : En captant un neutron, l'atome d'uranium alors instable va se scinder et libérer une très grande quantité d'énergie ainsi que 2 à 3 neutrons qui vont à leurs tours fissionner d'autres atomes d'U, c'est le principe de la fission nucléaire. L'énergie libérée par cette réaction est celle exploitée dans les centrales nucléaires. Cependant seul l'isotope 235 de l'U est fissile et l'uranium naturel n'en possède que 0,7 %. Ainsi, avant d'être utilisé comme combustible, l'uranium naturel devra être enrichi en isotope 235 et ce processus s'inscrit dans une suite de transformation de l'U mises en œuvre dans la partie amont du Cycle du combustible nucléaire.

S

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

Sites de dommages multiples (LMDS) : Les LMDS consistent en un grand nombre de lésions simples (dommages aux bases, CSB, CDB et associations ADN/protéine ou ADN/ADN), produites à proximité les unes des autres, sur une courte séquence de la molécule d'ADN

T

Toxicité : Particularité propre à diverses substances dont l'absorption a pour effet de perturber le métabolisme des êtres vivants, provoquant des troubles physiologiques pouvant aller jusqu'à la mort des individus exposés. En fonction de l'intensité et de la rapidité des effets, on distingue une toxicité aiguë, une toxicité subaiguë et une toxicité à long terme encore dénommée toxicité chronique, résultant de l'exposition permanente à de faibles concentrations d'un toxique.

Transfert d'énergie linéique (TEL) : le TEL est la quantité d'énergie transférée au milieu cible par la particule incidente par unité de longueur de trajectoire (unité : keV μm^{-1})

U

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

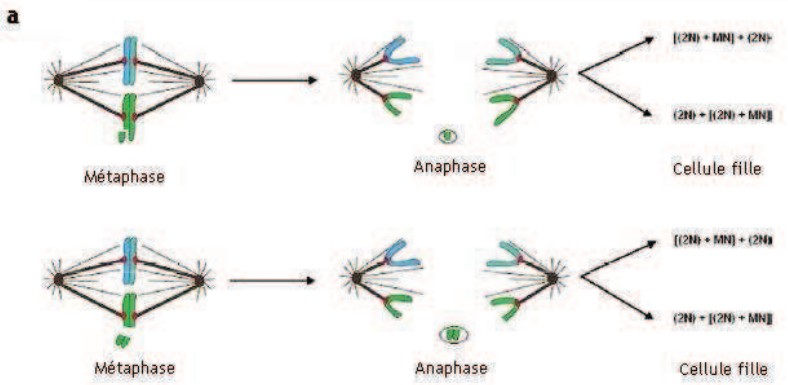
Uranium enrichi : uranium dont la teneur en isotope 235, le seul fissile, a été portée de son faible niveau naturel (0,72% en masse) à, par exemple, 3,5% pour un combustible destiné à un réacteur nucléaire.

ANNEXES

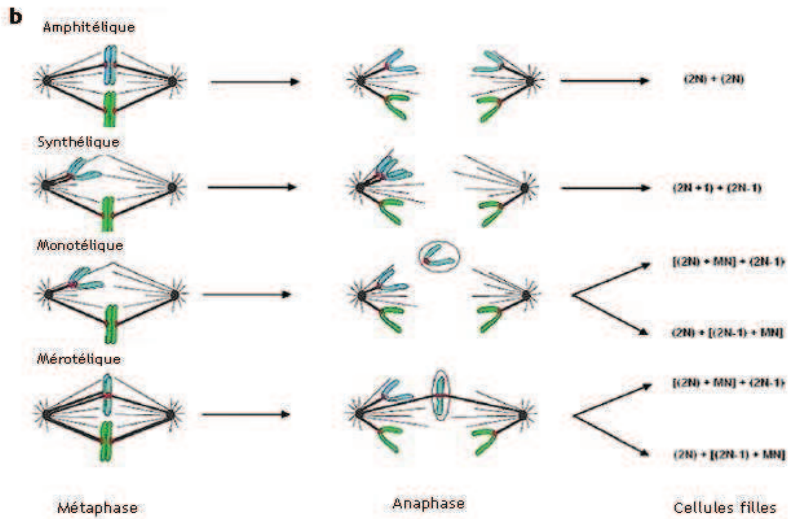
Principaux mécanismes possibles pour la formation des MNx

Les MNx peuvent principalement provenir (Cimini et Degrassi, 2005 ; Mateuca *et al.*, 2006) :

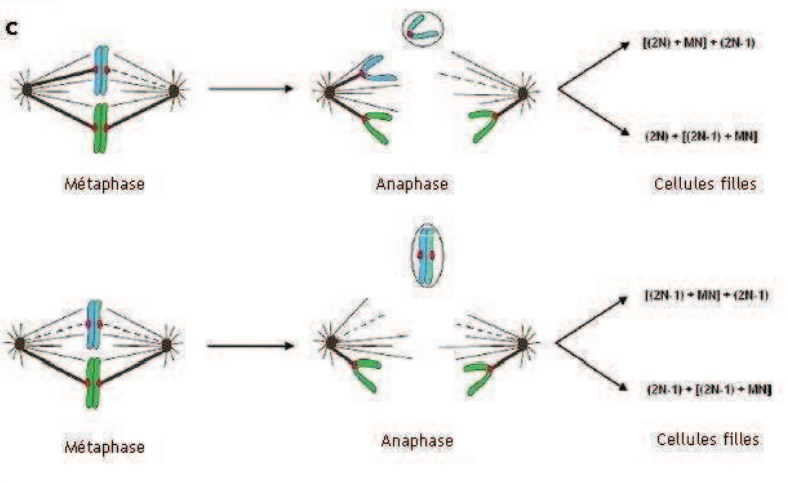
a. de chromosome acentrique/chromatide résultant d'une cassure d'ADN.



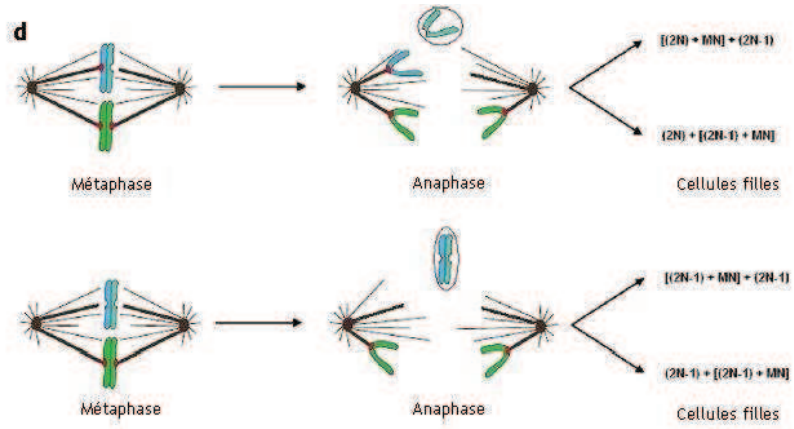
b. de chromosomes entiers (dû à un mauvais attachement des fibres de tubuline sur les kinétochores).



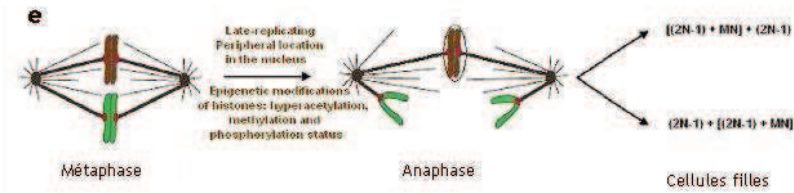
c. de dépolymérisation de la tubuline.



d. de défauts de l'ADN centromérique, des protéines des kinétochores ou dans l'assemblage des kinétochores.



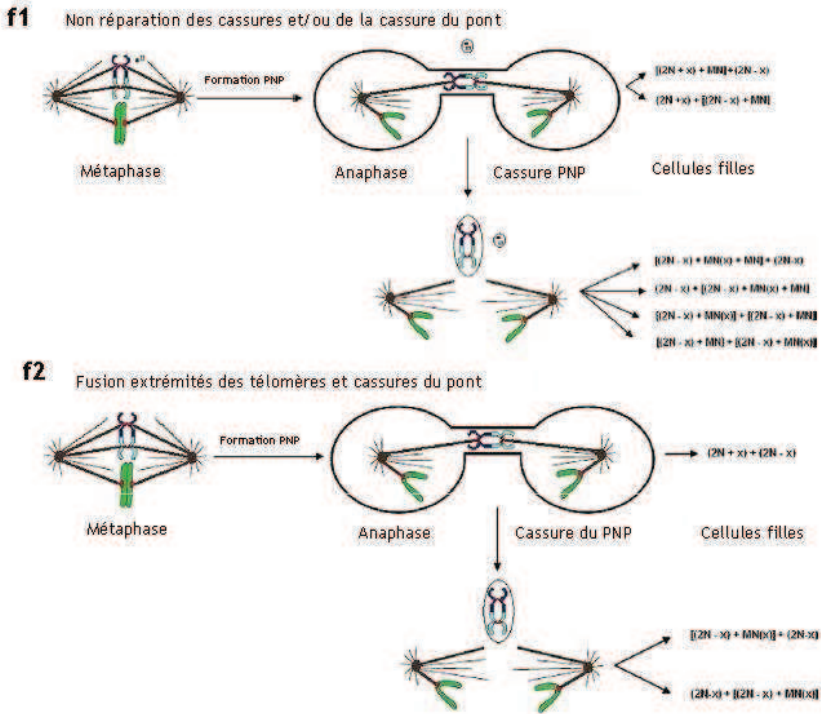
e. d'un retard de réplication, une localisation périphérique dans le noyau et des modifications épigénétiques des histones.



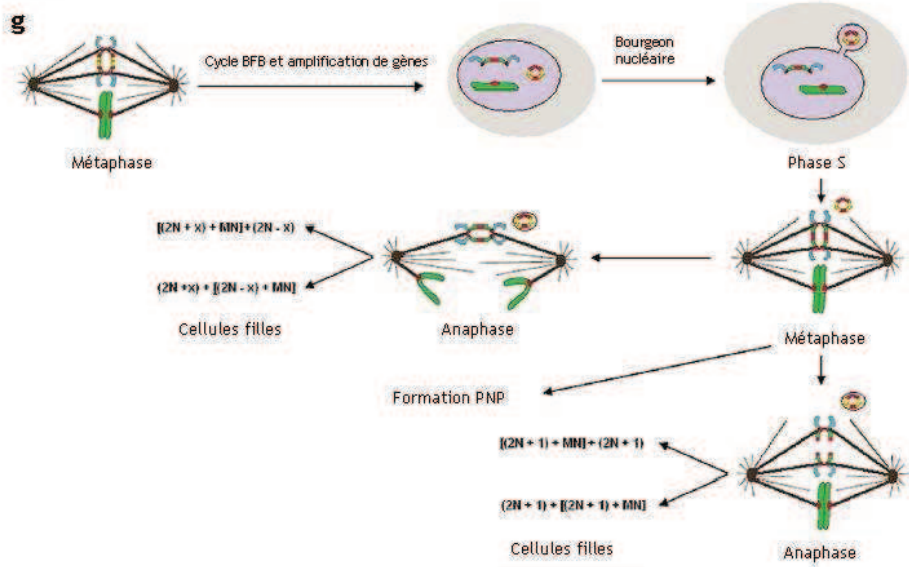
f. de la formation de ponts nucléoplasmiques (PNP) :

f1 : une mauvais réparation d'une cassure de deux chromosome peut mener à réarrangement asymétrique des chromosome produisant un chromosome dicentrique et un fragment acentrique.

f2 : les chromosomes dicentriques peuvent également provenir de la fusion des extrémités des télomères.



g. de l'amplification de gènes via le cycle BFB (Breakage-Fusion-Bridge) : quand l'ADN amplifié est sélectivement localisé en périphérie du noyau et éliminé via un bourgeon nucléaire pendant la phase S du cycle cellulaire.



Protocole de traitement à la DNase



Deoxyribonuclease I, Amplification Grade

Cat. No. 18068-015
Conc.: 1 U/μl

Size: 100 Units
Store at -20°C in a non-frost-free freezer.

Description:

Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (DNase I, Amp Grade) digests single- and double-stranded DNA to oligodeoxy-ribonucleotides containing a 5'-phosphate. It is suitable for eliminating DNA during critical RNA purification procedures such as those prior to RNA-PCR amplification. DNase I, Amp Grade is purified from bovine pancreas and has a specific activity of $\geq 10,000$ U/mg.

Components:

18068-015 DNase I, Amp Grade
Y02340 10X DNase I Reaction Buffer
Y02353 25 mM EDTA (pH 8.0)

Unit Definition:

One unit increases the absorbance of a high molecular weight DNA solution at a rate of 0.001 A_{260} units/min/ml of reaction mixture at 25°C.

Storage Buffer:

20 mM sodium acetate (pH 6.5)
5 mM $CaCl_2$
0.1 mM PMSF
50% (v/v) Glycerol

Unit Assay Conditions:

0.1 M sodium acetate (pH 5.0)
5 mM $MgCl_2$
50 μg/ml calf thymus DNA

10X DNase I reaction Buffer:

200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl

Quality Control:

The ability to digest double-stranded DNA to oligonucleotides is confirmed. DNase I and components are tested for the absence of RNase activity by incubating with 0.24-9.5 Kb RNA Ladder; gel analysis shows no degradation of the RNA ladder as compared to a no-DNase I control.

The enclosed buffers were assayed with the enzyme and met quality control specifications.

Protocols:

Preparation of RNA Sample Prior to RT-PCR:

Prepare duplicate tubes if positive and negative reverse transcriptase (RNA) samples are to be used in the amplification reaction. Add the following to an RNase-free, 0.5-ml microcentrifuge tube on ice:

1 μg RNA sample
1 μl 10X DNase I Reaction Buffer
1 μl DNase I, Amp Grade, 1 U/μl
DEPC-treated water to 10 μl

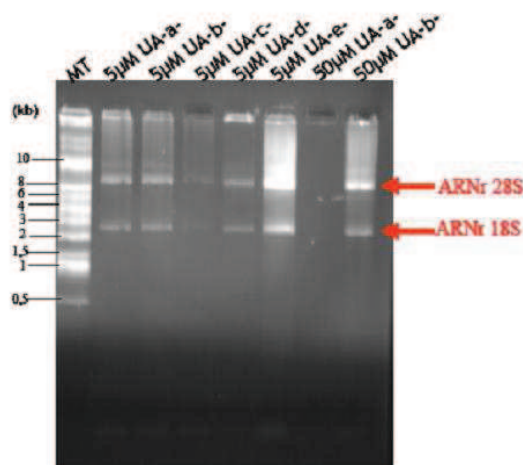
Liste des gènes étudiés sur la plaque Mouse DNA Damage Signaling Pathway Superarray[®]

Position	Unigene	GeneBank	Symbol	Description	Gene Name
A01	Mm.203	NM_009687	Apex1	Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1	APE/Apex
A02	Mm.5088	NM_007499	Atm	Ataxia telangiectasia mutated homolog (human)	AI256621/C030026E19Rik
A03	Mm.10141	NM_009530	Atrx	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked homolog (human)	ATR2/DXHX56677E
A04	Mm.244975	NM_009764	Brc1	Breast cancer 1	BRCA1
A05	Mm.236256	NM_009765	Brc2	Breast cancer 2	AI256696/AW045498
A06	Mm.358656	NM_013733	Chaf1a	Chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	AL023013/AL024058
A07	Mm.16753	NM_007691	Chek1	Checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)	C85740/Chk1
A08	Mm.254181	NM_009963	Cry2	Cryptochrome 2 (photolyase-like)	AV006279/D130054K12Rik
A09	Mm.14910	NM_007790	Smc3	Structural maintenance of chromosomes 3	Bamacan/Cspg6
A10	Mm.2805	NM_018831	Dclre1a	DNA cross-link repair 1A, PSO2 homolog (S. cerevisiae)	2810043H12Rik/AU022226
A11	Mm.280913	NM_007948	Ercc1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1	Ercc-1
A12	Mm.283046	NM_012012	Exo1	Exonuclease 1	Msa
B01	Mm.126106	NM_007985	Fancc	Fanconi anemia, complementation group C	BB116513/Facc
B02	Mm.23122	NM_053081	Fanccg	Fanconi anemia, complementation group G	AU041407/Xrcc9
B03	Mm.2952	NM_007999	Fen1	Flap structure specific endonuclease 1	AW538437
B04	Mm.288909	NM_010247	Xrcc6	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6	70kDa/G22p1
B05	Mm.389750	NM_007836	Gadd45a	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	AA545191/Ddit1
B06	Mm.22700	NM_008186	Gtf2h1	General transcription factor II H, polypeptide 1	62kDa/AW743425
B07	Mm.272533	NM_022011	Gtf2h2	General transcription factor II H, polypeptide 2	44kDa/Btf2p44
B08	Mm.245931	NM_010436	H2afx	H2A histone family, member X	AW228881/H2A.X
B09	Mm.42201	NM_008316	Hus1	Hus1 homolog (S. pombe)	mHus1
B10	Mm.288179	NM_010715	Lig1	Ligase I, DNA, ATP-dependent	AL033288/LigI
B11	Mm.263161	NM_181569	Mare	Alpha globin regulatory element containing gene	Aag/CGTH5A
B12	Mm.259308	NM_010774	Mbd4	Methyl-CpG binding domain protein 4	Med1
C01	Mm.71906	NM_008598	Mgmt	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	AGT/AI267024
C02	Mm.2326	NM_010798	Mif	Macrophage migration inhibitory factor	GIF/Glif
C03	Mm.196006	NM_026810	Mlh1	MutL homolog 1 (E. coli)	1110035C23Rik/AI317206
C04	Mm.311981	XM_900822	Mlh3	MutL homolog 3 (E coli)	AV125803/BB126472
C05	Mm.256299	NM_010822	Moq	N-methylpurine-DNA glycosylase	9830006D05/AI326268
C06	Mm.149071	NM_018736	Mre11a	Meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)	Mre11/Mre11b
C07	Mm.428585	NM_008628	Msh2	MutS homolog 2 (E. coli)	A1788990
C08	Mm.343101	NM_010829	Msh3	MutS homolog 3 (E. coli)	D13Em1/Rep-3
C09	Mm.180333	NM_133250	Mutyh	MutY homolog (E. coli)	5730495A01Rik/Mutyha
C10	Mm.148315	NM_008743	Nth1	Nth (endonuclease III)-like 1 (E.coli)	Nth1/Oct3
C11	Mm.43612	NM_010957	Oqq1	8-oxoquinine DNA-glycosylase 1	Mmh
C12	Mm.277779	NM_007415	Parp1	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	5830444G22Rik/AI893648
D01	Mm.281482	NM_009632	Parp2	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 2	Adprt2/Adprt12
D02	Mm.379214	NM_028228	2610028A01Rik	RIKEN cDNA 2610028A01 gene	221040316Rik/67-11-3
D03	Mm.60499	NM_153556	Pms1	Postmeiotic segregation increased 1 (S. cerevisiae)	MGC36491
D04	Mm.2950	NM_008886	Pms2	Postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)	AW555130/Pmsl2
D05	Mm.16549	NM_011131	Pold1	Polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit	125kDa
D06	Mm.37562	NM_133692	Pold3	Polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit	2410142G14Rik/C85233
D07	Mm.35061	NM_011132	Pole	Polymerase (DNA directed), epsilon	POLE
D08	Mm.311585	NM_030715	Polh	Polymerase (DNA directed), eta (RAD 30 related)	RAD30A/XPV
D09	Mm.244352	NM_011972	Poli	Polymerase (DNA directed), iota	Rad30b
D10	Mm.89926	NM_012048	Polk	Polymerase (DNA directed), kappa	Dinb1
D11	Mm.71	NM_011159	Prkdc	Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide	A1326420/AU019811
D12	Mm.6856	NM_013917	Pttg1	Pituitary tumor-transforming 1	AW555095/C87862
E01	Mm.38376	NM_011232	Rad1	RAD1 homolog (S. pombe)	RAD1
E02	Mm.248489	NM_011233	Rad17	RAD17 homolog (S. pombe)	9430035O09Rik/MmRad24
E03	Mm.103812	NM_021385	Rad18	RAD18 homolog (S. cerevisiae)	2810024C04Rik/Rad18sc
E04	Mm.182628	NM_009009	Rad21	RAD21 homolog (S. pombe)	SCC1/mKIAA0078
E05	Mm.255539	NM_009010	Rad23a	RAD23a homolog (S. cerevisiae)	2310040P19Rik/AL024030
E06	Mm.4888	NM_009012	Rad50	RAD50 homolog (S. cerevisiae)	Mrell/Rad50l
E07	Mm.434303	NM_011234	Rad51	RAD51 homolog (S. cerevisiae)	AV304093/Rad51a
E08	Mm.37376	NM_053269	Rad51c	Rad51 homolog c (S. cerevisiae)	Rad51l2
E09	Mm.341756	NM_009014	Rad51l1	RAD51-like 1 (S. cerevisiae)	AI553500/R51H2
E10	Mm.149	NM_011236	Rad52	RAD52 homolog (S. cerevisiae)	Rad52yh
E11	Mm.277629	NM_011237	Rad9	RAD9 homolog (S. pombe)	RAD9
E12	Mm.320090	NM_144912	Rad9b	RAD9 homolog B (S. cerevisiae)	A630082N15Rik/BC021784

F01	Mm.12145	NM_009030	Rbbp4	Retinoblastoma binding protein 4	mRbAp48
F02	Mm.426069	NM_009032	Rbm4	RNA binding motif protein 4	4921506122Rik/Mlark
F03	Mm.259294	NM_019570	Rev1	REV1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	1110027123Rik/AU022044
F04	Mm.281011	NM_009289	Slk	STE20-like kinase (<i>yeast</i>)	9A2/AV021402
F05	Mm.26412	NM_019710	Smc1a	Structural maintenance of chromosomes 1A	5830426124Rik/SMCB
F06	Mm.38933	NM_053188	Srd5a2	Steroid 5 alpha-reductase 2	SART2
F07	Mm.362118	NM_009460	Sumo1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (<i>yeast</i>)	GMP1/PIC1
F08	Mm.284252	NM_011561	Tdq	Thymine DNA glycosylase	E130317C12Rik/JZA-3
F09	Mm.4306	NM_009352	Terf1	Telomeric repeat binding factor 1	Pin2/Trbf1
F10	Mm.136511	NM_172664	Tlk1	Tousled-like kinase 1	4930545115Rik
F11	Mm.425024	NM_009407	Tnp1	Transition protein 1	Stp-1/TP1
F12	Mm.262117	NM_011637	Trex1	Three prime repair exonuclease 1	1661/AU041952
G01	Mm.222	NM_011640	Trp53	Transformation related protein 53	bb1/bfy
G02	Mm.292904	NM_011644	Trpc2	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 2	3010009007Rik/AI115608
G03	Mm.395649	NM_019668	Ube2a	Ubiquitin-conjugating enzyme E2A, RAD6 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	HHR6A/HR6A
G04	Mm.1393	NM_011677	Ung	Uracil DNA glycosylase	UNG1/UNG2
G05	Mm.228805	NM_011721	Wrm	Werner syndrome homolog (human)	A1846146
G06	Mm.286680	NM_030215	Wrnip1	Werner helicase interacting protein 1	4833444L21Rik/WHIP
G07	Mm.247036	NM_011728	Xpa	Xeroderma pigmentosum, complementation group A	A1573865/Xpac
G08	Mm.2806	NM_009531	Xpc	Xeroderma pigmentosum, complementation group C	XPC
G09	Mm.4347	NM_009532	Xrcc1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	Xrcc-1
G10	Mm.143767	NM_020570	Xrcc2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2	4921524004Rik/8030409M04Rik
G11	Mm.19082	NM_028875	Xrcc3	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3	4432412E01Rik/AI182522
G12	Mm.3065	NM_011917	Xrm2	5'-3' exoribonuclease 2	XRN2
H01	Mm.3317	NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta	A1747421/Gur
H02	Mm.299381	NM_013556	Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	C81579/HPGRT
H03	Mm.2180	NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	90kDa/AL022974
H04	Mm.343110	NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapd
H05	Mm.328431	NM_007393	Actb	Actin, beta, cytoplasmic	Actx/E430023M04Rik
H06	N/A	X03556	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination	MGDC
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC

Vérification de la qualité des ARN extraits et PCR de vérification

La qualité des ARN extraits des cellules contaminées par des concentrations croissantes d'UA ou d'UE (de 5 μM à 500 μM) a été vérifiée d'une part sur gels d'agarose sur lesquels les bandes des ARN ribosomiaux 28S et 18S étaient bien distinctes (cf. Figure), preuve d'un ARN non dégradé, et d'autre part par spectrophotométrie UV. Les valeurs obtenues, présentées dans le Tableau, traduisent l'absence de contamination protéique des ARN extraits au vu du rapport A260/A280 qui est pour toutes les conditions supérieur à 1,5.



