



HAL
open science

Étude de l'effet de l'uranium sur la multipotentialité des cellules souches neurales : modèle in vitro de culture de neurosphères

Antoine Becquet

► **To cite this version:**

Antoine Becquet. Étude de l'effet de l'uranium sur la multipotentialité des cellules souches neurales : modèle in vitro de culture de neurosphères. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01662196

HAL Id: dumas-01662196

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01662196>

Submitted on 12 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Thèse n°101

2017

THÈSE

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

ÉTUDE DE L'EFFET DE L'URANIUM SUR LA MULTIPOTENTIALITÉ DES CELLULES SOUCHES NEURALES

MODÈLE IN VITRO DE CULTURE
DE NEUROSPHÈRES

Présentée et soutenue le 23 novembre 2017 par

ANTOINE BECQUET

Né le 14 mars 1992

JURY

Pr. BERNARD MULLER

Dr. CHRYSTELLE IBANEZ

Dr. CLEMENT MORGAT

Président

Directrice de Thèse

Assesseur

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, Chrystelle Ibanez. Pour son accueil amical, ses précieux conseils, mais aussi sa bonne humeur et son soutien, qui ont fait de ces six mois une expérience aussi formatrice qu'agréable, je lui exprime toute ma reconnaissance.

Je remercie le Dr Karine TACK de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Radiotoxicologie et Radiobiologie Expérimental pour ce stage de Master 2, m'offrant une expérience capitale pour mon avenir professionnel.

J'adresse mes remerciements au Pr Bernard MULLER, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Bordeaux, et au Dr Clément MORGAT, Radiopharmacien au CHU de Bordeaux, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Ce projet a nécessité l'aide et les conseils précieux de plusieurs collègues qui ont toujours su répondre présent lorsque j'en avais le besoin.

J'exprime toute ma gratitude aux formidables techniciens du laboratoire : Céline GLOAGUEN, Christelle ELIE et Dimitri KERESLIDZE.

Je remercie également le Dr Tény EBRACHIMIAN, le Dr Yann GUEGUEN et le Dr Audrey LEGENDRE ainsi que l'ensemble des chercheurs et de l'équipe du LRTOX, toujours disponibles et à l'écoute de mes interrogations.

Enfin, j'adresse ma gratitude à mon amie, Charline, l'artiste qui a donné vie aux images et schémas qui illustrent cette thèse.

*A celle qui m'accompagne depuis le début et continue de m'encourager, jour après jour,
Merci.*

TABLE DES MATIERES

Remerciements	2
Table des Matières	4
Liste des Abréviations et Acronymes	6
Liste des Figures	7
Liste des Tableaux	8
Avant-propos	9
IRSN	9
Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale	9
Introduction	10
Uranium	10
1 Découverte fortuite	10
2 Caractéristiques dichotomiques d'un élément	10
3 Applications	12
4 Expositions	14
5 Biocinétique	16
Système Nerveux Central	17
1 Anatomie Générale.....	17
2 Neuroanatomie : Notions.....	18
3 Multipotentialité	20
Toxicités de l'Uranium	26
1 Généralités	26
2 Néphrotoxicité	27
3 Toxicité dans l'os.....	28
4 Autres organes cibles	29
5 Reprotoxicité	31
6 Uranium et cancers	32
7 Neurotoxicité	34
Problématique	37

Matériels et Méthodes	38
1 Modèle d'étude	38
2 Méthodes Analytique	40
Résultats.....	44
Prolifération et Neurosphères	44
Différenciation et Survie Cellulaire.....	44
Analyse Quantitative des Populations Neurales	46
1 Population cellulaire totale	46
2 Population Neuronale	46
3 Population de Progéniteurs Gliaux : Cellules Olig2+.....	48
4 Population Astrocytaire.....	48
5 Population Oligodendrocytaire mature	50
6 Proportion Relative des Sous-populations Neurales.....	50
Analyse de l'Expression Génie des Marqueurs Apoptotiques.....	52
Analyse de l'Expression Génique des Marqueurs de la Neurogenèse .	52
Discussion.....	54
Survie cellulaire.....	54
Morphologie des neurones	56
Multipotentialité.....	56
Expériences et Perspectives	58
Conclusion Générale	59
Bibliographie	60
Articles	60
Rapports & Livres	66
Sites internet.....	66
Abstract

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ALAT : Alanine Amino Tranférase

ANOVA : Analysis of Variance

ASAT : Aspartate Amino Transférase

ATSDR : Agency for Toxic Substance and Disease Registry

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CSN : Cellule(s) Souche(s) Neurale(s)

EPIC : Etablissement Public à Caractère Industriel et Commercial

EROs : Espèces Réactives de l'Oxygène

ETM : Élément-Trace Métallique

FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting

IRSN : Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

LRTOX : Laboratoire de RadioToxicologie Expérimentale

OMS (WHO) : Organisation Mondiale de la Santé

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

REG : Reticulum Endoplasmique Rugueux

RT-qPCR : Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction

SEM : Standard Error of the Mean

SIMS : Spectrométrie de Masse à Ionisation Secondaire

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

U : Uranium

UA : Uranium Appauvri

UE : Uranium Enrichi

UN : Uranium Naturel

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Martin Klaproth à gauche & Henri Becquerel à droite.....	10
Figure 2 : Minerai d'U.....	10
Figure 3 : Enrico Fermi.....	12
Figure 4 : Exemples d'utilisations civiles de l'U.....	12
Figure 5 : Exemples d'utilisations militaires de l'U.....	13
Figure 6 : Origines naturelles et artificielles de l'U présent dans l'alimentation.....	14
Figure 7 : Echelle de concentrations d'U mesurées dans les eaux environnementales	15
Figure 8 : Voies d'exposition et organes de stockages principaux de l'U.....	16
Figure 9 : Multipotentialité des CSN.....	21
Figure 10 : Organogenèse du SNC.....	23
Figure 11 : Double toxicité de l'U.....	26
Figure 12 : Protocole de culture primaire de CSN.....	39
Figure 13 : Suivi au jour 7 de la culture cellulaire.....	45
Figure 14 : Suivi de la différenciation des CSN en culture primaire au jour 6.....	45
Figure 15 : Représentation graphique des résultats de la quantification par immunocytochimie des différentes populations étudiées.....	47
Figure 16 : Illustration de la morphologie des neurones.....	49
Figure 17 : Illustration de la répartition des différents types cellulaire.....	49
Figure 18 : Illustration de la morphologie des oligodendrocytes.....	51
Figure 19 : Représentation graphique de l'analyse par RT-qPCR de l'expression génique des marqueurs apoptotiques.....	53
Figure 20 : Représentation graphique de l'analyse par RT-qPCR de l'expression génique des marqueurs neurogéniques.....	53
Figure 21 : Multipotentialité des CSN et influence de U sur l'expression des marqueurs neurogéniques.....	57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux isotopes de l'uranium (1)	11
Tableau 2 : Caractéristiques des différents types d'Uranium.....	13
Tableau 3 : Nature et rôle des marqueurs neurogéniques étudiés.....	25
Tableau 4 : Paramètres d'ensemencements des cultures	39
Tableau 5 : Paramètres d'entretien des cultures	39
Tableau 6 : Anticorps Primaires.....	41
Tableau 7 : Anticorps Secondaires et Fluorochromes	41
Tableau 8 : Gènes étudiés par RT-qPCR.....	42

IRSN

L'IRSN est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC) dont les missions ont été portées au niveau législatif par la Loi n° 2015-992 du 17 août 2015 relative à la transition énergétique pour la croissance verte (TECV). Il est placé sous la tutelle conjointe du ministre de la Transition écologique et solidaire, du ministre des Armées, du ministre des Solidarités et de la Santé et du ministre de l'Enseignement supérieur.

Expert des risques nucléaires et radiologiques, l'Institut apporte par ses missions de recherche, d'expertise et de surveillance, une évaluation scientifique et technique de ces risques. Ses activités s'étendent à de nombreux domaines en France et à l'international : sûreté des installations, des transports et des déchets nucléaires, surveillance de l'environnement, conseil et intervention en cas de risque radiologique, radioprotection de l'homme en situations normale et accidentelle. Ses compétences sont également mises en œuvre pour les activités analogues intéressant la défense.

L'IRSN concourt directement aux politiques publiques en matière de sûreté nucléaire, de protection de l'homme et de l'environnement contre les rayonnements ionisants ainsi que de protection des matières nucléaires, installations et transports à l'égard du risque de malveillance. Il interagit dans ce cadre avec tous les acteurs concernés par ces risques : pouvoirs publics, et notamment les autorités de sûreté et de sécurité nucléaires, collectivités locales, entreprises, organismes de recherche, associations, parties prenantes et représentants de la société civile.

L'Institut contribue à l'information du public en rendant accessible les résultats de ses travaux. Par ses actions, il concourt également à d'autres politiques publiques majeures comme celle de la recherche et de l'innovation, de la santé au travail ou de la santé environnementale.

LABORATOIRE DE RADIOTOXICOLOGIE EXPERIMENTALE

Le Laboratoire de Radiotoxicologie (LRTOX) mène des programmes de recherche expérimentaux avec pour objectif une meilleure évaluation des risques liés à l'exposition chronique de radionucléides sur la santé humaine. Il s'intéresse à la radioprotection des populations soumises à une contamination chronique à de faibles doses de radionucléides, par ingestion ou par inhalation, ainsi qu'aux expositions externes à des faibles doses de rayonnements ionisants.

Les principaux objectifs relatifs aux effets sur la santé sont d'identifier, à partir de modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* les effets biologiques et les dysfonctionnements éventuels, induits par une contamination interne à des radionucléides sur les grandes fonctions physiologiques (système nerveux central, cardiovasculaire, hépatorénal, reproducteur, etc.).

INTRODUCTION

URANIUM

1 Découverte fortuite

L'uranium (U), éponyme de la planète glacée Uranus, de symbole chimique ${}_{92}\text{U}$, est l'élément à l'origine de la découverte de la radioactivité naturelle.

Mis en évidence par le prusse Martin Heinrich Klaproth (Fig. 1) en 1789, ce n'est qu'en 1896 que le français Henri Becquerel (Fig. 1), lors d'un éminent cas de sérendipité, en découvre les propriétés radioactives.

Ce métal lourd radioactif est naturellement présent dans la croûte terrestre, où il est en relative abondance avec une concentration de $2,7\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. A titre d'exemple, c'est supérieur à l'abondance de l'argent.

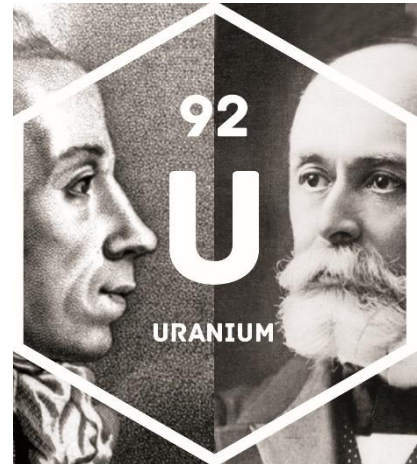


Figure 1 : Martin Klaproth à gauche & Henri Becquerel à droite

2 Caractéristiques dichotomiques d'un élément

2.1 Propriétés Physico-Chimiques

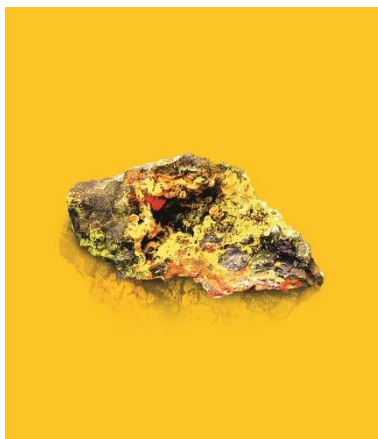


Figure 2 : Minerai d'U

L'uranium (Fig. 2), actinide de son état, abrite 92 protons qui en font le plus lourd, et donc le dernier des éléments naturels de Mendeleïev. Gris blanc à l'état pur chimique, son caractère malléable et ductile cache une densité 1,7 fois supérieure à celle du plomb.

Métal lourd, ou selon la nouvelle nomenclature, Élément-Trace Métallique (ETM), il côtoie dans les sols plomb (Pb), cadmium (Cd) et mercure (Hg). Il partage avec ces derniers sa rareté et différentes caractéristiques, telles que leur persistance dans l'environnement (peu bio-assimilables) et donc leur (éco)toxicité.

Cette nature de métal lourd lui confère une capacité à être chimio-toxique en plus d'être radiotoxique.

2.2 Propriétés Radiologiques

De 217 à 242, l'uranium (U) ne compte pas moins de 23 isotopes dont 3 seulement existent à l'état naturel.

L' ^{238}U est le plus abondant (99,3%). Il est fissile (susceptible de se fissionner sous l'effet d'un bombardement de neutrons rapides) et fertile (capable de produire un isotope fissile par capture d'un neutron).

L' ^{235}U (0,7%) est le seul isotope fissile naturel (capable de subir une fission nucléaire par un bombardement de neutrons de toute énergie y compris de neutrons lents).

Présent en infime quantité (0,01%), l' ^{234}U est le produit de la désintégration de l' ^{238}U .

Tous trois sont radioactifs par émission d'un rayonnement alpha. C'est-à-dire l'émission d'un noyau d'hélium (^4_2He), très lourd, très ionisant mais peu pénétrant qui ne survit que sur quelques dizaines de centimètres dans l'air.

C'est cette émission de rayonnements ionisants qui confère à l'uranium sa seconde toxicité : la radiotoxicité.

D'autres isotopes radioactifs de l'U existent mais ils sont produits artificiellement (Tab. 1).

Les périodes (temps nécessaire à la désintégration de la moitié des atomes instables – Tab. 1) très longues de ses isotopes font de l'Uranium Naturel (UN) un des radionucléides les moins radioactifs.

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux isotopes de l'uranium (1)

Isotope	Abondance Naturelle (%)	Période de décroissance (an)	Activité massique (Bq.g^{-1})	Caractéristiques
^{238}U	99,275	4,47 milliards	$1,24 \times 10^4$	Isotope principal
^{236}U	-	$23,7 \times 10^7$	$2,36 \times 10^6$	Isotope artificiel
^{235}U	0,719	704 millions	$8,00 \times 10^4$	Seul isotope fissile
^{234}U	0,0057	$2,5 \times 10^5$	$2,30 \times 10^8$	Isotope naturel le plus radioactif
^{233}U	-	$1,6 \times 10^5$	$3,56 \times 10^8$	Isotope artificiel
^{232}U	-	69,8	$8,17 \times 10^{11}$	Isotope artificiel

3 Applications

3.1 Industrielles et Energétiques

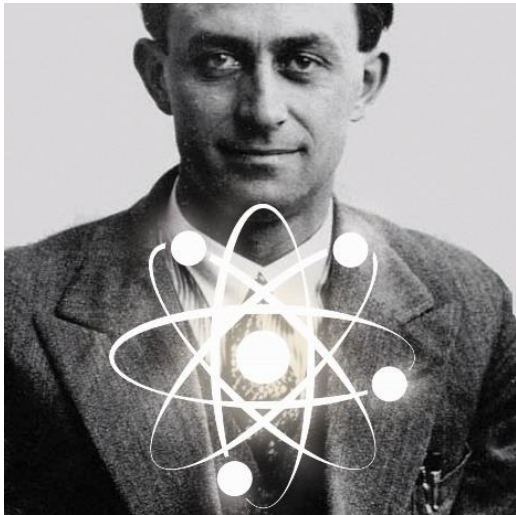


Figure 3 : Enrico Fermi

C'est à Enrico Fermi (Fig. 3) que l'on doit la découverte du potentiel énergétique d'un bombardement de l'U par des neutrons. La fission nucléaire est la capacité d'un atome à se scinder en 2 noyaux fils, transformation qui s'accompagne d'une importante libération d'énergie sous la forme d'un noyau d'hélium (rayonnement α), d'un électron (rayonnement β) ou d'un photon (rayonnement X ou gamma γ).

Cette découverte a abouti au développement du processus d'enrichissement : c'est-à-dire l'augmentation artificielle du taux d' ^{235}U à partir d'UN permettant l'obtention d'Uranium Enrichi (UE).

Le minerai appelé « Pechblende » est extrait de mines d'U notamment au Canada, au Kazakhstan et au Niger (Areva Mines). Celui-ci est ensuite concentré sous forme d'oxyde d'U (U_3O_8) appelé « Yellow Cake », puis purifié (UO_3) avant d'être enrichi en ^{235}U pour servir de combustible.

Si historiquement, l'U a d'abord servi de pigment pour la céramique, les propriétés radioactives de l'U sont aujourd'hui exploitées dans de nombreux secteurs, tels que la recherche, la médecine nucléaire et l'industrie nucléaire civile (Fig. 4).



Figure 4 : Exemples d'utilisations civiles de l'U

Le taux d'enrichissement varie selon les utilisations. L'U dit « faiblement enrichi » – 3-20% – sert de combustible dans les centres nucléaires de production d'électricité (CNPE). On estime, à masse équivalente, l'énergie ainsi produite un million de fois supérieure aux combustibles fossiles.

La conséquence de ce processus d'enrichissement est l'obtention d'un résidu appelé Uranium Appauvri (UA), contenant par conséquent un très faible taux d'isotopes légers ^{235}U (0,2-0,7%) et ^{234}U (<0,01%). Celui-ci est donc très peu radioactif mais conserve ses propriétés de métal lourd.

Le pourcentage de chaque isotope détermine le type d'U (Tab. 2).

Tableau 2 : Caractéristiques des différents types d'Uranium

Type	Taux ^{235}U (%)	Activité (kBq.g^{-1})
Uranium Naturel	0,71	25
Uranium Appauvri	0,2-0,4	12
Uranium Enrichi Civil	3-5	60
Uranium Militaire	85-99	2 500

3.2 Militaires

L'U est également utilisé dans le cadre d'applications militaires (Fig. 5).

Les bombes dites « nucléaires » contiennent de l'UE « de qualité militaire » qui a un pourcentage d' ^{235}U extrêmement élevé – 85-99%.

D'autre part, la densité de l'UA, 2 fois supérieure à celle du plomb, et son caractère pyrophorique, en ont fait un matériau de choix pour les blindages de véhicules et comme composant dans les projectiles de guerre lors de la première guerre du Golfe.

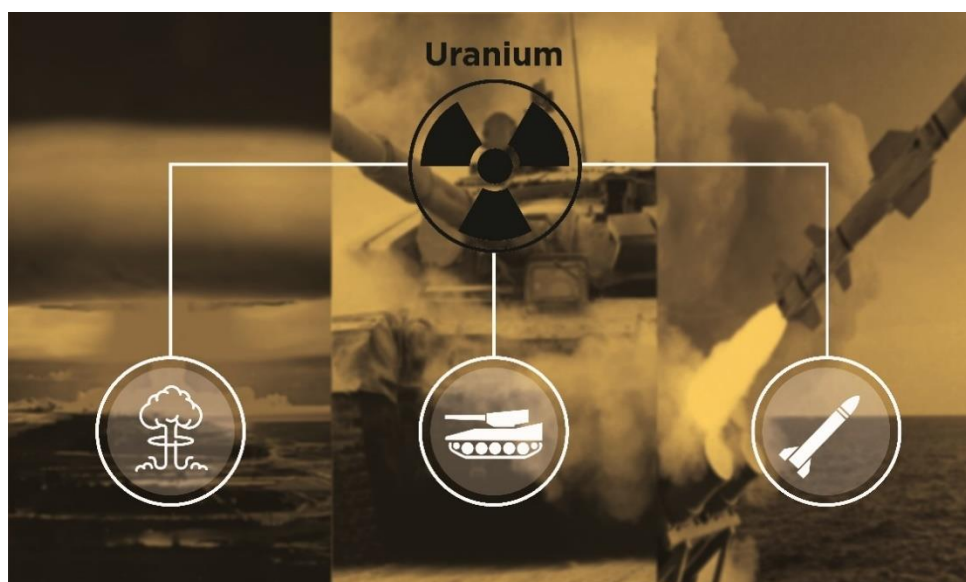


Figure 5 : Exemples d'utilisations militaires de l'U

4 Expositions

L'U est naturellement présent dans la croûte terrestre à hauteur de 2 mg.kg^{-1} , concentration variable ($1\text{-}90 \text{ mg.kg}^{-1}$) selon la constitution des roches (calcaires, granitiques, etc...) (ATSDR 2013)

Il est donc retrouvé de façon ubiquitaire mais non homogène à la surface de la Terre, dans les sols et les eaux, exposant ainsi l'ensemble de la population à des taux variables.

Le taux record est détenu par la Finlande, dans des eaux souterraines, où l'on a mesuré jusqu'à 20 mg.L^{-1} d'U (Prat, Vercoüter et al. 2009). C'est 100 à 5000 fois supérieur à la moyenne mondiale, estimée par l'OMS à $0,05\text{-}4 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ (Wade-Gueye, Delissen et al. 2012).

Aujourd'hui, cette exposition environnementale peut être accentuée par les activités humaines liées à l'exploitation de l'U (mines et centrales) et certains conflits modernes qui en augmentent ainsi sa dissémination potentielle dans l'environnement.

Cette dissémination naturelle et artificielle entraîne un risque d'exposition des populations et ce par différentes voies de contamination.



Figure 6 : Origines naturelles et artificielles de l'U présent dans l'alimentation

4.1 Ingestion

La voie de contamination principale des populations civiles est l'ingestion d'eau de boisson (1,5 µg/jour) et d'aliments contaminés (1-4 µg/jour) (WHO 2012).

L'OMS a fixé à 30 µg.L⁻¹ la valeur seuil d'U dans l'eau (WHO 2012).

