



UNIVERSITE PARIS 7-DENIS DIDEROT



UFR Biologie et Sciences de la Nature

Ecole Doctorale ABIES

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Paris 7, Denis Diderot
Discipline : Toxicologie

Présentée et soutenue publiquement par
Cyrill BUSSY

le 27 Septembre 2005

Effets Chimique et Radiologique d'une Ingestion Chronique d'Uranium sur le Cerveau du Rat.

**Effets sur les Neurotransmissions Dopaminergique,
Sérotoninergique et Cholinergique.**

Directeur de thèse
Christine AMOURETTE

Jury :

Pr. Francelyne MARANO, Université Paris VII - Denis Diderot
Dr. Luc DENOROY, Université Lyon I - Claude Bernard
Dr. Luc BELZUNCES, I.N.R.A. – Avignon
Dr. Christine AMOURETTE, C.R.S.S.A. Emile Pardé - La Tronche
Dr. Philippe LESTAEVEL, I.R.S.N. - Fontenay aux Roses
Mme Françoise DE BUTTET, Chambre syndicale des eaux minérales

président et examinateur
rapporteur
rapporteur
directeur de thèse
examinateur
invité

UNIVERSITE PARIS 7 - DENIS DIDEROT
UFR Biologie et Sciences de la Nature

Ecole Doctorale ABIES

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Paris 7, Denis Diderot
Discipline : Toxicologie

Présentée et soutenue publiquement par
Cyrill BUSSY

le 27 Septembre 2005

**Effets Chimique et Radiologique d'une Ingestion
Chronique d'Uranium sur le Cerveau du Rat.**

**Effets sur les Neurotransmissions Dopaminergique,
Sérotoninergique et Cholinergique.**

Directeur de thèse
Christine AMOURETTE

Jury :

Pr. Francelyne MARANO, Université Paris VII - Denis Diderot	président et examinateur
Dr. Luc DENOROY, Université Lyon I - Claude Bernard	rapporteur
Dr. Luc BELZUNCES, I.N.R.A. – Avignon	rapporteur
Dr. Christine AMOURETTE, C.R.S.S.A. Emile Pardé - La Tronche	directeur de thèse
Dr. Philippe LESTAEVEL, I.R.S.N. - Fontenay aux Roses	examineur
Mme Françoise DE BUTTET, Chambre syndicale des eaux minérales	invité

© UMLV

In tenui labor, at tenuis non gloria

A ceux qui sont partis trop tôt,

A ceux qui me manquent,

A ma famille,

*Thèse préparée au Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale de
l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire,
site nucléaire du Tricastin, Bât. 53, BP166, 26700 Pierrelatte,*

*Avec le soutien financier de la Chambre Syndicale des Eaux Minérales
et le soutien matériel du
Centre de Recherches Emile Pardé du Service de Santé des Armées.*

Remerciements

Je remercie l'ensemble des membres du jury qui a accepté d'examiner ce travail :

Madame le Professeur **Francelyne MARANO**, pour avoir accepté de présider ce jury de thèse et avoir suivi la progression de ce travail au nom de l'Université Paris VII et de l'école doctorale A.B.I.E.S.,

Monsieur le Docteur **Luc DENORoy**, qui me fait l'honneur de porter un regard d'expert sur ce travail et de participer à ce jury,

Monsieur le Docteur **Luc P.BELZUNCES**, pour l'examen critique et l'intérêt porté à ce travail,

Madame le Pharmacien en Chef et Docteur **Christine AMOURETTE**, pour avoir accepté de diriger ce travail de thèse mais avant tout pour son accueil toujours chaleureux au sein de son laboratoire et de son équipe, pour ses conseils, son soutien et sa grande disponibilité. Que ce travail soit un modeste témoignage de ma profonde déférence et reconnaissance,

Monsieur le Docteur **Philippe LESTAEVEL**, co-tuteur IRSN, pour avoir toujours su être disponible au pied levé et avoir su guider ce travail en répondant à mes interrogations. Qu'il accepte ce travail comme l'expression des conseils expérimentés qu'il a su me prodiguer.

Madame **Françoise DE BUTTET**, pour le soutien de la chambre syndicale des eaux minérales et le vif intérêt porté tout au long de ces années.