Gel d'agarose 2 % TAE 1X révélé au BET après migration d'ARN extraits des cellules C3H10T1/2 contaminées par l'uranium appauvri

Échantillons préparés par addition de colorant : Bleu de bromophénol, Xylène cyanol, Glycérol. Dépôt de 10 μL d'échantillon d'ARN (1 μL ARN + 1 μL Blue Stain 10X + 8 μL H₂O) et de 10 μL de marqueur de taille. Migration à 106 V pendant 40 min. Révélation au BET.

Données spectrophotométriques obtenues pour les ARN extraits des cellules C3H10T1/2 contaminées par l'UA ou l'UE

		Dilution	A260	A280	A320	A260/A280	Concentration en ARN dans la cuve $\mu\text{g/mL}$	Concentration en ARN dans l'échantillon ($\mu\text{g/mL}$)	
C3H10T1/2	UA	0 μM UA	2,076	1,224	0,015	1,70	83,04	332	
		5 μM UA	0,635	0,394	0,005	1,61	25,4	254	
		50 μM UA	0,526	0,318	0,007	1,65	21,04	210	
	UE	500 μM UA	1/10	1,524	0,881	0,011	1,73	60,96	610
		0 μM UE	1/10	1,552	0,881	0,012	1,76	62,06	621
		5 μM UE	1/10	1,502	0,897	0,019	1,67	60,06	601
		50 μM UE	1/10	1,079	0,655	0,011	1,65	43,16	432
		500 μM UE	1/10	0,917	0,521	0,009	1,76	36,68	367

Lors de la PCR de vérification, le gène de la β -2-microglobuline a été amplifié pour tous les échantillons testés. C'est-à-dire pour les trois séries d'ADNc correspondant aux ARN extraits des cellules contaminées par 5 μM , 50 μM et 500 μM d'UA ou d'UE. La réaction de transcription inverse a donc bien fonctionné, l'ADNc peut alors être utilisé pour les plaques permettant l'étude de l'expression des gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN.

*Variations d'expression génique après contamination par différentes concentrations d'UA
ou d'UE12%*

	UA			UE		
	5 μ M	50 μ M	500 μ M	5 μ M	50 μ M	500 μ M
Apex1	0,94	1,15	1,69	0,92	0,96	4,87
Atm	0,62	0,54	0,53	0,74	0,70	0,97
Atrx	0,51	0,54	0,42	1,10	0,68	0,51
Brca1	0,82	0,73	1,09	1,15	1,00	1,18
Brca2	0,97	0,67	0,43	0,86	0,71	0,54
Chaf1a	0,99	0,63	0,95	1,09	0,93	1,38
Chek1	0,87	0,66	1,28	1,02	0,97	2,39
Cry2	0,89	0,60	0,60	1,05	0,85	0,63
Smc3	0,83	0,91	1,50	0,86	0,94	2,12
Dclre1a	0,56	0,65	0,97	0,95	0,86	1,51
Erc1	0,87	1,00	0,57	0,73	0,80	0,92
Exo1	0,71	1,01	1,17	1,25	0,82	1,65
Fancc	0,74	0,59	1,16	0,90	1,11	1,55
Fancg	1,18	0,97	0,64	0,87	0,95	0,47
Fen1	1,02	0,42	2,08	1,22	1,57	3,17
Xrcc6	0,87	0,75	0,70	1,00	1,14	1,03
Gadd45a	1,35	1,03	0,37	0,75	0,99	0,57
Gtf2h1	0,99	0,81	1,35	0,81	1,09	1,85
Gtf2h2	0,75	0,68	0,61	0,75	0,85	0,71
H2afx	1,30	0,99	0,96	0,62	1,29	1,87
Hus1	1,44	1,01	0,77	0,82	0,66	0,86
Lig1	0,79	0,58	1,69	1,08	1,09	2,92
Mare	0,97	0,63	0,63	0,77	0,94	0,64
Mbd4	0,68	0,42	0,34	0,89	1,05	0,40
Mgmt	1,96	1,64	0,50	0,54	0,65	0,24
Mif	0,74	0,92	1,20	0,60	0,72	1,18
Mlh1	1,01	0,80	0,45	0,79	0,88	0,54
Mlh3	1,05	0,65	0,59	0,78	0,93	0,54
Mpg	1,05	0,86	0,27	0,60	0,65	0,20
Mre11a	1,32	0,88	0,83	0,96	1,08	0,87
Msh2	1,13	0,74	0,34	0,82	0,77	0,29
Msh3	0,88	0,50	0,19	0,90	0,84	0,31
Mutyh	1,24	0,76	0,80	0,89	0,99	0,65
Nthl1	1,11	0,36	0,30	0,94	1,01	0,28
Ogg1	1,17	0,57	0,39	0,87	0,89	0,47
Parp1	0,82	0,60	0,99	0,76	1,23	1,21
Parp2	0,93	1,17	0,85	0,92	1,01	0,81
Rik	1,05	0,94	0,81	1,04	1,04	1,48
Pms1	1,07	0,83	0,47	1,07	0,90	0,58
Pms2	1,10	1,15	1,27	1,14	1,12	1,46
Pold1	0,85	0,69	0,76	1,22	1,09	0,91
Pold3	1,13	0,81	1,11	1,14	0,96	1,42
Pole	0,81	0,72	0,52	1,05	0,85	0,59
Polh	0,77	0,61	1,29	0,95	0,93	1,83

	UA			UE		
	5 µM	50 µM	500 µM	5 µM	50 µM	500 µM
Poli	0,99	0,61	0,32	0,87	0,85	0,39
Polk	0,97	0,90	0,90	0,90	0,83	0,98
Prkdc	0,76	0,45	0,28	1,76	0,99	0,39
Pttg1	1,17	0,60	0,40	1,05	0,89	0,41
Rad1	0,69	0,59	0,57	0,61	0,65	0,81
Rad17	1,07	0,98	0,95	0,75	0,85	1,26
Rad18	1,42	0,63	0,54	0,90	0,92	0,65
Rad21	0,81	0,63	0,93	1,06	0,73	1,08
Rad23a	0,86	0,84	0,68	0,73	0,84	0,97
Rad50	0,85	0,77	0,61	0,86	0,69	0,64
Rad51	1,31	0,83	2,29	0,90	1,02	2,25
Rad51c	1,10	0,38	0,26	1,11	0,75	0,25
Rad51l1	0,98	0,48	0,31	1,08	0,84	0,34
Rad52	0,93	0,78	0,51	1,03	0,74	0,85
Rad9	1,08	0,98	1,00	0,78	0,83	1,61
Rad9b	0,72	0,42	0,45	0,86	0,67	0,81
Rbbp4	0,85	0,77	1,30	0,73	0,73	1,52
Rbm4	0,69	0,68	0,64	0,97	0,81	0,95
Rev1	0,75	0,59	0,65	0,76	0,76	0,94
Slk	0,84	0,77	1,13	1,17	0,88	1,34
Smc1a	0,77	0,80	0,77	1,17	0,86	0,85
Srd5a2	1,76	0,43	0,80	0,49	0,66	1,84
Sumo1	0,88	0,94	0,97	0,83	0,86	1,23
Tdg	0,83	0,69	0,79	0,68	0,74	0,97
Terf1	0,90	0,51	0,59	0,99	0,82	0,62
Tlk1	0,76	0,62	0,47	0,95	0,82	0,58
Tnp1	1,84	1,10	0,70	0,49	0,56	1,15
Trex1	0,75	0,47	0,47	0,91	0,78	0,40
Trp53	0,89	0,95	0,88	0,87	0,92	1,55
Trpc2	0,89	0,48	0,70	0,81	0,57	0,67
Ube2a	0,85	0,86	1,13	0,81	0,85	1,32
Ung	1,19	0,96	1,37	1,25	1,12	1,98
Wrn	0,70	0,64	0,32	0,97	0,85	0,22
Wrnip1	0,93	0,67	0,99	0,91	0,96	1,28
Xpa	0,94	1,04	0,17	0,81	0,89	0,11
Xpc	0,92	0,72	0,31	0,76	0,61	0,22
Xrcc1	0,77	0,78	0,70	0,75	0,79	0,70
Xrcc2	1,07	0,76	1,49	0,90	0,93	1,46
Xrcc3	0,79	0,41	0,36	1,02	0,79	0,40
Xrn2	0,52	0,48	0,20	1,04	0,84	0,72

Les gènes répertoriés dans ce tableau présentent une variation d'expression significative par rapport au contrôle avec $P < 0,05$ selon le test du Chi2

Les gènes notés en bleu et en rouge sont respectivement les gènes sous-exprimés ($< 0,5$) et surexprimés (> 2) par rapport au contrôle après contamination à l'UA et à l'UE.

Les gènes notés en rose sont inférieur à 2 (en étant très proche) et les gènes notés en vert supérieur à 0,5 (en étant très proche) mais ils sont significativement différents du contrôle non exposé

PUBLICATIONS

PUBLICATIONS 1

Different genotoxic profiles between depleted and enriched uranium.

Toxicoly Letters



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

Different genotoxic profiles between depleted and enriched uranium

C. Darolles^a, D. Broggio^b, A. Feugier^a, S. Frelon^a, I. Dublineau^c, M. De Meo^d, F. Petitot^{a,*}^a Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale IRSN/DRPH/SRBE/LRTOX, Site du Tricastin - B.P. 166, 26702 Pierrelatte Cedex, France^b Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Laboratoire d'Évaluation de la Dose Interne IRSN/DRPH/SDI/LEDI, BP-17 92262 Fontenay-aux-Roses, France^c Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale IRSN/DRPH/SRBE/LRTOX, BP-17 92262 Fontenay-aux-Roses, France^d Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale (EA 1784), Faculté de Médecine et Pharmacie, Université de la Méditerranée, 27 Bd Jean Moulin, Marseille Cedex 05, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2009

Received in revised form 3 November 2009

Accepted 4 November 2009

Available online 13 November 2009

Keywords:

Depleted uranium

Enriched uranium

Micronucleus

FISH

Aneugen

Clastogen

ABSTRACT

Uranium is an alpha-particle-emitting heavy metal. Its genotoxicity results from both its chemical and its radiological properties that vary with its isotopic composition (12% enriched uranium in ²³⁵U (EU) has a specific activity 20 times higher than 0.3% depleted uranium in ²³⁵U (DU)). The influence of the isotopic composition of uranium on its genotoxic profile (clastogenic/aneugenic) has never been described. The present study evaluated genotoxic profile of uranium with the cytokinesis-block micronucleus centromere assay. C3H10T1/2 mouse embryo fibroblasts were contaminated with either DU or EU at different concentrations (5 μM, 50 μM and 500 μM). Cells received low doses ranging from 0.3 μGy to 760.5 μGy. The frequency of binucleated cells with one micronucleus increased with increasing concentrations of both DU and EU in the same way. EU induced more centromere-negative micronuclei and nucleoplasmic bridges than DU. A correlation between these two clastogenic markers and ionizing radiation doses was observed. Finally, this study showed that the genotoxic profile of uranium depends on its isotopic composition. DU and EU are low and high clastogens, respectively. However, DU aneugenic effects remain high. Thus, there is a need to study the potential role of aneugenic effects of DU in carcinogenic risk assessment linked to uranium internal exposure.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Uranium (U) is an alpha-emitter radioactive element from the actinide group. This is a ubiquitous environmental trace metalloid element which is found in small amounts in food and water supplies as a non-essential inorganic component. In addition to this natural exposure, uranium has also several civilian and military applications that could cause dispersion in the environment (Bleise et al., 2003). Naturally occurring uranium consists of three isotopes – ²³⁴U, ²³⁵U, ²³⁸U – the mass proportions of which are 0.0056%, 0.72% and 99.28%, respectively. The production of nuclear fuel, for most reactor types, or nuclear weapons requires enriching natural uranium in fissile ²³⁵U, which also increases the proportion of highly radioactive ²³⁴U. The by-product of the enrichment process is depleted uranium. Uranium is classified as depleted or enriched

according to the percentage of ²³⁵U present in the isotopic mixture considered (Table 1). Internal exposure to uranium is a major risk for the workers of nuclear fuel cycle industry that can occur accidentally after inhalation, ingestion, or absorption through intact or injured skin. Public main route of exposure to uranium is ingestion via food and water (ATSDR, 1999). Due to its physical (alpha emitter) and chemical (heavy metal) properties, U toxicity results from both chemical and radiological toxicity (Priest, 2001). The biological effects of this radionuclide have been demonstrated in various organs such as bone, kidney, liver, brain, lung, intestine and reproductive system (Ballou et al., 1986; Dublineau et al., 2007; Grignard et al., 2008; Houpert et al., 2005; Kathren and Moore, 1986; Kurttio et al., 2002; Kurttio et al., 2005; Leggett, 1989; Lestaavel et al., 2005, 2009; McClain et al., 2001; Souidi et al., 2005). These effects of U were attributed either to its chemical or to its radiological properties. At the molecular level, U is known to induce DNA damage *in vitro* in Chinese hamster ovary cells (Lin et al., 1993), in human osteoblast cells (Miller et al., 2003; Miller et al., 2002c), in CHO EM9 (Stearns et al., 2005), in normal rat kidney proximal cells (NRK-52E) (Thiebault et al., 2007) and *in vivo* in rat lung cells after inhalation of depleted uranium (DU) (Monleau et al., 2006), as shown by the formation of micronuclei, DNA adducts, sister chromatid exchange, chromosome aberrations as well as double-

Abbreviations: MN, micronucleus; BN-1MN, binucleated cell with one micronucleus; BN-1MNC+, binucleated cell with one centromere-positive micronucleus; BN-1MNC-, binucleated cell with one centromere-negative micronucleus; Mono-MN_x, mononucleated cells with micronuclei; BN-NPB, binucleated cell with nucleoplasmic bridge.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 75 50 75 41; fax: +33 4 75 50 43 26.

E-mail address: fabrice.petitot@irsn.fr (F. Petitot).

Table 1
Isotopic composition and specific activity (Bq g⁻¹) of depleted uranium, natural uranium and 12% enriched uranium in ²³⁵U.

Naturals isotopes of uranium		²³⁴ U	²³⁵ U	²³⁸ U
Depleted uranium	Mass percentage (%)	0.001	0.27	99.8
	Specific activity (Bq g ⁻¹)		1.47 × 10 ⁴	
Natural uranium	Mass percentage (%)	0.0056	0.72	99.28
	Specific activity (Bq g ⁻¹)		2.5 × 10 ⁴	
12% enriched uranium in ²³⁵ U	Mass percentage (%)	0.1248	12.091	87.733
	Specific activity (Bq g ⁻¹)		30.6 × 10 ⁴	

strand breaks. Chromatin loss induced by uranium exposure was demonstrated *in vitro* using the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay developed by Fenech and Morley (Fenech and Morley, 1985a, 1985b). An increase in the frequency of micronuclei (MN) was reported, *in vitro*, in Human osteosarcoma cells (HOS) and in Chinese hamster ovary (CHO) cells which were treated with depleted uranium (DU), as compared to the uncontaminated group (Lin et al., 1993; Miller et al., 2003). These studies concluded that *in vitro* DU exposure resulted in genomic instability. Overall, all these studies demonstrated that U genotoxicity is partly due to alpha particle production which induces mainly DNA double-strand breaks and deletions and is responsible for clastogenic effects (Hei et al., 1997; Miller et al., 2002b). In addition, DU can induce the formation of oxidative DNA damage in the absence of significant radioactive decay. So, the metal toxicity generates an oxidative stress and is responsible for aneugenic effects of uranium (Miller et al., 2002a). However, none of these studies clearly differentiate the clastogenic and aneugenic effects of uranium. Currently, the most widespread and reliable assays that can discriminate between aneugenic and clastogenic effects of test compounds, are based on the CBMN assay. They identify whole chromosomes in MN by labeling their kinetochores or centromeres (see for a review Natarajan et al., 1996). The CREST assay detects kinetochore proteins by immunofluorescence techniques (Degrossi and Tanzarella, 1988; Hennig et al., 1988; Thomson and Perry, 1988), while the FISH assay labels centromeric DNA sequences (Becker et al., 1990; Kirsch-Volders et al., 1997; Migliore et al., 2002; Norppa et al., 1993). Elhajouji et al. (1998) reported a new and easy way to distinguish between aneugenic and clastogenic actions in the CBMN assay. The authors showed that some aneugens increased MN frequencies in mononucleated as well as binucleated cells, whilst clastogens induced MN solely in binucleated cells. This difference may allow discrimination between MN generated by aneugens and clastogens. Moreover, the CBMN assay gives indirect access to dicentric chromosomes, known as markers of a clastogenicity, by counting the nucleoplasmic bridges that result from the presence of a dicentric chromosome during cytokinesis (Fenech, 2006; Thomas et al., 2003; Umegaki and Fenech, 2000). The counting of micronuclei with (centromere-positive micronucleus: BN-1MNC+) and without (centromere-negative micronucleus: BN-1MNC-) centromeres in binucleated cells, the counting of micronuclei in mononucleated cells (Mono-MNx) and the counting of nucleoplasmic bridges (BN-NPB) in binucleated cells could allow differentiating between the clastogenic and aneugenic effects of genotoxic stresses induced by uranium.

Due to the dual toxicity of uranium (chemical and radiological), assessing and understanding its genotoxic risk is complex. Radiotoxic effects of a given isotopic mixture of U vary with its specific activity and so with its enrichment in ²³⁵U (Table 1) (Grignard et al., 2008; Houpert et al., 2005; Lestaavel et al., 2009). The aim of the present work was to assess genotoxic profile of U (clastogenic/aneugenic) as a function of its enrichment with CBMN in combination with the FISH of centromeric DNA probes. The study investigated the genotoxicity of U on mouse embryo fibroblasts contaminated with various concentrations of either depleted ura-

nium (DU: 0.3% ²³⁵U) or enriched uranium (EU: 12% ²³⁵U). Various cytogenetic abnormalities were studied: binucleated cells with one micronucleus (BN-1MN), with or without centromeres (BN-1MNC+ and BN-1MNC-, respectively), mononucleated cells with micronuclei (Mono-MNx), and nucleoplasmic bridges in binucleated cells (BN-NPB). In addition, the microdosimetric approach has been used to study a possible correlation between the ionizing radiation dose delivered by uranium to cells and genotoxicity markers studied.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and U preparation

The mouse embryo fibroblast cell line (C3H10T1/2 clone 8, CCL-226) was obtained from the American Type Culture Collection (LGC Promochem, USA). The C3H10T1/2 cell line harbouring wild-type p53 (Coleman et al., 1994), first developed for studies of neoplastic transformation (Reznikoff et al., 1973), was chosen both for its high genetic stability, which makes it suitable for assessing DNA damage, and for the possibility of evaluating ionizing radiation effects (Calini et al., 2002, 2003; OECD, 2007). Cells were cultured in Eagle's basal medium (BME) supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum and 2 mM L-glutamine (all from Invitrogen, France). They were grown at 37°C in 5% CO₂ at 95% humidity. Fresh medium was added 2 days after seeding. The cells were regularly checked for mycoplasma contamination with DNA-binding fluorescent dye (DAPI) (Uphoff et al., 1992). Cells tested negative for mycoplasma contamination were routinely passaged to maintain exponential growth. A 10 mM DU stock solution was prepared by dissolution of depleted uranyl nitrate in a 100 mM NaHCO₃ solution. The stock solution was stirred to ensure the total dissolution of U and filtered through a 0.22 µm filter unit. A 10 mM EU stock solution was prepared by dilution of the initial solution of enriched uranyl nitrate in a 100 mM NaHCO₃ solution. All uranium solutions were freshly prepared and were not stocked. Untreated controls were exposed in BME containing 100 mM NaHCO₃, Mitomycin C (Sigma Aldrich M0503, CAS Number 50-07-7) and Vincristine sulphate (Sigma-Aldrich V8879, CAS number 2068-78-2), were used as positive clastogenic control and positive aneugenic control, respectively. Experiments were performed with cells between passage 6 and passage 12.

2.2. Cell treatment

Twenty-four hours before contamination, 3 × 10⁶ fibroblasts were seeded per 75 cm² culture flask. Confluent cells (80% in G0-G1) were contaminated either with depleted uranium (DU: 0.3% ²³⁵U; U purity > 99%) or with enriched uranium (EU: 12% ²³⁵U; U purity > 99%). Isotopic composition and specific activity (Bq g⁻¹) of depleted uranium, natural uranium and enriched uranium are detailed in Table 1. DU (specific activity: 1.47 × 10⁴ Bq g⁻¹) and EU (specific activity: 30.6 × 10⁴ Bq g⁻¹) were purchased from AREVA NC (Pierrelatte, France). For each experiment, cells were exposed to DU or EU (0 µM, 5 µM, 50 µM and 500 µM) diluted in culture medium for 24 h at 37°C and 5% CO₂. In these conditions, UO₂(CO₃)₂⁴⁻ is the major U(VI) complex found in media used during cell exposure (Carriere et al., 2005). In biological fluids, theoretical studies of speciation have reported that uranium is mostly bound to carbonate and phosphate (Jones et al., 2002) or large proteins (Chevari and Likhner, 1968). UO₂(CO₃)₂⁴⁻, low molecular weight U(VI) complex could be implicated in U(VI) cellular accumulation and toxicity (Carriere et al., 2005). We chose 24 h of treatment because the population doubling was 24 h. In order to maximise the probability of detecting uranium acting at a specific stage in the cell cycle, it is important that sufficient numbers of cells were treated with the test substance during all stages of their cell cycle (Kirsch-Volders et al., 2003; OECD, 2007). We limited the uranium contamination to a maximum of 500 µM (DU or EU) because beyond this concentration a precipitate formed in the cell culture medium and induced a massive cell death.

Concerning positive genotoxic controls, confluent cells (80% in G0-G1) were contaminated during 24 h, either with Mitomycin C (1.5 µM, clastogenic control) or with Vincristine sulphate (16 µM, aneugenic control). For each condition, duplicate cultures were made.

2.3. Cell death assessment

2.3.1. Cytotoxicity test

Fibroblasts were stained with trypan blue (Invitrogen, Eragny Sur Oise, France) to discriminate between viable and dead cells. Cell mortality was assessed by scoring at least 100 cells three times or more and expressed as a percentage: (dead cells/total cells) × 100. The results were given as mean values with the standard deviation (SD).

2.3.2. Sub G0–G1 cell population assessment

An increase in the percentage of cells in sub G0–G1 was shown to indicate the induction of apoptosis (Chang et al., 2007). The sub G0–G1 cell population was measured in untreated cells (0 μM of DU or EU), cells contaminated with U (5 μM, 50 μM and 500 μM of DU or EU) and cells treated with genotoxic control agents (Mitomycin C and Vincristine sulphate).