4.2 Inhalation

Le mode de contamination par inhalation concerne davantage les travailleurs du cycle de l'U. Les mineurs qui extraient l'uranium et les « millers » qui s'occupent de son traitement y sont potentiellement exposés en dépit des moyens de radioprotection existant. Ces travailleurs constituent une source d'informations épidémiologiques importante.

Les populations habitant dans certaines zones de conflit lors de la Guerre du Golfe ou des Balkans, ou des vétérans ayant servi dans ces mêmes zones ont également pu être exposés à des poussières contenant de l'UA, dispersées lors de l'impact de projectiles.

4.3 Percutanée

Enfin, la voie percutanée peut être impliquée lors de blessures, et concerne là encore en premier lieu les travailleurs du nucléaire et les vétérans de la Guerre du Golfe touchés par des shrapnels (McDiarmid, Keogh et al. 2000).

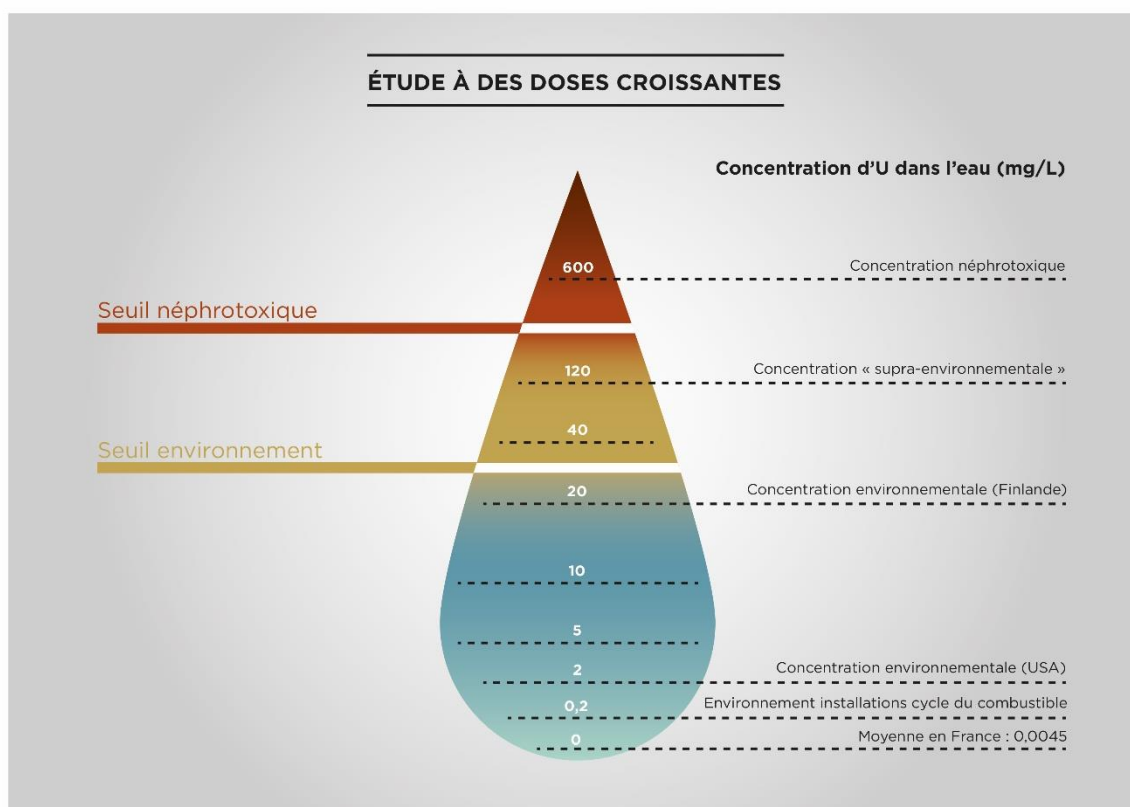


Figure 7 : Echelle de concentrations d'U mesurées dans les eaux environnementales

5 Biocinétique

La voie d'exposition majeure pour la population générale est donc l'ingestion. La prise quotidienne moyenne d'U est estimée entre 1 et 5 μg via l'alimentation (Priest 2001). Or seul 1 à 1,5% d'U ingéré est absorbé par l'organisme (Wrenn, Durbin et al. 1985). Ce taux peut être modifié selon différents paramètres (individuels ou liés à l'agent toxique). L'absorption se fait sous forme ionisée d'ion uranyle UO_2^{2+} , en majorité au niveau de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléum) (Dublineau, Grison et al. 2005).

De plus, 90% de l'U ingéré est éliminé dans les urines dans les 24 heures suivant la prise, et la majorité des 10% restant sera excrétée dans les semaines suivantes. Seul un faible pourcentage de l'U ingéré demeure donc dans l'organisme.

Une fois dans le compartiment sanguin, 20% des ions uranyles se lient à des protéines plasmatiques telles que la transferrine, la ferroxidase ou l'hémopexine, permettant sa distribution dans différents tissus.

Les principales cibles sont les reins (Pellmar, Fuciarelli et al. 1999), où l'U est filtré par le glomérule puis réabsorbé au niveau du tubule contourné proximal ; et les os, où l'U se substitue aux ions calciques lors d'un remodelage osseux, entraînant ainsi un stockage à long terme (Priest, Howells et al. 1982).

Néanmoins, on le retrouve dans d'autres organes, tels que les poumons, le foie, ou encore le cerveau, à des concentrations plus faibles.

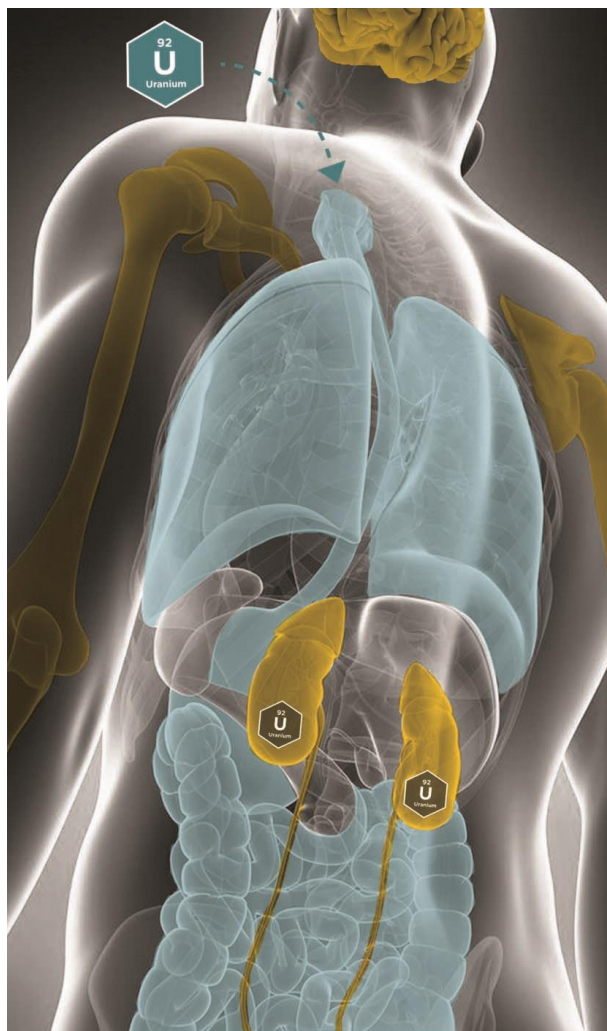


Figure 8 : Voies d'exposition, d'absorption (en bleu) et organes de stockages principaux (en jaune) de l'U

SYSTEME NERVEUX CENTRAL

1 Anatomie Générale

Le système nerveux comprend l'ensemble des centres nerveux, des nerfs et des ganglions, qui assurent la commande et la coordination des fonctions vitales, de l'appareil locomoteur, la réception des messages sensoriels et les fonctions psychiques et intellectuelles.

Il est constitué de 2 ensembles complémentaires : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP).

Le SNC comprend lui-même l'encéphale, protégé par le crâne, et la moelle épinière logée dans la colonne vertébrale.

1.1 Moelle Epinière

La moelle épinière est la prolongation du cerveau le long du rachis et fait office de relais de l'information entre ce dernier et le SNP. Elle donne naissance aux 31 paires de nerfs spinaux, afférents et sensitifs par leur racine dorsale, efférents et moteurs par leur racine ventrale.

1.2 Encéphale

Il est formé du télencéphale (hémisphères cérébraux), du diencephale, du cervelet et du tronc cérébral.

Le cortex est la partie la plus développée du SNC chez l'Homme. Il prend en charge les fonctions primaires (motrice, sensibles, visuelle, auditive) et cognitives (sensation, perception, mémoire, émotion, pensée).

Le thalamus et l'hypothalamus composent le diencephale. Le premier est le relais obligatoire des afférences sensorielles et sensibles et des commandes motrices. Le second est le « centre organisateur » de toutes les fonctions autonomes par l'intermédiaire du système endocrinien.

Le cervelet a un rôle majeur dans le tonus musculaire, l'équilibre et la coordination motrice.

Le tronc cérébral gère les fonctions vitales et inconscientes telles que le sommeil/éveil, la régulation du rythme cardiaque et de la respiration.

2 Neuroanatomie : Notions

2.1 Barrière Hémato-Encéphalique

La Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) a pour fonction la protection du SNC et le maintien de son homéostasie. Située au niveau des capillaires cérébraux, elle se manifeste par une perméabilité très sélective, permise par :

- Des cellules endothéliales étroitement jointives, grâce à des jonctions serrées. Les substances hydrosolubles sont soumises à une filtration très stricte.
- Des cellules gliales, les astrocytes, qui enveloppent les capillaires et limitent le passage des substances lipophiles.
- Une machinerie enzymatique importante de lyse et d'efflux.

2.2 Lignée Neuronale

Le neurone est une cellule capable de générer des signaux électriques appelés « potentiels d'action » qu'il convertit en signaux chimiques et réciproquement, à la base de la communication neuronale.

Il s'agit d'une cellule polarisée formée de :

- Un corps cellulaire (ou péricaryon) caractéristique avec un gros noyau sphérique clair riche en euchromatine (témoin d'une activité génomique intense) et un nucléole bien défini. Le cytoplasme contient l'ensemble des organites nécessaires à la synthèse et à la dégradation des macromolécules. Il possède notamment un réticulum endoplasmique rugueux abondant (agrégats de REG appelés Corps de Nissl).
On notera l'absence de centrioles, outil indispensable à la formation du fuseau mitotique. En effet, le neurone est une cellule qui ne se divise plus.

De ce corps cellulaire partent :

- Un axone, dont le rôle est le transport des neurotransmetteurs vers leur site d'utilisation et la conduction de l'influx nerveux jusqu'à ;
- Une terminaison nerveuse, où sont stockés les neurotransmetteurs, avant leur libération dans la synapse ;
- Un arbre dendritique composé de fins processus qui reçoivent les influx électriques d'autres neurones et les transmettent au corps cellulaire.

Le neurone est une cellule excitable. Sa dépolarisation modifie la perméabilité membranaire à divers cations et se propage alors le long de l'axone. Dans le cas des neurones myélinisés, cette propagation est saltatoire, d'un nœud de Ranvier (segment non myélinisé) à un autre, ce qui augmente la vitesse de conduction du message nerveux.

2.3 Lignées Gliales

Les cellules gliales constituent la deuxième population cellulaire indispensable au fonctionnement cérébral.

Elles jouent un rôle important de soutien et de nutrition des structures. Elles comprennent les astrocytes, impliqués dans la BHE, les oligodendrocytes et les cellules de Schwann responsables de la myélinisation des axones respectivement dans le SNC et le SNP.

2.3.1 Astrocytes

Les astrocytes, qui doivent leur nom à leur forme étoilée, ont un rôle dans le support et le métabolisme du tissu nerveux.

Leurs prolongements mettent en communication les capillaires sanguins cérébraux et les neurones. Entre autres, ils captent et métabolisent partiellement le glucose avant de le transmettre aux neurones. Ils participent également à l'homéostasie ionique du milieu extracellulaire.

Des études récentes ont émis la possibilité que les astrocytes jouent un rôle important dans la communication nerveuse, que l'on croyait spécifiques aux neurones, constituant un système de transmission extra-synaptique parallèle au système neuronal et ayant un rôle important dans la modulation de l'activité neuronale (Fields and Stevens-Graham 2002).

2.3.2 Oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont responsables de la myélinisation du SNC et sont issus de la zone ventriculaire du tube neural (voir 3.2.1 Embryogenèse Humaine).

Chaque oligodendrocyte émet plusieurs prolongements qui s'enroulent autour de différents axones adjacents. Il enroule sa membrane plasmique en couches superposées qui forment une spirale sur un segment d'axone ou internode. Les segments adjacents sont séparés par les nœuds de Ranvier, dépourvus de myéline.

Leurs homologues dans le SNP sont les cellules de Schwann, dont l'origine embryologique sont les crêtes neurales.

Plusieurs points distinguent la myélinisation centrale de la myélinisation périphérique. Un même oligodendrocyte myélinise plusieurs fibres nerveuses, là où une cellule de Schwann ne myélinise qu'un seul axone. De plus, la composition protéique de la myéline du SNP et du SNC est légèrement différente.

La myéline protège les axones et accroît considérablement la vitesse de conduction de l'influx nerveux. Celle-ci passe de moins de 1 m.s^{-1} pour un axone non myélinisé à 150 m.s^{-1} dans l'axone myélinisé. La myéline ne recouvre que les axones et jamais les dendrites.

3 Multipotentialité

Les Cellules Souches Neurales (CSN) sont capables d'auto-renouvellement et disposent d'une capacité de prolifération élevée. Elles sont également dites multipotentes. Elles ont la faculté de se différencier pour donner plusieurs types cellulaires : neurones, astrocytes et oligodendrocytes dans le SNC. Cette faculté est appelée multipotentialité.

Lors d'une mitose asymétrique, la CSN donne naissance à 2 cellules filles. L'une est identique à la CSN : c'est l'auto-renouvellement ; la seconde est un progéniteur neural, toujours multipotent. Celui-ci est capable de se diviser rapidement, lors de mitoses symétriques, donnant naissance à un pool de cellules important. Ces cellules progénitrices, sous l'influence de nombreux facteurs de transcription, vont alors s'engager dans une voie de détermination puis de différenciation. Ces voies concernent la lignée neuronale : c'est la neurogenèse qui donnera à terme un neurone, et la lignée gliale : c'est la gliogenèse qui pourra donner soit un astrocyte, soit un oligodendrocyte (Fig. 9).

Ces CSN peuvent être cultivées *in vitro*, à partir de cerveau embryonnaire de rat, en présence de facteurs de croissance (EGF, bFGF). La CSN se maintient en suspension prolifère et forme un clone qui s'organise de façon régulière aboutissant à une neurosphère. L'absence de ces facteurs et l'adhésion à un support solide vont faire entrer ces CSN en différenciation. Ce modèle *in vitro* permet donc d'étudier l'effet d'une exposition à des substances telles que l'U sur le devenir des CSN.

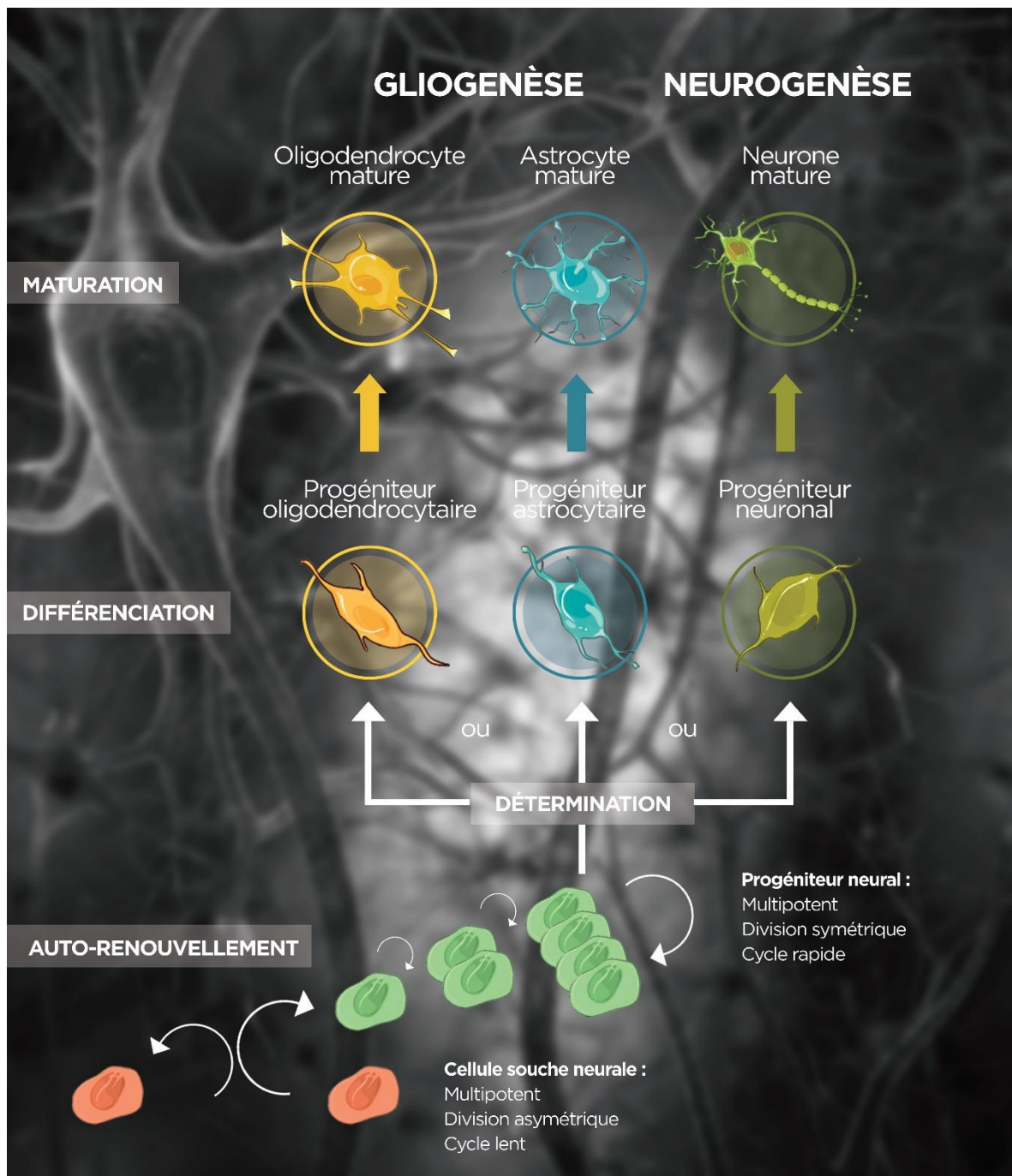


Figure 9 : Multipotentialité des CSN. Processus de détermination, différenciation et maturation des CSN en neurones, astrocytes ou oligodendrocytes matures

3.1 Neurogenèse

La neurogenèse est le processus de formation de nouveaux neurones à partir de Cellules Souches Neurales.

Elle débute précocement chez l'Homme, pendant le développement embryonnaire (19^e jour), pour former le système nerveux dont toutes les principales divisions sont formées à la 12^e semaine et se poursuit de façon intense jusqu'à la naissance (jusqu'à 100 milliards de neurones).

On sait aujourd'hui que la neurogenèse persiste chez l'adulte, dans certaines zones uniquement, notamment dans la zone hippocampique et dans le bulbe olfactif. Elle est un des mécanismes impliqués dans la plasticité neuronale adulte.

3.2 Principales zones neurogéniques

3.2.1 Embryogenèse Humaine

Au 17^e jour de la vie embryonnaire, l'embryon passe d'une structure didermique à un disque tridermique : c'est la gastrulation. Cette invagination met en place 3 feuillet superposés : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme.

L'intégralité du système nerveux est issue de l'ectoderme. La partie centrale dérive directement du tube neural tandis que le SNP provient des crêtes neurales.

La transformation de l'ectoderme en tube neural est appelée neurulation.

La plaque neurale se forme au 19^e jour de la vie embryonnaire. Son invagination aboutit à la gouttière neurale (23^e jours) qui se referme progressivement pour former le tube neural (28^e jours). Parallèlement, les crêtes neurales se dissocient du tube. Elles formeront à terme le SNP (nerfs, ganglions, système nerveux sympathique et parasymphatique).

La prolifération cellulaire du tube entraîne la formation des vésicules primaires (4^e semaine) : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale puis secondaires (5^e semaine) : télencéphale, diencéphale, mésencéphale, métencéphale et myélocéphale qui donneront les structures adultes (Fig. 10).

Les parois de ces vésicules sont constituées par le neuroépithélium, lui-même formé des cellules souches neurales multipotentes, à l'origine des progéniteurs de neurones (neuroblastes) et de cellules gliales (glioblastes), qui formeront l'intégralité des structures cérébrales.