J'adresse également mes remerciements les plus sincères à tous ceux qui ont initié ce travail et m'ont offert les moyens matériels, humains et intellectuels de le poursuivre :

Monsieur le Docteur **François PAQUET**, pour son accueil au sein du LEAR, restructuré depuis en LRTOX-Pierrelatte,

Madame le Vétérinaire et Docteur **Pascale HOUVERT**, tuteur IRSN, pour avoir mis en place les pierres fondatrices de ce projet et pour avoir trouvé les mots dans les moments de doutes,

Madame **Bernadette DHIEUX**, qui a guidé mes premiers pas au laboratoire et qui a toujours été disponible pour me prêter les deux mains et le cerveau supplémentaires nécessaires lorsque la charge devenait trop lourde,

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont apporté une petite contribution, sans toujours le mesurer, à la réalisation de ce travail :

A Mmes **Olivia DELISSEN** et **Anne-Marie MOREELS** ainsi qu'à Mrs **Elie TOURLONIAS** et **Christophe MAUBERT**, pour leur disponibilité, leur professionnalisme et leur jovialité. A Madame **Delphine LURMIN**, sans qui différents aspects de ce travail n'auraient pu être réalisés dans les temps et dans les règles de l'« *Administration* ». Et à Monsieur **Thierry LOISEAU**, sans qui nos petits pensionnaires auraient bien mal vécu leur séjour au laboratoire. Qu'ils considèrent que ce travail est aussi un peu le leur ou au moins le reflet de celui qu'ils accomplissent chaque jour,

Au Docteur **Sandrine FRELON**, pour l'aide apportée dans la réalisation des dosages ICPMS. Aux Docteurs **Valérie CHAZEL**, **Marie CLARAZ** et **Fabrice PETITOT** pour leur écoute attentive et leurs conseils expérimentés. A tous les **Fontenaisiens** croisés au détour d'un passage éclair à Pierrelatte,

A tous les stagiaires qui ont séjourné au laboratoire, pour tous les bons moments passés en votre compagnie et en particulier au future Docteur(e) **Marjorie MONLEAU**, ma comparse de bureau et de labeur, pour nos discussions, sa joie de vivre, son tempérament et enfin sa tolérance tout au long de ces trois années de co-habitation.

Pour finir, je profite de cette tribune pour remercier :

Madame **Michèle PAQUET**, documentaliste de l'IRSN, à Fontenay aux Roses, sans qui ce travail n'aurait pas la même consistance,

L'ensemble des personnes qui ont participé aux différents comités de thèse qui ont jalonné et rythmé ce travail : Mrs **P.E.CECCALDI**, **D.CLARENÇON**, **M.DISERBO**, **W.FAUQUETTE** et **P.GOURMELON** pour leurs discussions constructives et aussi les différents intervenants des entreprises des eaux minérales naturelles, Mme **F.DE BUCHY**, Mrs **V.DUCASSE**, **G.HOLZER**, **H.LAFFORGUE** et **J.TEYSSEYRE**, pour l'intérêt constant porté à ce travail,

L'ensemble du **personnel du C.R.S.S.A. Emile Pardé** et plus particulièrement celui du département des risques N qui a su m'accueillir avec beaucoup de sympathie, pendant le stage de formation scientifique, puis à chacun de mes passages,

Et enfin, **Evua**, sans laquelle ces trois années n'auraient pas eu la même saveur.

Résumé

Effets chimique et radiologique d'une ingestion chronique d'uranium sur le cerveau du rat. Effets sur les neurotransmissions dopaminergique, sérotoninergique et cholinergique.

L'uranium est un métal lourd présent partout dans l'environnement à l'état de traces. Il présente une toxicité chimique et radiologique. Après contamination chronique par ingestion, il diffuse dans l'ensemble de l'organisme et peut s'accumuler dans le cerveau. Les objectifs de ce travail étaient *i)* de déterminer et d'évaluer les effets de l'uranium sur les systèmes de neurotransmission dopaminergique, sérotoninergique et cholinergique et *ii)* de déterminer la distribution cérébrale d'uranium, après différentes périodes de contamination chronique, allant de 1,5 à 18 mois, par ingestion d'une solution d'uranium appauvri (UA) ou enrichi (UE) en ^{235}U , à la concentration unique de 40mg.L^{-1} soit 40ppm et pour différentes structures cérébrales chez le Rat. Les résultats obtenus aux différents temps montrent que les perturbations de la neurotransmission de même que l'accumulation cérébrale de l'uranium sont modérées, localisées, évolutives et dépendent de la composition isotopique de l'uranium utilisé. Les perturbations monoaminergiques sont progressives et chroniques après exposition à l'UA et tardives après exposition à l'UE. Ces modifications ne sont pas toujours accompagnées d'une accumulation d'uranium dans la structure cérébrale concernée. De plus, après 1,5 et 9 mois de contamination, le système cholinergique n'est pas affecté par l'UA alors que l'UE modifie l'activité de l'ChE à ces deux temps, notamment dans l'hippocampe. Ces perturbations cholinergiques sont à la fois dépendantes de l'accumulation *in situ* d'uranium et de l'activité spécifique de l'UE par rapport à l'UA. Les modifications cholinergiques et l'accumulation d'uranium observées dans l'hippocampe après contamination à l'UE, pourraient participer aux troubles de la mémoire spatiale de travail qui ont été rapportés dans la littérature.