Flow cytometric analysis of cellular DNA content was performed. After 24 h of contamination (Uranium, Mitomycin C or Vincristine sulphate), fibroblasts were washed with PBS, trypsinized, fixed and permeabilized with 70% ice-cold ethanol (and stored at –20 °C). Prior to analysis, cells were incubated 30 min at 37 °C with RNase A (final concentration 10 μg ml⁻¹) and stained with propidium iodide (final concentration 50 μg ml⁻¹). For each sample (controls and exposed cells), 20,000 cells were analysed by a FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, France).

The percentage of cells in sub G0–G1 phase was analysed using the standard CellQuest software program (Becton Dickinson, France).

2.4. Uranium measurement

In medium and cell samples, uranium was directly measured by ICP-MS (VG PQ EXCELL, Thermo Electron, France). A multi elemental standard solution (ANALAB SARL, Bischheim, France) was used to optimize the experimental conditions and the different parameters of the apparatus, and then to obtain the best signal/noise ratio for ²³⁸U. In all the samples or calibration solutions likely to be analysed, ²⁰⁹Bi was added as an internal standard, at 1 μg l⁻¹. Six standard solutions for calibration curves were freshly prepared at 0 μg l⁻¹, 0.005 μg l⁻¹, 0.01 μg l⁻¹, 0.1 μg l⁻¹, 0.5 μg l⁻¹ and 1 μg l⁻¹ by dilution of a standard solution at 1 g l⁻¹ in 2% nitric acid (JT Baker grade for metallic trace analysis, Sodipro France) from the medium samples and by dilution of a standard solution at 1 g l⁻¹ in 0.4% nitric acid for the cell samples.

Medium samples containing 0 μM, 5 μM, 50 μM and 500 μM of DU or EU were stirred and then diluted at 2 × 10⁻³, 1 × 10⁻⁴, 1 × 10⁻⁵, 1 × 10⁻⁶ and 1 × 10⁻⁷ respectively in 2% nitric acid before analysis. Cells samples containing 0 μM, 5 μM, 50 μM and 500 μM of DU or EU were stirred and then diluted at 2 × 10⁻¹, 1 × 10⁻¹, 1 × 10⁻¹, 2 × 10⁻³ and 1 × 10⁻⁴ respectively in 0.4% nitric acid before analysis.

2.5. Cytokinesis-block micronucleus assay

The cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) was used to measure chromosome breaks or losses in confluent fibroblasts contaminated with different DU or EU concentrations (0 μM, 5 μM, 50 μM and 500 μM). The CBMN assay was performed according to Fenech (Fenech, 2000). After 24 h of exposure to DU or EU or reference molecules (Mitomycin C and Vincristine sulphate), cells were trypsinized and seeded (2.25 × 10⁶ cells) in 75 cm² flask and cultured at 37 °C in the presence of 5% CO₂ and 95% humidity. Twenty-four hours later, Cytochalasin B was added to the culture medium at a final concentration of 3 μg ml⁻¹ to block cytokinesis. The culture was maintained for 28 h in order to arrest cytokinesis. Cytochalasin B is an inhibitor of actin polymerization, required for the formation of the microfilament ring that constricts the cytoplasm between the daughter nuclei during cytokinesis (Carter, 1967). Cells were then harvested and centrifuged. The supernatant was carefully discarded, and the pellet was fixed three times in methanol: acetic acid (3:1, v/v). The cell suspension was then dropped onto slides. The slides were air dried and stored at –20 °C until analysis. They were stained with a drop of DAPI in Vectashield® (Abcys SA, France). Two cultures per concentration were analysed. One thousand binucleated cells were examined per concentration and per culture. All slides were coded and analysed with an Olympus BX61 fluorescent microscope at 60× magnification.

2.6. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with a pancentromeric DNA probe

Fluorescence in situ hybridization was performed using mouse pancentromeric probes (Adgenix, Cambio, StarFISH, UK) pre-labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC). The remaining fixed cells were thawed and dropped onto pre-cleaned slides just before hybridization. FISH was performed according to the StarFISH protocols (Cambio, Cambridge, UK). After thawing, the slides were dehydrated at room temperature in three ethanol solutions of increasing concentration (70%, 90%, 100%; 2 min each) and air dried. DNA was denatured by immersing the slides in 70% formamide in 2× SSC at 70 °C for 2 min. After denaturation, the slides were placed in ice-cold 70% ethanol for 2 min and the cells were dehydrated by dipping the slides into the three ethanol solutions for 2 min. Directly labelled mouse pancentromeric DNA probes from Cambio (STAR®FISH 1697-MF-02; fluorescein isothiocyanate (FITC) label, Cambridge, UK) were pre-warmed at 37 °C for 5 min, denatured for 10 min at 85 °C and chilled on ice. Following an overnight hybridization at 37 °C, the

slides were washed in 2× SSC at 37 °C (5 min), in 50% formamide/2× SSC at 37 °C (2 × 5 min) and in 2× SSC at 37 °C (2 × 5 min). The cells were then counterstained with DAPI in Vectashield® (Abcys SA, France) and analysed using 60× magnification under an Olympus BX61 fluorescent microscope equipped with FITC filters.

2.7. Slide scoring

2.7.1. Cytokinesis-block micronucleus assay

Standard criteria were used for micronuclei identification (Fenech et al., 2003). Binucleated cells with one micronucleus (BN-1MN), mononucleated cells with micronuclei (Mono-MNx) and binucleated cells with nucleoplasmic bridges (BN-NPB) were scored. Exposed and control group samples were processed by the same operator on coded slides. For assessment of possible effects on cell proliferation, the Cytokinesis Block Proliferation Index (CBPI) was determined, which was calculated by the formula $CBPI = (M1 + 2M2 + 3(M3 + M4))/N$ where $M1$ – $M4$ represented the number of cells with one to four nuclei ($M3$ and $M4$ are considered to be in their third cell cycle) and N was the total number of scored viable cells (Kirsch-Volders et al., 2003; OECD, 2007; Surrallés et al., 1995). This index was evaluated by classified 500 cells according to the number of nuclei.

For each spot of cells scored, the following criteria were analysed to determine chromosome damage:

- The number of BN cells containing one micronucleus: BN-1MN (in 1000 BN cells). The MN scoring criteria were those defined by Fenech et al. (2003). Micronuclei were scored when their diameter was between 1/16 and 1/3 of the diameter of the main nucleus, when they were round in shape, not refractile, and when their chromatin structure and staining colour were similar to those of the main nucleus. One thousand BN per condition and per culture were examined for the presence of one MN. The data are presented as the number of binucleated cells with one micronucleus per 1000 binucleated cells (%BN-1MN). In this study, we scored only binucleated cells with one micronucleus (BN-1MN) because binucleated cells with 2 or more MNx were not observed.
- The number of BN cells containing one or more nucleoplasmic bridges: BN-NPB (in 1000 BN cells). An NPB was considered as a continuous nucleoplasmic link between the nuclei in a binucleated cell, and the width of a NPB usually did not exceed 1/4 of the diameter of the nuclei within the cell (Fenech et al., 2003). One thousand BN per condition and per culture were examined for the presence of NPB. The data are presented as the number of binucleated cells with NPBs per 1000 binucleated cells (%BN-NPB).
- The number of mononucleated cells containing micronuclei (Mono-MNx). Micronucleus in mononucleated cells were scored when their diameter was between 1/16 and 1/3 of the diameter of the main nucleus, when they were round in shape, not refractile, and when their chromatin structure and staining colour were similar to those of the main nucleus. The mononucleated cells with or without MN were examined and data are presented as the percentage of mononucleated cells with micronuclei per mononucleated cells (%Mono-MNx). In this study, we scored only mononucleated cells with one and two micronuclei (Mono-MNx) because mononucleated cells with more than 2 micronuclei were not observed.

2.7.2. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with a pancentromeric DNA probe

Coloured cells with DAPI were preliminarily scored for the presence of micronuclei in binucleated cells. When a binucleated cell with one micronucleus was noted, the filter setting was changed in order to observe the fluorescein-labelled centromeres and to determine whether the MN contained centromere signals or not. If one or more green spots (FITC-labelled centromeres) were observed inside the MN, it was classified as centromere-positive (BN-1MNC+). An MN without labelling was classified as centromere-negative (BN-1MNC–). The number of fluorescent spots per micronuclei was also recorded. One thousand BN per condition and per culture were examined for the presence of one micronucleus with (BN-1MNC+) or without (BN-1MNC–) centromeric signals. The data are presented as the number of binucleated cells containing one micronucleus with (%BN-1MNC+) or without (%BN-1MNC–) centromeric signals per 1000 binucleated cells. Exposed and control group samples were processed by the same operator.

2.8. Monte Carlo dose calculation

Monte Carlo dose calculations were performed with a dedicated computer code (IDL language) to obtain meaningful physical quantities: the one-hit distribution of energy imparted to biological targets and the one-hit probability (ICRU, 1983). The biological targets were either the cell nucleus or the whole cell (cytoplasm + nucleus). A rectangular lattice of 5000 cells was simulated and cell shape was analytically defined by a parametric surface of the form $(x-X(t,u), y-Y(t,u), z=Z(t))$, such that it defined in all Z planes an ellipse whose ratio of long and short axes was fixed. This ratio was determined from a morphometric analysis of the cells to be modelled. On the base plane the half long and short axes were 22 μm and 12.6 μm, respectively. Inside the cell, a spherical nucleus 20 μm in diameter was also modelled. An illustration of the resulting

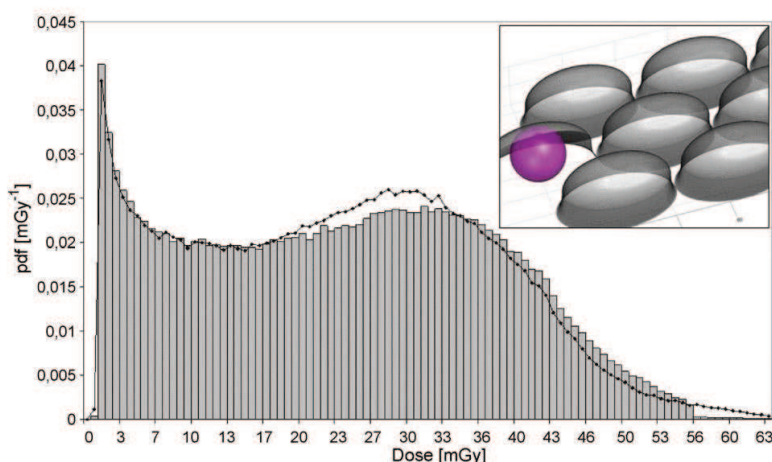


Fig. 1. Distribution of energy imparted in one-hit to the cell from inter-cellular uranium, DU (bars), EU (points). The inset shows the adopted shape for fibroblast and nucleus and the positioning of cells in the lattice (see text for dimensions).

cell lattice is shown in the inset of Fig. 1. Different parametric surfaces were tried until a sufficiently realistic shape was obtained. The simulated cell lattice was selected to minimize the free space between cells and to mimic confluent cells.

The EU and DU alpha emission spectra were simplified so that each isotope emitted mono-energetic particles whose energy was the yield-weighted average of the correct emission spectrum (ICRP, 1983). Alpha particle energy loss was calculated according to the continuous slowing down approximation, and the range-energy curves were those given by the NIST Astar database (Berger et al., 2005). A tracking algorithm was enabled for scoring both the energy and location of an alpha particle randomly emitted in the simulated medium using the periodic structure of the lattice and the analytical representation of the cell. As a result, it was possible to calculate the distribution of energy distributed to the simulated targets using the values of energy difference between entering and leaving particles. The energy carried out from the target by electrons that were ejected during the slowing down process of the alpha particles. Practically, the one-hit distributions were obtained separately for each isotope and then added to the weight corresponding to the DU and EU isotopic compositions. Since the simulated cell volume was known (12,055 μm^3), the distributed energy could be converted to dose (more exactly to specific energy). The code developed enabled to treat separately uniform alpha emission outside and inside the targets.

The one-hit probability was obtained in two ways. Firstly, knowing the experimental duration, the specific activity, concentration and isotopic composition of DU and EU and the simulated volume, the total number of disintegrations in this volume was calculated for each isotope. Secondly, the mean number of one-hit events was determined for a large number of particles in the simulated medium and then scaled to the true number of disintegrations. When uranium was inside the cell, it was assumed that one disintegration gave one hit to the cell, but not to the nucleus, basically because a disintegration in the cytoplasm can result in an alpha particle emitted in all directions and especially opposite to the nucleus. The hit probability was calculated to include all possible routes of the particle.

2.9. Statistical analysis

All data were analysed using the SAS CATMOD (Categorical Modelling) procedure of the Statistical Analysis Systems package (SAS, 1999). The two types of uranium (DU and EU) were combined with four concentrations (0 μM , 5 μM , 50 μM

and 500 μM) in a 2×4 factorial design. This model included type of uranium and concentration of uranium as the two main effects, as well as their interaction. No significant interaction between experimental factors (type of U and concentration of U) was noted for any of the measured parameters. Contrast method was also used to compare each level of a factor with the other(s).

For aneugen and clastogen positive controls, contrast method was also used to compare each control (untreated control vs. Mitomycin C, untreated control vs. Vincristine sulphate and Mitomycin C vs. Vincristine sulphate).

3. Results

3.1. Cell death and cell proliferation assessment

In our experimental conditions, EU had a specific activity about 20 times higher than DU. No toxicity was observed after contamination with all tested concentrations of DU and EU (5 μM , 50 μM and 500 μM) or with Mitomycin C (1.5 μM) or with Vincristine sulphate (16 μM) as compared to the untreated control group (cell death <1%) with the trypan blue staining technique (Fig. 2A and B). Viability of fibroblasts was not affected by DU, EU, Mitomycin C or Vincristine sulphate contamination after 24 h of exposure for all tested concentrations. These results were confirmed with flow cytometry experiments. The percentage of cells in sub G0–G1 was not significantly modified after contamination with 5 μM , 50 μM and 500 μM of DU or EU and after contamination with 1.5 μM Mitomycin C or 16 μM Vincristine sulphate (Fig. 3A and B). Therefore, DU, EU, Mitomycin C and Vincristine sulphate exposures were not cytotoxic for all tested concentrations during this study.

Furthermore, Cytokinesis Block Proliferation Index (CBPI) was not significantly modified after exposure to DU, EU, Mitomycin C or Vincristine sulphate (Table 2). Therefore, these results indicated the absence of an inhibitory effect on fibroblasts proliferation.

Table 2
Cytokinesis Block Proliferation Index (CBPI).

	EU				DU				Controls		
	0 ^a	5 ^a	50 ^a	500 ^a	0 ^a	5 ^a	50 ^a	500 ^a	Untreated control	Mitomycin C	Vincristine
CBPI	1.36 ± 0.01	1.36 ± 0.01	1.38 ± 0.02	1.31 ± 0.01	1.36 ± 0.01	1.35 ± 0.02	1.36 ± 0.02	1.31 ± 0.01	1.36 ± 0.01	1.35 ± 0.01	1.34 ± 0.01

The Cytokinesis Block Proliferation Index (CBPI) was determined, which was calculated by the formula $CBPI = (M1 + 2M2 + 3(M3 + M4)) / N$ where M1–M4 represented the number of cells with one to four nuclei (M3 and M4 are considered to be in their third cell cycle) and N was the total number of scored viable cells (Surrallés et al., 1995). This index was evaluated by classified 500 cells according to the number of nuclei.

^a Concentration (μmol).

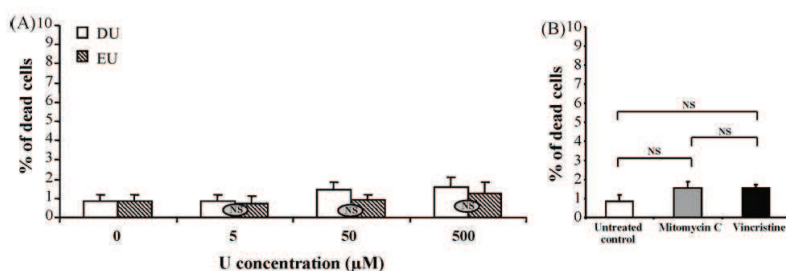


Fig. 2. Effect of depleted uranium (DU, white bars) or enriched uranium (EU, hatching pattern bars) (A) and of Mitomycin C (positive clastogen control, grey bar) or Vincristine sulphate (positive c aneugen control, black bar) (B) on cell mortality (mean of the percentage of dead fibroblasts \pm SD) after 24 h of exposure. NS: no statistically significant difference between DU and EU groups (contrast method).

3.2. Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay and Fluorescence in situ hybridization (FISH) with a pancentromeric DNA probe

The CBMN assay was used in combination with Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) of mouse pancentromeric probes. The aim of this assay was to assess the respective influence of the concentration of U and the type of U on micronuclei (MN) that originated from acentric fragments (clastogenic events: BN-1MNC⁻) and MN containing whole chromosomes (aneugenic events: BN-1MNC⁺).

3.2.1. Binucleated cells with one micronucleus (BN-1MN)

Fig. 4A and B illustrated the proportion of binucleated cells with one micronucleus (BN-1MN) after exposure to DU or EU at various concentrations (Fig. 4A) or after exposure to Mitomycin C or Vincristine sulphate (Fig. 4B). The CBMN assay revealed that binucleated cells with one micronucleus (BN-1MN) were induced by uranium exposure but were not modulated by the type of uranium (DU and EU; $p=0.81$). BN-1MN production was affected by U concentration ($p<0.001$; e.g. 15% for 5 µM DU and 5 µM EU vs. 38% for 500 µM DU and 500 µM EU) and was higher in the U exposed cells for all tested concentrations than in the control group ($p<0.001$; e.g. 18% for 50 µM DU vs. 4% in control; and 22% for 50 µM EU vs. 4% in control). The number of micronuclei per 1000 binucleated cells after exposure to Mitomycin C (clastogen positive control) and Vincristine sulphate (aneugen positive control) was comparable to the highest concentration of uranium (500 µM).

3.2.2. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with a pancentromeric DNA probe

Fig. 5 showed the proportion of binucleated cells with one centromere-positive micronucleus (BN-1MNC⁺: with one or several centromeres; Fig. 5A1 and A2) and binucleated cells with one centromere-negative micronucleus (BN-1MNC⁻: without a cen-

tomere; Fig. 5B1 and B2) after exposure to DU or EU at various concentrations (Fig. 5A1 and B1) and to Mitomycin C or Vincristine sulphate (Fig. 5A2 and B2). FISH analysis revealed the presence of BN-1MNC⁺ and BN-1MNC⁻ in the cells exposed to DU, EU, Mitomycin C or Vincristine sulphate.

After DU exposure, BN-1MNC⁺ production was observed for all concentrations tested (5–500 µM) compared to the control group (Fig. 5A1). The frequency of BN-1MNC⁺ was 6, 7.5 and 14 times higher in the DU exposed group (for 5 µM, 50 µM and 500 µM, respectively) than in the control group. The difference was statistically significant for the three tested doses as compared to the control group. After EU exposure, the BN-1MNC⁺ frequency also increased with concentration, but the difference compared to the control group became significant above 50 µM. U concentration was a factor that had a statistical significant influence on BN-1MNC⁺ induction ($p<0.001$). DU exposure tended to induce more BN-1MNC⁺ than EU exposure ($p=0.06$), and this difference was significant for 500 µM ($p=0.02$).

Globally, the frequency of BN-1MNC⁻ increased with U concentration ($p<0.001$) for both types of U considered ($p=0.007$) (Fig. 5B1). More precisely, this increased frequency was more pronounced in the EU group than the DU group; the level of BN-1MNC⁻ after EU exposure for all concentrations tested remained significantly greater than the untreated control. Specifically, BN-1MNC⁻ frequency was 5, 7.5 and 12.5 times higher in the EU exposed group (for 5 µM, 50 µM and 500 µM, respectively) than in the control group. In contrast, after DU exposure, BN-1MNC⁻ frequency was significantly higher than the control group only for the 500 µM concentration.

BN-1MN production after DU exposure was thus mainly due to an increase in BN-1MNC⁺, reflecting an increase in chromosome loss. DU induced at least 3 times more BN-1MNC⁺ than BN-1MNC⁻ ($p<0.001$). By contrast, BN-1MN production after EU exposure was mainly due to an increase in BN-1MNC⁻ reflecting an increase in chromosome breakage with EU. EU induced at least 2 times

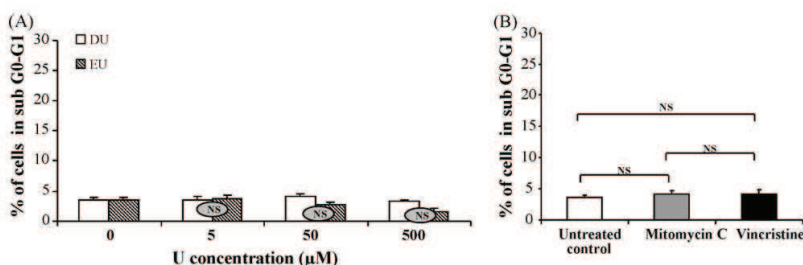


Fig. 3. Effect of depleted uranium (DU, white bars) or enriched uranium (EU, hatching) (A) and of Mitomycin C (positive clastogen control, grey bar) or Vincristine sulphate (positive c aneugen control, black bar) (B) on cell mortality (sub G0–G1). The percentage of cells residing in sub G0–G1 was measured. NS: no statistically significant difference between DU and EU groups (contrast method).

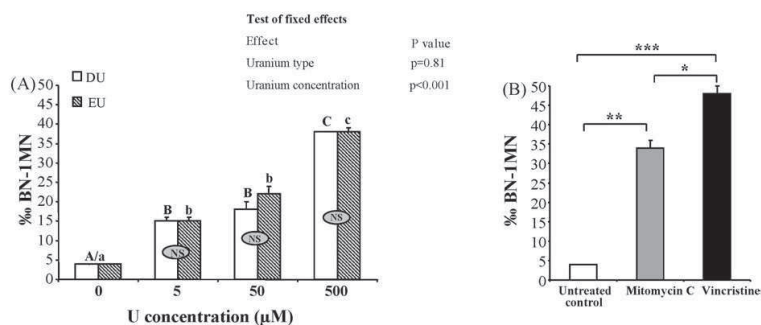


Fig. 4. Results (means ± SD) of the micronucleus assay: proportion of binucleated fibroblasts with one micronucleus after exposure to various concentrations (0 μM, 5 μM, 50 μM and 500 μM) of depleted uranium (DU, white bars) or enriched uranium (EU, hatching pattern bars) (A) and to Mitomycin C (positive clastogen control, grey bar) or Vincristine sulphate (positive c aneugen control, black bar) (B). %BN-1MN: % binucleated cells with one micronucleus. A–C: proportion with a different letter are significantly different (contrast method) between concentrations of DU group ($p < 0.05$); a–c: proportion with a different letter are significantly different (contrast method) between concentrations of EU group ($p < 0.05$); NS: no statistically significant difference between DU and EU groups (contrast method); * $p < 0.05$ statistically significant difference between Mitomycin C and Vincristine sulphate (contrast method); ** $p < 0.01$ statistically significant difference between positive control (Mitomycin C) and untreated control (contrast method); *** $p < 0.001$ statistically significant difference between positive control (Vincristine sulphate) and untreated control (contrast method).

more BN-1MNC– than BN-1MNC+ ($p = 0.005$). The Mitomycin C, known to be mainly clastogenic, induced significantly more BN-1MNC– ($p = 0.005$) and less BN-1MNC+ ($p = 0.005$) than Vincristine sulphate, known to be aneugenic. The Mitomycin C induced 3 times more BN-1MNC– than BN-1MNC+. These results were compara-

ble with those observed after EU exposure indicating potential clastogenicity. In contrast, Vincristine sulphate induced 2 times more BN-1MNC+ than BN-1MNC–. These results were comparable with those observed after DU exposure indicating potential aneugenicity.