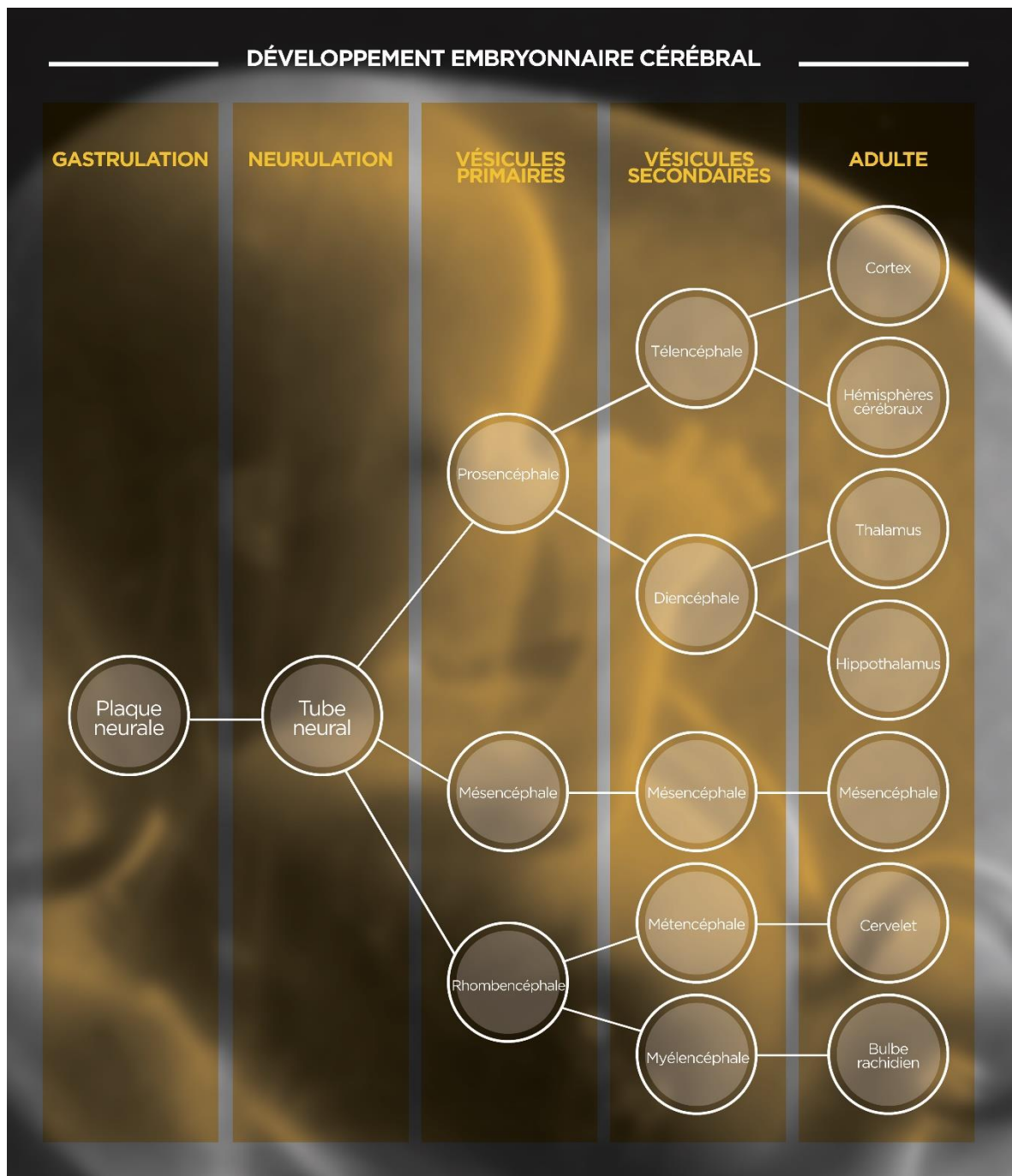


Figure 10 : Organogenèse du SNC. Processus d'invagination et de prolifération aboutissant à la formation des différentes structures du système nerveux adulte

3.3 Marqueurs Neurogéniques

La formation de neurones, astrocytes et oligodendrocytes est régulée par un ensemble de facteurs de transcription et protéines qui déterminent la destinée cellulaire.

Les gènes « proneuraux » sont des gènes nécessaires (perte de fonction) et suffisants (gain de fonction) pour activer un programme de différenciation neuronale ou gliale. Ils codent pour des facteurs de transcription à domaine basic-helix-loop-helix (bHLH) de classe II (Bertrand, Castro et al. 2002, Wilkinson, Dennis et al. 2013). Ces-derniers se dimérisent afin de pouvoir se fixer au niveau de séquences consensus E-Box dans des régions promotrices ou enhancer de leurs gènes cibles (Wilkinson, Dennis et al. 2013).

Parmi les gènes sélectionnés dont nous mesurons l'expression à la suite d'une contamination chronique à l'UA, plusieurs appartiennent à cette famille de facteurs.

3.3.1 Mash1 (ASCL1)

Achaete-scute homolog 1 (ASCL1) (anciennement Mash1) est un facteur de transcription bHLH. Il est impliqué dans la détermination des CSN du neuroépithélium (tube neural) en neuroblastes (Sanes, D.H. (2011) Development of the nervous system).

Il est donc un marqueur très précoce de la neurogenèse.

D'autre part, ASCL1 peut forcer une détermination oligodendrocytaire lorsqu'il est surexprimé chez des progéniteurs dans le gyrus denté adulte (Jessberger, Toni et al. 2008, Wilkinson, Dennis et al. 2013).

3.3.2 Neurogénines

Les neurogénines (Ngn ou NeuroG) sont également des facteurs de transcription de la famille bHLH. Elles forment des hétérodimères avec d'autres protéines bHLH afin d'activer leurs gènes cibles (Yuan and Hassan 2014).

Elles sont détectées principalement dans les progéniteurs sur une période très restreinte, aux stades fœtal et post-natal précoce (Yuan and Hassan 2014).

Elles jouent un rôle essentiel dans la détermination des progéniteurs et notamment dans la voie de sous-population neuronale (neurones gaba/glutamin-ergique).

En plus de leur influence sur la détermination, les Ngn2/3 agissent sur la morphologie dendritique et axonale, façonnant le réseau neuronal. Il a été observé que Ngn3 est impliquée dans la croissance dendritique et la synaptogenèse au niveau hippocampique (Yuan and Hassan 2014).

D'autre part, Ngn3 participerait à la gliogenèse en induisant une détermination à la fois en progéniteurs d'astrocytes et d'oligodendrocytes dans la moelle épinière sur modèle murin (Lee, Wu et al. 2003, Yuan and Hassan 2014). Des marqueurs gliaux tels que MBP ou GFAP ont été nettement réduits lors d'un knockout de Ngn3.

3.3.3 NeuroD

Les facteurs de différenciation neurogéniques (NeuroD1, NeuroD2, NeuroD4, NeuroD6) appartiennent également aux facteurs de transcription de la famille bHLH.

NeuroD est un facteur précoce qui induit la neurogenèse au niveau de l'ectoderme. Il est détecté chez la souris au jour embryonnaire 9,5 et son expression augmente progressivement jusqu'au jour 12. Il est également retrouvé dans le cerveau de souris nouveau-nées et adultes (McCormick, Tamimi et al. 1996).

3.3.4 Notch1

Le récepteur Notch est une protéine de surface impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. S'il est faiblement exprimé, la prolifération est active alors qu'une forte expression de Notch stoppe la mitose. Le mécanisme moléculaire à l'origine de ces effets antinomiques est inconnu (Guentchev and McKay 2006).

3.3.5 GAP43

Growth Associated Protein 43 (GAP43) est une protéine de membrane spécifique des neurones, localisée au niveau présynaptique. Il est exprimé lors du développement cérébral et dans la régénération des neurites consécutive à une lésion (Scheytt, Riediger et al. 2015).

GAP43 est un substrat de la Protéine Kinase C (PKC). Sa phosphorylation est impliquée dans le développement des neurites. Il a été montré que sa surexpression induisait la formation spontanée de nouvelles synapses tandis qu'un knockout conduisait à l'arrêt de la croissance axonale (Shen, Tsai et al. 2012).

Tableau 3 : Nature et rôle des marqueurs neurogéniques étudiés

Gène	Nature	Rôle
Mash1 (ASCL1)	Facteur de transcription bHLH	Induit la détermination neuronale
Notch1	Récepteur membranaire de surface	Régulation du cycle cellulaire Morphologie dendritique
NeuroD	Facteurs de transcription	Induit la différenciation neuronale
GAP43	Phosphoprotéine axonale	Induit la croissance axonale et dendritique
NeuroG3	Facteurs de transcription bHLH	Facteur de détermination Morphologie dendritique Gliogenèse

TOXICITES DE L'URANIUM

1 Généralités

La toxicité de l'U résulte d'une combinaison de ses propriétés chimiques et radiologiques.

Une toxicité chimique due à sa nature de métal lourd, et une toxicité radiologique par émission de rayonnements ionisants de type α , induite par son instabilité de radioélément.

La distinction entre les effets chimiotoxiques et radiologiques de l'U et de ses éléments fils sont dès lors difficiles à discerner.

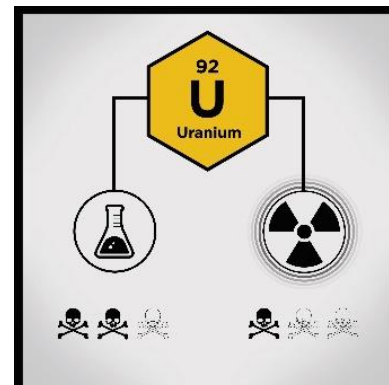


Figure 11 : Double toxicité de l'U

Cependant, on peut postuler que l'UN et l'UA ont une radioactivité très faible, voire négligeable en comparaison de leur toxicité chimique, au regard de leur faible pourcentage en ^{235}U (0,2-0,7%). De plus, le ratio toxicité chimique versus radiologique dépend également des concentrations auxquelles les expositions ont lieu.

On distingue toxicité aiguë pour des expositions généralement à de fortes doses sur une courte période (quelques heures à quelques jours) et toxicité sub-chronique (inférieure à 90 jours) ou chronique qui correspondent à des expositions longues (supérieures à 3 mois).

Chez le rat, une intoxication aiguë par ingestion s'exprime par une altération de l'état général (perte de poids, hypothermie, tremblements) et des signes d'atteintes rénale et cérébrale. La dose létale 50 (DL50) a été estimée à 204 mg.kg^{-1} en administration orale unique par gavage (Domingo, Llobet et al. 1987).

Aujourd'hui, la majorité des travaux se concentrent sur les effets biologiques d'une exposition chronique à de faibles doses d'uranium. Plusieurs études épidémiologiques ont été menées sur trois types de populations exposées de façon chronique à l'U. Les mineurs d'U ainsi que les travailleurs du cycle de l'U sont surveillés depuis les années 1950. Les vétérans et les populations locales des zones de conflits impliquant la dispersion d'UA (première guerre du Golfe et zone des Balkans) sont une seconde population d'observation. Enfin certaines eaux sont naturellement riches en U. Les populations consommant ces eaux, notamment retrouvées en Finlande, de façon quotidienne constituent également une source de données épidémiologiques.

Enfin, les études expérimentales animales et sur des modèles cellulaires apportent de nombreuses informations sur les potentielles cibles et mécanismes de l'U.

Le rein et les os sont les principaux organes cibles de l'U selon le consensus général. Cependant, comme précisé précédemment, il est également retrouvé, en concentrations plus ou moins importantes selon la voie d'exposition, dans les poumons, le foie et le cerveau. Sa toxicité sur le système reproducteur fait également l'objet de recherches, de même que son potentiel cancérogène.

2 Néphrotoxicité

De par son rôle biologique de filtre, le rein est un organe cible préférentiel des xénobiotiques, et l'U n'échappe pas à la règle. Le rein constitue en effet un organe de stockage de l'U. Suite à sa filtration par le glomérule, l'U est absorbé au niveau du tube contourné proximal où il tend à précipiter sous la forme d'aiguilles de phosphate d'uranyle (Leggett 1989).

Les études épidémiologiques ont montré des résultats mitigés. Pour Zamora *et al*, une consommation d'eau de boisson riche en uranium ($0,03 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$) entraînerait une modification de l'excrétion de calcium, une augmentation de l'excrétion de β_2 -microglobuline et une glycosurie (Zamora, Tracy et al. 1998). En revanche, les études de Kurttio *et al* n'ont pas mis en évidence de variations des biomarqueurs rénaux lors d'une exposition similaire (Kurttio, Auvinen et al. 2002).

D'autre part, le suivi d'une cohorte de vétérans de la Golfe blessés par des éclats d'armements contenant de l'UA a montré la présence d'U dans les urines 25 ans après l'incorporation de ces fragments. Néanmoins, aucune pathologie rénale n'a pu être associée à cette excrétion d'U (McDiarmid, Keogh et al. 2000, McDiarmid, Engelhardt et al. 2009, McDiarmid, Gaitens et al. 2017).

De la même manière, une cohorte de mineurs d'U au nouveau Mexique n'a pas montré d'augmentation significative des causes de décès associées à des cancers ou à des maladies respiratoires, rénales ou hépatiques (Boice, Cohen et al. 2008).

En sus des études épidémiologiques, des expérimentations animales ont également été menées. Ainsi, l'exposition aigue par ingestion à de fortes doses d'UA, supérieures à $70\text{-}100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, aurait de graves conséquences pour le rein, notamment des dommages au niveau des cellules épithéliales du tube contourné proximal (Briner 2010).

Ces résultats sont connus depuis déjà plusieurs dizaines d'années. En 1982, Haley *et al* avaient déjà observé qu'une exposition aigue à l'U entraînait des lésions rénales, principalement au niveau des tubules contournés proximaux (Haley 1982). En 1987, Domingo *et al* avaient également établi qu'une dose orale d'U de 204 mg.kg^{-1} , entraînait une néphrite tubulaire aigue responsable de la mort de l'animal (Domingo, Llobet et al. 1987).

Cependant, dans les cas accidentels d'exposition humaine à de fortes doses d'U, ces mêmes effets sont restés temporaires et complètement réversibles (Priest 2001).

A très fortes doses, les études expérimentales indiquent que ces dommages peuvent s'étendre aux glomérules rénaux. L'effet néphrotoxique de l'U est donc essentiellement induit par sa valence chimiotoxique (Souidi, Tissandie et al. 2009).

Dans le cas d'une contamination chronique via l'eau de boisson, on observe chez le rat une atteinte tubulaire et glomérulaire (Gilman, Villeneuve et al. 1998). Les paramètres rénaux sont modifiés : glycosurie (Ortega, Domingo et al. 1989) et augmentation de la créatinine plasmatique (Taulan, Paquet et al. 2004).

Un modèle d'exposition par implant d'U chez des rats mâles Sprague-Dawley, avec 3 concentrations d'U et une contamination variant de 1 jour à 12 mois, a montré que la concentration urinaire était proportionnelle à la durée de l'exposition. Des dommages structuraux ont aussi été observés par MET au niveau de la membrane basale des glomérules et du tubule proximal. Les paramètres rénaux considérés (β 2-microglobuline, albuminurie, créatinémie et l'urée plasmatique) étaient progressivement augmentés en fonction de la dose et de la durée d'exposition (Zhu, Tan et al. 2009).

Si le mécanisme précis n'a pas encore été élucidé, il a été démontré à la fois *in vitro* et *in vivo* que l'acétate d'uranyl présentait une toxicité mitochondriale. Les ions uranium seraient en effet capables de perturber la chaîne de transfert d'électrons, induisant la production d'EROs, suivie d'une peroxydation lipidique, conduisant à une détérioration de la membrane mitochondriale (Berradi, Bertho et al. 2008).

Néanmoins, une étude plus récente de contamination à l'U via l'eau de boisson (de 0 à 600 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ soit une dose estimée de 0 à 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$) pendant 3 et 9 mois a obtenu des résultats allant à l'encontre des observations antérieures. La quantité d'U tissulaire dans le foie, les reins et les os était linéaire et proportionnelle à la dose d'U ingérée, avec un maximum de 6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tissu rénal pour la concentration maximale (600 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Malgré cette quantité élevée d'U tissulaire, aucune lésion histologique n'a pu être mise en évidence, ni de modifications des biomarqueurs de la fonction rénale (créatinine et KIM-1). Au contraire, l'analyse des processus antioxydant a révélé une augmentation des niveaux de glutathione dans les reins (Poisson, Stefani et al. 2014). Cette étude remet donc en cause la notion de dose néphrotoxique de l'U.

3 Toxicité dans l'os

Suite à son entrée dans le flux sanguin, l'U est en partie co-déposé avec le calcium à la surface des os où il subsiste pendant de nombreuses années (Faa, Gerosa et al. 2017).

Relativement peu d'études ont étudié les effets de l'U sur les os chez l'Homme. La majorité des connaissances disponibles proviennent d'études expérimentales sur l'animal.

Plusieurs d'entre elles tendent à montrer que les phases précoces de développement – durant lesquelles ont lieu l'ossification endochondrale et la croissance osseuse – sont plus sensibles à l'U lors d'une contamination *via* l'eau de boisson (Wade-Gueye, Delissen et al. 2012).

Chez des rats Wistar, la prise orale d'U réduit la croissance des os, leur volume, et la minéralisation des métaphyses du tibia, et diminue la croissance du cartilage et la formation des surfaces osseuses (Arzuaga, Gehlhaus et al. 2015).

Une exposition aiguë à l'U induit une diminution de l'activité ostéoblastique et retarde l'ossification intramembranaire. Lors du processus de consolidation, la formation osseuse est caractérisée par un volume osseux et une densité osseuse réduits, et une résorption osseuse accrue (Arzuaga, Gehlhaus et al. 2015).

L'U semble en effet capable d'augmenter la résorption osseuse. Plusieurs études ont montré que la résorption dans les métaphyses de l'os tibial et fémoral ou encore dans l'os trabéculaire était significativement augmentée jusqu'à 60 jours après exposition à une dose unique d'U (Arzuaga, Gehlhaus et al. 2015).

Chez l'Homme, une étude épidémiologique a mis en évidence une relation entre l'exposition à l'U via l'eau de boisson et une augmentation des taux sériques des télopeptides C-terminal du collagène de type I qui est un marqueur de la résorption osseuse (Kurttio, Komulainen et al. 2005).

Le suivi des vétérans de la guerre du Golfe a révélé une légère modification de la formation osseuse mais sans observer de variations significatives de la vitamine D ou de la parathormone (McDiarmid, Engelhardt et al. 2009). Une étude sur une population ayant consommé quotidiennement, pendant 13 ans, de l'U *via* leur eau de boisson ($27 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) a montré une augmentation de certains marqueurs osseux tel que l'ostéocalcine (Kurttio, Harmoinen et al. 2006).

Dans l'ensemble, l'état actuel des connaissances suggère que l'exposition à l'U interfère avec l'ossification endochondrale et intramembranaire et accroît la résorption osseuse chez l'animal. D'autre part, les stades précoces de la vie seraient plus sensibles aux effets de l'U.

4 Autres organes cibles

4.1 Poumons

Les poumons constituent un autre organe cible de l'U, notamment lors des cas d'exposition par inhalation de particules uranifères. Nous verrons que le cerveau est également une cible directe de l'U *via* ce mode de contamination.

Dans l'optique de mieux comprendre les conséquences pathologiques d'une inhalation d'UA, une étude a montré que les macrophages présents dans les espaces alvéolaires constituaient le principal type cellulaire impliqué dans l'internalisation des particules d'U. Toujours dans cette étude, il a été montré que les ions d'U perturbent le métabolisme cellulaire de plusieurs manières : à faibles doses, l'U induit une phagocytose et une production d'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), tandis que de fortes doses provoquent la sécrétion de TNF α aboutissant à une apoptose cellulaire (Orona and Tasat 2012).

Une étude sur cellules épithéliales pulmonaires de rat a révélé que l'U serait également responsable de la production de radicaux libres dans ce type cellulaire. En induisant une chute de la glutathione totale et de la superoxyde dismutase, il provoque une diminution du potentiel antioxydant, conduisant à un stress oxydatif, ce qui aurait pour conséquence une diminution de la prolifération cellulaire (Periyakaruppan, Kumar et al. 2007).

Monleau *et al*/ ont étudié les effets de l'UA en termes de génotoxicité et d'inflammation. Ils ont ainsi montré sur des rats qu'une exposition à l'UA par inhalation résultait en des cassures de brins d'ADN dans les cellules broncho-alvéolaires. Ils ont également mis en évidence une augmentation des cytokines pro-inflammatoires et de la production d'EROs

dans les tissus pulmonaires suggérant que les dommages à l'ADN sont la conséquence de processus inflammatoires et d'un stress oxydatif. Un test des comètes a révélé une part de cassures doubles brins dans les dommages à l'ADN, laissant sous-entendre un rôle de la radioactivité dans les effets génotoxiques de l'U (Monleau, Bussy et al. 2005).

4.2 Cœur

Très peu de données sont disponibles sur les éventuels effets de l'U sur le système cardiovasculaire.

Les données disponibles concernent davantage les effets consécutifs à une irradiation par l'U ou ses éléments fils qu'à une potentielle chimiotoxicité.

Si les résultats de ces études tendent à montrer une relation entre l'exposition à des irradiations à faibles doses (dose cumulée < 0,5 mSv ou fréquence < 10 mSv.jour⁻¹) et les maladies cardiovasculaires (Little, Azizova et al. 2012), aucune publication ne suggère à ce jour de perturbation du système cardiovasculaire suite à une contamination par des particules uranifères (Craft, Abu-Qare et al. 2004).

4.3 Foie

L'exposition à de fortes doses (210 mg.kg⁻¹) entraînent des lésions histologiques importantes (Domingo, Lobet et al. 1987). Les métabolismes du cholestérol et de la vitamine D sont également perturbés lors d'une prise orale importante (240 mg.kg⁻¹).

Lors de contaminations à plus faible dose (9 mg.kg⁻¹.jour⁻¹) *via* l'eau de boisson pendant 4 semaines, on observe une élévation des concentrations plasmatiques des enzymes hépatiques (ASAT, ALAT) (Ortega, Domingo et al. 1989).

Chez le rat, l'injection sous-cutanée d'U (11,5 mg.kg⁻¹.jour⁻¹) pendant 3 jours entraîne également l'augmentation des transaminases, associée à une diminution des triglycérides circulants. Ces modifications traduisent une altération de la perméabilité membranaire et peuvent suggérer une nécrose hépatique (Domingo, Lobet et al. 1987, Guéguen, Souidi et al. 2006).