Mots clefs : uranium ; cerveau, système nerveux central ; contamination chronique, contamination interne par ingestion ; système dopaminergique, système sérotoninergique, système cholinergique ; toxicité, neurotoxicité, chimiotoxicité, radiotoxicité ;

Abstract

**Chemical and radiological effects of chronic ingestion of uranium in the rat brain.
Biochemical impairment on dopaminergic, serotonergic and cholinergic neurotransmission.**

Uranium is an environmental ubiquitous metal-trace element. It has both chemical and radiological toxicity. After chronic ingestion, uranium can distribute in any part of the body and accumulate in the brain. The aims of this study was *i)* to determine and estimate the effects of uranium on dopaminergic, serotonergic and cholinergic systems and *ii)* to measure the uranium amount in the brain, after chronic exposure by ingestion of depleted (DU) or enriched (EU) uranium during 1.5 to 18 months at 40mg.L⁻¹ (40ppm) in different rat brain areas. At any time of exposure, the results show that both the neurotransmission alterations and the uranium brain accumulation were moderate, area-specific, time-evoluted and depended on uranium specific activity. After DU exposure, monoamine perturbations are chronic and progressive. On the contrary, monoamine alterations occurred only after long term of EU exposure. These monoaminergic modifications are not always dependent on uranium accumulation in brain areas. Moreover, although the cholinergic system was not affected at both 1.5 and 9 months of DU exposure, the alteration of ChE activity after EU exposure are both dependent on uranium accumulation in brain areas and on uranium specific activity. After EU exposure, cholinergic modification and uranium accumulation in hippocampus could partially explain the short-term memory disturbances which have been previously reported.

Key words : uranium ; brain, central nervous system ; chronic contamination, contamination by ingestion ; dopaminergic system, serotonergic system, cholinergic system ; toxicity, neurotoxicity, chemical toxicity, radiological toxicity ;

Table des matières

Remerciements.....	6
Résumé	9
Abstract	10
Glossaire	15
Liste des abréviations	16
Liste des tableaux.....	17
Liste des figures.....	18
Liste des annexes.....	21
INTRODUCTION GENERALE	23
CHAPITRE I – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :	25
INTRODUCTION : le risque sanitaire de l’ingestion de métaux	25
I.1. L’ingestion d’un métal particulier : l’uranium (^{92}U)	26
I.1.1. Généralités	26
I.1.2. Propriétés chimiques, physiques et radiologiques de l’uranium	26
I.1.3. Source d’exposition à l’uranium	27
I.1.3.1. Une exposition naturelle par l’eau de boisson et l’alimentation.	27
I.1.3.2. Une exposition du fait de l’activité humaine.	28
I.1.4. Bio-cinétique de l’uranium après une contamination interne	28
I.1.4.1. Voies d’entrées.	28
I.1.4.2. Transfert aux organes cibles.	30
I.1.4.3. Rétention et excrétion.	30
I.1.5. Effets toxiques aigus ou sub-chroniques de l’uranium	31
I.1.5.1. Evaluation du risque sanitaire :	31
I.1.5.2. Toxicité chimique de l’uranium :	31
I.1.5.2.1. Effets sur le rein.	31
I.1.5.2.2. Effets sur les os.	33
I.1.5.2.3. Effets sur les poumons.	33
I.1.5.2.4. Effets sur le système reproducteur.	34
I.1.5.2.5. Effets mutagènes, génotoxiques.	34
I.1.5.2.6. Effets carcinogènes.	35
I.1.5.2.7. Autres effets répertoriés.	35
I.1.5.3. Toxicité radiologique de l’uranium :	35
I.1.6. Effets toxiques d’une ingestion chronique d’uranium	37
I.1.6.1. Etudes sur l’Homme (épidémiologiques et expérimentales) :	37
I.1.6.2. Etudes expérimentales - partie A - :	37
I.1.6.3. Etudes expérimentales - partie B - (programme de recherche ENVIRHOM) :	40
I.2. Le Système Nerveux Central	42
I.2.1. Présentation générale	42