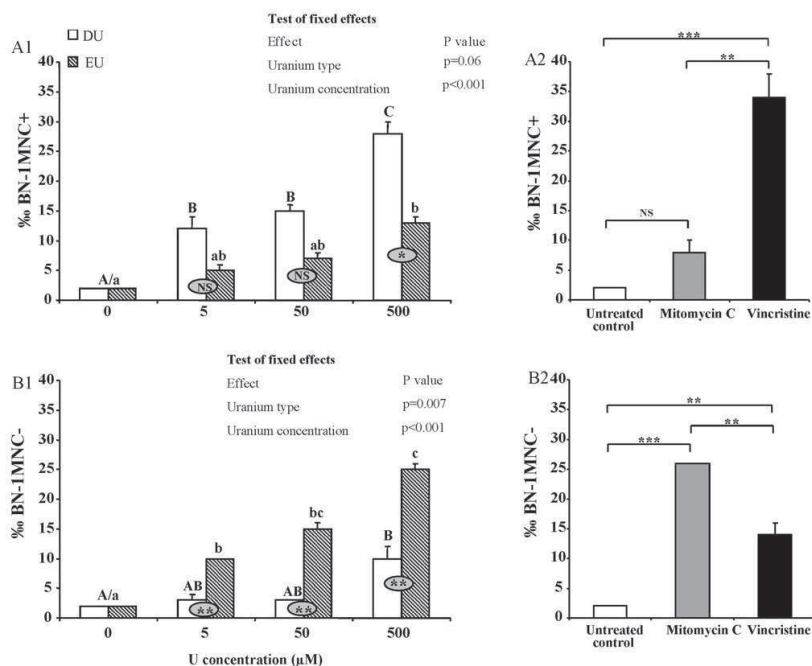


Fig. 5. Centromere contents of micronuclei in binucleated mouse embryo fibroblasts after exposure to different concentrations of depleted uranium (DU) or enriched uranium (EU) (A1 and B1) and to Mitomycin C or Vincristine sulphate (A2 and B2). Presence (A: BN-1MNC+) or absence (B: BN-1MNC–) of centromere DNA was assessed by fluorescence *in situ* hybridization with pancentromeric DNA probes. Cells were incubated with different concentrations (0 μM, 5 μM, 50 μM and 500 μM) of DU (white bars) or EU (hatching pattern bars) and with Mitomycin C (positive clastogen control, grey bar) or Vincristine sulphate (positive c aneugen control, black bar). % BN-1MNC+: % binucleated cells with one micronucleus containing one or more centromeres (centromere-positive micronucleus). % BN-1MNC–: % binucleated cells with one micronucleus without a centromere (centromere-negative micronucleus). A–C: proportion with a different letter are significantly different (contrast method) between concentrations of DU group ($p < 0.05$); a–c: proportion with a different letter are significantly different (contrast method) between concentrations of EU group ($p < 0.05$); NS: no statistically significant difference between DU and EU groups (contrast method); * $p < 0.05$ statistically significant difference between DU and EU (contrast method); ** $p < 0.01$ (A) statistically significant difference between DU and EU (contrast method), (B) statistically significant difference between positive controls (Mitomycin C and Vincristine sulphate) and untreated control (contrast method); *** $p < 0.001$ statistically significant difference between positive control (Mitomycin C) and untreated control (contrast method).

Overall, both concentrations and types of U influenced formation of BN-1MNC– cells, without any interaction between these two factors. In addition, these results showed that BN-1MNC– cells discriminated between DU and EU effects, whatever the concentration considered from 5 to 500 μM . However, BN-1MN and BN-1MNC+ cells were only influenced by U concentration. Therefore, BN-1MN from 5 to 500 μM and BN-1MNC+ from 5 to 50 μM did not discriminate between DU and EU effects.

3.2.3. Mononucleated cells with micronuclei (Mono-MNx)

Fig. 6 illustrated the percentage of mononucleated cells with micronuclei (Mono-MNx) after exposure to DU or EU at various concentrations (Fig. 6A) and to Mitomycin C or Vincristine sulphate (Fig. 6B). Mono-MNx production after U exposure was influenced by both concentration ($p=0.005$) and type of U ($p<0.001$) without any interaction. Mono-MNx was 1.8 and 1.3 times higher after exposure to 5 μM DU and 5 μM EU respectively compared to control group. In contrast to other parameters studied, the percentage of Mono-MNx decreased when U concentration increases from 5 μM to 500 μM (7.2 vs. 5.6 for 5 μM and 500 μM of DU, respectively; 5.2 vs. 4.4 for 5 μM and 500 μM of EU, respectively). DU induced more Mono-MNx than EU; this difference was statistically significant for all concentrations.

The percentage of Mono-MNx induced by the aneugenic agent, Vincristine sulphate was significantly higher than the percentage of Mono-MNx induced by the clastogenic agent, Mitomycin C. The percentage of Mono-MNx after exposure to Mitomycin C was comparable to untreated control and highest concentrations of EU (50 μM and 500 μM). By contrast, the proportion of Mono-MNx after exposure to Vincristine sulphate was similar to those observed after exposure to the lowest concentration of DU (5 μM).

Overall, these results showed that Mono-MNx could discriminate between DU and EU effects, whatever the concentration considered.

3.2.4. Nucleoplasmic bridges in binucleated cells (BN-NPBs)

Fig. 7 illustrated the proportion of binucleated cells with nucleoplasmic bridges (BN-NPBs) after exposure to DU or EU at various concentrations (Fig. 7A) and to Mitomycin C or Vincristine sulphate (Fig. 7B). BN-NPB production after U exposure was influenced by both concentration ($p<0.001$) and type of U ($p<0.001$) without any interaction. After EU exposure, the BN-NPB levels for all tested concentrations remained significantly greater than the untreated control (e.g. 13.5% for 50 μM EU vs. 2.5% in control). In addition, BN-NPB frequency increased with EU concentration and was 3.4, 5.4 and 7.6 times higher in the EU exposed group (for 5 μM , 50 μM and 500 μM , respectively) than in the control group. By contrast, after DU exposure, BN-NPB frequencies at low concentrations (5 μM and 50 μM) were comparable with the frequency of BN-NPB in the control. BN-NPB frequency was 3 times higher than the control group from 500 μM of DU. On the other hand, EU induced significantly more BN-NPB than DU (by a factor of at least 2); this difference was statistically significant for the three tested concentrations.

The frequency of BN-NPB induced by the clastogenic agent, Mitomycin C, is significantly higher than the frequency of BN-NPB induced by the aneugenic agent, Vincristine sulphate. The proportion of nucleoplasmic bridges after exposure to Vincristine sulphate was comparable to untreated control and lowest concentrations of DU (5 μM and 50 μM). These results could indicate a probable absence of clastogenicity of DU at low concentrations. By contrast, the proportion of BN-NPB after exposure to Mitomycin C was similar to those observed after exposure to the highest concentration of DU (500 μM) and the lowest concentration of EU (5 μM). These results could indicate a possible potential clastogenicity of EU.

Overall, these results showed that BN-NPB could discriminate between DU and EU effects, whatever the concentration considered.

3.3. Uranium content of cells

In the cell samples, uranium was directly measured by ICP-MS. The quantity of U in the cells increased with the U concentration in the culture medium (Table 3). After exposure to EU, the quantity of U in cells ranged from 0.46 ng U/10⁶ to 150 ng U/10⁶ cells. After exposure to DU, the quantity of U in cells ranged from 0.62 ng U/10⁶ to 144.6 ng U/10⁶ cells. These experimental values were used to calculate the one-hit probability to cell and nucleus, due to intra-cellular contamination; without information on U distribution between the cytoplasm and nucleus, a uniform distribution was used. Despite measurements of the intra-cellular U concentration, initial U concentration was used to calculate the one-hit probability resulting from uranium in the inter-cellular medium. Indeed, U penetration in the cells did not significantly modify the inter-cellular U concentration, but it was likely to significantly increase the hit probability, since intra-cellular alpha emission induced a single hit to the cell and this emission was more likely to result in one hit to the nucleus than an extra cellular emission.

3.4. Estimated doses received by cells

The one-hit distributions of energy imparted to the whole cell and the nucleus was calculated for DU and EU in the case of inter- and intra-cellular U contamination. In all cases, these distributions were very similar for DU and EU and the distribution means were not statistically different. DU and EU one-hit distributions of energy imparted to the whole cell in the case of inter-cellular space contamination are shown in Fig. 1. A small difference was noted in the high energy values, due to the high ²³⁴U proportion in EU. For these distributions, the means were 23.4 mGy and 23.6 mGy for EU and DU, respectively. If the considered target was the nucleus, these means were 39.6 mGy and 41.2 mGy for EU and DU, respectively (distributions not shown).

The relationship between biological effects and critical dosimetric quantities was calculated using the mean dose equation:

$$D = f_{in}\overline{D}_{in} + f_{out}\overline{D}_{out} = f_{tot}\overline{D}_{tot}$$

The subscript “in” refers to the intra-cellular medium and “out” to the inter-cellular medium. \overline{D} was the mean of the one-hit distribution of distributed energy and “f” was the one-hit probability; these quantities were calculated with the nucleus and the whole cell as targets. Summing the event frequencies due to intra and extra cellular alpha emission naturally led to define a “total” dose and frequency, as written in the last part of the above equation. As expected, f_{out} was directly proportional to the U concentration in the medium and about 20 times higher for EU than for DU (alpha particles from ²³⁴U had a longer range than other alpha particles and their higher proportion in EU resulted in a greater number of particles likely to reach the target; thus the ratio of f_{out} for DU and EU was slightly different from the ratio of specific activities). Considering the nucleus as the target, f_{out} was respectively $7.1 \times 10^{-3}\%$ and $0.3 \times 10^{-3}\%$ for EU and DU at 5 μM . The DU value could be compared with the value given by Miller et al. (1998), using a microdosimetric code developed by Humm (1987); the hit frequency at 10 μM for *in vitro* DU-UO₂Cl₂ contaminated osteoblast was reported to be $1.4 \times 10^{-3}\%$. Although the osteoblast modelling was not described, the calculated hit frequency in the present study could be considered to give an adequate order of magnitude, as far

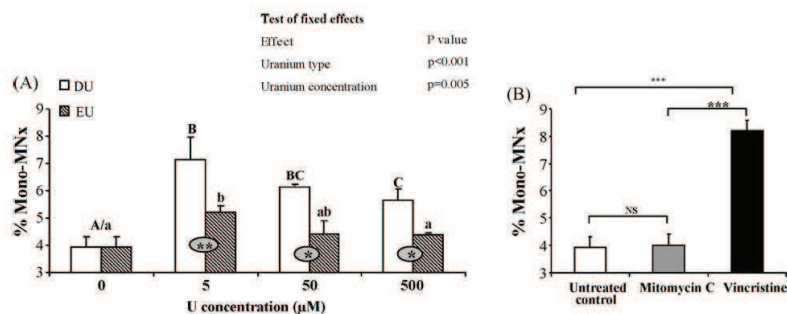


Fig. 6. Percentage (mean ± SD) of mononucleated cells with micronuclei (Mono-MNx) incubated with various concentrations (0 µM, 5 µM, 50 µM and 500 µM) of depleted uranium (DU, white bars) or enriched uranium (EU, hatching pattern bars) (A) and to Mitomycin C (positive clastogen control, grey bar) or Vincristine sulphate (positive c aneugen control, black bar) (B). %Mono-MNx: % mononucleated cells with micronuclei. A–C: proportion with a different letter are significantly different (contrast method) between concentrations of DU groups ($p < 0.05$); a–c: proportion with a different letter are significantly different (contrast method) between concentrations of EU groups ($p < 0.05$); NS: no statistically significant difference between Mitomycin C and untreated control (contrast method); * $p < 0.05$ statistically significant difference between DU and EU groups (contrast method); ** $p < 0.01$ statistically significant difference between DU and EU groups (contrast method); *** $p < 0.001$ statistically significant difference between positive controls (Mitomycin C and Vincristine sulphate) and untreated control (contrast method).

as the two simulations described a realistic and comparable cellular environment.

For EU and DU at 5 µM and 50 µM, the maximal contribution of intra-cellular emitters was 3% for the dose at the cell and 9% for the dose at the nucleus. At 500 µM, the experimentally measured intra-cellular concentrations of U increased this contribution to 8.5% and 25% (EU and DU, respectively) for the cell dose, and to 10% and 25% (EU and DU, respectively) for the nucleus dose. The total doses received by cells were expressed in µGray (Table 3): EU exposed cells received doses ranging from 7.2 µGy to 760.5 µGy, while DU exposed cells received doses ranging from 0.3 µGy to 38.4 µGy. Cells exposed to EU received a dose 20 times higher than DU for the same concentration (e.g. 760.5 µGy and 38.4 µGy for 500 µM EU and DU respectively). For the purpose of simplicity the contributions of intra and extra cellular events are not shown in Table 3, nor are the nucleus doses given.

3.5. Correlation of dose received by cells with the observed biological effects

Fig. 8 illustrated the correlation between dose and binucleated cells with nucleoplasmic bridges (Fig. 8A), and dose and binucleated cells with one centromere-negative micronucleus (Fig. 8B). The correlation between the dose received by cells and the observed biological effects (BN-1MNC– and BN-NPB) consolidated and validated our results. A highly significant correlation between biological effects and dose received by cells tends to indicate a radiological effect. BN-1MNC– and BN-NPB (Fig. 8A and 8B) were significantly correlated with the doses received by cells ($y = 2.8311 \ln(x) + 3.2559, r^2 = 0.87, P < 0.001$ for BN-1MNC–; $y = 2.2086 \ln(x) + 3.0421, r^2 = 0.88, p < 0.001$ for BN-NPB). However, BN-1MN, BN-1MNC+ and Mono-MNx were not significantly correlated to the doses received by cells (data not shown). A similar trend was obtained if the nucleus dose rather than the cell dose was

used. The relationship between doses and BN-NPB and BN-1MNC– yields, as illustrated in Fig. 8, is only provided to give the trend of the observed effects and might be useful to give order of magnitude of effects in the explored dose range. Despite the evident lack of a mechanistic explanation of the relationship obtained, this trend illustrates the rapid increase in effects at low doses (~50 µGy) followed by a slowing down of effects with increasing dose. Nevertheless we should note that the dose taken into account is the product of the hit probability and the mean dose, which results in averaging the mean dose imparted to a small number of cells across all cells.

4. Discussion

The present study compared the genotoxic effects of DU and 12% EU for the first time, using the CBMN assay coupled with fluorescence *in situ* hybridization on an *in vitro* C3H10T1/2 embryo fibroblast model that mimics internal contamination. With this method, clastogenic and aneugenic effects of both DU and EU were measured. The well characterized dosimetric status of this model enabled us to correlate clastogenic effect of U and ionizing radiation dose received by cells.

The genotoxicity of U is mediated by its radioactivity and its chemical properties and leads to both clastogenic and aneugenic effects (Lin et al., 1993; Miller et al., 1998, 2003; Monleau et al., 2006; Stearns et al., 2005). Since there is currently no comparative analysis of the various isotopic mixtures of U, the genotoxic profile of U (clastogenic/aneugenic) as a function of its enrichment has not been evaluated. Comparing DU and EU effects exposure demonstrated that changes in the isotopic composition of uranium involving also an increase in the specific activity lead to an increase in radiotoxic effects and can specifically modify the rate of cytogenetic abnormalities measured by the CBMN assay. In the *in vitro* model used in this study, DU and EU exposures were not cytotoxic

Table 3
Results of the uranium measurement in cells and doses received by cells according to microdosimetric calculation (µGy).

	EU				DU			
	0 ^a	5 ^a	50 ^a	500 ^a	0 ^a	5 ^a	50 ^a	500 ^a
U quantity in cells (ng U/10 ⁶ cells)	0.02 ± 0.1	0.46 ± 0.2	3.2 ± 0.5	150 ± 1.1	0.02 ± 0.1	0.62 ± 0.5	4.6 ± 0.7	144.6 ± 0.5
Cell dose (µGy)	0	7.2	70.9	760.5	0	0.3	3	38.4
Cell hit frequency	–	3.1 × 10 ⁻⁴	3.1 × 10 ⁻³	3.4 × 10 ⁻²	–	1.3 × 10 ⁻⁵	1.3 × 10 ⁻⁴	1.8 × 10 ⁻³

Uranium measurements are expressed as ng U/10⁶ cells. Results are presented as the mean of a minimum of 3 values ± SE.

^a Concentration (µmol).

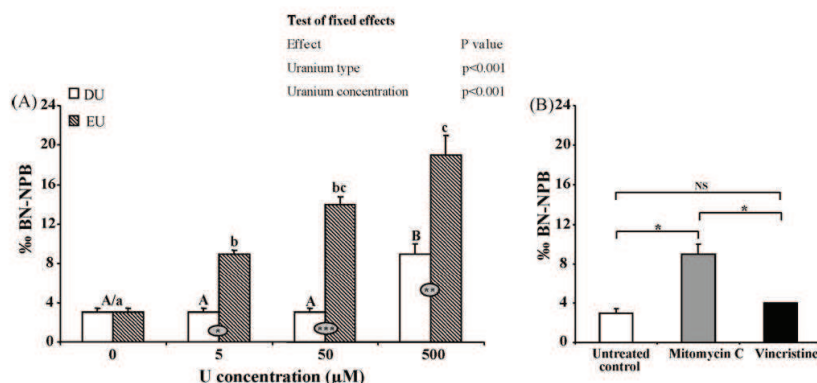


Fig. 7. Proportion (mean ± SD) of binucleated cells with nucleoplasmic bridges (BN-NPBs) incubated with various concentrations (0 μM, 5 μM, 50 μM and 500 μM) of depleted uranium (DU, white bars) or enriched uranium (EU, hatching pattern bars) (A) and to Mitomycin C (positive clastogen control, grey bar) or Vincristine sulphate (positive c aneugenic control, black bar) (B). %BN-NPBs: % of nucleoplasmic bridges. A–C: proportion with a different letter are significantly different (contrast method) between concentrations of DU groups ($p < 0.05$); a–c: proportion with a different letter are significantly different (contrast method) between concentrations of EU groups ($p < 0.05$); * $p < 0.05$ (A) statistically significant difference between DU and EU groups (contrast method), (B) statistically significant difference between positive controls (Mitomycin C and Vincristine sulphate) and untreated control (contrast method); ** $p < 0.01$ statistically significant difference between DU and EU groups (contrast method); *** $p < 0.001$ statistically significant difference between DU and EU groups (contrast method).

for all tested concentrations. In addition, DU and EU exposures had no effect on the fibroblast proliferation.

4.1. MN induction in binucleated cells

The results of the present work confirmed the increase in BN-1MN following exposure to either a clastogenic agent, Mitomycin C, or an aneugenic agent, Vincristine sulphate. This study showed that all tested U concentrations induced an increase in binucleated cells with one micronucleus. These results confirm previous works that showed an increase of micronuclei in Chinese Hamster Ovary cells, human osteoblast cells, as well as in lymphocytes after U exposure (Krunic et al., 2005; Lin et al., 1993; Miller et al., 2003). Surprisingly, no statistically significant difference in BN-1MN frequency was observed between DU and EU contaminated groups in the present study. Moreover, our results showed that the frequency of binucleated cells with one MN was not correlated to ionizing radiation dose delivered to cells by uranium. However, it could be

a good marker of chemotoxic effects of U since BN-1MN induction was impacted by U concentrations only. The subsequent question is thus to know if BN-1MN was only due to chemotoxic effect of U.

4.2. CBMN centromere assay

To explore this possibility, fluorescence *in situ* hybridization with a pancentromeric probe was performed on micronucleus preparations in the second part of this study. The frequencies of micronuclei have been shown to be increased by exposure to clastogenic and aneugenic agents and in cells showing genomic instability (Fenech, 2000; Gisselsson et al., 2001; Norppa and Falck, 2003). The contents of micronuclei, as assessed by centromeric DNA probes, reflect their origin (Kirsch-Volders et al., 1997; Norppa and Falck, 2003). Centromere-negative micronuclei are induced by clastogens and represent acentric fragments of chromosomes. Centromere-positive micronuclei are produced by aneugens and are considered to contain whole chromosomes. This study showed that the increase in BN-1MN with DU exposure was mainly due to an increase in BN-1MNC+. BN-1MNC+ tended to be preferentially induced by DU exposure (BN-1MNC+ represented 80% and 33% of BN-1MN following DU and EU exposures respectively). This reflects an increased chromosome loss associated with DU exposure. With our *in vitro* model, BN-1MNC+ induced by the aneugenic agent, Vincristine, represented 71% of BN-1MN. Thus, DU can be classified as an aneugenic agent. Our results are consistent with those obtained with some metals by Seoane and Dulout (2001), who found that around 70% or more of BN-1MN were BN-1MNC+ after *in vitro* exposure of diploid human fibroblasts to cadmium, chromium or nickel salt. No significant correlation between BN-1MNC+ and the ionizing radiation dose received by cells could be established, in the present work. Thus, the increase in BN-1MNC+ seems therefore to be mainly due to the chemical effect of U as a metal and partly to alpha radiation.

The increase in BN-1MN after EU exposure was mainly due to an increase in BN-1MNC-, reflecting an increased chromosome breakage with EU. The induction of BN-1MNC- was twice as high in EU as in DU-treated cells for all tested concentrations. BN-1MNC- were induced more by EU (around 67% of BN-1MN) than DU (around 20% of BN-1MN). With our *in vitro* model, BN-1MNC- induced by the clastogenic agent, Mitomycin C, represented 76% of BN-1MN. Thus, EU can be classified as a clastogen agent. Our results are

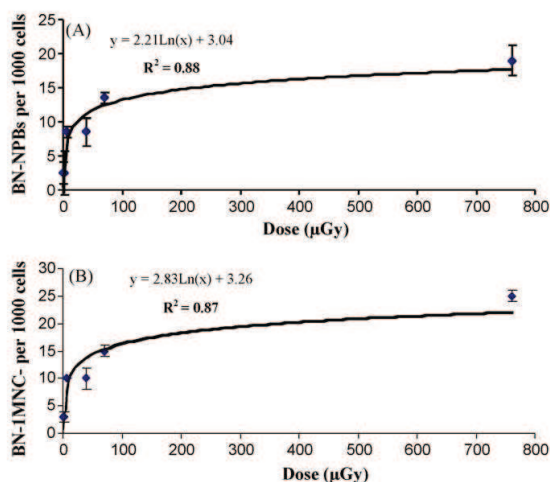


Fig. 8. Dose–response relationship of nucleoplasmic bridges (A) and binucleated cells with one centromere-negative micronucleus (B).

consistent with those obtained by Darroudi et al. (1996) and Sari-Minodier et al. (2002), who found that a total of around 70% or more of BN-1MN was constituted by BN-1MNC– in human peripheral blood lymphocytes after *in vitro* exposure to known clastogens (methyl methanesulphonate, X-rays or gamma-emitting radionuclide sources). In the experimental conditions presented in the present article, BN-1MNC– could be thus due partly to the radiological effects of U as an alpha emitter. In addition, the significant correlation between BN-1MNC– levels and the ionizing radiation doses received by cells confirms that clastogenic effects of uranium quantified by BN-1MNC– depended mainly on the radiological effects of U.

In whole cell exposure conditions described in the present study, BN-1MN was composed by both BN-1MNC+ and BN-1MNC–. The scoring of BN-1MN cannot show any significant difference between DU and EU genotoxic effects. However, fluorescence *in situ* hybridization with a pancentromeric probe on the micronucleus preparations made it possible to differentiate between the clastogenic and aneugenic actions of isotopic mixtures of U. Thus, BN-1MN induction is not only the result of the chemical effects of U as a metal; depleted uranium can be classified as an aneugenic agent and 12% enriched uranium can be classified as a clastogenic agent.

4.3. MN in mononucleated cells and NPB in binucleated cells are markers of aneugenic and clastogenic actions of uranium, respectively

With CBMN assay, various cytogenetic abnormalities can be observed including mononucleated cells with micronuclei (Mono-MNx) and binucleated cells with nucleoplasmic bridges (BN-NPB). In the third part of the present study, both cytogenetic markers were analysed to confirm previous conclusions obtained with CBMN in combination with the FISH of centromeric DNA probes.