Enfin, l'activité des enzymes hépatiques de phase I (cytochromes P450) est perturbée lors d'une contamination à l'U (2 mg.kg⁻¹.jour⁻¹) pendant 9 mois (Souidi, Gueguen et al. 2005, Guéguen, Souidi et al. 2006).

5 Reprotoxicité

La toxicité de l'U sur la reproduction concerne à la fois les fonctions de reproduction et le développement embryonnaire et foetal.

Des études épidémiologiques sur des mineurs d'U en Namibie ont révélé une diminution de la concentration plasmatique de testostérone mais sans effets observables sur les fonctions reproductrices (Zaire, Notter et al. 1997).

D'un point de vue expérimental, des rats mâles exposés à 10, 20 ou 40 mg.kg⁻¹.jour⁻¹ d'UA pendant 3 mois, ont exprimé une diminution significative du nombre de spermatozoïdes associée à des modifications tissulaires des testicules. Le taux de fécondation de ces mâles suite à leur accouplement avec des femelles non-exposées était diminué de façon significative (Linares, Albina et al. 2005).

Pour des doses plus faibles, une contamination de rats mâles à 2 mg.kg⁻¹.jour⁻¹ d'UE entraîne une perturbation dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes testiculaires mais cet effet n'est pas retrouvé avec une exposition à l'uranium appauvri (Grignard, Gueguen et al. 2008). Cela met en évidence le rôle de la radiotoxicité de l'U à des faibles doses.

Chez la femelle, une contamination par ingestion d'U (20-40 mg.kg⁻¹.jour⁻¹) pendant 49 jours *via* l'eau de boisson entraîne une altération de la qualité des ovocytes. La principale caractéristique consistant en une cavité périvitelline anormale (Feugier, Frelon et al. 2008). Des anomalies dans la folliculogénèse ont également pu être observées suite à une exposition à l'UN (Arnault, Doussau et al. 2008).

La toxicité sur les femelles gestantes a été évaluée sur des souris par gavage à l'UA (5, 10, 25 et 50 mg.kg⁻¹.jour⁻¹) du 6^e au 15^e jour de gestation. Cette étude a mis en évidence une diminution de la prise alimentaire et de la prise de poids (Domingo, Paternain et al. 1989).

L'influence du jour d'exposition a été étudié par injection unique d'UA à la dose de 4 mg.kg⁻¹ entre E9 et E12. Le nombre de décès, de foetus résorbés et de pertes post-implantation est augmenté pour chaque temps avec un pic à E10 (Bosque, Domingo et al. 1993).

En outre, des études expérimentales animales ont rapporté une toxicité prénatale et postnatale, tératogène, suivant une exposition à l'U pendant la gestation (Domingo 2001).

Des souris femelles traitées pendant 14 jours ont été accouplées avec mâles eux-mêmes prétraités pendant 60 jours (5, 10 ou 25 mg.kg⁻¹.jour⁻¹). La contamination des femelles s'est poursuivie au cours de la gestation, de la parturition puis de l'allaitement. Cette étude a révélé un taux élevé de létalité embryonnaire et un ralentissement de croissance des nouveau-nés (Paternain, Domingo et al. 1989).

La toxicité foetale a pu être démontré par injection unique (4 mg.kg⁻¹) ou répétées (0,5, 1 ou 2 mg.kg⁻¹.jour⁻¹) d'UA pendant la gestation. Les foetus exprimaient une diminution de poids corporel, des perturbations de l'ossification et la présence de fentes palatines (Bosque, Domingo et al. 1993).

De plus, une étude réalisée à l'IRSN, a exploré chez le rat les effets d'une exposition à l'U (40 ou 120 mg.L⁻¹) depuis le stade embryonnaire jusqu'à l'âge adulte sur la spermatogenèse et la stéroïdogénèse. Aucune lésion histologique n'a été mise en évidence si ce n'est une diminution du nombre de vacuoles basales. Cependant, le groupe fortement exposé (120 mg.L⁻¹) a exprimé une augmentation des concentrations hormonales de FSH et LH ainsi qu'une baisse de l'estradiol intra-testiculaire. A ces observations est associée une diminution de l'expression génique du récepteur à la LH (LHR) et des enzymes impliquées dans la production des hormones stéroïdiennes (Legendre, Elie et al. 2016).

Enfin, une étude menée sur souris transgéniques indique clairement qu'une exposition chronique paternelle antérieure à la conception pourrait induire une transmission transgénérationnelle de facteurs conduisant à une instabilité génomique chez la descendance, favorisant l'apparition de cancers (Miller, Stewart et al. 2009).

La littérature indique donc bien une reprotoxicité de l'U touchant les fonctions de reproduction mâles comme femelles, ainsi qu'une toxicité maternelle et une toxicité sur la descendance, aux stades embryonnaires, foétaux et postnatals.

6 Uranium et cancers

L'U appartient au groupe 3 de la classification du CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) depuis 1999. Cela signifie que l'U est considéré comme inclassable quant à sa cancérogénicité chez l'Homme ou l'animal dû au manque d'indications à disposition.

Pourtant, durant ces dernières années, la littérature scientifique a rassemblé de nombreuses données sur les risques d'une exposition à l'U sur la cancérogénicité.

En effet, il a été montré que l'acétate d'uranyl et le nitrate d'uranyl sont capables d'induire des cassures de brins d'ADN suggérant une possible génotoxicité de l'U (Yazzie, Gamble et al. 2003). Une étude *in vitro* a montré sur des cellules humaines de bronches exposées à des particules d'U une perte de l'inhibition de contact et une forte instabilité chromosomique (Faa, Gerosa et al. 2017).

Il y a déjà 50 ans, on observait une augmentation de l'incidence du cancer du poumon chez des mineurs d'U (SACCOMANNO, ARCHER et al. 1964). Une récente étude française ayant pour objectif de montrer la relation entre l'exposition à des composés uranifères et la mortalité dans une cohorte de 4688 travailleurs du cycle de l'U a révélé que le taux de mortalité standardisé pour le cancer de la plèvre était significativement augmenté comparé à la population générale française (Zhivin, Guseva Canu et al. 2016).

D'autre part, une augmentation du risque de cancer a été observée parmi les travailleurs du cycle de l'U et les vétérans de la guerre du Golfe et des Balkans (Zhivin, Laurier et al. 2014).

Le risque de développer des hémopathies malignes (leucémie, lymphome, etc.) a également été l'objet de plusieurs études. Si la plupart ne mettaient pas en évidence de relation causale avec une exposition à l'UA, une étude récente sur des patients irakiens atteints de leucémie suite à la Guerre du Golfe a montré des niveaux plasmatiques d'U significativement supérieurs aux sujets sains (Al-Hamzawi, Jaafar et al. 2014, Faa, Gerosa et al. 2017).

Des travaux ont montré une augmentation de l'incidence des cancers des testicules sur une population croate entre avant et après la guerre, des cancers de la vessie parmi des soldats norvégiens ayant combattu au Kosovo et enfin des cancers du sein chez les femmes irakiennes entre l'avant et l'après-guerre, dont une proportion de 33,8% chez des jeunes filles de moins de 15 ans (Faa, Gerosa et al. 2017).

L'ensemble des données rassemblées par Faa *et al*/ suggèrent que la pollution consécutive à la Guerre du Golfe, dont le déversement d'U, devrait être considérée comme un potentiel facteur étiologique à l'accroissement du nombre de cancer du sein, notamment chez les très jeunes irakiennes. De la même façon, les données suggèrent que l'utilisation d'UA dans les conflits armés serait à l'origine d'une augmentation des cancers des testicules (Faa, Gerosa et al. 2017).

Enfin, une large étude de mortalité a été entreprise par l'IRSN sur une cohorte 12 649 travailleurs français du cycle de l'U suivis entre 1968 et 2006. La cohorte TraCy est l'une des plus importante de ce type. Il a été observé un fort « *healthy worker effect* » (biais du travailleur en bonne santé) pour les pathologies non-cancéreuses mais moins prononcé dans le cas des groupes de cancers. S'il n'est pas observé de différences significatives sur la mortalité de l'ensemble des cancers, on note néanmoins une hausse non significative pour quelques cancers spécifiques et une augmentation significative de mésothéliome pleuraux malins (Samson, Piot et al. 2016).

Des études expérimentales initiées par l'IRSN vont venir compléter les données déjà publiées concernant le potentiel génotoxique et cancérigène de l'U.

7 Neurotoxicité

La neurotoxicité est un effet néfaste d'un xénobiotique sur le système nerveux à l'échelle moléculaire, cellulaire ou tissulaire et qui se traduit par une modification comportementale, locomotrice, cognitive ou sensitive.

Des métaux lourds tels que le plomb, le cadmium ou le mercure sont connus pour leur neurotoxicité, même à faible concentration (Saturnisme, Maladie de Minamata et Itai-Itai). Ce sont aussi des perturbateurs du comportement, du sommeil, de l'attention (Dribben, Creeley et al. 2011, Farina, Avila et al. 2013, Monaco, Grimaldi et al. 2016).

Ils sont également suspectés d'avoir un rôle dans plusieurs pathologies neurodégénératives telles que Alzheimer, Parkinson ou encore la sclérose en plaques.

L'U appartenant également à cette classe de métaux lourds, des effets apparentés peuvent donc être suspectés mais peu de données sont disponibles chez l'Homme (Howland 1948).

7.1 Uranium et Cerveau

Il a été montré que l'U avait lui aussi un tropisme pour le cerveau, plus ou moins important selon la voie de contamination et qu'il n'était pas localisé de façon homogène dans toutes les structures. Cette présence hétérogène a été démontrée chez le rat suite à une ingestion chronique d'U (Lestaevel, Houpert et al. 2005, Paquet, Houpert et al. 2006, Houpert, Frelon et al. 2007). Sa distribution varie également selon la voie et la durée de l'exposition.

On a vu précédemment le rôle protecteur de la BHE que très peu de substances peuvent franchir. La concentration d'U retrouvée dans le cerveau est inférieure à celle des autres organes. Néanmoins, la présence d'U dans le cerveau implique qu'il serait capable de franchir la BHE. Les mécanismes de ce passage sélectif sont encore mal connus.

D'autre part, des études récentes ont mis en évidence une présence d'U dans le bulbe olfactif suite à des expositions répétées par inhalation (Monleau, Blanchardon et al. 2006, Tournier, Frelon et al. 2009). Les recherches actuelles étudient donc un potentiel contournement de la BHE lors d'une exposition par inhalation, *via* le nerf olfactif, à travers la lame criblée, *via* le fluide cérébro-spinal (Ibanez, Suhard et al. 2014). Cette hypothèse est étayée par le fait que la quantité d'U retrouvée dans le cerveau est supérieure lors d'une exposition par inhalation que par ingestion.

De plus, l'U est capable de pénétrer dans les cellules neuronales et ce même à faible concentration. En effet, une étude *in vitro*, sur cellules neuronales (IMR-32) a montré par spectrométrie de masse à ionisation secondaire (SIMS) que de l'U pénètre dans la cellule, avec une localisation nucléaire, à partir de 50 μM (Rouas, Bensoussan et al. 2010).

Ce travail est à la base du choix des concentrations d'UA choisies pour cette étude.

Ces données suggèrent donc que plusieurs mécanismes de passage de l'U dans le cerveau sont possibles.

7.2 Effets de l'Uranium

Plusieurs études ont d'ores et déjà constaté des perturbations des fonctions motrices et cognitives. Des troubles de la mémoire spatiale sont observés chez des rats adultes contaminés à l'U sur le long terme *via* l'eau de boisson (Houpert, Lestaevel et al. 2005) ou par inhalation de particules uranifères (Monleau, Bussy et al. 2005). Plus récemment, une étude sur rats juvéniles contaminés via la lactation puis l'eau de boisson ont exprimé un comportement dépressif et des troubles de l'anxiété (Lestaevel, Grison et al. 2016).

Des études épidémiologiques menées chez des travailleurs ayant subi une forte exposition par inhalation ont mis en évidence des troubles du comportement, des états dépressifs ou d'agitation (Howland 1948). D'autre part, des concentrations d'U urinaire supérieures aux témoins ont été mesurées chez des vétérans de la Guerre du Golfe présentant des troubles neurocognitifs tels que des pertes de mémoire (McDiarmid, Keogh et al. 2000, McDiarmid, Gaitens et al. 2017). Cependant, aucun lien n'a clairement été établi entre ces troubles, regroupés sous le terme « syndrome de la guerre du Golfe », et l'exposition à l'U, notamment à cause de l'exposition simultanée à de nombreuses autres substances chimiques également neurotoxiques.

7.3 Mécanismes d'action

Le cerveau étant le principal consommateur de glucose de l'organisme, le métabolisme de ce dernier représente une source importante d'espèces réactives de l'oxygène (EROs). Le cerveau est également relativement pauvre en enzymes antioxydantes telles que la Superoxyde Dismutase (SOD) ou la Glutathion Peroxydase (GPx). La combinaison de ces deux facteurs en fait un organe sensible aux dommages oxydatifs (Lestaevel, Romero et al. 2009).

Or, il est connu que les métaux lourds sont également à l'origine d'une production d'EROs. Ce surplus pourrait être à l'origine d'un débordement des enzymes détoxifiantes et une modification de la balance pro/anti-oxydante. Cette hypothèse est appuyée par la mise en évidence de peroxydation lipidique lors d'une ingestion chronique à l'UE et UA, notamment au niveau de l'hippocampe (Briner and Murray 2005, Lestaevel, Dhieux et al. 2015).

7.4 Uranium et Neurogenèse

Pendant le développement, la sensibilité du cerveau aux lésions par des agents neurotoxiques est augmentée (Rice and Barone 2000). L'exposition aux métaux lourds à des phases critiques du développement cérébral peuvent avoir un impact sur la neurogenèse : prolifération, différenciation, migration et apoptose (Gotz and Huttner 2005) et donc sur les fonctions cérébrales à l'âge adulte .

Des études menées au LRTOX ont montré qu'une exposition à l'UA aux stades pré et post natals entraînait une baisse de l'activité locomotrice et une perturbation de l'anxiété (Lestaevel, Dhieux et al. 2015).

Une des hypothèses de mécanisme émise portait sur une perturbation des processus de neurogenèse au cours du développement prénatal. Deux études très récentes au LRTOX ont donc étudié l'effet d'une contamination par l'UA sur la neurogenèse (Legrand, Elie et al. 2016, Legrand, Lam et al. 2016), sur modèle *in vivo* de contamination chronique à faibles concentrations d'U (40 et 120 mg.L⁻¹) aux stades prénatal, néonatal et postnatal.

L'étude de la morphologie, prolifération et mort cellulaire a montré que l'exposition à l'U pendant le développement cérébral entraînait une perturbation de la neurogenèse (Legrand, Elie et al. 2016). Il a également été mis en évidence une perturbation des marqueurs neurogéniques se traduisant par des troubles de la mémoire spatiale à l'âge adulte.

PROBLEMATIQUE

Dans le cadre de la mission de Santé Publique portée par l'IRSN et du programme d'étude des expositions aux radionucléides à faibles doses, l'U constitue un axe majeur de recherche.

Sa présence naturelle dans l'environnement (eaux et sols), accentuée par les activités humaines liées à son exploitation en font un risque pour les populations civiles.

De nombreuses études internationales ont déjà établi que l'U avait un impact sur plusieurs systèmes physiologiques et organes, y compris le système nerveux.

Des études antérieures menées au LRTOX ont montré que l'U pouvait influencer sur le comportement. Une exposition chronique à de faibles concentrations d'U entraînerait des perturbations des fonctions cognitives (Lestaevel, Dhieux et al. 2015), comme la mémoire spatiale, le cycle veille/sommeil ou encore des troubles locomoteurs.

Suite à la mise en évidence des effets sur la neurogenèse *in vivo* (Legrand, Lam et al. 2016), il convenait de s'intéresser aux processus cellulaires et moléculaires qui permettraient d'expliquer ces observations à l'aide d'un modèle *in vitro*.

Mon projet consiste donc en l'étude de l'effet d'une exposition à l'UA sur la neurogenèse, *via* un modèle *in vitro*. L'objectif est de déterminer l'effet d'une contamination à l'UA sur la multipotentialité des CSN et d'élucider les mécanismes impliqués. Cette étude est réalisée à l'aide d'un modèle *in vitro* de culture primaire de neurosphères obtenues à partir de télencéphales d'embryons de rat au stade E13, exposées à différentes concentrations d'U pendant la phase de différenciation.

La multipotentialité des CSN et la survie cellulaire seront étudiées par une étude semi-quantitative par immunocytochimie à l'aide de marqueurs spécifiques de chaque sous population en fonction des concentrations d'U.

Cette analyse sera accompagnée d'une étude mécanistique de biologie moléculaire. L'étude par RT-qPCR apportera des informations sur l'expression des marqueurs apoptotiques et neurogéniques chargés du contrôle et de la régulation de la neurogenèse.

MATERIELS ET METHODES

1 Modèle d'étude

Le modèle d'étude a été établi dans la continuité des expériences déjà réalisées au sein du laboratoire. Le choix a été fait de se concentrer sur le stade embryonnaire E13, stade où la neurogenèse est très active chez le rat et pour lequel des effets ont été observés *in vivo* à l'âge adulte (Legrand, Elie et al. 2016, Legrand, Lam et al. 2016).

1.1 Animaux

1.1.1 Rats femelles gestantes Sprague-Dawley

Des rates gestantes Sprague-Dawley (CharlesRiver, France) ont été utilisées. Elles sont arrivées à l'animalerie à E12 et ont été sacrifiées à E13, sous anesthésie par isoflurane et par injection intracardiaque de pentobarbital. Les embryons (non sexés) ont été extraits et les encéphales sont isolés par microdissection sous poste de PSM. Les embryons d'une seule femelle ont été utilisés pour une culture. Six femelles gestantes ont été sacrifiées, permettant l'obtention de six cultures primaires. Le protocole expérimental a été approuvé par le comité d'éthique interne de l'IRSN et validé par le ministère de l'Agriculture.

Au total, 6 femelles gestantes ont été sacrifiées au cours du stage, donnant lieu à 6 cultures primaires indépendantes.

1.2 Protocole *In Vitro*

1.2.1 Culture primaire de neurosphères

Les encéphales d'embryon d'une même femelle sont rassemblés et les cellules dissociées mécaniquement par scalpel puis enzymatiquement par une solution de trypsine 0,1%-DNAse 0,04%(Sigma) à 37°C pendant 20 minutes.

La réaction est stoppée par un inhibiteur de trypsine et les cellules sont lavées au *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Fisher Scientific). Les cellules sont centrifugées 6 minutes à 1000rpm et le surnageant prélevé. Les cellules sont remises en suspension dans une solution de DNAse 0,04% (Sigma) et triturées par passage en seringues 21G et 23G puis lavées dans du DMEM et centrifugées. Elles sont ensuite remises en suspension dans du Growth Medium (GM).

Composition Growth Medium :

- DMEM/Ham's F12 (3:1)
- B27 (1/50^e) (Fisher scientific) : supplément optimisé pour CN
- Héparine (5mg.L⁻¹) (Sigma)
- Pénicilline et Streptomycine (1%)
- Facteurs de croissance : bFGF et EGF (10ng.L⁻¹) (R&D systems)

Les cellules sont ensemencées à une densité de 200 000 cellules/mL dans des flaques T25 non coatées (Costar) et mises à incuber à 37°C / 5% CO₂.

La moitié du milieu est changé au bout de 2-3 jours. Si la flasque présente une population trop importante de cellules de type fibroblastique adhérentes, les CSN en suspension sont purifiées par un changement complet de milieu et de flasque.

1.2.2 Différenciation et contamination à l'UA

Lorsque les sphères ont atteint une taille suffisante (J6-7), le milieu est récupéré et centrifugé. Le surnageant est prélevé et les neurosphères sont dissociées par ajout de trypsine 0,01% (Sigma) puis par pipetage et passage à travers une seringue 23G.

Elles sont ensuite mises à différencier sur différents supports : des labteks 8 puits (ThermoFisher, France) pour les futures expériences d'immunocytochimie et des plaques 96 puits à fond plat et clair pour les futures expériences de biologie moléculaire.

Tableau 4 : Paramètres d'ensemencements des cultures

Support	Densité (cellules/mL)	Volume
Labteks 8 puits	100 000	200 µL/puit
Plaque 96 puits	100 000	150µL/puit

La différenciation se fait en présence de Differentiation Medium (DM) selon 4 conditions de contamination à l'UA : témoin, 10 µM, 50 µM, 100 µM.

Composition du Differentiation Medium :

- DMEM/Ham's F12 (3:1)
- B27 (1/50e) (Fisher scientific) : supplément optimisé pour CN
- Héparine (5mg.L⁻¹) (Sigma)
- Pénicilline et Streptomycine (1%)
- Sérum de veau (10%)

Les cellules sont mises à différencier en incubateur à 37°C / 5% CO₂. La différenciation et la contamination durent 7 jours.

Tableau 5 : Paramètres d'entretien des cultures

Support	J3	Volume
Labteks 8 puits	Ajout de milieu frais	200 µL/puit
Plaque 96 puits	Ajout de milieu frais	150µL/puit

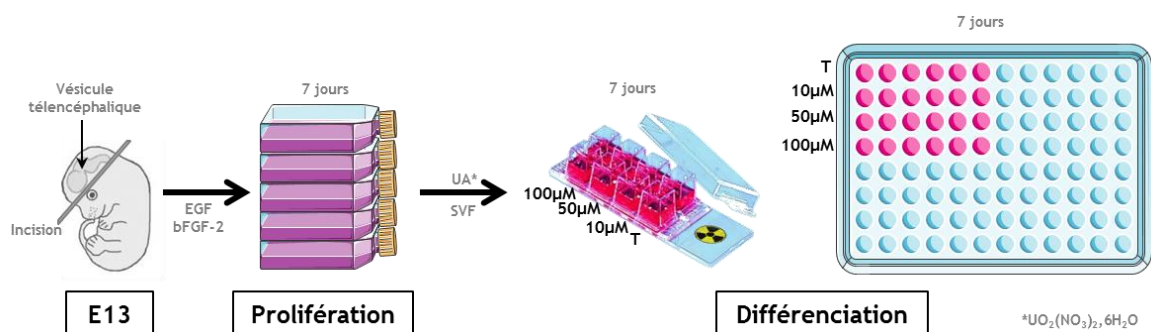


Figure 12 : Protocole de culture primaire de CSN

1.2.3 Arrêt de différenciation à J7

1.2.3.1 Labteks 8 puits

Le milieu contaminé est retiré. Les cellules sont fixées au PFA 4% pendant 40 minutes. Les puits sont lavés au PBS trois fois et conservés dans le PBS à 4°C.

1.2.3.2 Plaque 96 puits

Les échantillons sont traités en suivant le protocole Kit Cells-To-CT (4402955, ThermoFisher Scientific, France).

Le milieu contaminé est retiré. Les puits sont rincés au PBS sans décoller le tapis cellulaire. Les cellules sont lysées dans le tampon de lyse du kit. La lyse est stoppée par la solution stop du kit puis conservées à -20°C.

1.2.3.3 Solution de contamination d'UA

La solution d'UA consiste en des cristaux de nitrate d'uranyle hexahydratés ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) de masse molaire $488 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et de composition isotopique ^{238}U : 99,74%, ^{235}U : 0,26% et ^{234}U : 0,001% (AREVA-NC, Pierrelate, France). Ces cristaux sont dissous dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium NaHCO_3 (Sigma) à 0,1 M. La masse d'U est calculée pour obtenir une solution mère de concentration 10 mM d'U.

Cette solution est ensuite diluée au $1/1000^{\text{e}}$, $1/200^{\text{e}}$ et $1/100^{\text{e}}$ dans le DM pour obtenir les différentes conditions du schéma de contamination : 10, 50 et 100 μM .

Ces concentrations se basent sur l'étude de Rouas et al (2010), où il est montré sur différentes lignées cellulaires dont la lignée neurale IMR-32, par spectrométrie de masse à ionisation secondaire, que de l'U pénètre dans les cellules lors d'expositions à de faibles concentrations (50 et 100 μM).

2 Méthodes Analytique

2.1 Immunocytochimie – Quantification sur labteks

Les immunocytochimies sont réalisées directement dans les labteks.

2.1.1 Anticorps primaires

Le PBS est éliminé. Les sites aspécifiques sont bloqués par une solution de PBS-triton 0,1% avec du sérum de veau foetal 5%, pendant 40 minutes à température ambiante.

Les anticorps primaires dilués à $1/200^{\text{e}}$ dans le PBS-triton 0,1% sont mis à incuber toute la nuit à 4°C.

Tableau 6 : Anticorps Primaires

Type cellulaire	Cible	Marquage	Animal	Fournisseur
Neurones progéniteurs et matures	β Tubuline	Cytoplasmique	Mouse	Sigma-Aldrich
Astrocytes	GFAP	Cytoplasmique	Rabbit	Dako
Oligodendrocytes progéniteurs et matures	Olig2	Nucléaire	Rabbit	Millipore
Oligodendrocytes matures	MBP	Membranaire	Chicken	Millipore

2.1.2 Anticorps secondaires

Le lendemain, la solution d'anticorps primaires est éliminée. 3 lavages successifs de PBS-Triton 0,1% de 15 minutes à température ambiante sous agitation sont réalisés.

Les anticorps secondaires dilués à 1/200^e dans le PBS-Triton 0,1% sont mis à incuber pendant 2 heures à température ambiante.

Tableau 7 : Anticorps Secondaires et Fluorochromes

Anticorps	Fluorochrome	Marque
Donkey anti Mouse	Cyanine 3	Jackson Immunoresearch
Goat anti Rabbit	FITC	
Goat anti Rabbit	Cyanine 3	
Donkey anti Chicken	Alexa 488	

La solution d'anticorps secondaire est éliminée. 3 lavages successifs de PBS-Triton 0,1% de 15 minutes à température ambiante sous agitation sont réalisés.

La chambre du labtek est retirée. Quelques gouttes d'une solution de montage VectaShield avec DAPI sont déposées sur la lame avant d'appliquer la lamelle.

La lame montée est conservée à 4°C.

2.1.3 Microscope à fluorescence

Les lames sont observées en microscopie optique à fluorescence Axio Imager 2 (Zeiss, France).

La quantification se fait sur photos prises à grossissement x40 à la longueur d'onde correspondant au fluorochrome utilisé pour chaque marqueur de chaque type cellulaire étudié : 5 champs par puit sont photographiés et quantifiés.

2.1.4 Logiciels de traitement

Les photos sont prises à l'aide du logiciel Archimed 10.

Les quantifications sont réalisées manuellement par pointage sur Histolab 10.

2.2 RT-PCR sur Plaque 96 puits

La « *Polymerase Chain Reaction* » semi-quantitative en temps réel (RT-qPCR) a pour but d'amplifier une faible quantité d'acides nucléiques permettant d'en quantifier l'expression génique.

2.2.1 Kit Cells-To-Ct

Le Kit *Power SYBR® Green Cells-To-Ct* (4402955, Thermo Fisher Scientific, France) permet une extraction rapide à partir des lysats cellulaires et de réaliser une RT-PCR directement sur les tapis cellulaires.

La transcription inverse est réalisée en thermocycleur Hybaid PX2 (Thermo) avec une solution contenant les reverse transcriptases et le matériel nécessaire (dNTP) fourni dans le kit. On obtient ainsi l'ADNc nécessaire à la PCR.

La RT-qPCR proprement dite est réalisée en thermocycleur QuantStudio 12K Flex Realtime PCR System (Thermo Fisher Scientific, France) ; en plaque 384 puits, contenant 4 µL d'ADNc dilués au 1/25^e et 6µL d'un mélange réactionnel contenant les amorces (sens et anti-sens) et le SYBR Green.

Le programme utilisé pour l'amplification est le suivant : 2 minutes à 50°C ; 10 minutes à 95°C ; 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C.

Les résultats sont normalisés par 2 gènes de ménages utilisés comme référence : l'Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT) et Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

2.2.2 Amorces ADN

Les amorces ADN proviennent toutes du même fournisseur : Invitrogen, ThermoFisher Scientific.

Tableau 8 : Gènes étudiés par RT-qPCR

Gène	Forward	Reverse
NeuroD	CTCAGTTCTCAGGACGAGGA	TAGTTCTTGGCCAAGCGCAG
NeuroG3	GCAAACTTCGAAGCGAGCA	CAGGCTACCAGCTTGGGAAA
Mash1	AGCAGCTGCTGGACGAGCA	CCTGCTTCCAAAGTCCATTC
Notch1	GCAGCCACAGAACTTACAAATCCAG	TAAATGCCTCTGGAATGTGGGTGAT
GAP43	AGCCAAGGAGGAGCCTAAAC	CTGTCCGGGCACTTTCCTTAG
Bcl2	AGCATGCGACCTCTGTTTGA	TCACTTGTGGCCAGGTATG
Bax	CAACATGGAGCTGCAGAGGA	TAGGAAAGGAGGCCATCCCA
Caspase 3	GAGCTTGGAACGCGAAGAAA	TAACCGGGTGCGGTAGAGTA
Caspase 9	AGCTGGCCAGTGTGAATAC	GCTCCACCTCAGTCAACTC

2.4 Analyses Statistiques

Le logiciel SigmaPlot 11 est utilisé pour réaliser les tests statistiques.

Pour les expériences d'immunocytochimie, 5 champs de 6 cultures différentes (n=3 à 5 selon les marqueurs) sont quantifiés pour l'ensemble des marqueurs immunocytochimiques utilisés. Pour les expériences de biologie moléculaire, nous disposons d'un n=8 de deux cultures indépendantes.

Les moyennes et SEM de chaque groupe sont calculées. Un test de normalité Shapiro-Wilk est utilisé. Puis une analyse de variance de type ANOVA paramétrique One Way ou ANOVA non paramétrique Kruskal Wallis est lancée selon le résultat du test de normalité. Les comparaisons entre les groupes contaminés et témoins sont réalisées avec un test de Student-Neuwman-Keulls ou Rank-Sum test. Le niveau de significativité est fixé pour une valeur de p inférieure ou égale à 0,05.

RESULTATS

L'objectif de l'étude est d'évaluer la multipotentialité des CSN, *in vitro* en présence d'UA, sur un modèle de culture primaire de neurosphères à partir de vésicules télencéphaliques d'embryons au stade E13.

Les résultats concernent donc dans un premier temps l'observation microscopique des cultures primaires en prolifération puis en phase de différenciation.

La multipotentialité proprement dite est étudiée par une mesure quantitative des différentes populations neurales et de leur proportion par rapport au nombre total de cellules vivantes.

Enfin, une étude de l'expression génique de marqueurs neurogéniques est réalisée dans les différentes conditions de contamination.

PROLIFERATION ET NEUROSPHERES

La culture primaire de neurosphères est faite en absence de contamination afin d'obtenir des clones de CSN que nous mettrons ensuite en condition de différenciation.

Une neurosphère est constituée d'un clone de CSN, qui s'organise de façon régulière à partir de la CSN originelle.

Les plus petites sphères restent en suspension dans le milieu et conservent leur forme régulière (Fig. 13A). Les plus développées peuvent parfois sédimenter, captées par quelques cellules fibroblastiques tapissant le fond de la flasque (Fig. 13B).

DIFFERENCIATION ET SURVIE CELLULAIRE

Après 7 jours de prolifération, les neurosphères sont dissociées et mises à différencier en présence de concentrations croissantes d'UA : 10, 50 et 100 μM comparées à un groupe témoin (Fig. 14).

Après 6 jours *in vitro*, l'observation au microscope permet de constater une diminution du nombre de cellules de façon dose-dépendante suggérant un effet sur la survie cellulaire (Fig. 14A à D). Nous observons également une modification de la morphologie des neurones survivants dans les groupes exposés à 50 et 100 μM comparés au témoin (Fig. 14F). Les neurones du groupe fortement exposé sont bipolaires, avec des ramifications avortées et un corps cellulaire gonflé là où les témoins ont un soma bien délimité, un arbre dendritique et des prolongements axonaux développés (Fig. 14E).

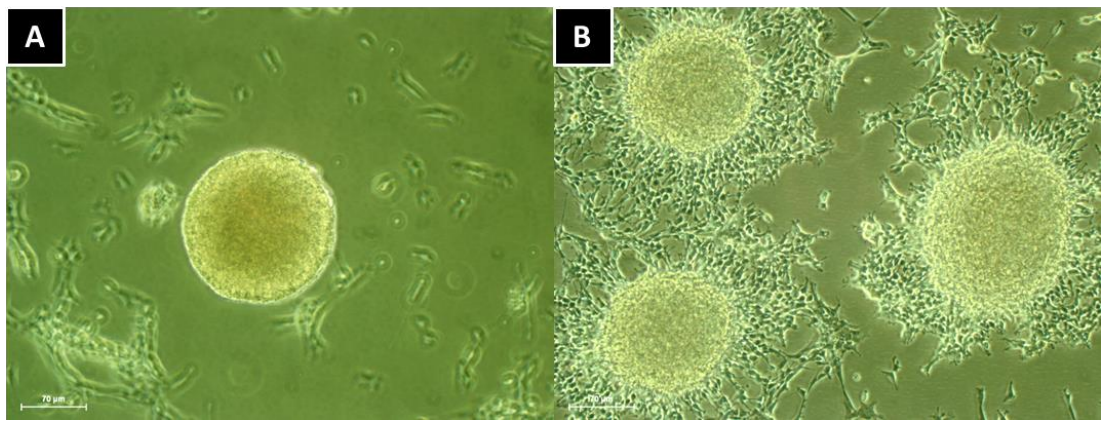


Figure 13 : Suivi au jour 7 de la culture cellulaire faite à partir de la vésicule télencéphalique des embryons de rat au stade E13. (A) Neurosphère en suspension. (B) Neurosphères ayant sédimentées, présence de cellules fibroblastiques adhérentes. Images photographiées en microscopie optique (objectif x10)

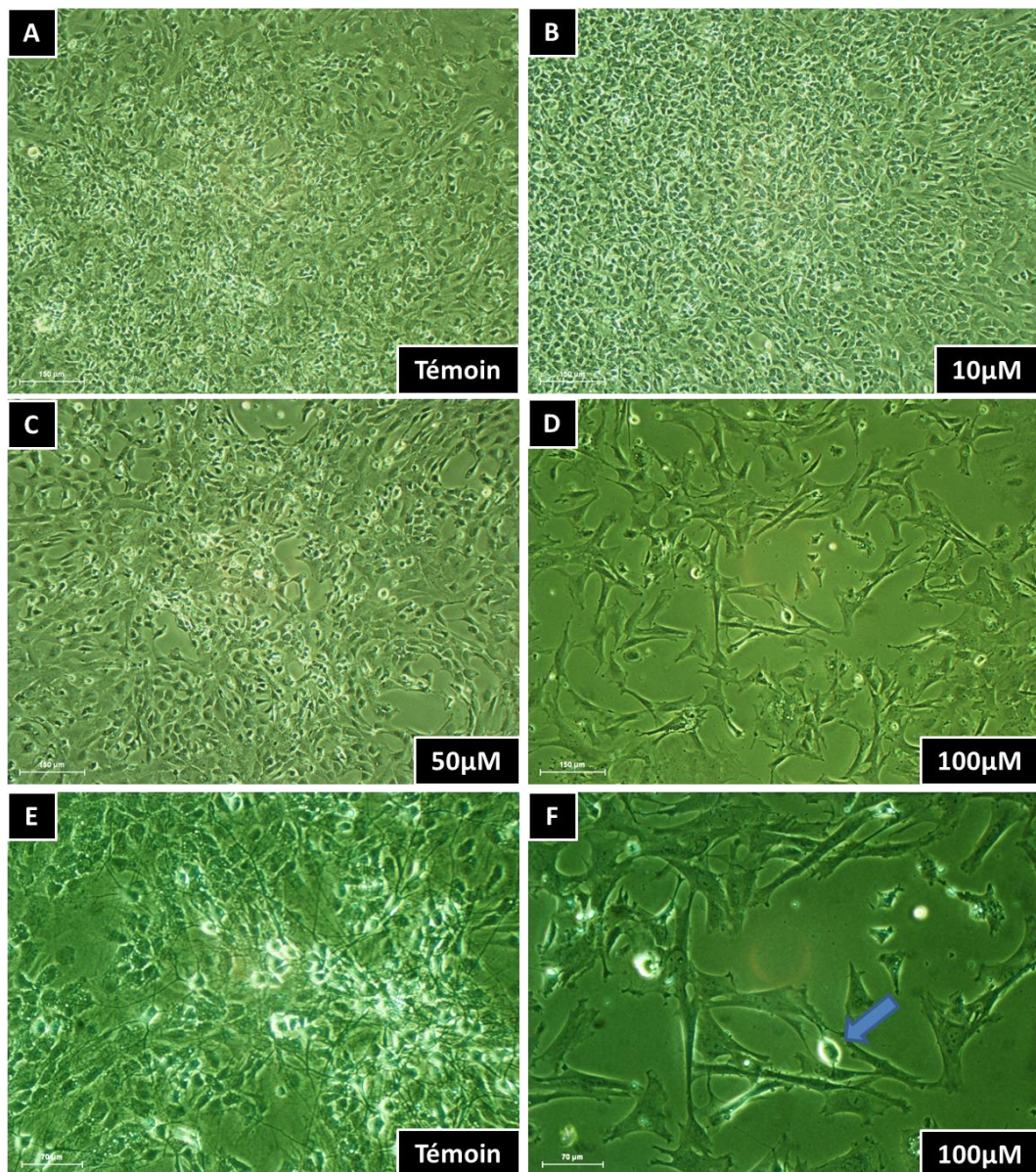


Figure 14 : Suivi de la différenciation des CSN en culture primaire au jour 6. (A) Condition Témoin (B) 10 µM d'UA (C) 50 µM d'UA (D) 100 µM d'UA (E) Neurones en condition Témoin (x20) (F) Neurone exposé à 100 µM. Images photographiées en microscopie optique (A, B, C, D) objectif x10 (E, F) (objectif x20)

ANALYSE QUANTITATIVE DES POPULATIONS NEURALES

La quantification des populations neurales est réalisée après immunocytochimie à l'aide de marqueurs spécifiques à chaque population. Le comptage est fait manuellement au microscope à fluorescence grâce au logiciel Histolab.

1 Population cellulaire totale

Les lames sont montées avec un milieu Vectashield contenant du Dapi. Il s'agit d'un agent intercalant de l'ADN (bases pyrimidiques A et T) qui fluoresce dans le bleu. Il permet donc un marquage nucléaire des cellules survivantes.

Les résultats de la quantification de la population cellulaire totale sont reportés sur le graphe de la figure 15A. Ils confirment un effet statistiquement significatif de l'UA sur la survie cellulaire. On note une diminution significative de 25% du nombre total de cellules (Dapi+) dès 50 μM et atteint 65% à la concentration maximale de 100 μM (Anova on ranks $p \leq 0,001$; Témoin vs 50 μM $p < 0,05$; Témoin vs 100 μM $p < 0,05$) (Fig. 15A).

Cette baisse suit une nette relation dose-effet.

Ce résultat *in vitro* confirme donc les observations faites en microscopie dans les flasques de cultures mentionnées dans le paragraphe précédent.

2 Population Neuronale

La β -Tubuline (βTub) est une protéine associée aux microtubules, exprimée exclusivement dans les neurones (Katsetos, Legido et al. 2003). Son immunomarquage permet donc d'identifier avec une forte spécificité les progéniteurs de neurones et les neurones matures (en fluorescence rouge sur les figures 16 et 17).

Compte tenu des observations faites dans les flasques de culture, la morphologie des neurones marqués par la βTub est analysée à fort grossissement. La βTub marquant les prolongements neuronaux, on constate un changement net entre la condition témoin et les cellules contaminées (Fig. 16). Les neurones de la condition témoin sont multipolaires et possèdent un arbre dendritique très développé et un axone bien délimité (Fig. 16). Dès 50 μM , les neurones adoptent une morphologie dite « en tête d'épingle ». Ils sont bi voire unipolaires, avec très peu de ramifications.

Les résultats sont reportés sur le graphe 15B. On observe une diminution entre les conditions témoins et contaminées. Cette variation est significative dès 50 μM et suit une relation dose-réponse jusqu'à la concentration maximale. Entre le témoin et le 100 μM , on mesure une baisse de 76% de la population neuronale (Anova on Ranks $p \leq 0,001$; Témoin vs 50 μM $p < 0,05$; Témoin vs 100 μM $p < 0,05$) (Fig. 15B).

Si on s'intéresse à la proportion de neurones, on constate qu'elle est également diminuée de façon significative, et ce dès 10 μM (Anova on Ranks $p = 0,038$; Témoin vs 10 μM $p < 0,05$; Témoin vs 50 μM $p < 0,05$; Témoin vs 100 μM $p < 0,05$). Constituant 23,2% de la population totale à la condition témoin, ils n'en représentent plus que 12,9% en présence de 100 μM d'U, soit une diminution de moitié de leur proportion (Fig. 15B et 15F).