Recent studies have indicated that aneugens, but not clastogens, induce micronuclei in mononucleated cells (Elhajouji et al., 1998; Rosefort et al., 2004). In line with this study, our results showed that Mitomycin C (clastogen) did not increase MN frequencies in mononucleated cells, while Vincristine sulphate (aneugen) did. DU induced more Mono-MNx than EU and this difference was statistically significant for all concentrations. This result suggests that Mono-MNx could be a discriminating factor of DU and EU effects independently from the tested concentrations. The percentage of Mono-MNx after exposure to highest concentrations of EU (50 μ M and 500 μ M) was comparable to untreated control and Mitomycin C. Thus, EU can be classified as a low aneugenic agent. By contrast, the proportion of Mono-MNx after exposure to the lowest concentration of DU (5 μ M) was similar to those observed after exposure to Vincristine sulphate. As a consequence, DU can be classified as an aneugen agent. In contrast to other cytogenetic parameters studied, the percentage of Mono-MNx decreased with increasing ionizing radiation doses received by cells and therefore with increasing clastogenic effects.

In most studies using CBMN assay, BN-NPBs have not been recorded. Umegaki and Fenech (2000) have proposed that nucleoplasmic bridges (NPBs) between nuclei in binucleated cells should also be scored in the CBMN assay, since they provide a measure of chromosome rearrangements not otherwise measured in this assay when the scoring is limited to BN-1MN. The NPBs originate from dicentric chromosomes that are easily identifiable. In the CBMN assay, BN cells with NPBs are allowed to accumulate because cytokinesis is inhibited and the nuclear membrane is eventually synthesized around the chromosomes, allowing an NPB to be observed. Heavy metals such as nickel or tungsten, considered to be low clastogenic agents, do not induce dicentric chromosomes and thus NPBs (Miller et al., 2002b). By contrast, the induction of dicen-

tric chromosomes, and thus NPBs, by alpha radiation, considered to be high clastogenic agent, is well documented (Greiner et al., 1999; Plan et al., 2005; Stephan et al., 2005). Overall, dicentric chromosomes, and thus NPBs, are considered to be specific indicators of ionising radiation exposure, because of their low spontaneous frequency in the unexposed population (Hoffmann and Schmitz-Feuerhake, 1999; Miller et al., 2002b). In the present study, EU exposure induced more BN-NPBs than DU exposure. This result suggests that BN-NPB could be a discriminating factor of EU and DU effects independently from the tested concentrations. These results confirm the work of Miller et al. (2002b) which showed an increase in the number of dicentric chromosomes related to uranium exposure. The tight correlation between the numbers of BN-NPB and the radiation doses showed that the NPBs were mainly due to the radiological effects of U.

Finally, the presence of Mono-MNx reflected the aneugenic effects of U which decreased with U enrichment in 235 U and the presence of BN-NPB reflected the clastogenic effects of U which increased with U enrichment in 235 U. These results confirmed previous conclusions obtained with CBMN in combination with the FISH of centromeric DNA probes. Mono-MNx and BN-NPB frequency should be quantified during the CBMN assay to assess respectively aneugenic and clastogenic effects of a given isotopic mixture of U. All the data presented in this article converge on the following conclusion: genotoxicity linked to chemical effects of U and genotoxicity linked to radiological effects of U are not additive effects. When clastogenic effects of U increase due to an increasing specific activity of the isotopic mixture, the aneugenic effects decrease. Consequently, concerning U genotoxicity, clastogenic effects mainly due to radiotoxicity of U seem to be dominant effects compared to aneugenic effects due mainly to chemotoxicity and partly to radiotoxicity of U. The exact mechanism underlying the relation between chemical effects of U, radiological effects of U and the resulting genotoxicity remains to be clarified.

5. Conclusion and prospects

This study showed for the first time that the genotoxic profile of U (aneugenic/clastogenic) was bound to its isotopic composition and therefore to its specific activity. It showed that the frequency of BN-1MN, alone, was not enough to accurately assess uranium genotoxicity. Indeed, the frequency of BN-1MNC– and the frequency of BN-NPB were necessary to reflect the level of clastogenic effects of a given isotopic mixture of U. The tight correlation between these two genotoxic markers and ionizing radiation dose received by cells demonstrated that the increase of clastogenic effects of U with its enrichment in 235 U is linked to an increase of radiotoxicity. Currently, International Agency for Research on Cancer (IARC) does not specifically list U and its compounds as carcinogens. However, as an alpha-particle-emitting radionuclide, internally deposited U is classified as a carcinogen agent to humans (IARC, 2001). As a consequence, carcinogenic risk assessment linked to U exposure is only based on radiation dose calculation (ICRP, 1997, 2007). United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation considers that damage to DNA is the main initiating event by which radiation causes long term harm to organs and tissues of the body, such as cancers. Double-strand breaks in DNA, responsible for clastogenic effects, are regarded as the most likely candidate for causing cancer initiation (UNSCEAR, 2000). Together, these considerations lead to conclude that carcinogenic risk related to DU internal exposure is lower than carcinogenic risk related to 12% EU internal exposure. However, the results presented in this article demonstrated that even if DU had a low clastogenic effect, its aneugenic effect was significant and led to a global genotoxic effect equivalent to 12% EU as assessed by classical CBMN assay (BN-1MN count-

ing). Aneugenic agents are known to induce aneuploidy that plays a significant role in cancer (see for reviews Aardema et al., 1998; Iarmarcovai et al., 2006). Thus, this work highlighted the need to further investigate the potential role of aneugenic effects of DU in carcinogenic risk assessment that is linked to U internal exposure.

Conflict of interest statement

None.

Acknowledgements

This work was supported by grants from AREVA NC and IRSN. Special thanks are given to Dr A. Acker and Dr B. Auriol for many helpful discussions and their support of the project.

References

- Aardema, M.J., Albertini, S., Arni, P., Henderson, L.M., Kirsch-Volders, M., Mackay, J.M., Sarrif, A.M., Stringer, D.A., Taalman, R.D., 1998. Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutat. Res.* 410, 3–79.
- ATSDR, 1999. Toxicological Profile for Uranium. US Public Services, Washington, DC.
- Ballou, J.E., Gies, R.A., Case, A.C., Haggard, D.L., Buschbom, R.L., Ryan, J.L., 1986. Deposition and early disposition of inhaled $^{233}\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ and $^{232}\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ in the rat. *Health Phys.* 51, 755–771.
- Becker, P., Scherthan, H., Zankl, H., 1990. Use of a centromere-specific DNA probe (p82H) in nonisotopic *in situ* hybridization for classification of micronuclei. *Genes Chromosomes Cancer* 2, 59–62.
- Berger, M.J., Coursey, J.S., Zucker, M.A., Chang, J., 2005. ESTAR, PSTAR, and ASTAR: Computer Programs for Calculating Stopping-Power and Range Tables for Electrons, Protons, and Helium Ions (version 1.2.3). National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD.
- Bleise, A., Danesi, P.R., Burkart, W., 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J. Environ. Radioact.* 64, 93–112.
- Calini, V., Urani, C., Camatini, M., 2002. Comet assay evaluation of DNA single- and double-strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells. *Cell Biol. Toxicol.* 18, 369–379.
- Calini, V., Urani, C., Camatini, M., 2003. Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicol. In Vitro* 17, 561–566.
- Carriere, M., Khodja, H., Avocan, L., Carrot, F., Gouget, B., 2005. Uranium (VI) complexation in cell culture medium: influence of speciation on Normal Rat Kidney (NRK-52) cell accumulation. *Radiochim. Acta* 93, 691–697.
- Carter, S.B., 1967. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* 213, 261–264.
- Chang, M.C., Chan, C.P., Wang, Y.J., Lee, P.H., Chen, L.L., Tsai, Y.L., Lin, B.R., Wang, Y.L., Jeng, J.H., 2007. Induction of necrosis and apoptosis to KB cancer cells by sanguinarine is associated with reactive oxygen species production and mitochondrial membrane depolarization. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218, 143–151.
- Chevari, S., Likhner, D., 1968. Complex formation of natural uranium in blood. *Med. Radiol. (Mosk)* 13, 53.
- Coleman, W.B., Grisham, J.W., Smith, G.J., 1994. Morphologic transformation of the C3H 10T1/2 cell line is accompanied by altered expression of the p53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* 15, 145–152.
- Darroudi, F., Meijers, C.M., Hadjidekova, V., Natarajan, A.T., 1996. Detection of aneugenic and clastogenic potential of X-rays, directly and indirectly acting chemicals in human hepatoma (Hep G2) and peripheral blood lymphocytes, using the micronucleus assay and fluorescent *in situ* hybridization with a DNA centromeric probe. *Mutagenesis* 11, 425–433.
- Degrassi, F., Tanzarella, C., 1988. Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy. *Mutat. Res.* 203, 339–345.
- 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, 458–468.
- Elhajouji, A., Cunha, M., Kirsch-Volders, M., 1998. Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis* 13, 193–198.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455, 81–95.
- Fenech, M., 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res.* 600, 58–66.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 534, 65–75.
- Fenech, M., Morley, A., 1985a. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 43, 233–246.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1985b. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147, 29–36.
- Gisselsson, D., Bjork, J., Hoglund, M., Mertens, F., Dal Cin, P., Akerman, M., Mandahl, N., 2001. Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. *Am. J. Pathol.* 158, 199–206.
- Greinert, R., Thieke, C., Detzler, E., Boguhn, O., Frankenberg, D., Harder, D., 1999. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by 3.45 MeV alpha particles analyzed by premature chromosome condensation. *Radiat. Res.* 152, 412–420.
- Grignard, E., Gueguen, Y., Grison, S., Lobaccaro, J.M., Gourmelon, P., Souidi, M., 2008. Contamination with depleted or enriched uranium differently affects steroidogenesis metabolism in rat. *Int. J. Toxicol.* 27, 323–328.
- Hei, T.K., Wu, L.J., Liu, S.X., Vannais, D., Waldren, C.A., Randers-Pehrson, G., 1997. Mutagenic effects of a single and an exact number of alpha particles in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 3765–3770.
- Hennig, U.G., Rudd, N.L., Hoar, D.I., 1988. Kinetochores immunofluorescence in micronuclei: a rapid method for the *in situ* detection of aneuploidy and chromosome breakage in human fibroblasts. *Mutat. Res.* 203, 405–414.
- Hoffmann, W., Schmitz-Feuerhake, I., 1999. How radiation-specific is the dicentric assay? *J. Exposure Anal. Environ. Epidemiol.* 9, 113–133.
- 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, 1015–1020.
- Humm, J.L., 1987. A microdosimetric model of astatine-211 labeled antibodies for radioimmunotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 13, 1767–1773.
- IARC, 2001. Ionizing radiation. Part 2. Some internally deposited radionuclides. In: IARC Press (Ed.), IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 78. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, p. 595.
- Iarmarcovai, G., Botta, A., Orsiere, T., 2006. Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. *Toxicol. Lett.* 166, 1–10.
- ICRP, 1983. Radionuclide transformations, energy and intensity of emissions. In: Press, P. (Ed.), ICRP Publication 38, Oxford.
- ICRP, 1997. Individual monitoring for internal exposure of workers. Publication 78. *Ann. ICRP* 27, 1–164.
- ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP publication 103. *Ann. ICRP* 37, 1–332.
- ICRU, 1983. Microdosimetry. In: ICRU (Ed.), ICRU Report 36. MD, Bethesda.
- Jones, P.W., Taylor, D.M., Webb, L.M., Williams, D.R., 2002. Computer modelling of the chemical speciation of caesium, uranium(VI) and neptunium(V) in human duodenal fluids under fasting conditions. *Appl. Radiat. Isotopes* 57, 159.
- Kathren, R.L., Moore, R.H., 1986. Acute accidental inhalation of U: a 38-year follow-up. *Health Phys.* 51, 609–619.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P., 1997. The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat. Res.* 392, 19–30.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M.J., Albertini, S., Fenech, M., Ishidate, M.J., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., 2003. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutat. Res.* 540, 153–163.
- Krunic, A., Haveric, S., Ibrulj, S., 2005. Micronuclei frequencies in peripheral blood lymphocytes of individuals exposed to depleted uranium. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 56, 227–232.
- Kurttio, P., Auvinen, A., Salonen, L., Saha, H., Pekkanen, J., Makelainen, I., Vaisanen, S.B., Penttila, I.M., Komulainen, H., 2002. Renal effects of uranium in drinking water. *Environ. Health Perspect.* 110, 337–342.
- Kurttio, P., Komulainen, H., Leino, A., Salonen, L., Auvinen, A., Saha, H., 2005. Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ. Health Perspect.* 113, 68–72.
- Leggett, R.W., 1989. The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys.* 57, 365–383.
- Lestaevel, P., Houpert, P., Bussy, C., Dhieux, B., Gourmelon, P., Paquet, F., 2005. The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 212, 219–226.
- 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.
- Lin, R.H., Wu, L.J., Lee, C.H., Lin-Shiau, S.Y., 1993. Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 319, 197–203.
- McClain, D.E., Benson, K.A., Dalton, T.K., Ejnik, J., Emond, C.A., Hodge, S.J., Kalinich, J.F., Landauer, M.A., Miller, A.C., Pellmar, T.C., Stewart, M.D., Villa, V., Xu, J., 2001. Biological effects of embedded depleted uranium (DU): summary of armed forces radiobiology research institute research. *Sci. Total Environ.* 274, 115–118.
- Migliore, L., Frenzilli, G., Nesti, C., Fortaner, S., Sabbioni, E., 2002. Cytogenetic and oxidative damage induced in human lymphocytes by platinum, rhodium and palladium compounds. *Mutagenesis* 17, 411–417.
- Miller, A.C., Blakely, W.F., Livengood, D., Whittaker, T., Xu, J., Ejnik, J.W., Hamilton, M.M., Parlette, E., John, T.S., Gerstenberg, H.M., Hsu, H., 1998. Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride. *Environ. Health Perspect.* 106, 465–471.
- Miller, A.C., 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, 247–259.

- Miller, A.C., Stewart, M., Brooks, K., Shi, L., Page, N., 2002a. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *J. Inorg. Biochem.* 91, 246–252.
- Miller, A.C., Xu, J., Stewart, M., Brooks, K., Hodge, S., Shi, L., Page, N., McClain, D., 2002b. Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints. *Radiat. Prot. Dosimetry* 99, 275–278.
- Miller, A.C., Xu, J., Stewart, M., Prasanna, P.G., Page, N., 2002c. 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.* 167, 120–122.
- Monleau, M., De Meo, M., Paquet, F., Chazel, V., Dumenil, G., Donnadiou-Claraz, M., 2006. Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicol. Sci.* 89, 287–295.
- Natarajan, A.T., Boei, J.J., Darroudi, F., Van Diemen, P.C., Dulout, F., Hande, M.P., Ramalho, A.T., 1996. Current cytogenetic methods for detecting exposure and effects of mutagens and carcinogens. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 3), 445–448.
- Norppa, H., Falck, G.C., 2003. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18, 221–233.
- Norppa, H., Renzi, L., Lindholm, C., 1993. Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization. *Mutagenesis* 8, 519–525.
- OECD, 2007. OECD Guideline for Testing of Chemicals. No. 487. *In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (MNvit)*.
- Plan, Y., Hlatky, L., Hahnfeldt, P., Sachs, R., Loucas, B., Cornforth, M., 2005. Full-color painting reveals an excess of radiation-induced dicentrics involving homologous chromosomes. *Int. J. Radiat. Biol.* 81, 613–620.
- Priest, N.D., 2001. Toxicity of depleted uranium. *Lancet* 357, 244–246.
- Reznikoff, C.A., Bertram, J.S., Brankow, D.W., Heidelberger, C., 1973. Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division. *Cancer Res.* 33, 3239–3249.
- Rosefort, C., Fauth, E., Zankl, H., 2004. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis* 19, 277–284.
- Sari-Minodier, I., Orsiere, T., Bellon, L., Pompili, J., Sapin, C., Botta, A., 2002. Cytogenetic monitoring of industrial radiographers using the micronucleus assay. *Mutat. Res.* 521, 37–46.
- Seoane, A.I., Dulout, F.N., 2001. Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mutat. Res.* 490, 99–106.
- Souidi, M., Gueguen, Y., Linard, C., Dudoignon, N., Grison, S., Baudelin, C., Marquette, C., Gourmelon, P., Aigueperse, J., Dublineau, I., 2005. In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* 214, 113–122.
- Stearns, D.M., Yazzie, M., Bradley, A.S., Coryell, V.H., Shelley, J.T., Ashby, A., Asplund, C.S., Lantz, R.C., 2005. Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis* 20, 417–423.
- Stephan, G., Kampen, W.U., Nosske, D., Roos, H., 2005. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of patients treated with radium-224 for ankylosing spondylitis. *Radiat. Environ. Biophys.* 44, 23–28.
- Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos, R., 1995. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 341, 169–184.
- 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, 479–487.
- Thomas, P., Umegaki, K., Fenech, M., 2003. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* 18, 187–194.
- Thomson, E.J., Perry, P.E., 1988. The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploidy. *Mutagenesis* 3, 415–418.
- Umegaki, K., Fenech, M., 2000. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis* 15, 261–269.
- UNSCEAR, 2000. Vol. II: effects. In: Nations, U. (Ed.), *Sources and Effects of Ionizing Radiation*. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, New York, USA, p. 580.
- Uphoff, C.C., Brauer, S., Grunicke, D., Gignac, S.M., MacLeod, R.A., Quentmeier, H., Steube, K., Tummeler, M., Voges, M., Wagner, B., et al., 1992. Sensitivity and specificity of five different mycoplasma detection assays. *Leukemia* 6, 335–341.

PUBLICATIONS 2

Discrimination of radiotoxic and chemotoxic effects of uranium with the micronucleus centromere assay: a preliminary study on ten patients

(*Soumission* Environmental health perspectives)

Discrimination of radiotoxic and chemotoxic effects of uranium with the micronucleus centromere assay: a preliminary study on ten patients

Darolles C.¹, Broggio D.², Feugier A.¹, De Meo M.⁴ and Petitot F.^{1*}

¹Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale
IRSN/DRPH/SRBE/LRTOX, Site du Tricastin - B.P. 166 - 26702 Pierrelatte Cedex, France

²Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Laboratoire d'Évaluation de la Dose Interne
IRSN/DRPH/SDI/LEDI, BP-17 92262 Fontenay-aux-Roses, France

³Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale
IRSN/DRPH/SRBE/LRTOX, BP-17 92262 Fontenay-aux-Roses, France

⁴Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale (EA 1784), Faculté de
Médecine et Pharmacie, Université de la Méditerranée, 27 Bd Jean Moulin, Marseille Cedex
05, France.

*To whom correspondence should be addressed at Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire,
Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale IRSN/DRPH/SRBE/LRTOX, Site du Tricastin - B.P.
166 - 26702 Pierrelatte Cedex, France. Tel. 33 4 75 50 75 41. Fax: 33 4 75 50 43.26. E-mail:
fabrice.petitot@irsn.fr

1. Introduction

Uranium (U) is an alpha-emitter radioactive element from the actinide group and can also be considered a heavy metal. Used as fuel in nuclear power plants, U is present in the different steps of the nuclear industry with different isotopic compositions (natural, depleted or enriched in ^{235}U ; Table 1) and with different speciations involving several solubilities (ATSDR, 1999). Due to these physical and chemical properties, U toxicity results from both chemical and radiological toxicity (Priest, 2001). Internal exposure to uranium is a major risk for the workers of nuclear fuel cycle industry that can occur accidentally after inhalation, ingestion, or absorption through intact or injured skin (ATSDR, 1999). The chemical and radiological toxicities of this radionuclide have been demonstrated in various organs such as bone, kidney, liver and brain system (Kathren and R. H. Moore, 1986; Kurttio et al., 2002 and 2005, La Touche et al., 1985; Leggett, 1989; Lestaevel et al., 2005, McClain et al., 2001, Pellmar et al., 1999). At the molecular level, U is known to induce DNA damage *in vitro* in Chinese hamster ovary cells (Lin et al., 1993), in human osteoblast cells (Miller et al., 2002 and 2003), in CHO EM9 (Stearns et al., 2005), in normal rat kidney proximal cells (NRK-52E) (Thiebault et al., 2007), in mouse embryo fibroblasts cells (C3H10T1/2) (Darolles et al., 2010) and *in vivo* in rat lung cells after inhalation of depleted uranium (DU) (Monleau et al., 2006), as shown by the formation of micronuclei, DNA adducts, sister chromatid exchange, chromosome aberrations as well as double-strand breaks. These effects of U were attributed either to its chemical or to its radiological properties.

Due to uranium's dual toxicity, assessing its carcinogenic risks and, more generally, its health risks is complex. In the specific case of workers handling U, biomonitoring is primarily based on measurements of uranium isotopes in urine and/or faeces. These measurement values are named biomarkers of exposure. The obtained results allow, using mathematical models developed by the International Commission on Radiological Protection (ICRP) (ICRP, publication 68), to calculate the uranium uptake and the resulting committed equivalent dose. Then, the comparison of the calculated committed equivalent dose to ICRP recommended exposure limits allow physicians to estimate an average risk to the health of a patient after an internal contamination. However, this method of risk assessment has two main weaknesses. First, exposure limits take into account the radiological toxicity of U, whereas its chemical toxicity receives little attention. Then, nothing guarantees an absence of risk associated with a chemotoxic effect of U (Priest, 2001). Second, the interindividual variability response of the body to toxic effects of the radionuclide is not taken into account. Indeed, biokinetic parameters governing radionuclide incorporation, distribution and elimination, and sensitivity to the toxic effects of a given radionuclide vary from an individual to another and can be largely different from what ICRP described for the reference man (ICRP, publication 23 and 89). Biomarkers of effects have been thus developed to try to complete biomarkers of exposure. While biomarkers of exposure determine the amount of a radionuclide in the body, the aim of biomarkers of effect is to reveal physiological dysfunction of organs (with plasma or urinary markers) or genotoxic effects (markers of genotoxicity) caused by the incorporation of a radionuclide. Markers of the biological effects of internal U contamination, such as markers of genotoxicity, could be helpful to define the proportion of toxic effects due to either the radiological or chemical properties of uranium.

Although cytogenetic analyses for dicentrics and translocations are the state of the art techniques for biological dosimetry, using them for biomonitoring or screening of relatively large groups of radiation

workers is difficult, since chromosome analyses are time-consuming and require highly skilled personnel. The cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay is a valuable and less laborious alternative for large scale studies (Fenech and Morley, 1985; Thierens et al., 1999). Moreover, this assay gives indirect access to dicentric chromosomes by scoring the nucleoplasmic bridges that result from the presence of a dicentric chromosome during cytokinesis (Fenech, 2006). The CBMN assay was used *in vitro* to evaluate the genotoxicity of uranium and *in vivo* for biomonitoring studies of U exposure. An increase in the frequency of micronuclei (MN) was reported, *in vitro*, in Human osteosarcoma cells (HOS) and in Chinese hamster ovary (CHO) cells which were treated with depleted uranium (DU), as compared to the uncontaminated group (Lin et al., 1993; Miller et al., 2003). These studies demonstrated that *in vitro* DU exposure resulted in genomic instability. However, in these studies, the CBMN assay was unable to differentiate the radiological or chemical origin of the induced genotoxic effects of DU. The sensitivity of the micronucleus assay to radiation could be enhanced by the scoring micronuclei with (centromere-positive micronucleus: BN-1MNC+) and without (centromere-negative micronucleus: BN-1MNC-) centromeres (Norppa et al., 1993), and could allow differentiating between the clastogenic and aneuploidogenic consequences of genotoxic stresses (Kirsch-Volders et al., 1997). A study on nuclear plant workers, compared to an age matched control group, showed that the systematic increase in the MN frequency with donor age was almost entirely due to an increase in BN-MNC+, and reflected an increased chromosomal loss with age (Thierens et al., 1999). Currently, the radiological stress induced by U has not been specifically assessed as no comparative analysis of various isotopic mixtures of U has been performed. Information therefore needs to be collected on specific markers identifying which kind of U toxicity (radiological or chemical) is involved. Data from the literature show that the best candidates are cytogenetic markers. Genotoxicity markers seem well suited for this problem.