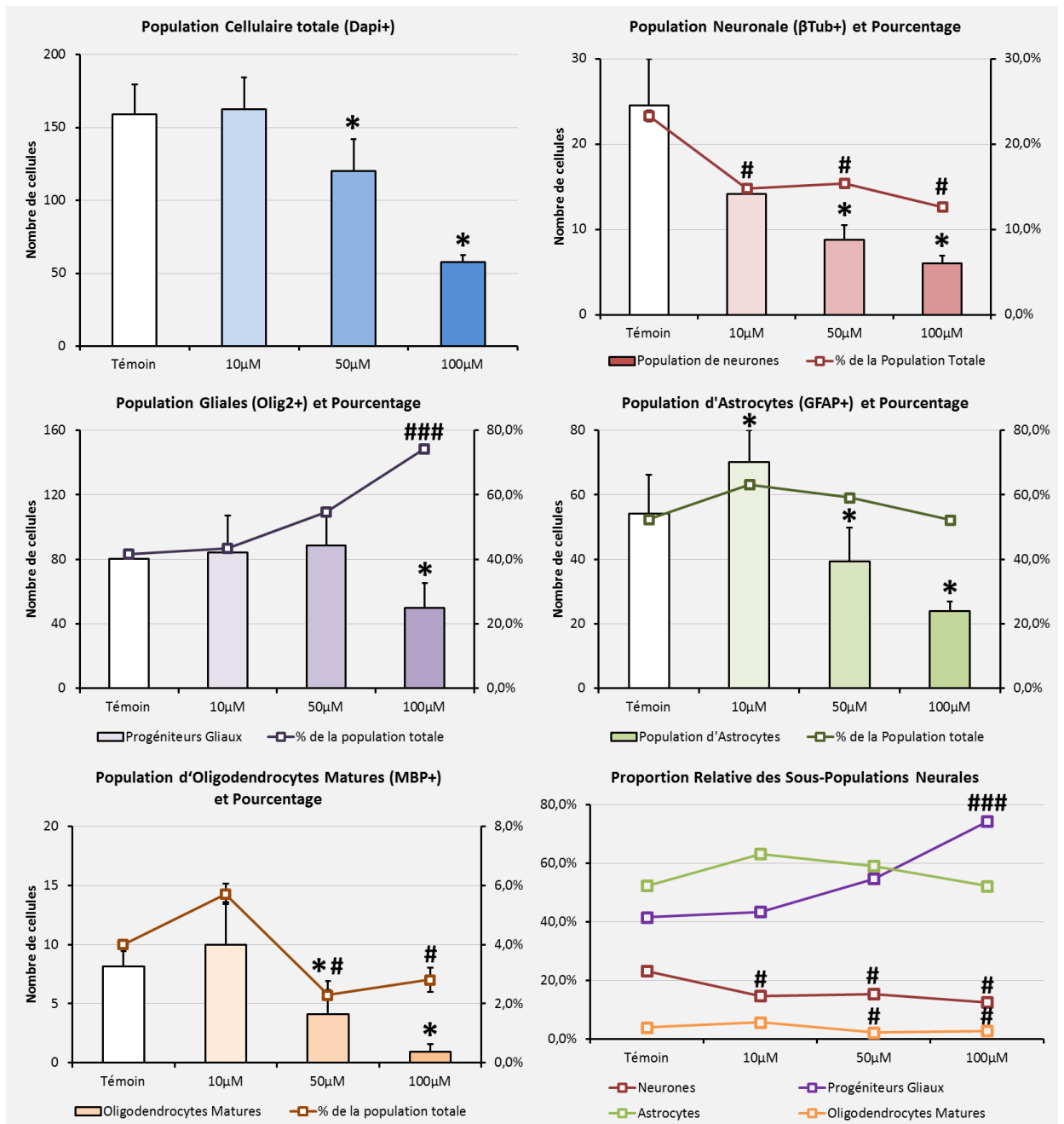


Figure 15 : Représentation graphique des résultats de la quantification par immunocytochimie des différentes populations étudiées. Moyenne du nombre de cellules ± SEM par champ photographié (n=5) par culture. (A) Quantification de la population cellulaire totale (PCT) par marquage au Dapi (n=5 cultures). **(B)** Quantification de la population neuronale et proportion par rapport à la PCT par marquage à la βTub (n=4). **(C)** Quantification de la population gliale et proportion par rapport à la PCT par marquage à Olig2 (n=3). **(D)** Quantification de la population d'astrocytes et proportion par rapport à la PCT par marquage au GFAP (n=4). **(E)** Quantification de la population d'oligodendrocytes matures et proportion par rapport à la PCT par marquage au MBP (n=3). **(F)** Proportion des populations de neurones, d'astrocytes matures et d'oligodendrocytes matures par rapport à la PCT. (significativité * p<0,05)

3 Population de Progéniteurs Gliaux : Cellules Olig2+

Olig2 est un facteur de transcription exprimé à la fois chez les oligodendrocytes matures et les progéniteurs, impliqué dans leur développement (Jakovcevski and Zecevic 2005). Des études ont également montré que Olig2 peut être exprimé chez des progéniteurs d'astrocytes (Marshall, Novitch et al. 2005). Nous qualifierons donc les cellules Olig2 positives comme étant des progéniteurs gliaux, pouvant devenir soit des oligodendrocytes matures (toujours Olig2+), soit des astrocytes (perdant l'expression d'Olig2).

Le résultat de la quantification du marquage Olig2 montre une diminution moins importante que pour les autres populations (Fig. 15C et 18). Celle-ci n'est significative que pour la condition maximale de 100 μ M avec une baisse de 37% (Anova on ranks $p=0,012$; Témoin vs 100 μ M $p<0,05$).

Néanmoins, il est intéressant de constater que malgré cette diminution du nombre absolu de cellules, la proportion de cellules Olig2+ survivantes à 100 μ M, par rapport à la population totale, est augmentée de façon très significative (One Way Anova $p\leq 0,001$; Témoin vs 100 μ M $p<0,001$) (Fig. 15C et 15F).

4 Population Astrocytaire

La Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) est une protéine du cytosquelette : il s'agit d'un filament intermédiaire exprimé dans les astrocytes matures (Uyeda, Eng et al. 1972) (en fluorescence verte sur la figure 17).

On observe une importante modification de la morphologie des astrocytes à 50 μ M et 100 μ M. Le nombre et la taille des prolongements cytoplasmiques sont considérablement réduits. Les corps cellulaires et les noyaux sont gonflés (Fig. 17).

Les résultats de la quantification reportés sur le graphe 3D montrent une baisse significative à partir de 50 μ M (28%) et qui s'accroît pour la concentration d'U maximale (56%) (ANOVA on ranks $p\leq 0,001$; Témoin vs 50 μ M $p<0,05$; Témoin vs 100 μ M $p<0,05$) (Fig. 15D).

On notera que la différenciation de la lignée astrocytaire semble épargnée puisque la proportion relative reste inchangée malgré la chute du nombre absolu de cellule (Fig. 15D et 15F).

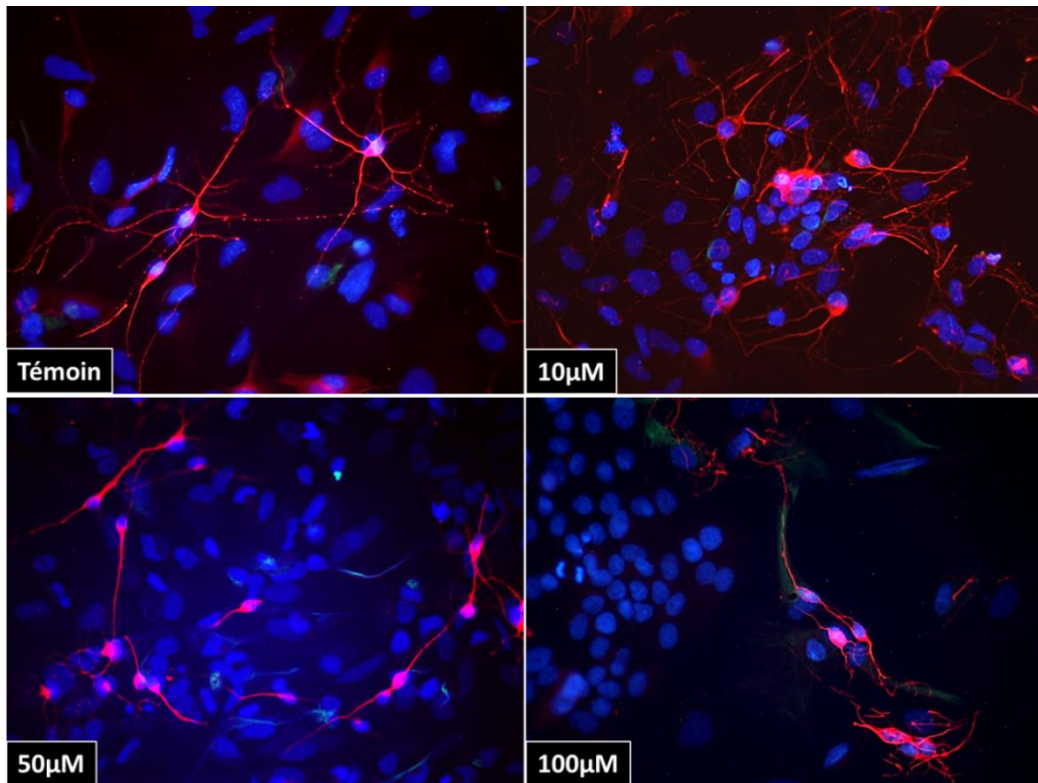


Figure 16 : Illustration de la morphologie des neurones dans les labteks aux différentes conditions de contamination à l'UA après immunomarquage. Les noyaux des cellules sont marqués au Dapi (bleu), les neurones (progéniteurs et matures) sont identifiés par la β Tub (rouge). Les images sont photographiées au microscope optique à fluorescence à grossissement x40.

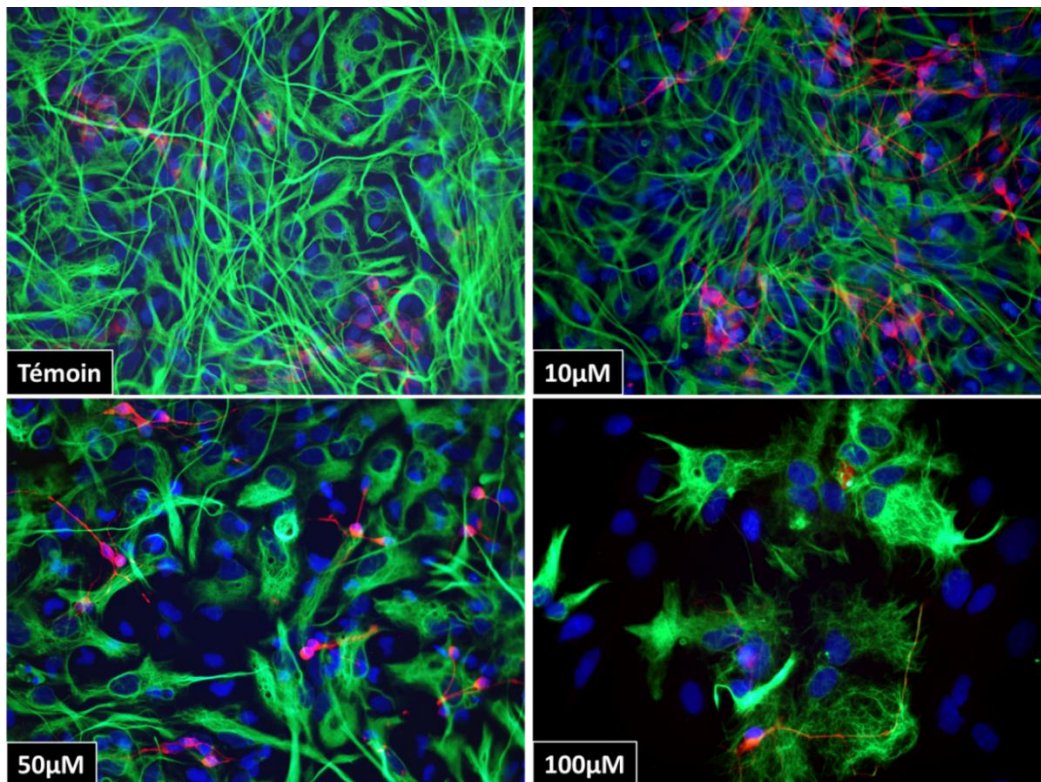


Figure 17 : Illustration de la répartition des différents types cellulaire dans les labteks aux différentes conditions de contamination à l'UA après immunomarquage. Les noyaux des cellules sont marqués au Dapi (bleu), les neurones (progéniteurs et matures) sont identifiés par la β Tub (rouge) et les astrocytes par la GFAP (vert). Les images sont photographiées au microscope optique à fluorescence à grossissement x40.

5 Population Oligodendrocytaire mature

La myelin basic protein (MBP) est impliquée dans la myélinisation des axones du système nerveux. Elle est donc exprimée à la surface de la membrane plasmique des oligodendrocytes matures et permet leur marquage.

La différenciation des oligodendrocytes est un évènement plus rare, même chez la condition témoin (Fig. 15E et 15F). On mesure néanmoins une baisse significative dès 50 μM du nombre d'oligodendrocytes matures (ANOVA on Ranks $p \leq 0,001$; Témoin *vs* 50 μM $p < 0,05$) et qui s'accroît pour la concentration d'U maximale (56%) (Témoin *vs* 100 μM $p < 0,05$) (Fig. 15E).

Leur proportion relative évolue de façon similaire avec une diminution statistiquement significative à 50 et 100 μM (ANOVA on Ranks $p = 0,005$; Témoin *vs* 50 μM $p < 0,05$; Témoin *vs* 100 μM $p < 0,05$) (Fig. 15E et 15F).

6 Proportion Relative des Sous-populations Neurales

Le nombre absolu de cellules de toutes les populations neurales (neurones, astrocytes matures et oligodendrocytes matures) est donc diminué de façon statistiquement significative dès 50 μM (Fig. 15A à 15E).

En ce qui concerne les proportions relatives, deux tendances se dégagent. Tout d'abord une diminution des populations matures. Et d'autre part, une augmentation de la proportion de progéniteurs gliaux non ou peu différenciés (Fig. 15F).

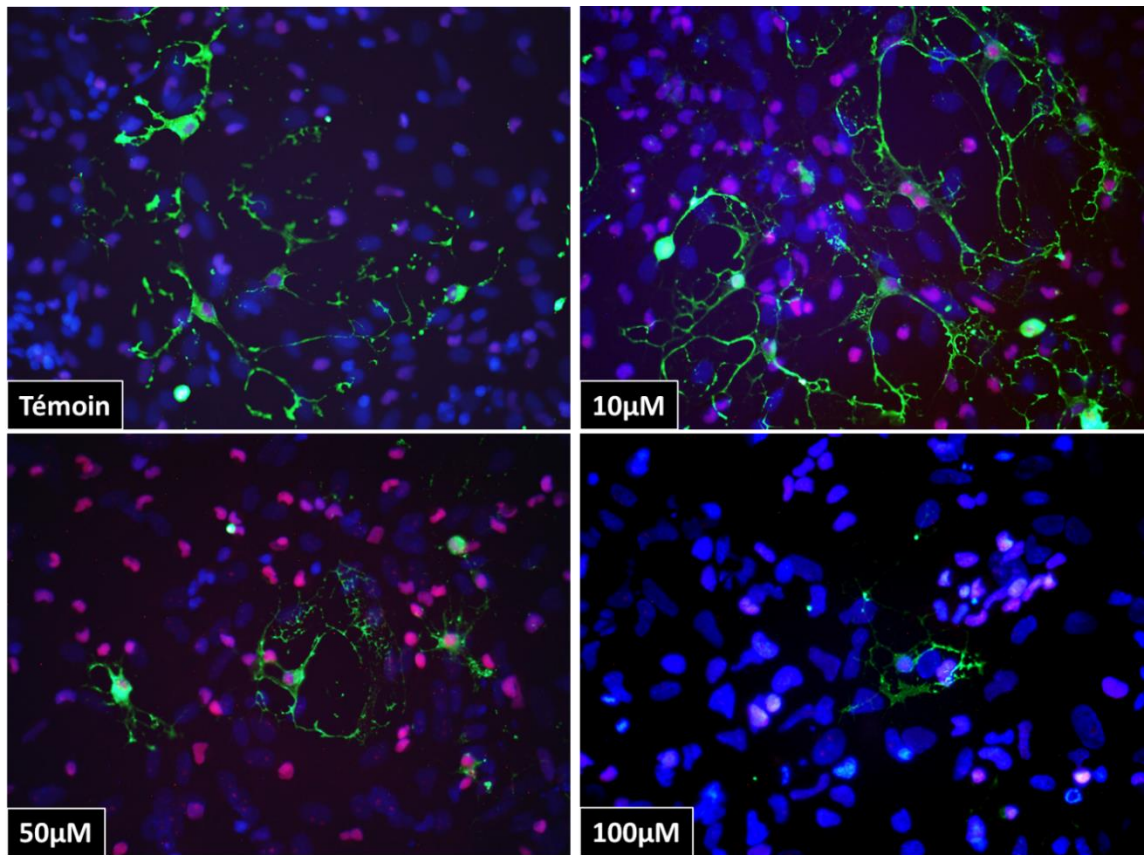


Figure 18 : Illustration de la morphologie des oligodendrocytes dans les labteks aux différentes conditions de contamination à l'UA après immunomarquage. Les noyaux des cellules sont marqués au Dapi (bleu), Les oligodendrocytes sont identifiés par marquage Olig2 (rouge) et les prolongements des oligodendrocytes matures par MBP (vert). Les images sont photographiées au microscope optique à fluorescence à grossissement x40.

ANALYSE DE L'EXPRESSION GENIE DES MARQUEURS APOPTOTIQUES

Compte tenu des effets observés sur la survie cellulaire, l'expression de gènes impliqués dans les voies apoptotiques est étudiée dans les différents groupes de contaminations.

L'expression des caspases 3 et 9 reste inchangée exceptée pour la condition 10 μM où la caspase 9 est diminuée de façon significative (One Way Anova $p=0,006$; Témoin vs 10 μM $p<0,05$) (Fig. 19). Cette baisse est cohérente avec l'absence d'effet de l'UA à la plus faible concentration, puisque la caspase 9 est pro-apoptotique par induction de la caspase 3.

La balance Bcl2/Bax est un facteur important de l'entrée en apoptose.

L'homodimérisation de Bax constitue un signal pro-apoptotique. Bcl2 exerce une action anti-apoptotique en se fixant sur Bax, ce qui empêche son homodimérisation et donc inhibe son action pro-apoptotique.

L'analyse de l'expression du gène Bcl2 révèle un doublement de son expression couplée à une diminution de 50% de Bax à la condition 100 μM (Fig. 19). Ces résultats ne sont pas significatifs mais des expériences complémentaires sont en cours, compte tenu de l'amplitude des variations.

ANALYSE DE L'EXPRESSION GENIQUE DES MARQUEURS DE LA NEUROGENESE

La seconde partie de l'étude s'intéresse aux mécanismes à l'origine des effets observés lors de la quantification des types cellulaires et sur la morphologie des neurones. Nous nous sommes donc concentrés sur l'analyse de certains facteurs clés de la neurogenèse.

Les variations d'expression génique des facteurs Mash1 et NeuroD ne sont pas statistiquement significatives. De même, si Notch1 démontre des variations plus importantes notamment pour la concentration de 50 μM , aucune différence statistique n'est apparue comme étant significative (Fig. 20).

Les variations les plus importantes sont observées pour l'expression du gène NeuroG3 qui est fortement augmenté à 100 μM (One Way Anova $p=0,001$; Témoin vs 100 μM $p=0,002$). Au contraire, l'expression de GAP43 est diminuée de façon significative, également pour la condition de 100 μM (One Way Anova $p=0,003$; Témoin vs 100 μM $p=0,043$) (Fig. 20).

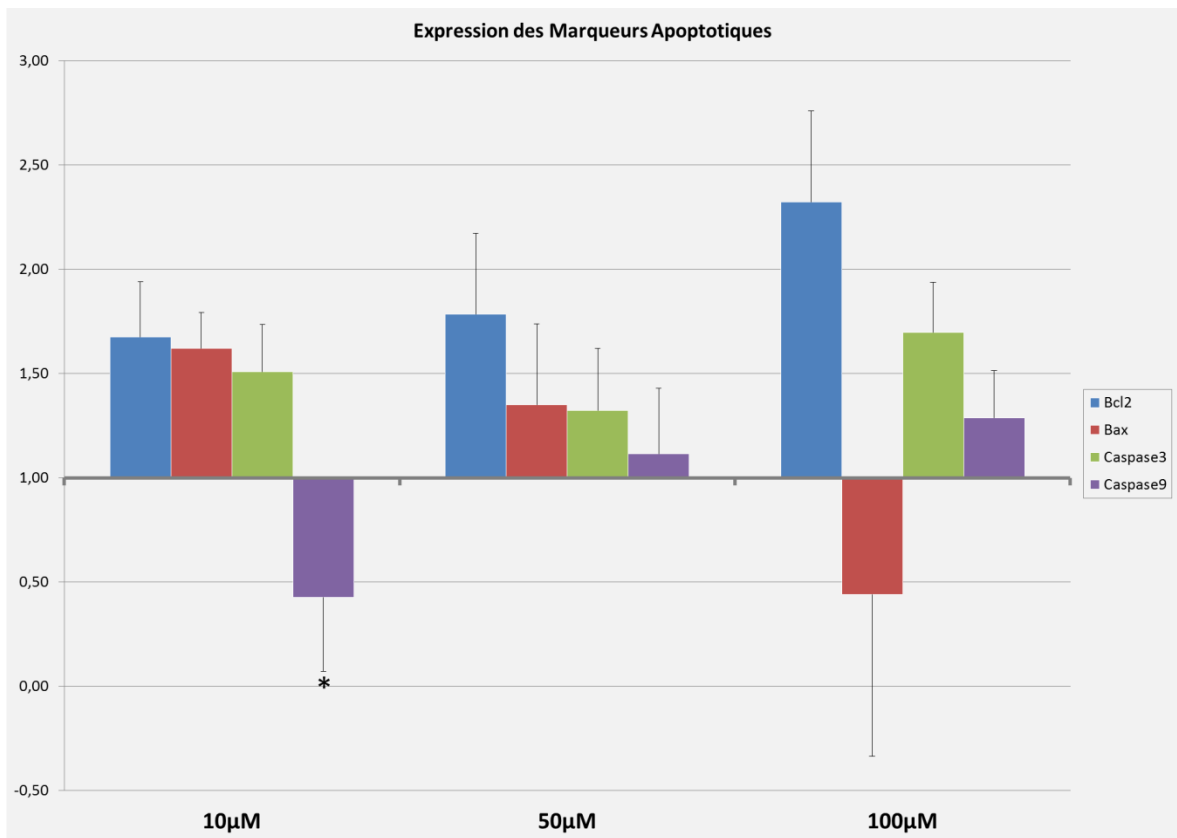


Figure 19 : Représentation graphique de l'analyse par RT-qPCR de l'expression génique (ARNm) des marqueurs apoptotiques aux différentes conditions de contamination par l'UA (significativité * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$) (n=8, 2 cultures indépendantes)

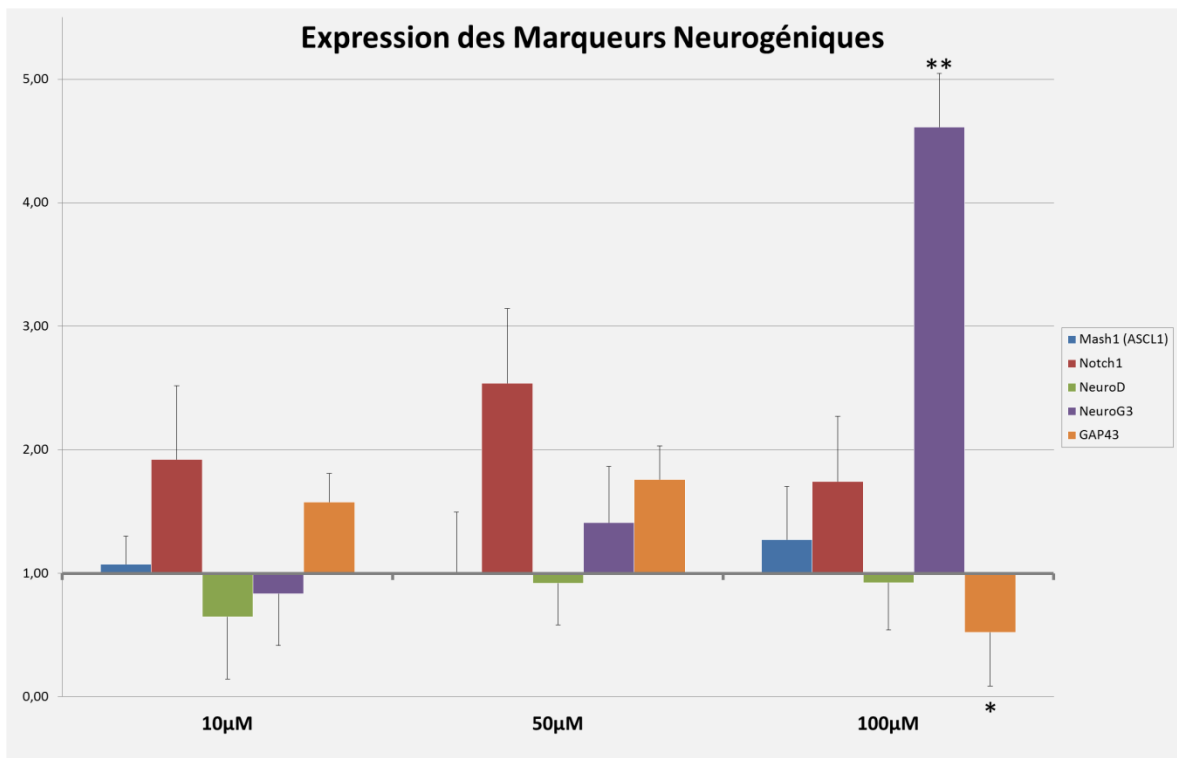


Figure 20 : Représentation graphique de l'analyse par RT-qPCR de l'expression génique (ARNm) des marqueurs neurogéniques aux différentes conditions de contamination par l'UA (significativité * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$) (n=8, 2 cultures indépendantes)

DISCUSSION

L'U est un polluant émergent présent dans l'environnement (Prat, Vercoeur et al. 2009) et auquel l'Homme est susceptible d'être exposé de par ses activités d'extraction et d'exploitation. S'attirant par là-même l'intérêt de la communauté scientifique, sa potentielle toxicité à faible dose fait aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches.