The aim of this work was to search genotoxicity markers of internal contamination by U in order to discriminate chemical and radiological toxicity for a given U compound. The identification of these biomarkers are required to assess accurately the health effects of isotopic mixtures such as depleted U in ^{235}U with a low specific activity. This is a preliminary study of 10 donors before being validated on a much larger population. The assessment of biomarkers of U contamination was performed on human lymphocytes that were exposed to different isotopic mixtures of U. The cytokinesis-block micronucleus (MN) centromere assay was performed to identify various cytogenetic abnormalities: binucleated cells with one micronucleus (BN-1MN), with or without centromeres (BN-MNC+ and BN-MNC-, respectively), mononucleated cells with micronuclei (Mono-MNx), and nucleoplasmic bridges in binucleated cells (BN-NPB).

2. Materials and Methods

2.1 Blood sample collection

Evaluation of uranium genotoxicity was performed on lymphocytes obtained from ten healthy, non-smoking male voluntary donors, aged 30-40 years. According to a questionnaire, which the donors completed, they had not been exposed to ionising radiation for diagnostic or therapeutic purposes or to known genotoxic chemicals that might have interfered with the results of the testing for a year before blood sampling. All donors were acquainted with the study and they gave their permission for their blood

samples to be used for scientific purposes. Blood was collected under sterile conditions in heparinised vacutainer tubes (Becton Dickinson, NJ, USA) containing lithium heparin as anticoagulant, and kept at room temperature for less than 6h. After collection, blood was divided into a large number of samples.

2.2 Preparation of solutions for contamination

Various mixtures of U with different radiological activities while maintaining the same molar concentration of U, and inversely (different molar concentration of U while maintaining the same radiological activity) were prepared. Thus, we have for three molar concentrations of U (0.5 μM , 5 μM and 50 μM) a single radiological activity (175 Bq/L). And inversely, for three radiological activities (175 Bq/L, 1750 Bq/L and 17500 Bq/L) we have a single molar concentration of U (0.5 μM). This is the same for each molar concentration and for each radiological activity. Finally, we have 9 experimental conditions:

175 Bq/L-0.5 μM , 175 Bq/L-5 μM , 175 Bq/L-50 μM
1750 Bq/L-0.5 μM , 1750 Bq/L-5 μM , 1750 Bq/L-50 μM
17500 Bq/L-0.5 μM , 17500 Bq/L-5 μM , 17500 Bq/L-50 μM .

To have the concentrations and the wished activities, the depleted uranium was associated with ^{233}U (AREVA NC. Pierrelatte, France). A 10 mM DU stock solution was prepared by dissolution of depleted uranyl nitrate in a 100 mM NaHCO_3 solution. The stock solution was stirred to ensure the total dissolution of U and filtered through a 0.22 μm filter unit. All uranium solutions were freshly prepared and were not stocked. Untreated controls were exposed in RPMI 1640 medium containing 100 mM NaHCO_3 . Mitomycin C (Sigma Aldrich M0503, CAS Number 50-07-7. 1.5 μM) and Vincristine sulphate (Sigma Aldrich V8879, CAS number 2068-78-2. 16 μM), were used as positive clastogenic and positive aneugenic control, respectively.

2.3 Cytochalasin B blocked micronucleus test

The CBMN assay was performed following the guidelines described by Fenech and Morley (1985) and Fenech et al. (2003). Lymphocyte cultures were exposed to different concentrations of various mixture of uranium. Briefly lymphocyte cultures were started by adding 0.5 ml of whole blood to 4.5 ml of RPMI 1640 medium (RPMI 1640 medium 1X, without glutamine) supplemented with 20% heat inactivated foetal bovine serum (SVF), antibiotics (penicillin 10 000 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ and streptomycin 10 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and L-glutamine and were stimulated by 1% phytohaemagglutinin (all from Invitrogen®, France). Uranium was added 24 h after phytohaemagglutinin stimulation. Cytochalasin B, at a final concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, was added at 44 h after the cultures were established, to arrest cytokinesis of dividing cells.

At 72h, the cells were subjected to a mild hypotonic treatment (0.075 M KCl), fixed twice with methanol/acetic acid (3/1), then smeared on pre-cleaned microscope slides and air-dried and stored à -20°C until analysis. They were stained with a drop of DAPI in Vectashield® (Abcys SA, France). Two cultures per concentration were analysed. A total of 500 binucleated cells were examined per concentration and per culture. All slides were coded and analysed with an Olympus BX61 fluorescent microscope at 60x magnification.

A negative control (0 μM : NaHCO_3) and two positives controls (Mitomycin C (MMC): 1.5 μM and Vincristine Sulphate (VS): 16 μM) were included and were contaminated during 20 hours.

2.4 Fluorescence in situ hybridization (FISH) with a pancentromeric DNA probe

Fluorescence in situ hybridization was performed with a human pancentromeric probes (Adgenix, Cambio, StarFISH, UK) directly labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC). The remaining fixed cells were thawed and dropped onto pre-cleaned slides just before hybridization. FISH was performed according to the StarFISH protocols (Cambio, Cambridge, UK). Briefly, after thawing, the slides were dehydrated at room temperature in three ethanol solutions of increasing concentration (70%, 90%, 100%; 2 min each) and air dried. DNA was denatured by immersing the slides in 70% formamide in 2X SSC at 70°C for 2 min. After denaturation, the slides were placed in ice cold 70% ethanol for 2 min and the cells were dehydrated by dipping the slides into the three ethanol solutions for 2 min. Directly labelled human pancentromeric DNA probes from Cambio (STAR*FISH 1697-MF-02; fluorescein isothiocyanate (FITC) label. Cambridge, UK) were pre-warmed at 37°C for 5 min, denatured for 10 min at 85°C and chilled on ice. Following an overnight hybridization at 37°C, the slides were washed in 2X SSC at 37°C (5 min), in 50% formamide/2X SSC at 37°C (2 x 5 min) and in 2X SSC at 37°C (2 x 5 min). The cells were then counterstained with DAPI in Vectashield® (Abcys SA, France) and analysed using 60x magnification under an Olympus BX61 fluorescent microscope equipped with FITC filters.

2.5 Slide scoring

2.5.1 Cytokinesis-block micronucleus assay

Standard criteria were used for micronuclei identification (Fenech *et al.*, 2003). Binucleated cells (BN) with micronuclei (BN-MNi), mononucleated cells with micronuclei (Mono-MNi) and binucleated cells with nucleoplasmic bridges (BN-NPB) were scored. Exposed and control group samples were processed by the same operator on coded slides. For assessment of possible effects on cell proliferation, the Cytokinesis Block Proliferation Index (CBPI) was determined, which was calculated by the formula $CBPI = (M1 + 2M2 + 3(M3 + M4)) / N$ where M1 to M4 represented the number of cells with one to four nuclei (M3 and M4 are considered to be in their third cell cycle) and N was the total number of scored viable cells (Kirsch-Volders *et al.*, 2003; OECD, 2007; Surralles *et al.*, 1995). This index was evaluated by classified 500 cells according to the number of nuclei.

For each spot of cells scored, the following criteria were analysed to determine chromosome damage:

- i. The number of BN cells containing micronuclei: BN-MNi (in 500 BN cells).

The MN scoring criteria were those defined by Fenech *et al.* (Fenech *et al.*, 2003). Micronuclei were scored when their diameter was between 1/16 and 1/3 of the diameter of the main nucleus, when they were round in shape, not refractile, and when their chromatin structure and staining colour were similar to those of the main nucleus. A total of 500 BN per condition and per culture were examined for the presence of MNi. The data are presented as the percentage of binucleated cells with micronuclei (% BN-MNi).

- ii. The number of BN cells containing one or more nucleoplasmic bridges: BN-NPBs (in 500 BN cells).

An NPB was considered as a continuous nucleoplasmic link between the nuclei in a binucleated cell, and the width of a NPB usually did not exceed ¼ of the diameter of the nuclei within the cell (Fenech *et al.*,

2003). A total of 500 BN per condition and per culture were examined for the presence of NPBs. The data are presented as the percentage of binucleated cells with NPBs (% BN-NPBs).

iii. The number of mononucleated cells containing micronuclei (Mono-MNi).

Micronucleus in mononucleated cells were scored when their diameter was between 1/16 and 1/3 of the diameter of the main nucleus, when they were round in shape, not refractile, and when their chromatin structure and staining colour were similar to those of the main nucleus. The mononucleated cells with or without MN were examined and data are presented as the percentage of mononucleated cells with micronuclei per mononucleated cells (%Mono-MNi).

2.5.2 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with a pancentromeric DNA probe

Coloured cells with DAPI were preliminarily scored for the presence of micronuclei in binucleated cells. When a binucleated cell with micronuclei was noted, the filter setting was changed in order to observe the fluorescein-labelled centromeres and to determine whether the MN contained centromere signals or not. If one or more green spots (FITC-labelled centromeres) were observed inside the MN, it was classified as centromere-positive (BN-MNC+). An MN without labelling was classified as centromere-negative (BN-MNC-). The number of fluorescent spots per micronuclei was also recorded. The BN-MNC+ were classified as micronucleus harboring a single centromeres (BN-MNC1+) or several centromeres (BN-MNCx+). A total of 500 BN per condition and per culture were examined for the presence of micronucleus with (BN-MNC+) or without (BN-1MNC-) centromeric signals, and for the BN-MNC+ the presence of one (BN-MNC1+) or multicentromeres (BN-MNCx+) in the micronucleus. The data are presented as the number of binucleated cells containing micronucleus with (%BN-1MNC+) or without (%BN-1MNC-) centromeric signals per 1000 binucleated cells, mono (%BN-MNC1+) and multicentromeric (%BN-MNCx+) micronuclei. Exposed and control group samples were processed by the same operator.

2.7 Statistical analysis

All data were analysed using the Statistical Analysis Systems Institute package (SAS, 1999). All data (BN-MNi, BN-MNC+, BN-MNC1+, BN-MNCx+, BN-MNC-, BN-PNBs, and Mono-MNi) were analysed as Bernoulli variables (range 0-1) by analysis of variance using Proc mixed of SAS. The statistical model included two fixed effects:

- chemical effect with molar concentration of U with three levels (0.5, 5 and 50 μM)
- and radiological effect with radiological activity with three levels (175, 1750 and 17500 Bq/L). The

human effect was considered as a random term.

The interaction between these two fixed effects (molar concentration of U and radiological activity) was also tested. No significant interaction between these two factors (molar concentration of U and radiological activity) was noted for any of the measured parameters.

For negative and positive controls, contrast method was also used to compare each control (negative control vs Mitomycin C, negative control vs Vincristine Sulphate and Mitomycin C vs Vincristine Sulphate).

3. Results

3.1 Spontaneous Cytogenetic abnormalities

Table 1 showed the average total number of micronuclei (MNi), centromeres-positives micronuclei (MNC+) classified in monocentromeric (MNC1+) and multicentromeric (MNCx+), centromeres-negatives micronuclei (MNC-), nucleoplasmic bridges (NPB) in one thousand binucleated cells, for each of the 10 donors tested. Finally, this table showed the average total number of micronuclei (MNi(mono)) in mononucleated cells, for each of the 10 donors tested.

The mean spontaneous frequency of binucleated cells with micronuclei was $0.9 \% \pm 0.2$ (range 0.6 % - 1.2 %).

Micronuclei are thought to be a biomarker either of exposure to environmental mutagens or carcinogens, or of chromosome/genome instability. Fluorescent *in situ* hybridization with human pancentromeric DNA probes discriminates between negatively labelled MN containing acentric chromosome fragments (centromere-negative MN, MNC-) and positively labelled MN (centromeric MN, centromere-positive MN, MNC+) containing one or several whole chromosomes, respectively consecutive to clastogenic or aneugenic events. The mean spontaneous frequency of binucleated cells with centromere-positive MN (BN-MNC+) was $0.6 \% \pm 0.1$ (range 0.4 % - 0.8 %). The mean spontaneous frequency of binucleated cells with centromere-negative MN (BN-MNC-) was $0.3 \% \pm 0.1$ (range 0.2 % - 0.6 %).

Aneugenic events leading to centromeric MN may arise through different pathways. Chromosome migration impairment would lead to increased MNC1+ frequency whereas centrosome amplification would induce MNCx+ with three or more centromeric signals (Iarmarcovai *et al.*, 2007). The mean spontaneous frequency of BN-MNC1+ was $0.2 \% \pm 0.1$ (range 0.2 % - 0.4 %). The mean spontaneous frequency of BN-MNCx+ was $0.4 \% \pm 0.1$ (range 0.2 % - 0.6 %).

The nucleoplasmic bridges (NPBs) are assumed to occur when the centromeres of dicentric chromosomes are pulled to opposite poles of the cell at anaphase. The mean spontaneous frequency of BN-NPBs was $0.2 \% \pm 0.1$ (range 0.1 % - 0.3 %).

Finally, mean spontaneous frequency of micronuclei in mononucleated cells (MNi(mono)) was $2.2\% \pm 0,1$ (range 1.9 % - 2.4 %).

3.2 Evaluation of cytogenetic abnormalities after exposure to different isotopic mixtures of uranium with the micronucleus assay

3.2. Binucleated cells with micronuclei after exposure to different isotopic mixtures of U (BN-MNi)

Micronucleus assay, performed on 10 volunteer donors, revealed that the production of MNi in binucleated cells was modulated by the molar concentration of U ($P < 0.001$) and by the radiological activity of U ($P < 0.001$) without any interaction between these two factors (Figure 1). Data of 10 patients could be therefore grouped according to the molar concentration of U in 3 subgroups (0.5 μM , 5 μM and 50 μM) (Figure 1 A1) or according to the radiological activity of U in 3 subgroups (175 Bq/L, 1750 Bq/L and 17500 Bq/L) (Figure 1 A2).

The mean percentage of BN-MNi, for the 10 donors, increased with the molar concentration of U (Figure 1 A1; 3.5 %, 3.9 % and 4.3 % for 0.5, 5 and 50 μM , respectively). Moreover, the mean percentage of BN-MNi, for the 10 donors, increased with the radiological activity of U (Figure 1 A2; 2.8%, 3.9% and 4.3% for 175 Bq/L, 1750 Bq/L and 17500 Bq/L, respectively).

In conclusion, the formation of BN-MNi was significantly ($P < 0.001$) affected by the molar concentration and the radiological activity of U ($P < 0.001$).

Vincristine Sulphate (aneugen positive control) and Mitomycin C (clastogen positive control) induced significantly more BN-MNi than the control (spontaneous frequency). Indeed, Vincristine Sulphate induced a mean of 5% of BN-MNi (about 5 times more than control), and Mitomycin C induced a mean of 3% of BN-MNi (about 3 times more than control) (Figure 1B).

3.2.2 Fluorescence in situ hybridization (FISH) with a pancentromeric DNA probe

3.2.2.a Centromeric content (with or without centromeres)

Micronucleus centromeres assay, performed on 10 volunteer donors, revealed that the production of BN-MNC+ was only influenced by the molar concentration of U ($P < 0.001$) (Figure 2 A1). Indeed, the radiological activity of U did not influence the formation of BN-MNC+ ($P = 0.8$) and no interaction between molar concentration and radiological activity of U was observed. Data from 10 volunteer donors for BN-MNC+ could be therefore grouped according to the molar concentration of U in 3 subgroups (0.5 μM , 5 μM and 50 μM) (Figure 2 A1).

Micronucleus centromeres assay, performed on 10 volunteer donors, revealed that the production of BN-MNC- was only influenced by the radiological activity of U ($P < 0.001$) (Figure 2 A2). Indeed, the molar concentration of U did not influence the formation of BN-MNC- ($P = 0.1$) and no interaction between molar concentration and radiological activity of U was observed. Data from 10 volunteer donors for cells BN-MNC- could be therefore grouped according to the radiological activity of U in 3 subgroups (175 Bq/L, 1750 Bq/L and 17500 Bq/L) (Figure 2 A2).

The mean percentage of BN-MNC+ for the 10 donors, increased with the molar concentration of U (1.4%, 2% and 2.2% for 0.5, 5 and 50 μM , respectively). The percentage of BN-MNC+ was significantly higher for 5 μM and 50 μM compared to 0.5 μM , however no significant difference between 5 μM and 50 μM was observed. Moreover, the mean percentage of BN-MNC-, for the 10 donors, increased with the radiological activity of U (0.8%, 2.1% and 2.7% for 175 Bq/L, 1750 Bq/L and 17500 Bq/L respectively). This difference was statistically significant for the three radiological activity tested.

In conclusion, the formation of BN-MNC+ was affected by the molar concentration of U while the formation of BN-MNC- was affected by the radiological activity of U. Indeed, more the molar concentration of U will be important and more the formation of BN-MNC+ will be observed; and more the radiological activity of U will be important more the formation of BN-MNC- will be observed. In addition, these results showed that BN-MNC- and BN-MNC+ could discriminate between radiological and chemical toxicity of U.

Figure 2 B showed the proportion of BN-MNC+ and BN-MNC- after exposure to Mitomycin C and Vincristine Sulphate and in control (spontaneous frequency). BN-MNi production in the control was mainly due to an increase in BN-MNC+, reflecting an increase in chromosome loss. Indeed, 67 % of BN-MNi were BN-MNC+. In contrast, production of BN-MNi after exposure to Mitomycin C was mainly due to an increase in the frequency of BN-MNC-, reflecting an increase of chromosome breakage. Indeed, 82 % of BN-MNi cells were BN-MNC-; this result confirmed the clastogenic effect of Mitomycin C. Finally, the production of BN-MNi after exposure to Vincristine Sulphate was mainly due to an increase in the frequency of BN-MNC+ reflecting an increase in chromosome loss. Indeed, 70 % of BN-MNi were BN-MNC+; this result confirmed the aneugenic effect of Vincristine Sulphate.

3.2.2.b Number of centromeric signals in the centromeres-positives micronuclei

Micronucleus centromeres assay, performed on 10 volunteer donors, revealed that the production of BN-MNC1+ and the production of BN-MNCx+ were influenced only by the molar concentration of U ($P = 0.03$ and $P < 0.001$) (Figures 3 A1 and 3 A2). Indeed, the radiological activity of U did not influence the formation of BN-MNC1+ and BN-MNCx+ ($P = 0.5$ and $P = 0.7$) and no interaction between molar concentration and radiological activity of U was observed. Data from 10 patients for BN-MNC1+ and BN-MNCx+ could be therefore grouped according to the molar concentration of U in 3 subgroups (0.5 μM , 5 μM and 50 μM) (Figures 3 A1 and 3 A2).

The mean percentage of BN-MNC1+ for the 10 donors, increased with the molar concentration of U (0.9%, 1.1% and 1.3% for 0.5, 5 and 50 μM , respectively). The percentage of cells BN-MNC1+ was significantly higher for 50 μM compared to 0.5 μM , however no significant difference between 0.5 μM and 5 μM and between 5 μM and 50 μM was observed. Moreover, the mean percentage of BN-MNCx+ for the 10 donors, increased also with the molar concentration of U (0.45%, 0.9% and 0.96% for 0.5, 5 and 50 μM , respectively). The percentage of BN-MNCx+ was significantly higher for 5 μM and 50 μM compared to 0.5 μM , however no significant difference between 5 μM and 50 μM was observed.

In conclusion, the molar concentration of U influenced the formation of BN-MNC1+ and the formation of BN-MNCx+. Indeed, more the molar concentration of U will be important and more the formation of BN-MNC1+ and BN-MNCx+ will be increased. In addition, these results showed that BN-MNC1+ and BN-MNCx+ were induced by the chemotoxic effect of U. However, these events were scarce due to the breakdown of BN-MNi in many sub-classes (first in two classes: BN-MNC+ or BN-MNC-, the BN-MNC+ are redrawn in BN-MNC1+ or BN-MNCx+).

Mitomycin C, induced as many BN-MNC1+ and BN-MNCx+ as the control (spontaneous frequency) (Figure 3 B). Indeed the difference between Mitomycin C and the control was not statistically significant. Vincristine Sulphate induced significantly more BN-MNC1+ and BN-MNCx+ than the control (spontaneous frequency). Indeed, Vincristine Sulphate induced approximately 6 times more BN-MNC1+ and about 6 times more BN-MNCx+ than the control (1.15 % for Vincristine Sulphate vs 0.2% for control to BN-MNC1+, 2.35% for Vincristine Sulphate vs 0.4% for control to BN-MNCx+). Finally, Vincristine Sulphate induced significantly more BN-MNC1+ and BN-MNCx+ than Mitomycin C. Indeed, Vincristine Sulphate induced approximately 4 times more BN-MNC1+ and 9 times more BN-MNCx+ than Mitomycin C.

3.2.3 Binucleated cells with nucleoplasmic bridges (BN-NPB)

Micronucleus assay, performed on 10 volunteer donors, revealed that production of nucleoplasmic bridges in binucleated cells was modulated only by the radiological activity of U ($P < 0.001$) (Figure 4 A). Indeed, the molar concentration of U did not influence the formation of BN-NPBs ($P = 0.7$); there was no interaction between the molar concentration and the radiological activity of U. Data from 10 patients for BN-NPBs could be therefore grouped according to the radiological activity of U in 3 subgroups (175 Bq/L, 1750 Bq/L and 17500 Bq/L) (Figure 4 A).

The mean percentage of BN-NPBs for the 10 donors increased with the radiological activity of U (0.9%, 2.8% and 3.9% for 175 Bq/L, 1750 Bq/L and 17500 Bq/L, respectively). This difference was statistically significant for the three radiological activity tested.

In conclusion, the formation of BN-NPBs was affected by the radiological activity of U; indeed more radiological activity of U will be important and more the formation of NPBs will be observed. In addition, these results showed that BN-NPBs are induced by the radiological effect of U.

Figure 4 B illustrated the proportion of BN-NPBs after exposure to Mitomycin C and Vincristine Sulphate (genotoxic positive control) and in control (spontaneous frequency). The frequency of BN-NPBs induced by Mitomycin C was significantly higher than control. In contrast, the proportion of BN-NPBs after exposure to Vincristine Sulphate was comparable to the control. Moreover, the frequency of BN-NPBs induced by Mitomycin C (clastogenic agent) was significantly higher than the frequency of BN-NPBs induced by Vincristine Sulphate (aneugenic agent) (2.85% for Mitomycin C vs 0.25% for Vincristine Sulphate).

3.2.4 Mononucleated cells with micronuclei (Mono-MNi)

Micronucleus assay, performed on 10 volunteer donors, revealed that production of MNi in mononucleated cells was only modulated by the molar concentration of U ($P < 0.001$) (Figure 9). Indeed, the radiological activity of U did not influence the formation of Mono-MNi ($P = 0.8$); there was no interaction between the molar concentration and the radiological activity of U. Data from 10 patients for Mono-MNi could be therefore grouped according to the molar concentration of U in 3 subgroups (0.5 μM , 5 μM and 50 μM) (Figure 5 A).

The mean percentage of Mono-MNi, for the 10 donors, decreased with the molar concentration of U (5.2%, 4.2% and 3.7% for 0.5 μM , 5 μM and 50 μM , respectively). The percentage of Mono-MNi was significantly higher for 0.5 μM compared to 5 μM and 50 μM , however no significant difference between 5 μM and 50 μM was observed. Compared with other factors studied, the percentage of Mono-MNi decreased with the molar concentration of U. Moreover, at high molar concentrations the percentage of Mono-MNi was similar to the percentage of Mono-MNi in control.

In conclusion, the formation of Mono-MNi was affected by the molar concentration of U. Indeed, more the molar concentration of U will be weak and more the formation of Mono-MNi will be important. In addition, these results showed that Mono-MNi were induced by the chemical effect of U.