Dans les modèles expérimentaux, il a ainsi été démontré que l'U est à l'origine de perturbations comportementales et cognitives chez le rat (Lestaevel, Dhieux et al. 2015).

D'autre part, il est admis que le cerveau constitue une cible de l'U, malgré une perméabilité sélective de la BHE, comme cela a été observé chez le rat par spectroscopie de masse à plasma à couplage induit (ICP-MS) (Lemercier, Millot et al. 2003). Les mécanismes d'action impliqués dans ce passage de la BHE sont en cours d'étude. L'U est également capable également de pénétrer dans les cellules neuronales *in vitro* (IMR-32), même à faible concentration, dès 50 μM (Rouas, Bensoussan et al. 2010). Ces travaux sont à l'origine du choix des concentrations utilisées dans cette étude.

Une des hypothèses émises à l'origine des troubles du comportement est une perturbation des processus de la neurogenèse par l'UA (Legrand, Elie et al. 2016, Legrand, Lam et al. 2016).

Cette étude s'inscrit donc dans la continuité de ces résultats obtenus *in vivo* démontrant un effet de l'UA sur la survie cellulaire et la neurogenèse. Le modèle de culture primaire de neurosphères est utilisé afin d'étudier les mécanismes d'action impliqués notamment sur la multipotentialité des CSN.

SURVIE CELLULAIRE

Les résultats obtenus *in vitro* montrent une diminution statistiquement significative du nombre absolu de cellules pour les populations neuronales, astrocytaires et oligodendrocytaires.

Ces effets de l'U sont cohérents avec la littérature concernant la (neuro)toxicité d'autres métaux lourds et leur propension à induire une mort cellulaire au niveau cérébral. Si peu de modèles *in vitro* ont exploré les effets de l'uranium sur le cerveau, plusieurs d'études *in vivo* décrivent les effets neurodégénératifs des métaux lourds. Dribben et al ont montré *in vivo* chez la souris nouveau-née qu'une exposition au plomb entraînait une augmentation importante de la mort cellulaire programmée dans plusieurs régions cérébrales (Dribben, Creeley et al. 2011). Le mercure est également neurotoxique. Il a été observé chez des jeunes rats âgés de 7 jours exposés au méthylmercure (MeHg) une réduction de la taille de leur hippocampe associée à une augmentation significative des processus apoptotiques caspase-dépendant (Falluel-Morel, Sokolowski et al. 2007).

L'analyse de l'expression génique des marqueurs des voies apoptotiques révèle des effets différents selon les concentrations d'U. D'abord une diminution significative, à la condition 10 μ M, de la caspase 9 (effectrice de la caspase 3 pro-apoptotique), cohérente avec la survie cellulaire des cellules différenciées observées pour cette concentration *in vitro* qui est non différente du témoin.

On observe une situation intermédiaire à 50 μ M, où les variations de l'expression des gènes ne sont pas significatives malgré une diminution statistiquement significative du nombre absolu de cellules survivantes, pour la population totale comme pour les différents types cellulaires.

Enfin à 100 μ M, la balance Bcl2/Bax bascule vers un profil en faveur de la survie cellulaire avec une augmentation de Bcl2 (anti-apoptique) et une diminution de Bax (pro-apoptotique). Ces résultats pourraient traduire un mécanisme adaptatif de défense des cellules ayant survécu après 7 jours de contamination *in vitro*. Un complément d'expérience augmentant le nombre d'échantillons pourrait dégager une significativité à 100 μ M.

A noter qu'il s'agit d'un état de la situation à 7 jours de contamination. Des analyses à des temps plus précoces sont à envisager afin de déterminer si des profils d'expression différents sont obtenus à la fois pour les caspases et pour la balance Bcl2/Bax. On peut exprimer l'hypothèse que les profils d'expression de ces gènes soient directement en lien avec un profil de mort cellulaire à des temps plus précoces.

Cette analyse rejoint les résultats de Legrand et al (Legrand, Elie et al. 2016) qui observaient une diminution de la mort cellulaire durant le développement cérébral *in vivo* au stade E13, lors d'une exposition à l'UA sans modification du nombre de cellules apoptotiques.

Ces résultats obtenus *in vitro* font ressortir un mécanisme plus précis directement au niveau des CSN et de leurs cellules filles qui se différencient en neurones, astrocytes et oligodendrocytes.

Ces processus de réponse adaptative pourraient expliquer pourquoi la morphologie globale du neuroépithélium *in vivo* semble intègre malgré la présence d'U.

MORPHOLOGIE DES NEURONES

Cette étude a permis une seconde observation qui est la modification importante de la morphologie des neurones après 7 jours de contamination.

Notamment, il a été mis en évidence un avortement de l'arbre dendritique et du développement axonal. Cette observation est à mettre en perspective avec les résultats obtenus par qPCR qui montrent une diminution statistiquement significative de GAP43 à 100 μM . En effet, GAP43 est impliqué dans la croissance de l'arbre dendritique et la pousse des cônes neuronaux (Shen, Tsai et al. 2012). Une étude de contamination interne par le plomb sur des rats *in utero* avait également révélé une modification de la morphologie des neurones hippocampiques au stade adulte (Verina, Rohde et al. 2007).

Des métaux lourds tels que l'U pourrait donc induire une diminution de l'expression de GAP43, ce qui expliquerait la morphologie avortée des neurones à 100 μM .

Il serait intéressant d'approfondir ces résultats *in vitro* par une nouvelle étude de contamination *in vivo* se concentrant plus précisément sur l'observation de l'arbre dendritique par microscopie confocale ou microscopie électronique, afin de vérifier si les modifications de morphologies observées *in vitro* se maintiennent dans un environnement *in vivo*.

De même que précédemment, malgré l'absence d'anomalie morphologique du neuroépithélium hippocampique observée par Legrand et al, une perturbation de la maturation finale des neurones, notamment le développement des contacts synaptiques qu'ils ont besoin d'établir avec les autres neurones, pourrait être à l'origine des déficits cognitifs observés *in vivo*.

MULTIPOTENTIALITE

Les résultats obtenus *in vitro* montrent une diminution statistiquement significative du nombre absolu de cellules (neurones, d'astrocytes et d'oligodendrocytes). Néanmoins, les proportions relatives des populations différenciées demeurent inchangées les unes par rapport aux autres.

L'inertie des gènes Mash1, Notch1 et NeuroD obtenue *in vitro* était déjà retrouvée *in vivo* par Legrand et al. aux stades prénatals (Legrand, Lam et al. 2016).

Alattia et al. ont étudié la neurotoxicité du mercure sur un modèle *in vitro* d'abord puis sur la drosophile, montrant une perturbation de la voie de signalisation Notch de façon dose-dépendante, induisant des troubles du développement du système nerveux (Alattia, Kuraishi et al. 2011).

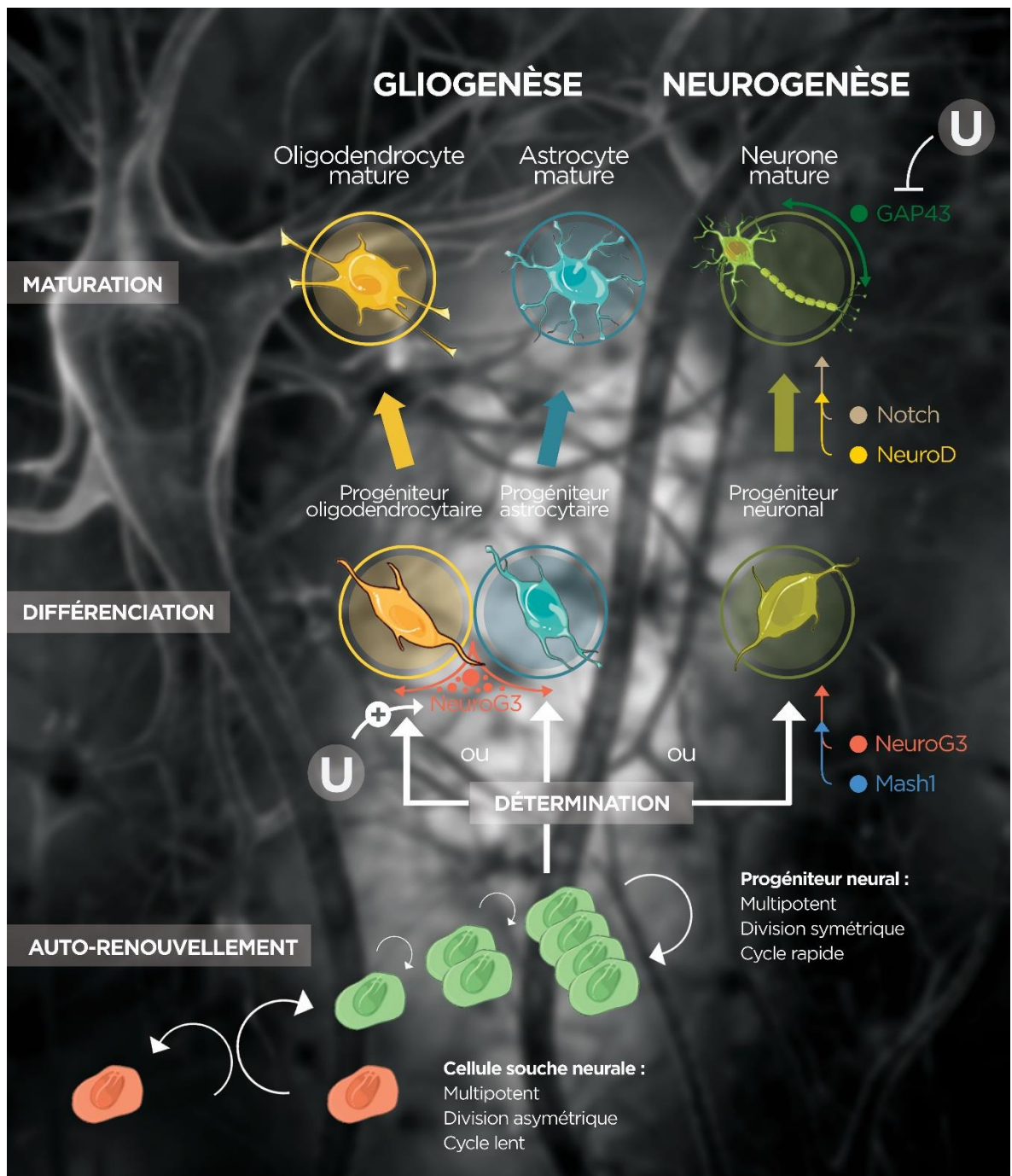


Figure 21 : Multipotentialité des CSN et influence de U sur l'expression des marqueurs neurogéniques

Ainsi, alors que des études ont montré que d'autres métaux lourds affectent la neurogenèse *via* une perturbation des facteurs de détermination (voie Notch), l'U semble épargner le stade de détermination cellulaire, exprimant un mécanisme d'action qui lui est spécifique.

De fait, concernant la voie de la neurogenèse, ces résultats pourraient suggérer un blocage de la différenciation terminale, avec des cellules qui stagnent à un stade peu différencié, avec un phénotype de précurseur ou de neurones post-mitotiques non matures avec une action de l'U sur la diminution de l'expression génique de GAP43. Concernant la voie de la gliogenèse, une action similaire de l'U est à envisager puisque nous avons clairement une diminution du nombre de d'oligodendrocytes matures, et une représentativité de précurseurs gliaux Olig2 positifs fortement augmentée, en lien avec un maintien de l'expression de NeuroG3 à la condition 100 μ M. La littérature rapporte en effet que le facteur de différenciation NeuroG3, en sus de sa propriété pro-neurale est fortement impliqué dans la voie de détermination gliogénique. Sa surexpression bloquerait la différenciation terminale des progéniteurs gliaux (Yuan and Hassan 2014).

L'analyse quantitative révèle également une proportion d'astrocytes supérieure aux autres types cellulaires quelle que soit la condition. Ce ratio est cohérent avec les résultats décrits dans la littérature concernant ce modèle de culture (Aimone, Li et al. 2014).

Sur un modèle de zebrafish exposé au cadmium, Monaco et al ont observé une diminution significative de l'expression de la GFAP dans les fibres de la neuroglie, démontrant la toxicité de cet élément sur les astrocytes (Monaco, Grimaldi et al. 2016). Il est intéressant de faire le parallèle avec nos propres observations, qui montrent également une atrophie importante des prolongements astrocytaires pour la condition de 100 μ M.

EXPERIENCES ET PERSPECTIVES

Un comptage cellulaire plus fin par une technique de cytométrie en flux (FACS) permettrait d'une part de renforcer la puissance de nos résultats, et d'autre part de compléter nos marquages par d'autres cibles autorisant une ségrégation notamment des précurseurs et des cellules matures.

En outre, une étude *in vivo* de la morphologie des neurones par observation au microscope électronique ou par microscopie confocale permettrait d'observer si ces anomalies de maturation terminale sont retrouvées lors d'une contamination *in vivo*.

L'influence du microenvironnement est un facteur capital dans l'étude du développement et de la survie cellulaire (Baumann and Pham-Dinh 2001). Les interactions cellules-cellules notamment déterminent le devenir des CSN.

C'est pourquoi une approche *in vitro* par un modèle organotypique permettrait d'étudier les effets de l'U dans un contexte proche des conditions *in vivo* d'échanges moléculaires entre cellules (Cavaliere, Benito-Munoz et al. 2016).

CONCLUSION GENERALE

La formation d'un SNC fonctionnel dépend d'une régulation fine spatio-temporelle de l'expression de facteurs de transcription et de protéines impliquées dans les voie de détermination et différenciation cellulaire (Ware, Hamdi-Roze et al. 2016).

L'ensemble de nos résultats confirme d'une part un effet sur la survie cellulaire par une diminution statistiquement significative des 3 populations cellulaires (neurones, astrocytes et oligodendrocytes) à partir de 50 μ M. Les études antérieures sur lignées cellulaires montraient un effet toxique à partir de concentrations supérieures (300-500 μ M) (Rouas, Bensoussan et al. 2010), suggérant une sensibilité supérieure des cellules neurales issues de culture primaire.

D'autre part, les résultats suggèrent un effet propre de l'U sur les phases plus tardives de différenciation et maturation cellulaire plutôt que sur la phase précoce de détermination. L'analyse immunocytochimique montrant clairement une altération du développement de l'arbre dendritique des neurones, une atrophie des prolongements astrocytaires et une diminution du nombre d'oligodendrocytes matures alors que les stades de progéniteurs semblent plus épargnés.

Sur la base de ces résultats, de nouvelles études *in vivo* des effets de l'U à différents stades du développement cérébral permettraient de se concentrer notamment sur l'arborisation de l'arbre dendritique des neurones et de vérifier si ces effets sont à l'origine des troubles cognitifs observés à l'âge adulte.

BIBLIOGRAPHIE

ARTICLES

Aimone, J. B., Y. Li, S. W. Lee, G. D. Clemenson, W. Deng and F. H. Gage (2014). "Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition." Physiol Rev **94**(4): 991-1026.

Al-Hamzawi, A. A., M. S. Jaafar and N. F. Tawfiq (2014). "Uranium concentration in blood samples of Southern Iraqi leukemia patients using CR-39 track detector." J Radioanal Nucl Chem **299**(3): 1267-1272.

Alattia, J. R., T. Kuraishi, M. Dimitrov, I. Chang, B. Lemaitre and P. C. Fraering (2011). "Mercury is a direct and potent gamma-secretase inhibitor affecting Notch processing and development in *Drosophila*." FASEB J **25**(7): 2287-2295.

Arnault, E., M. Doussau, A. Pesty, B. Gouget, A. Van der Meeren, P. Fouchet and B. Lefèvre (2008). "Natural uranium disturbs mouse folliculogenesis in vivo and oocyte meiosis in vitro." Toxicology **247**(2-3): 80-87.

Arzuaga, X., M. Gehlhaus and J. Strong (2015). "Modes of action associated with uranium induced adverse effects in bone function and development." Toxicol Lett **236**(2): 123-130.

Baumann, N. and D. Pham-Dinh (2001). "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system." Physiol Rev **81**(2): 871-927.

Berradi, H., J. M. Bertho, N. Dudoignon, A. Mazur, L. Grandcolas, C. Baudelin, S. Grison, P. Voisin, P. Gourmelon and I. Dublineau (2008). "Renal anemia induced by chronic ingestion of depleted uranium in rats." Toxicol Sci **103**(2): 397-408.

Bertrand, N., D. S. Castro and F. Guillemot (2002). "Proneural genes and the specification of neural cell types." Nat Rev Neurosci **3**(7): 517-530.

Boice, J. D., S. S. Cohen, M. T. Mumma, B. Chadda and W. J. Blot (2008). "A cohort study of uranium millers and miners of Grants, New Mexico, 1979-2005." J Radiol Prot **28**(3): 303-325.

Bosque, M. A., J. L. Domingo, J. M. Llobet and J. Corbella (1993). "Embryotoxicity and teratogenicity of uranium in mice following subcutaneous administration of uranyl acetate." Biol Trace Elem Res **36**(2): 109-118.

Briner, W. (2010). "The toxicity of depleted uranium." Int J Environ Res Public Health **7**(1): 303-313.

Briner, W. and J. Murray (2005). "Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats." Neurotoxicol Teratol **27**(1): 135-144.

Cavaliere, F., M. Benito-Munoz and C. Matute (2016). "Organotypic Cultures as a Model to Study Adult Neurogenesis in CNS Disorders." Stem Cells Int **2016**: 3540568.

Craft, E., A. Abu-Qare, M. Flaherty, M. Garofolo, H. Rincavage and M. Abou-Donia (2004). "Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects." J Toxicol Environ Health B Crit Rev **7**(4): 297-317.

- Domingo, J. L. (2001). "Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review." Reprod Toxicol **15**(6): 603-609.
- Domingo, J. L., J. M. Llobet, J. M. Tomás and J. Corbella (1987). "Acute toxicity of uranium in rats and mice." Bull Environ Contam Toxicol **39**(1): 168-174.
- Domingo, J. L., J. L. Paternain, J. M. Llobet and J. Corbella (1989). "The developmental toxicity of uranium in mice." Toxicology **55**(1-2): 143-152.
- Dribben, W. H., C. E. Creeley and N. Farber (2011). "Low-level lead exposure triggers neuronal apoptosis in the developing mouse brain." Neurotoxicol Teratol **33**(4): 473-480.
- Dublineau, I., S. Grison, C. Baudelin, N. Dudoignon, M. Souidi, C. Marquette, F. Paquet, J. Aigueperse and P. Gourmelon (2005). "Absorption of uranium through the entire gastrointestinal tract of the rat." Int J Radiat Biol **81**(6): 473-482.
- Faa, A., C. Gerosa, D. Fanni, G. Floris, P. V. Eyken, J. I. Lachowicz and V. M. Nurchi (2017). "Depleted Uranium and Human Health." Curr Med Chem.
- Falluel-Morel, A., K. Sokolowski, H. M. Sisti, X. Zhou, T. J. Shors and E. Diccico-Bloom (2007). "Developmental mercury exposure elicits acute hippocampal cell death, reductions in neurogenesis, and severe learning deficits during puberty." J Neurochem **103**(5): 1968-1981.
- Farina, M., D. S. Avila, J. B. da Rocha and M. Aschner (2013). "Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury." Neurochem Int **62**(5): 575-594.
- Feugier, A., S. Frelon, P. Gourmelon and M. Claraz (2008). "Alteration of mouse oocyte quality after a subchronic exposure to depleted Uranium." Reprod Toxicol **26**(3-4): 273-277.
- Fields, R. D. and B. Stevens-Graham (2002). "New insights into neuron-glia communication." Science **298**(5593): 556-562.
- Gilman, A. P., D. C. Villeneuve, V. E. Secours, A. P. Yagminas, B. L. Tracy, J. M. Quinn, V. E. Valli, R. J. Willes and M. A. Moss (1998). "Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat." Toxicol Sci **41**(1): 117-128.
- Gotz, M. and W. B. Huttner (2005). "The cell biology of neurogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(10): 777-788.
- Grignard, E., Y. Gueguen, S. Grison, J. M. Lobaccaro, P. Gourmelon and M. Souidi (2008). "Contamination with depleted or enriched uranium differently affects steroidogenesis metabolism in rat." Int J Toxicol **27**(4): 323-328.
- Guentchev, M. and R. D. McKay (2006). "Notch controls proliferation and differentiation of stem cells in a dose-dependent manner." Eur J Neurosci **23**(9): 2289-2296.
- Guéguen, Y., M. Souidi, C. Baudelin, N. Dudoignon, S. Grison, I. Dublineau, C. Marquette, P. Voisin, P. Gourmelon and J. Aigueperse (2006). "Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat." Arch Toxicol **80**(4): 187-195.
- Haley, D. P. (1982). "Morphologic changes in uranyl nitrate-induced acute renal failure in saline- and water-drinking rats." Lab Invest **46**(2): 196-208.

- Houpert, P., S. Frelon, M. Monleau, C. Bussy, V. Chazel and F. Paquet (2007). "Heterogeneous accumulation of uranium in the brain of rats." Radiat Prot Dosimetry **127**(1-4): 86-89.
- Houpert, P., P. Lestaevel, C. Bussy, F. Paquet and P. Gourmelon (2005). "Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat." Neurotoxicology **26**(6): 1015-1020.
- Howland, J. W. (1948). "Comprehensive summary of the pharmacology and toxicology of uranium compounds; studies on human exposures to uranium compounds." At Energy Biophys Biol Med **1**(5): 174.
- Ibanez, C., D. Suhard, C. Tessier, O. Delissen, P. Lestaevel, I. Dublineau and P. Gourmelon (2014). "Intranasal exposure to uranium results in direct transfer to the brain along olfactory nerve bundles." Neuropathol Appl Neurobiol **40**(4): 477-488.
- Jakovcevski, I. and N. Zecevic (2005). "Olig transcription factors are expressed in oligodendrocyte and neuronal cells in human fetal CNS." J Neurosci **25**(44): 10064-10073.
- Jessberger, S., N. Toni, G. D. Clemenson, Jr., J. Ray and F. H. Gage (2008). "Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain." Nat Neurosci **11**(8): 888-893.
- Katsetos, C. D., A. Legido, E. Perentes and S. J. Mork (2003). "Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology." J Child Neurol **18**(12): 851-866; discussion 867.
- Kurttio, P., A. Auvinen, L. Salonen, H. Saha, J. Pekkanen, I. Mäkeläinen, S. B. Väisänen, I. M. Penttilä and H. Komulainen (2002). "Renal effects of uranium in drinking water." Environ Health Perspect **110**(4): 337-342.
- Kurttio, P., A. Harmoinen, H. Saha, L. Salonen, Z. Karpas, H. Komulainen and A. Auvinen (2006). "Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water." Am J Kidney Dis **47**(6): 972-982.
- Kurttio, P., H. Komulainen, A. Leino, L. Salonen, A. Auvinen and H. Saha (2005). "Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water." Environ Health Perspect **113**(1): 68-72.
- Lee, J., Y. Wu, Y. Qi, H. Xue, Y. Liu, D. Scheel, M. German, M. Qiu, F. Guillemot, M. Rao and G. Gradwohl (2003). "Neurogenin3 participates in gliogenesis in the developing vertebrate spinal cord." Dev Biol **253**(1): 84-98.
- Legendre, A., C. Elie, C. Ramambason, L. Manens, M. Souidi, P. Froment and K. Tack (2016). "Endocrine effects of lifelong exposure to low-dose depleted uranium on testicular functions in adult rat." Toxicology **368-369**: 58-68.
- Leggett, R. W. (1989). "The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment." Health Phys **57**(3): 365-383.
- Legrand, M., C. Elie, J. Stefani, N. Flores, C. Culeux, O. Delissen, C. Ibanez, P. Lestaevel, P. Eriksson and C. Dinocourt (2016). "Cell proliferation and cell death are disturbed during prenatal and postnatal brain development after uranium exposure." Neurotoxicology **52**: 34-45.
- Legrand, M., S. Lam, I. Anselme, C. Gloaguen, C. Ibanez, P. Eriksson, P. Lestaevel and C. Dinocourt (2016). "Exposure to depleted uranium during development affects neuronal

- differentiation in the hippocampal dentate gyrus and induces depressive-like behavior in offspring." Neurotoxicology **57**: 153-162.
- Lemercier, V., X. Millot, E. Ansoborlo, F. Menetrier, A. Flury-Herard, C. Rousselle and J. M. Scherrmann (2003). "Study of uranium transfer across the blood-brain barrier." Radiat Prot Dosimetry **105**(1-4): 243-245.
- Lestaevel, P., B. Dhieux, O. Delissen, M. Benderitter and J. Aigueperse (2015). "Uranium modifies or not behavior and antioxidant status in the hippocampus of rats exposed since birth." J Toxicol Sci **40**(1): 99-107.
- Lestaevel, P., S. Grison, G. Fave, C. Elie, B. Dhieux, J. C. Martin, K. Tack and M. Souidi (2016). "Assessment of the Central Effects of Natural Uranium via Behavioural Performances and the Cerebrospinal Fluid Metabolome." Neural Plast **2016**: 9740353.
- Lestaevel, P., P. Houpert, C. Bussy, B. Dhieux, P. Gourmelon and F. Paquet (2005). "The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium." Toxicology **212**(2-3): 219-226.
- Lestaevel, P., E. Romero, B. Dhieux, H. Ben Soussan, H. Berradi, I. Dublineau, P. Voisin and P. Gourmelon (2009). "Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats." Toxicology **258**(1): 1-9.
- Linares, V., M. L. Albina, M. Bellés, E. Mayayo, D. J. Sánchez and J. L. Domingo (2005). "Combined action of uranium and stress in the rat. II. Effects on male reproduction." Toxicol Lett **158**(3): 186-195.
- Little, M. P., T. V. Azizova, D. Bazyka, S. D. Bouffler, E. Cardis, S. Chekin, V. V. Chumak, F. A. Cucinotta, F. de Vathaire, P. Hall, J. D. Harrison, G. Hildebrandt, V. Ivanov, V. V. Kashcheev, S. V. Klymenko, M. Kreuzer, O. Laurent, K. Ozasa, T. Schneider, S. Tapio, A. M. Taylor, I. Tzoulaki, W. L. Vandoolaeghe, R. Wakeford, L. B. Zablotska, W. Zhang and S. E. Lipshultz (2012). "Systematic review and meta-analysis of circulatory disease from exposure to low-level ionizing radiation and estimates of potential population mortality risks." Environ Health Perspect **120**(11): 1503-1511.
- Marshall, C. A., B. G. Novitch and J. E. Goldman (2005). "Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells." J Neurosci **25**(32): 7289-7298.
- McCormick, M. B., R. M. Tamimi, L. Snider, A. Asakura, D. Bergstrom and S. J. Tapscott (1996). "NeuroD2 and neuroD3: distinct expression patterns and transcriptional activation potentials within the neuroD gene family." Mol Cell Biol **16**(10): 5792-5800.
- McDiarmid, M. A., S. M. Engelhardt, C. D. Dorsey, M. Oliver, P. Gucer, P. D. Wilson, R. Kane, A. Cernich, B. Kaup, L. Anderson, D. Hoover, L. Brown, R. Albertini, R. Gudi and K. S. Squibb (2009). "Surveillance results of depleted uranium-exposed Gulf War I veterans: sixteen years of follow-up." J Toxicol Environ Health A **72**(1): 14-29.
- McDiarmid, M. A., J. M. Gaitens, S. Hines, M. Condon, T. Roth, M. Oliver, P. Gucer, L. Brown, J. A. Centeno, M. Dux and K. S. Squibb (2017). "The U.S. Department of Veterans' Affairs depleted uranium exposed cohort at 25 Years: Longitudinal surveillance results." Environ Res **152**: 175-184.
- McDiarmid, M. A., J. P. Keogh, F. J. Hooper, K. McPhaul, K. Squibb, R. Kane, R. DiPino, M. Kabat, B. Kaup, L. Anderson, D. Hoover, L. Brown, M. Hamilton, D. Jacobson-Kram, B. Burrows and M. Walsh (2000). "Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans." Environ Res **82**(2): 168-180.

- Miller, A. C., M. Stewart and R. Rivas (2009). "DNA methylation during depleted uranium-induced leukemia." Biochimie **91**(10): 1328-1330.
- Monaco, A., M. C. Grimaldi and I. Ferrandino (2016). "Neuroglial alterations in the zebrafish brain exposed to cadmium chloride." J Appl Toxicol **36**(12): 1629-1638.
- Monleau, M., E. Blanchardon, M. Claraz, F. Paquet and V. Chazel (2006). "The effect of repeated inhalation on the distribution of uranium in rats." J Toxicol Environ Health A **69**(17): 1629-1649.
- Monleau, M., C. Bussy, P. Lestaevel, P. Houpert, F. Paquet and V. Chazel (2005). "Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations." Neurosci Lett **390**(1): 31-36.
- Orona, N. S. and D. R. Tasat (2012). "Uranyl nitrate-exposed rat alveolar macrophages cell death: influence of superoxide anion and TNF α mediators." Toxicol Appl Pharmacol **261**(3): 309-316.
- Ortega, A., J. L. Domingo, J. M. Llobet, J. M. Tomás and J. L. Paternain (1989). "Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats." Bull Environ Contam Toxicol **42**(6): 935-941.
- Paquet, F., P. Houpert, E. Blanchardon, O. Delissen, C. Maubert, B. Dhieux, A. M. Moreels, S. Frelon and P. Gourmelon (2006). "Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion." Health Phys **90**(2): 139-147.
- Paternain, J. L., J. L. Domingo, A. Ortega and J. M. Llobet (1989). "The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice." Ecotoxicol Environ Saf **17**(3): 291-296.
- Pellmar, T. C., A. F. Fuciarelli, J. W. Ejnik, M. Hamilton, J. Hogan, S. Strocko, C. Emond, H. M. Mottaz and M. R. Landauer (1999). "Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets." Toxicol Sci **49**(1): 29-39.
- Periyakaruppan, A., F. Kumar, S. Sarkar, C. S. Sharma and G. T. Ramesh (2007). "Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells." Arch Toxicol **81**(6): 389-395.
- Poisson, C., J. Stefani, L. Manens, O. Delissen, D. Suhard, C. Tessier, I. Dublineau and Y. Guéguen (2014). "Chronic uranium exposure dose-dependently induces glutathione in rats without any nephrotoxicity." Free Radic Res **48**(10): 1218-1231.
- Prat, O., T. Vercoeur, E. Ansoborlo, P. Fichet, P. Perret, P. Kurttio and L. Salonen (2009). "Uranium speciation in drinking water from drilled wells in southern Finland and its potential links to health effects." Environ Sci Technol **43**(10): 3941-3946.
- Priest, N. D. (2001). "Toxicity of depleted uranium." Lancet **357**(9252): 244-246.
- Priest, N. D., G. R. Howells, D. Green and J. W. Haines (1982). "Uranium in bone: metabolic and autoradiographic studies in the rat." Hum Toxicol **1**(2): 97-114.
- Rice, D. and S. Barone, Jr. (2000). "Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models." Environ Health Perspect **108 Suppl 3**: 511-533.
- Rouas, C., H. Bensoussan, D. Suhard, C. Tessier, L. Grandcolas, F. Rebiere, I. Dublineau, M. Taouis, M. Pallardy, P. Lestaevel and Y. Gueguen (2010). "Distribution of soluble uranium in the nuclear cell compartment at subtoxic concentrations." Chem Res Toxicol **23**(12): 1883-1889.

- SACCOMANNO, G., V. E. ARCHER, R. P. SAUNDERS, L. A. JAMES and P. A. BECKLER (1964). "LUNG CANCER OF URANIUM MINERS ON THE COLORADO PLATEAU." Health Phys **10**: 1195-1201.
- Samson, E., I. Piot, S. Zhivin, D. B. Richardson, P. Laroche, A. P. Serond, D. Laurier and O. Laurent (2016). "Cancer and non-cancer mortality among French uranium cycle workers: the TRACY cohort." BMJ Open **6**(4): e010316.
- Scheytt, S., N. Riediger, S. Braunsdorf, C. Sommer and N. Uceyler (2015). "Increased gene expression of growth associated protein-43 in skin of patients with early-stage peripheral neuropathies." J Neurol Sci **355**(1-2): 131-137.
- Shen, Y. C., H. M. Tsai, M. C. Cheng, S. H. Hsu, S. F. Chen and C. H. Chen (2012). "Genetic and functional analysis of the gene encoding GAP-43 in schizophrenia." Schizophr Res **134**(2-3): 239-245.
- Souidi, M., Y. Gueguen, C. Linard, N. Dudoignon, S. Grison, C. Baudelin, C. Marquette, P. Gourmelon, J. Aigueperse and I. Dublineau (2005). "In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat." Toxicology **214**(1-2): 113-122.
- Souidi, M., E. Tissandie, R. Racine, H. Ben Soussan, C. Rouas, E. Grignard, I. Dublineau, P. Gourmelon, P. Lestaevel and Y. Gueguen (2009). "[Uranium: properties and biological effects after internal contamination]." Ann Biol Clin (Paris) **67**(1): 23-38.
- Taulan, M., F. Paquet, C. Maubert, O. Delissen, J. Demaille and M. C. Romey (2004). "Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice." Environ Health Perspect **112**(16): 1628-1635.
- Tournier, B. B., S. Frelon, E. Tournalias, L. Agez, O. Delissen, I. Dublineau, F. Paquet and F. Petitot (2009). "Role of the olfactory receptor neurons in the direct transport of inhaled uranium to the rat brain." Toxicol Lett **190**(1): 66-73.
- Uyeda, C. T., L. F. Eng and A. Bignami (1972). "Immunological study of the glial fibrillary acidic protein." Brain Res **37**(1): 81-89.
- Verina, T., C. A. Rohde and T. R. Guilarte (2007). "Environmental lead exposure during early life alters granule cell neurogenesis and morphology in the hippocampus of young adult rats." Neuroscience **145**(3): 1037-1047.
- Wade-Gueye, N. M., O. Delissen, P. Gourmelon, J. Aigueperse, I. Dublineau and M. Souidi (2012). "Chronic exposure to natural uranium via drinking water affects bone in growing rats." Biochim Biophys Acta **1820**(7): 1121-1127.
- Ware, M., H. Hamdi-Roze, J. Le Friec, V. David and V. Dupe (2016). "Regulation of downstream neuronal genes by proneural transcription factors during initial neurogenesis in the vertebrate brain." Neural Dev **11**(1): 22.
- Wilkinson, G., D. Dennis and C. Schuurmans (2013). "Proneural genes in neocortical development." Neuroscience **253**: 256-273.
- Wrenn, M. E., P. W. Durbin, B. Howard, J. Lipsztein, J. Rundo, E. T. Still and D. L. Willis (1985). "Metabolism of ingested U and Ra." Health Phys **48**(5): 601-633.
- Yazzie, M., S. L. Gamble, E. R. Civitello and D. M. Stearns (2003). "Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C)." Chem Res Toxicol **16**(4): 524-530.

Yuan, L. and B. A. Hassan (2014). "Neurogenins in brain development and disease: an overview." Arch Biochem Biophys **558**: 10-13.

Zaire, R., M. Notter, W. Riedel and E. Thiel (1997). "Unexpected rates of chromosomal instabilities and alterations of hormone levels in Namibian uranium miners." Radiat Res **147**(5): 579-584.

Zamora, M. L., B. L. Tracy, J. M. Zielinski, D. P. Meyerhof and M. A. Moss (1998). "Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans." Toxicol Sci **43**(1): 68-77.

Zhivin, S., I. Guseva Canu, E. Samson, O. Laurent, J. Grellier, P. Collomb, L. B. Zablotska and D. Laurier (2016). "Mortality (1968-2008) in a French cohort of uranium enrichment workers potentially exposed to rapidly soluble uranium compounds." Occup Environ Med **73**(3): 167-174.

Zhivin, S., D. Laurier and I. Guseva Canu (2014). "Health effects of occupational exposure to uranium: do physicochemical properties matter?" Int J Radiat Biol **90**(11): 1104-1113.

Zhu, G., M. Tan, Y. Li, X. Xiang, H. Hu and S. Zhao (2009). "Accumulation and distribution of uranium in rats after implantation with depleted uranium fragments." J Radiat Res **50**(3): 183-192.

RAPPORTS & LIVRES

ATSDR (2013). "Toxicological Profile for Uranium. U.S. Department of Health and Human Services." Agency for Toxic Substance and Disease Registry, Atlanta, GA.

Sanes, D. H., Reh, T. A., & Harris, W. A. (2011). Development of the nervous system. Academic Press.

WHO 2012 Uranium in drinking water. Background document for development of world health organization guidelines for drinking-water quality

SITES INTERNET

(1) IRSN <http://www.irsn.fr>

(2) Embryology.ch <http://embryology.ch/index.html>

ABSTRACT

L'uranium (U) est un métal lourd naturellement présent dans la croûte terrestre. Les activités humaines (extraction, cycle du combustible) peuvent en accentuer la présence dans l'environnement, l'alimentation et l'eau de boisson soulevant des inquiétudes pour la santé de l'Homme. Des études expérimentales rapportent des perturbations cognitives suite à une exposition à l'U par ingestion. Des perturbations de la neurogenèse, notamment sur la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales (CSN). Un modèle de culture primaire de neurosphères issues de télencéphales d'embryon de rat à E13 est utilisé pour étudier les effets de l'U sur la multipotentialité des CSN exposées à différentes concentrations d'U (10, 50 et 100 μM) pendant 7 jours comparée à un témoin. Nos résultats montrent un effet sur la survie cellulaire révélé par une diminution significative du nombre absolu de neurones, astrocytes et oligodendrocytes matures à partir de 50 μM d'U. Parmi les cellules survivantes après 7 jours, l'analyse de l'expression des gènes apoptotiques suggère la mise en place d'une réponse adaptative avec une balance Bax/Bcl2 favorable à la survie cellulaire à 100 μM qui reste à confirmer. La morphologie des neurones montrant des ramifications et des prolongements avortés après 7 jours de contamination à 100 μM est en lien direct avec une diminution statistiquement significative du messenger de GAP43 impliqué dans le développement de l'arbre dendritique. Concernant la gliogénèse, l'action de l'U s'exerce sur le maintien d'une population de progéniteurs gliaux olig2+ en lien avec une augmentation du messenger de NeuroG3 à 100 μM . Ces résultats suggèrent que l'U semble épargner les stades de détermination cellulaire, exprimant un mécanisme d'action qui lui est spécifique et dirigé sur les phases plus tardives de maturation cellulaire.

EFFECT OF URANIUM ON NEURAL STEM CELLS MULTIPOTENTIALITY IN A NEUROSPHERE CULTURE MODEL

Uranium (U) is a heavy metal naturally present in earth crust. Human activities (extraction, use in nuclear fuel cycles) can lead to environment dispersal. U can then be found in drinking water and food and represents a rising concern about consequences on human health. Experimental studies have shown that U exposure by ingestion can cause cognitive impairment. A neurogenesis disruption could explain such effects. Using *in vitro* neurosphere primary cultures from embryo's telencephalon at E13, we studied U impact on neural stem cell (NSC) multipotentiality within a range of concentrations (10, 50, 100 μM) *versus* control over 7 days of contamination. Our results show a significant effect on cell survival *via* a decrease of the absolute number of all cell types neurons, astrocytes and mature oligodendrocytes at 50 and 100 μM . Among cells surviving after 7 days *in vitro*, analysis of apoptotic gene expression tend to reveal an adaptative response *via* Bax/Bcl2 balance in favour of cell survival at 100 μM condition that will need further investigations. After 7 days of contamination at 100 μM , neurons exhibit an aborted morphology with a reduction of the axon and dendrite length correlated with a significant decrease of gene expression GAP43 known to be involved in dendritic arborization development. Regarding gliogenesis, U seem to have a direct action on the maintenance of a population of glial progenitors olig2+ linked with a significant increase of NeuroG3 gene expression at 100 μM . All together, these results suggest that U exerts a specific action on late cell maturation phases rather than on early determination stages.

Keywords: uranium, neurosphere, neural stem cell, multipotentiality, maturation

DISCIPLINE : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

INSTITUT DE RADIOPROTECTION ET DE SURETE NUCLEAIRE (IRSN)

LABORATOIRE DE RADIOTOXICOLOGIE ET RADIOBIOLOGIE EXPERIMENTALE

FONTENAY-AUX-ROSES, FRANCE