Figure 5 B illustrated the proportion of Mono-MNi after exposure to Mitomycin C and Vincristine Sulphate (genotoxic positive control) and in control (spontaneous frequency). The frequency of Mono-MNi induced by Mitomycin C was comparable to the control (spontaneous frequency). In contrast, the proportion of Mono-MNi after exposure to Vincristine Sulphate was significantly higher than control. Moreover, the frequency of Mono-MNi induced by aneugenic agent, Vincristine Sulphate, was significantly higher than the frequency of Mono-MNi induced by clastogenic agent, Mitomycin C (5.8% for Vincristine Sulphate vs 2.4% for Mitomycin C).

4. Discussion

The present study compared the genotoxic effects of different isotopic mixtures of U using the CBMN assay coupled with fluorescence *in situ* hybridization on an *in vitro* human lymphocytes that mimics internal contamination. With this method, chemotoxic and radiotoxic effects of U have been evaluated.

The genotoxicity of U is mediated by its radioactivity, as an alpha emitter, and its chemical properties, as a heavy metal (Lin *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2003; Monleau *et al.*, 2006; Stearns *et al.*, 2005).

To dissociate these two effects (chemical and radiological effects), three different molar concentrations were chosen with a single fixed radiological activity, and inversely for three different radiological activities one molar concentration was fixed. If the two effects (molar concentration for chemical effect and radiological activity for radiation effect) move at the same time, it is not possible to discriminate these two effects.

4.1. Spontaneous cytogenetic abnormalities

This study on human lymphocytes, using the cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN), has identified spontaneous frequencies of cytogenetic abnormalities on unexposed lymphocytes from 10 donors tested. The background frequency in 10 volunteers studied was a mean of 9 micronuclei per 1000 binucleated cells. These results are consistent with numerous previous studies, the frequency of spontaneous MNi ranged between 6 and 18 MNi per 1000 binucleated cells (Fenech and Morley, 1986; Livingston *et al.*, 1993; Surrallés and Natarajan, 1997; Sari-Minodier *et al.*, 2002 and 2007). The extreme values observed (6 to 12 MNi per 1000 binucleated cells) reflect a slight interindividual variability in the relatively homogeneous population chosen. Numerous factors are known to modify the base rate of MNi such as age, sex or even smoking (Ban *et al.*, 1993; Fenech and Morley, 1985). The present study was so done on a homogeneous population (same age, same sex, not smoking, not occupationally exposed to ionizing radiation ...) to minimize the influence of individual variability on the biological markers studied. These reasons have explained the slight interindividual variability observed.

Fluorescent *in situ* hybridization with a pancentromeric DNA probes has detected the presence (BN-MNC+) or not (BN-MNC-) of centromeres in MNi, and the number of centromeres in the BN-MNC+ (BN-MNC1+ and BN-MNCx+). The background frequency in the ten donors studied was a mean of 6 BN-MNC+ and 3 BN-MNC- per 1000 binucleated cells. In the population studied, the MNi production was mainly due to the presence of centromere-positive micronucleus (about 70 % of MNi). These results were consistent with numerous previous studies, who found that a total of around 70 % of BN-MNi was constituted by centromere-positive micronucleus in "control" population (Thierens *et al.* 2000; Sari-Minodier *et al.*, 2002 and 2007; Kryscio *et al.*, 2001. *cf.* Table 2). Scoring the number of centromeric signals in the CBMN assay may give an important contribution to genotoxicity studies and could provide additional information on the mechanism formation of BN-MNC+. Aneugenic events leading to MN containing a single centromere (BN-MNC1+) and two or more centromeres (BN-MNCx+) may arise through different pathways. Chromosome migration impairment would lead to increased MNC1+ frequency whereas centrosome amplification would induce MNCx+ with three or more centromeric signals (Iarmarcovai *et al.*, 2006). The background frequency in the ten donors studied was a mean of 2 BN-MNC1+ and 4 BN-MNCx+ per 1000 binucleated cells. In the study population, the production of MNC+ was mainly due to the presence of multicentromeric micronuclei (approximately 70% of BN-MNC+ were BN-MNCx+); thus an abnormal duplication of centrosome were primarily responsible for the formation of MNC+ in the studied population. These results were consistent with those of Baciuchka-Palmaro and colleagues (2002) as well as Orsiere and colleagues (2006) in which approximately 70% of BN-MNi were BN-MNCx+ in the control population (*cf.* Table 2).

In most studies using CBMN assay, BN-NPBs have not been recorded. But [Thomas and colleagues \(2003\)](#) have validated the use of BN-NPBs as a biomarker of DNA damage and chromosome rearrangement. In addition, they showed that the inclusion of BN-NPBs measurement in the CBMN assay increased its versatility as a genotoxicity test because not only does it allow a measurement of chromosome rearrangement that was previously unavailable in this test, but can also make a distinction between aneugenic and clastogenic agents. The background frequency in the ten donors studied was a mean of 2 NPBs per 1000 binucleated cells. These results were consistent with those observed by [Thomas and colleagues \(2003\)](#) in their control population. The extreme values observed (1 to 3 micronuclei per 1000 binucleated cells) reflect a near absence of interindividual variability. The very low proportion of spontaneous nucleoplasmic bridges in the general population could make it a biomarker of genotoxicity very powerful. Indeed, in studies with ionizing radiation, known to induce dicentric chromosomes, the NPBs biomarkers could be very interesting.

The evaluation of MNi in mononucleated cells (Mono-MNi) was an interesting additional parameter in the CBMN assay to differentiate aneugenic and clastogenic compounds ([Elhajouji et al. 1998](#); [Rosefort et al., 2004](#)). The background frequency in the ten donors studied was a mean of 22 MNi per 1000 mononucleated cells.

4.2 Cytogenetic abnormalities after exposure to different isotopic mixtures of uranium

4.2.1 Binucleated cells with micronuclei

This study showed that U exposure induced an increase in binucleated cells with MNi (BN-MNi). These results confirmed previous work that showed an increase of MNi in Chinese Hamster Ovary cells, human osteoblast cells, as well as in human lymphocytes after exposure to U ([Krunic et al., 2005](#); [Lin et al., 1993](#), [Miller et al. 2003](#); [Ibrulj et al. 2004](#)). The BN-MNi production was influenced by both molar concentration and radiological activity of U. More the molar concentration of U or more the radiological activity of U will be increased, and more the BN-MNi frequency will be high. Therefore the BN-MNi can not discriminate the chemotoxic and radiotoxic effects of U.

The background frequency of spontaneous BN-MNi was 0.9%. This frequency for positive controls was significantly increased; in fact it was 3% and 5% for Mitomycin C and Vincristine Sulphate, respectively. The mean frequency observed after contamination by U in the present study was about 4%. This frequency was similar to those of positives genotoxic controls and was significantly above the mean spontaneous frequency. Therefore, the frequency of BN-MNi was a biomarker of U genotoxicity.

These results confirmed previous work on mouse embryo fibroblasts ([Darolles et al., 2010](#)). Indeed, U exposure induced MNi in binucleated cells but no significant difference in the frequency of BN-MNi between depleted uranium (DU) and enriched uranium (EU) was observed. Only an increase with the molar concentration of U was recorded. With the present study, it is possible to conclude that the induction of BN-MNi was not only impacted by the chemical toxic effect or only by the radiological activity of U but by the effect of both (chemical and radiological). Therefore, BN-MNi could be a good marker of U genotoxicity but can not discriminate the chemotoxic or radiotoxic effects of U.

4.2.2 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with a pancentromeric DNA probe

4.2.2.a Centromeric content (with or without centromeres)

Fluorescence *in situ* hybridization with human pancentromeric DNA probes discriminates between chemical and radiological effects of U. Indeed, the centromeric content of micronuclei reflects their origin (Kirsch-Volders et al. 1997; Norppa and Falck, 2003). Micronuclei with labelled centromere (centromere-positive MN: BN-MNC+) are induced by aneugenic agents and are considered to contain whole chromosome. In contrast, micronuclei without labelled centromere (centromere-negative MN: BN-MNC-) are induced by clastogenic agents and represent acentric fragments of chromosomes.

The present study showed that the production of BN-MNC+ was modulated by the molar concentration of U, the induction of BN-MNC+ increased with the molar concentration of U. The mean frequency of spontaneous BN-MNC+ was 0.6%. This frequency for aneugenic control was significantly higher (3.5%); however after exposure to clastogenic control this frequency was similar to the spontaneous frequency. The mean frequency observed after exposition with different molar concentrations of U was about 2%. The mean frequency after U contamination was similar to the aneugenic control and was significantly higher than the mean spontaneous frequency. Therefore, the BN-MNC+ frequency seems to be rather a marker of chemotoxic effects induced by U.

These results confirmed previous study on mouse embryo fibroblasts exposed to DU or EU (Darolles et al., 2010). Indeed, BN-MNC+ were preferentially induced by DU (80 % of BN-1MN were MNC+) compared to EU. In the present study, concentrations below 0.5 μM induced a mean of 70% of BN-MNC+; concentrations of U above 0.5 μM induced only 40% of BN-MNC+.

The increase of BN-MNC+ is related to the chemical effect of U as a heavy metal. Therefore, the BN-MNC+ frequency seemed to be a marker of chemotoxic effect of U.

In parallel, the present study showed that the production of BN-MNC1+ and BN-MNCx+ were modulated by the molar concentration of U. After exposure to different isotopic mixtures of U, the production of BN-MNC+ was mainly due to the presence of BN-MNC1+ (more 50% of BN-MNC+ were BN-MNC1+ for each condition tested. cf. Table 3); chromosome migration impairment were mainly responsible for the formation of BN-MNC+ after U exposure. The spontaneous production of BN-MNC+ was mainly due to the presence of BN-MNCx+ (more 60 % of BN-MNC+ were BN-MNCx+). Therefore, chromosomes migrations impairments induced by U were different from those induced spontaneously. In conclusion, scoring the number of centromeric signals of MN can provide additional information on the mechanism formation of BN-MNC+. Currently, few studies have investigated the number of fluorescent signals in MNi, thus it was difficult to compare our data with those of literature. The main reason is that previous studies dealt with *in vivo* exposure at the work place and not after an *in vitro* exposure.

BN-MNC- production was modulated by the radiological activity of U; the induction of BN-MNC- increased with the radiological activity of U. The BN-MNC- frequency was 0.84% for the lowest activity (175 Bq/L), increased to 2.1% for the median activity (1750 Bq/L) and to 2.7% for the highest activity (17500 Bq/L). The mean frequency of spontaneous BN-MNC- in our study was 0. %. The frequency for positives controls was significantly higher (2.5% and 1.5% for Mitomycin C and Vincristine sulphate, respectively) than the spontaneous frequency. The frequency after U exposure was similar to the clastogenic control and was significantly higher than the spontaneous frequency. Furthermore, Mitomycin C (clastogenic compound) induced 80% of BN-MNC- while Vincristine Sulphate (aneugenic compound) induced only 30% of BN-MNC-. In the present study, activities greater than 1 750 Bq / L induced a mean of

60 % of BN-MNC-. In contrast, activities below 1 750 Bq / L induced only 30%. Results of the present study confirm previous work after contamination of mouse embryo fibroblasts to DU or EU (Darolles et al. 2010) who the rate of BN-MNC- was correlated with the radiological effects of U.

In conclusion, in whole cell exposure conditions describes in the present study, BN-MNi was composed by both BN-MNC+ and BN-MNC-. BN-MNi alone is a good biomarker of U genotoxicity but can not discriminate the chemotoxic and radiotoxic effects of U. However, fluorescent *in situ* hybridization can discriminate radiotoxic and chemotoxic effects of an isotopic mixture of U. Indeed, high level of BN-MNC+ reveal chemotoxic effect of U, while high levels of BN-MNC- are the result of radiotoxic effect of U. Moreover, after exposure to different isotopic mixtures of U, lymphocytes showed a significant increase in the frequency of Bn-MNC1+) and BN-MNCx+ compared to the control (spontaneous frequency). The centromeric analysis of MNi enhances knowledge about their mechanisms of formation. However, the study objective was to identify biomarkers to discriminate chemotoxic and radiotoxic effect of U, the low rate of mono- and multicentromeric MNi hamper their use as biomarkers.

The work objective was to identify biomarkers to discriminate chemotoxic and radiotoxic effect of U that could be used to improve monitoring of internal contamination victims. The BN-MNC- reflecting the level of U radiotoxic effects and the BN-MNC+ reflect the level of chemotoxic effect of U, it would be interesting to define a ratio from these two types of damage to evaluate the effects induced by U: chemical or radiological stress. Therefore, a ratio has been defined: MNC-/MNC+ (Table 4). With this ratio, it is possible to define an uranium compound with a low radiological stress and a compound with a high radiological stress. Indeed, in the present study, uranium mixtures with low specific activity (chemical stress dominant) have a mean ratio MNC-/MNC+ near 0.4. In contrast, uranium mixtures with a high specific activity (radiation stress dominant) have a mean ratio MNC-/MNC+ greater than 1. A ratio between 0.3 and 0.5 could indicate that the contamination has been carried out with an uranium compound with a high chemical stress. Contrary, a ratio between 1.1 and 5 could indicate that the contamination has been carried out with a compound with a high radiological stress. Further studies were necessary to better define these thresholds.

4.3 Other cytogenetic abnormalities identified with CBMN assay

With CBMN assay, various cytogenetic abnormalities can be observed including mononucleated cells with micronuclei (Mono-MNi) and binucleated cells with nucleoplasmic bridges (BN-NPBs). In the next part of the present study, both cytogenetic markers were analysed.

4.3.1 Binucleated cells with nucleoplasmic bridges (BN-NPBs)

The spontaneous frequency of BN-NPBs (mean of 0.2%) observed in the general population was very low; these results are consistent with those of Thomas and colleagues (2003). The NPBs could become a marker of radiotoxicity after exposure to radiation (dicentric chromosomes are mainly radio-induced). The BN-NPBs produced after U exposure was modulated by the radiological activity of U. The mean frequency of BN-NPBs after U exposure in this study was 2.5%.

The important difference with the spontaneous frequency of BN-NPBs should make a powerful biomarker of U genotoxic effects. These results confirm previous work which showed an increase of dicentric chromosomes after exposure to U and after exposure to ionising radiation (Miller et al., 2002b ; Greinert et al., 1999 ; Plan et al., 2005 ; Stephan et al., 2005). The observed results confirm previous

work where we demonstrated that the BN-NPBs reflected the clastogenic effect of U which increased with ^{235}U enrichment (Darolles et al. 2010).

In addition, Thomas et al. (2003) have suggested that the NPB/MN ratio could be a critical indicator to assess the toxic effects of tested compounds. Thus, MN induction in the absence of NPB could reflect the action of aneugenic agents, such as a spindle poison, since the MN would be the result of chromosome losses from spindle failures. Therefore, at one end, an aneugenic agent such as a spindle poison would be expected to exhibit an NPB/MN ratio close to 0 (Umegaki et al. 2001), while at the other end a highly clastogenic agent such as the ionizing radiations could have a ratio over 0.6 (Thomas et al. 2003). In the present study, the average ratio NPB/MN ratio was close to 0.3 for low radiological activities (≤ 175 Bq/L), indicating a mainly aneugenic effect of U. In contrast, for the other radiological activities (1750 Bq/L and 17500 Bq/L) the average ratio NPB/MN was close to 0.8, indicating a predominantly clastogenic effect of U. Moreover, the ratio for Vincristine Sulphate was 0 (aneugenic control) whereas it was 1 for Mitomycin C (clastogenic control). In conclusion, the BN-NPBs were mainly due to the radiotoxic effects of U.

These results confirm previous work where we found that the average NPB/MN ratio was 0.2 for DU and 0.6 for EU. Overall, DU could be identified primarily as a mainly aneugenic agent while EU could be assimilated as a mainly clastogenic agent. The tight correlation between the numbers of BN-NPB and the doses showed that the NPBs were mainly due to the radiological effects of U.

4.3.2 Mononucleated cells with micronuclei (Mono-MNi)

Recent studies have indicated that aneugens, but not clastogens, induce MNi in mononucleated cells (Elhajouji et al. 1998; Rosefort et al., 2004). In line with this study, our results showed that Mitomycin C (clastogen) did not increase MNi frequency in mononucleated cells, while Vincristine Sulphate (aneugen) did. Production of Mono-MNi after exposure to different isotopic mixtures of U was mainly modulated by the molar concentration of U. In contrast to other cytogenetic parameters studied, the percentage of Mono-MNi decreased with the increasing of molar concentration of U and with the increasing of ionizing radiation doses and thus with the increasing of clastogenic effects. These results confirm our previous work performed on mouse embryo fibroblasts (Darolles et al. 2010). Indeed, the frequency of Mono-MNi decreased or disappeared (identical frequency to the untreated control) when a significant radiological effect exist. With this study on human lymphocytes, we can now propose that the induction of Mono-MNi is correlated to the chemotoxic effect of U as a heavy metal. The concomitant analysis of BN-NPBs and Mono-MNi should allow to discriminate the chemotoxic and radiotoxic effect of a given isotopic mixture of U.

5. Conclusion and Prospects

The contamination study of *in vitro* human lymphocytes with different isotopic mixtures of U has confirmed that the genotoxic profile (chemotoxic/radiotoxic) of U was bound to its isotopic composition and therefore to its specific activity.

The increase of MNi in binucleated cells is characteristic of U contamination regardless the isotope mixture. In contrast, the frequency of MNi, alone, can not discriminate the chemotoxic and radiotoxic

effects of U. The frequency of the micronuclei contents (centromeric micronuclei (BN-MNC +) and acentric (BN-MNC-)), nucleoplasmic bridges (BN-PNPS) and mononucleated cells with MNi (Mono-MNi) allows for such discrimination. Indeed, the frequencies of BN-1MNC- and BN-NPBs were necessary to reflect the level of radiotoxic effect of a given isotopic mixture of U. While the frequencies of BN-1MNC+ and the Mono-MNi were necessary to reflect the level of chemotoxic effect of given isotopic mixture of U.

The combination of these different genotoxicity biomarkers should help to discriminate chemotoxic and radiotoxic effects of U. These biomarkers may complement conventional markers of dosimetry to assess the consequences of internal contamination in the U. These two genotoxic markers could complement classical dosimetric biomarkers to assess internal contamination with uranium.

These promising results are preliminary and must be validated. A screening of a control population rather diverse (age, sex, lifestyle ...) should assess the interindividual variations. Subsequently, a study on blood samples from persons accidentally contaminated by U could be conducted to assess the four biomarkers (BN-MNC+, BN-MNC-, BN-NPBs, Mono-MNi).

Acknowledgements

This work was supported by grants from AREVA NC and IRSN. Special thanks are given to Dr A. Acker and Dr B. Auriol for many helpful discussions and their support of the project.

Conflict of Interest Statement

None

References

- ATSDR, 1999. Toxicological profile for uranium. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of health and human services.
- Baciuchka-Palmaro, M., Orsiere, T., Duffaud, F., Sari-Minodier, I., Pompili, J., Bellon, L., De Meo, M., Digue, L., Favre, R., Botta, A., 2002. Acentromeric micronuclei are increased in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients. *Mutat Res* 520, 189-198.
- Ban, S., Cologne, J.B., Fujita, S., Awa, A.A., 1993. Radiosensitivity of atomic bomb survivors as determined with a micronucleus assay. *Radiat Res* 134, 170-178.
- Darolles C, Broggio D, Feugier A, Frelon S, Dublineau I, De Meo M, Petitot F. Different genotoxic profiles between depleted and enriched uranium. *Toxicology Letters*. 2010 Feb 15;192(3):337-48.
- Elhajouji, A., Cunha, M., Kirsch-Volders, M., 1998. Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis* 13, 193-198.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147, 29-36.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 534, 65-75.
- Fenech, M., 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 600, 58-66.
- Greinert, R., Thieke, C., Detzler, E., Boguhn, O., Frankenberg, D., Harder, D., 1999. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by 3.45 MeV alpha particles analyzed by premature chromosome condensation. *Radiat Res* 152, 412-420.
- Ibrulj, S., Kronic-Haveric, A., Haveric, S., Pojskic, N., Hadziselimovic, R., 2004. Micronuclei occurrence in population exposed to depleted uranium and control human group in correlation with sex, age and smoking habit. *Med Arh* 58, 335-338.
- Kathren, R.L., Moore, R.H., 1986. Acute accidental inhalation of U: a 38-year follow-up. *Health Phys* 51, 609-619.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P., 1997. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res* 392, 19-30.

- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res* 540, 153-163.
- Kryscio, A., Ulrich Muller, W.U., Wojcik, A., Kotschy, N., Grobelny, S., Streffer, C., 2001. A cytogenetic analysis of the long-term effect of uranium mining on peripheral lymphocytes using the micronucleus-centromere assay. *Int J Radiat Biol* 77, 1087-1093.
- Kurttio, P., Auvinen, A., Salonen, L., Saha, H., Pekkanen, J., Makelainen, I., Vaisanen, S.B., Penttila, I.M., Komulainen, H., 2002. Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 110, 337-342.
- Kurttio, P., Komulainen, H., Leino, A., Salonen, L., Auvinen, A., Saha, H., 2005. Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 113, 68-72.
- Iarmarcovai, G., Botta, A., Orsiere, T., 2006. Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. *Toxicol Lett* 166, 1-10.
- Iarmarcovai, G., Botta, A., Orsiere, T., 2007. Changes in chromosome number, genetic instability, and occupational exposures. *Bull Cancer* 94, 381-388.
- La Touche, Y.D., Willis, D.L., Dawydiak, O.I., 1987. Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health Phys* 53, 147-162.
- Leggett, R.W., 1989. The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys* 57, 365-383.
- Lestaevel, P., Houpert, P., Bussy, C., Dhieux, B., Gourmelon, P., Paquet, F., 2005. The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 212, 219-226.
- Lin, R.H., Wu, L.J., Lee, C.H., Lin-Shiau, S.Y., 1993. Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 319, 197-203.
- Livingston, G.K., Foster, A.E., Elson, H.R., 1993. Effect of in vivo exposure to iodine-131 on the frequency and persistence of micronuclei in human lymphocytes. *Journal of toxicology and environmental health* 40, 367-375.
- McClain, D.E., Benson, K.A., Dalton, T.K., Ejnik, J., Emond, C.A., Hodge, S.J., Kalinich, J.F., Landauer, M.A., Miller, A.C., Pellmar, T.C., Stewart, M.D., Villa, V., Xu, J., 2001. Biological effects of embedded depleted uranium (DU): summary of armed forces radiobiology research institute research. *Sci Total Environ* 274, 115-118.
- Miller, A.C., 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, 247-259.
- Miller, A.C., Xu, J., Stewart, M., Brooks, K., Hodge, S., Shi, L., Page, N., McClain, D., 2002b. Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints. *Radiat Prot Dosimetry* 99, 275-278.
- OECD, 2007. OECD Guideline for Testing of Chemicals. No. 487. In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (MNvit).
- Orsiere, T., Sari-Minodier, I., Iarmarcovai, G., Botta, A., 2006. Genotoxic risk assessment of pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde by use of personal air sampling and analysis of DNA damage in peripheral lymphocytes. *Mutat Res* 605, 30-41.
- Norppa, H., Falck, G.C., 2003. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18, 221-233.
- Priest, N.D., 2001. Toxicity of depleted uranium. *Lancet* 357, 244-246.
- Rosefort, C., Fauth, E., Zankl, H., 2004. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis* 19, 277-284.
- Stearns, D.M., Yazzie, M., Bradley, A.S., Coryell, V.H., Shelley, J.T., Ashby, A., Asplund, C.S., Lantz, R.C., 2005. Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis* 20, 417-423.
- Stephan, G., Kampen, W.U., Nosske, D., Roos, H., 2005. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of patients treated with radium-224 for ankylosing spondylitis. *Radiat Environ Biophys* 44, 23-28.
- Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos, R., 1995. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 341, 169-184.
- 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, 479-487.
- Thierens, H., Vral, A., Barbe, M., Aousalah, B., De Ridder, L., 1999. A cytogenetic study of nuclear power plant workers using the micronucleus-centromere assay. *Mutat Res* 445, 105-111.
- Rosefort, C., Fauth, E., Zankl, H., 2004. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis* 19, 277-284.

- Sari-Minodier, I., Orsiere, T., Auquier, P., Martin, F., Botta, A., 2007. Cytogenetic monitoring by use of the micronucleus assay among hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation. *Mutat Res* 629, 111-121.
- Sari-Minodier, I., Orsiere, T., Bellon, L., Pompili, J., Sapin, C., Botta, A., 2002. Cytogenetic monitoring of industrial radiographers using the micronucleus assay. *Mutat Res* 521, 37-46.
- Thomas, P., Umegaki, K., Fenech, M., 2003. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* 18, 187-194.
- Umegaki, K., Fenech, M., 2000. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis* 15, 261-269.

Figures

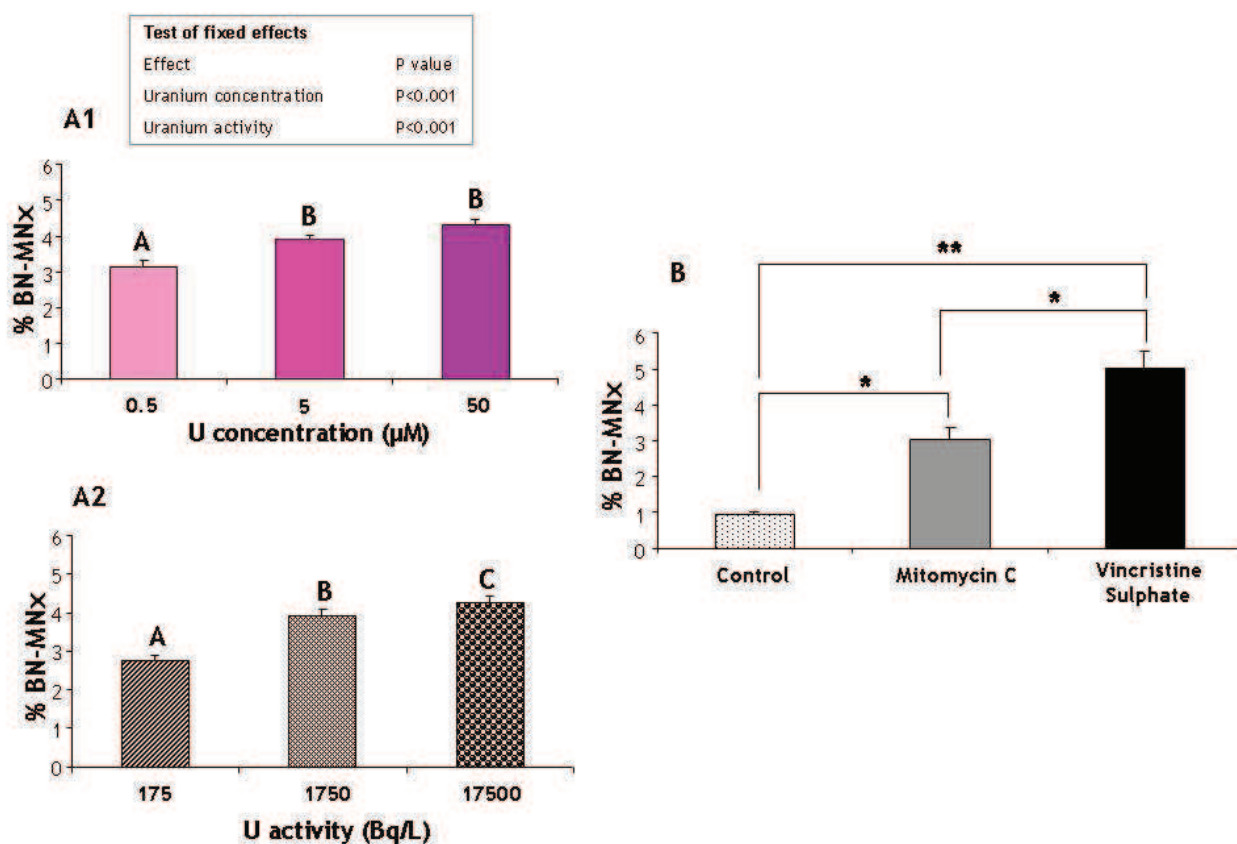


Figure 1. (A1) Percentage (mean ± standard deviation) of binucleated lymphocytes with micronuclei (% BN-MNx) according to different molar concentrations tested (0.5 μM, 5 μM and 50 μM) for the 10 donors. (A2) Percentage (mean ± standard deviation) of binucleated lymphocytes with micronuclei (% BN-MNx) according to different radiological activities tested (175 Bq/L, 1750 Bq/L and 17500 Bq/L) for the 10 donors

(B) Percentage of binucleated lymphocytes with micronuclei (% BN-MNx) after exposure to genotoxic controls (Mitomycin C: gray bar and Vincristine Sulphate: black bar) as well as in the control (bar with black dots)

% BN-MNx: % binucleated lymphocytes with micronuclei

A, B, C: bars with different letter are significantly different between the molar concentrations of U or between the activity concentrations of U (P <0.05, contrasts method) (p<0.05)

* P <0.05 difference statistically significant between Control and Mitomycin C and between Mitomycin C and Vincristine sulphate (contrast method)

** P <0.01 difference statistically significant between Control and Vincristine sulphate (contrast method)

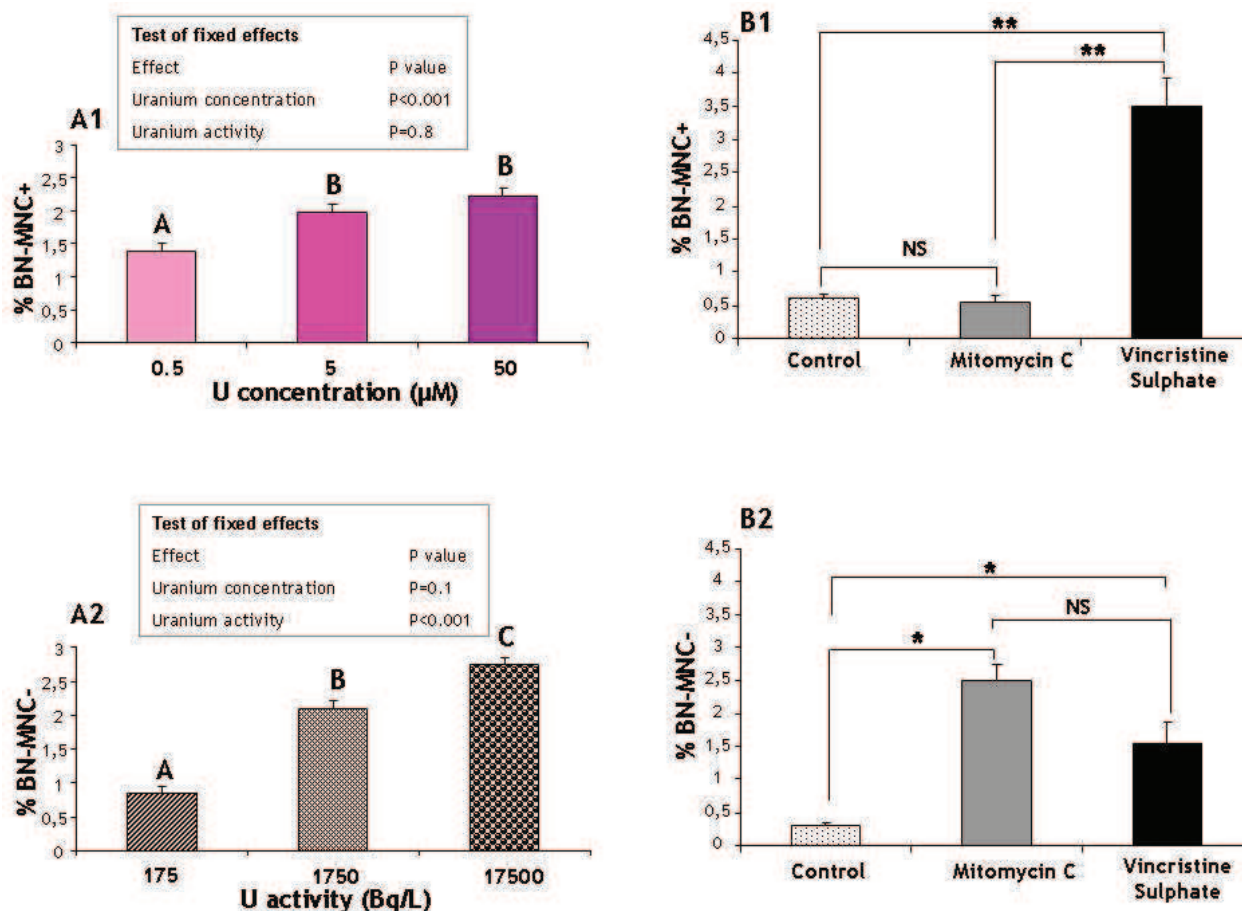


Figure 2. (A) Centromere contents of micronuclei in binucleated lymphocytes after exposure to different isotopic mixtures of U according to different molar concentrations tested (0.5 μM , 5 μM and 50 μM) for BN-MNC+ (A1) and according to different radiological activities tested (175 Bq/L, 1750 Bq/L and) 17500 Bq/L) for BN-MNC- (A2).

(B) Percentage of binucleated lymphocytes with centromere-positive micronuclei (BN-MNC+) and centromere-negative micronuclei (B2) after exposure to genotoxic controls (Mitomycin C: gray bar and Vincristine Sulphate: black bar) as well as in the control (bar with black dots)

% BN-MNC+: % binucleated cells with micronuclei containing one or more centromeres (centromere-positive micronucleus).

% BN-MNC-: % binucleated cells with micronuclei without a centromere (centromere-negative micronucleus).

A, B, C: bars with different letter are significantly different between the molar concentrations of U or between the activity concentrations of U ($P < 0.05$, contrasts method) ($p < 0.05$)

NS: no statistically significant difference between controls (contrast method)

* $P < 0.05$ difference statistically significant between Control and Mitomycin C and between Control and Vincristine sulphate (contrast method)

** $P < 0.01$ difference statistically significant between Control and Vincristine sulphate and between Mitomycin C and Vincristine sulphate (contrast method)

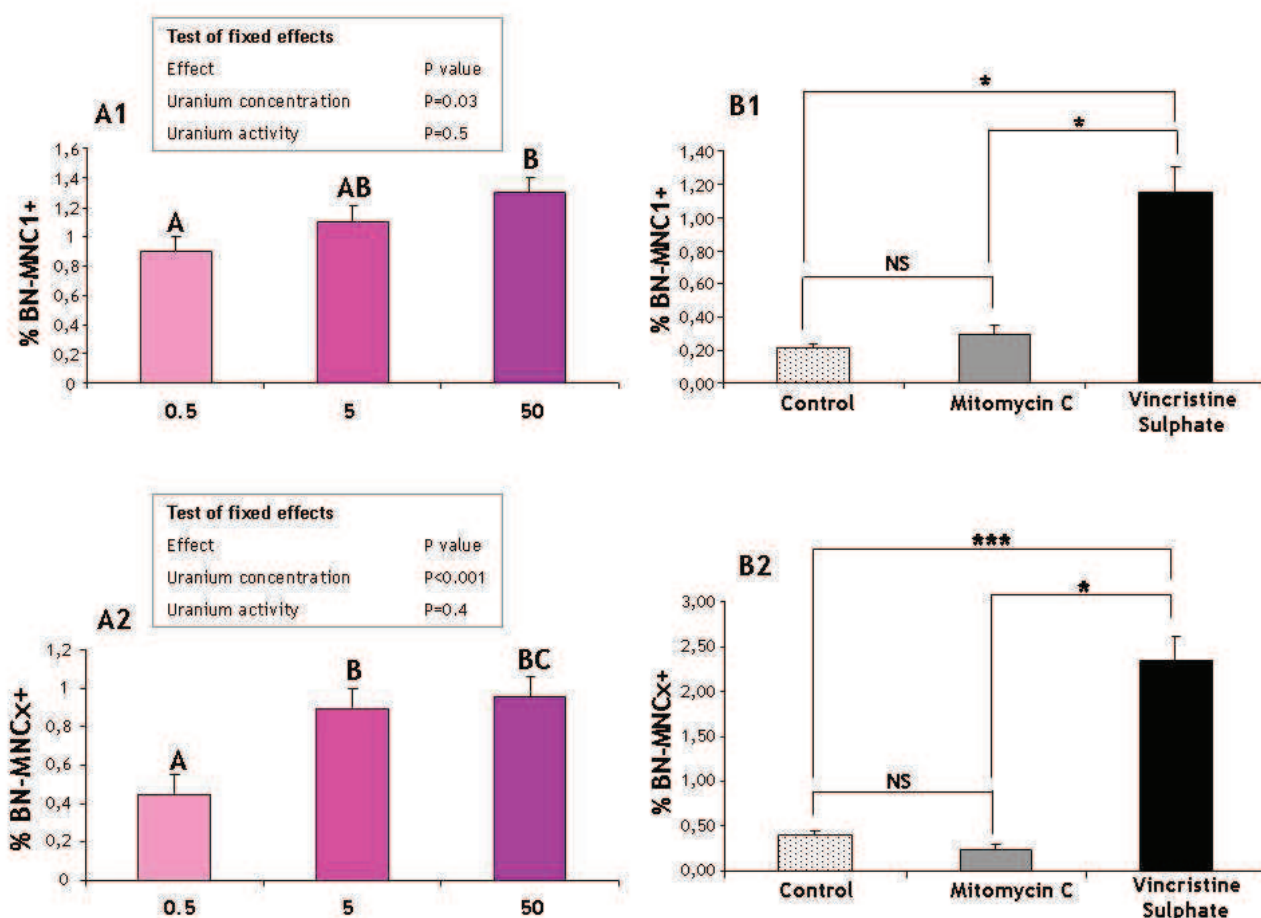


Figure 3. (A1 and A2) Percentage (mean \pm standard deviation) of binucleated lymphocytes with one (%BN-MNC1+) or (%BN-MNCx+) centromeric signals according to different molar concentrations tested (0.5 μ M, 5 μ M and 50 μ M) for the 10 donors.

(B) Percentage of binucleated lymphocytes with micronuclei with one (%BN-MNC1+) or (%BN-MNCx+) several centromeric signals after exposure to genotoxic controls (Mitomycin C: gray bar and Vincristine Sulphate: black bar) as well as in the control (bar with black dots)

% BN-MNC+: % binucleated cells with micronuclei containing one or more centromeres (centromere-positive micronucleus).

% BN-MNC-: % binucleated cells with micronuclei without a centromere (centromere-negative micronucleus).

A, B, C: bars with different letter are significantly different between the molar concentrations of U or between the activity concentrations of U ($P < 0.05$, contrasts method) ($p < 0.05$)

NS: no statistically significant difference between controls (contrast method)

* $P < 0.05$ difference statistically significant between Control and Mitomycin C and between Control and Vincristine sulphate (contrast method)

** $P < 0.01$ difference statistically significant between Control and Vincristine sulphate and between Mitomycin C and Vincristine sulphate (contrast method)

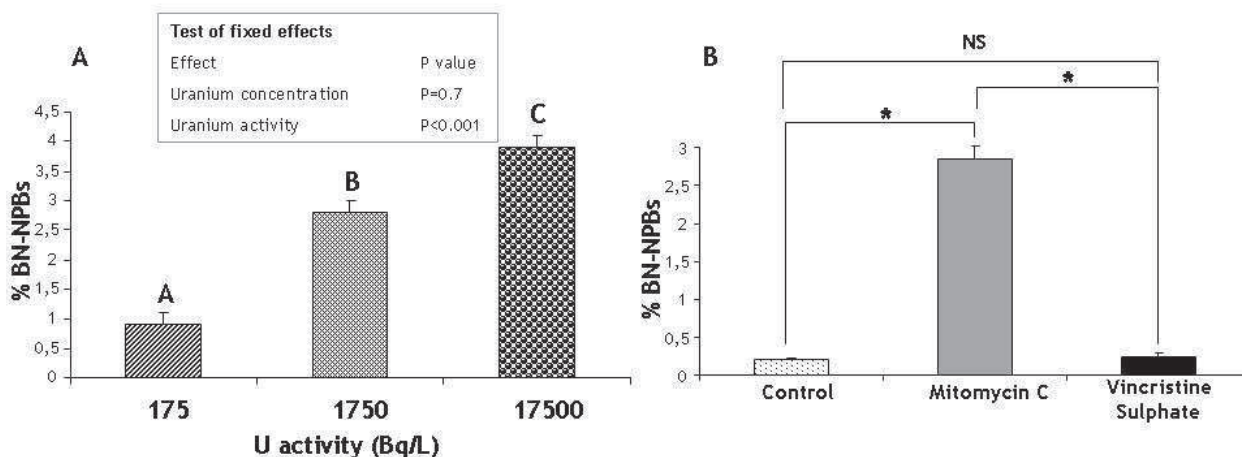


Figure 4. Percentage (mean ± standard deviation) of binucleated cells with nucleoplasmic bridges (BN-NPBs) according to different radiological activities tested (175 Bq/L, 1750 Bq/L and 17500 Bq/L) for the 10 donors (A) and after exposure to Mitomycin C (positive clastogen control, grey bar) or Vincristine sulphate (positive c aneugen control, black bar) (B). % NPBs: % of nucleoplasmic bridges.

A, B, C: bars with different letter are significantly different between the molar concentrations of U or between the activity concentrations of U ($P < 0.05$, contrasts method) ($p < 0.05$)

NS: no statistically significant difference between Control and Vincristine Sulphate (contrast method)

$P < 0.05$ difference statistically significant between Control and Mitomycin C and between Mitomycin C and Vincristine sulphate (contrast method)

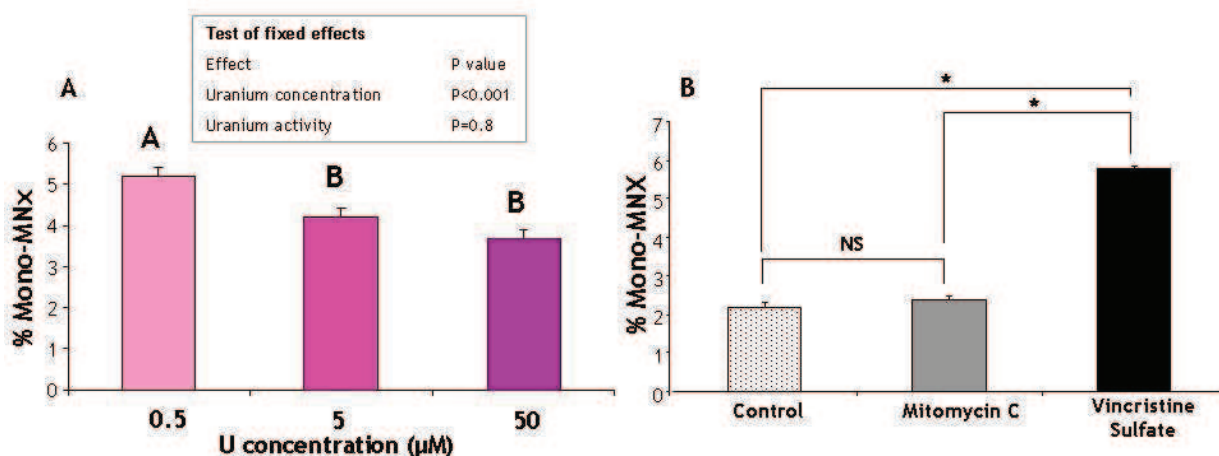


Figure 5. Percentage (mean ± standard deviation) of mononucleated cells with micronuclei (Mono-MNx) according to different molar concentrations tested (0.5 µM, 5 µM and 50 µM) for the 10 donors (A) and after exposure to Mitomycin C (positive clastogen control, grey bar) or Vincristine sulphate (positive c aneugen control, black bar) (B).

% Mono-MNx: % mononucleated cells with micronuclei.

A, B, C: bars with different letter are significantly different between the molar concentrations of U ($p < 0.05$)

NS: no statistically significant difference between Control and Mitomycin C (contrast method)

* $P < 0.05$ difference statistically significant between Control and Vincristine sulphate and between Mitomycin C and Vincristine sulphate (contrast method)

RESUME

La toxicité de l'uranium (U) résulte de la combinaison de ses propriétés chimiques, en tant que métal lourd, et de ses propriétés radiologiques, en tant qu'émetteur de rayonnements ionisants. L'identification de marqueurs biologiques permettant de discriminer pour un composé uranifère donné la part de sa toxicité chimique, de la part de sa toxicité radiologique, évite de sous-estimer les effets sur la santé des mélanges isotopiques ayant une faible activité spécifique et donc un faible impact en terme de dose tels que l'U appauvri en ^{235}U . Les données de la littérature montrent que les meilleurs candidats pour répondre à cette problématique sont des marqueurs cytogénétiques.

La recherche de biomarqueurs de contamination par l'U a été mise en œuvre sur trois modèles cellulaires (fibroblastes de souris, lymphocytes de rat et humains) exposés à divers mélanges isotopiques de l'U (diverses activités spécifiques). Le test des micronoyaux (MN) avec marquage centromérique a été réalisé afin de discriminer les effets chimiotoxiques des effets radiotoxiques de l'U.

Ces études révèlent que le seul dénombrement des cellules binucléées avec des MNx ne suffit pas à évaluer avec précision la génotoxicité de l'U. En revanche, les fréquences d'apparition de cellules binucléées avec des MNx centromères-négatifs ou avec un pont nucléoplasmique peuvent refléter le niveau des effets radiotoxiques de l'U. Par ailleurs, la numération des cellules binucléées avec des MNx centromères-positifs et des cellules mononucléées avec des MNx peut refléter le niveau des effets chimiotoxiques de l'U.

Ces marqueurs cytogénétiques validés sur différents modèles biologiques permettent de déterminer pour un mélange isotopique donné de l'U la part des effets génotoxiques liée à sa chimiotoxicité de la part des effets génotoxiques liée à sa radiotoxicité. Ces marqueurs biologiques pourraient compléter les marqueurs classiques de dosimétrie pour évaluer les conséquences de la contamination interne à l'U.

Mots-clés : uranium appauvri, uranium enrichi, chimiotoxicité, radiotoxicité, génotoxicité, micronoyaux, FISH.

ABSTRACT

Uranium (U) is a heavy metal that is also considered as an alpha emitter. Thus the origin of U toxicity is both chemical and radiological. The identification of biomarkers to discriminate chemical and radiological toxicity for a given U compound is required to assess accurately the health effects of isotopic mixtures such as depleted U in ^{235}U with a low specific activity. Data from the literature show that the best candidates are cytogenetic markers. In the present work, the assessment of biomarkers of U contamination was performed on three cellular models (mouse fibroblasts, rat lymphocytes and human lymphocytes) that were exposed to different isotopic mixtures of U. The cytokinesis-block micronucleus (MN) centromere assay was performed to discriminate the chemotoxic and radiotoxic effects of U. This study showed that the evaluation of micronuclei in binucleated cells could not assess U genotoxicity accurately. Instead, the assessment of centromere-negative micronuclei and nucleoplasmic bridges correlated with the radiotoxic effects of U. The evaluation of centromere-positive micronuclei and micronuclei in mononucleated cells correlated with the chemotoxic effects of U. These cytogenetic markers should be validated on different biological models and could be proposed to discriminate radiological and chemical toxicity of a given isotopic mixture of U. These four cytogenetic markers could be a useful complement of the classical dosimetric biomarkers for the assessment of internal uranium contamination.

Key words : Depleted uranium, enriched uranium, chemotoxicity, radiotoxicity, genotoxicity, micronuclei, FISH.