I.2.2. La synapse chimique et les neurotransmetteurs	44
I.2.2.1. Organisation de la synapse chimique :	44
I.2.2.2. Biochimie de la transmission synaptique :	44
I.2.2.3. Transmission synaptique mono-aminergique :	46
I.2.2.3.1. La neurotransmission sérotoninergique : neurones à sérotonine.	46
I.2.2.3.2. La neurotransmission dopaminergique : neurones à dopamine.	49
I.2.2.4. Transmission synaptique cholinergique : neurones à acétylcholine.	52
I.3. Les Effets sur le SNC d'une Intoxication à l'Uranium	57
I.3.1. Accumulation d'uranium dans le tissu cérébral	57
I.3.1.1. Accumulation dans le cerveau entier :	57
I.3.1.2. Accumulation dans les structures cérébrales :	58
I.3.2. Effets sur l'homme :	58
I.3.2.1. Toxicité aiguë :	58
I.3.2.2. Toxicité chronique :	59
I.3.3. Effets cliniques et cognitifs expérimentaux :	59
I.3.3.1. Toxicité aiguë :	59
I.3.3.2. Toxicité chronique :	60
I.3.4. Cas particulier des effets induits sur le SNC apres inhalation d'uranium :	61
I.3.4.1 Etude humaine :	61
I.3.4.2 Etude expérimentale :	62
I.3.5. Effets biologiques / Mécanisme d'action :	63
I.3.5.1. Histopathologie :	63
I.3.5.2. Effets de l'uranium sur l'électrophysiologie de l'hippocampe :	63
I.3.5.3. Un transporteur cérébral potentiel de l'uranium :	63
I.3.5.4. Effets du stress :	64
I.3.5.5. Effets sur la peroxidation lipidique et la régulation hormonale :	64
I.3.5.6. Effet indirect / direct :	65
I.3.5.7. Effets de l'uranium sur le système nerveux périphérique :	65
I.3.5.8. Effets de l'uranium sur la neurotransmission dans le système nerveux central :	65
I.4. Synthèse de la bibliographie	66
CHAPITRE II - MATERIELS ET METHODES :	67
II.1. Modèle Animal	67
II.2. Modalités de Contaminations	67
II.2.1. Contamination Aiguë	68
II.2.1. Contamination Chronique	68
II.2.1.1. Contamination chronique à l'uranium appauvri (UA) :	70
II.2.1.2. Contamination chronique à l'uranium enrichi (UE) :	70
II.3. Matériels Biologiques :	70
II.3.1. Prélèvements de structures cérébrales pour les dosages biochimiques (neurotransmetteurs + activité enzymatique) :	70
II.3.2. Prélèvements de structures cérébrales pour le dosage de l'uranium :	71
II.3.3. Prélèvements des autres parties du corps, différents compartiments de contamination :	71
II.4. Dosage de L'Uranium :	72
II.4.1. Préparation des échantillons biologiques :	72
II.4.2. Dosage par KPA : Kinetic Phosphorescence Analyser	73
II.4.3. Dosage par ICPMS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer	73

II.5. Dosage des monoamines (dopaminergiques et sérotoninergiques) cérébrales :	74
II.5.1. Principe du dosage électrochimique après séparation en chromatographie liquide haute performance :	74
II.5.2. Préparation tissulaire :	75
II.5.3. Dosage électrochimique après séparation HPLC :	75
II.5.4. Dosage des protéines :	77
II.6. Mesure de L'activité des Acétylcholine Estérases (ChE) Cérébrales	77
II.6.1. Principe de la technique : méthode d'Ellman par spectrophotométrie	77
II.6.2. Préparation de l'homogénat de cerveau :	78
II.6.3. Mesure de l'activité ChE :	78
II.7. Analyse statistique	78
CHAPITRE III - RESULTATS :	80
III - Partie 1. Contamination Aiguë	80
III.1.1. Paramètres généraux :	80
III.1.2. Dosage des monoamines (hémisphère droit) :	81
III.1.3. Dosage de l'uranium (hémisphère gauche + reste du cerveau) :	86
III - Partie 2. Contaminations Chroniques	88
III.2.1. Observations générales :	88
III.2.2. Effets à court terme : contamination chronique de 1,5 mois	88
III.2.2.1. Paramètres généraux :	88
III.2.2.2. Dosage des monoamines (hémisphère cérébral droit) :	90
III.2.2.3. Mesure de l'activité acétylcholinestérase (hémisphère cérébral gauche) :	95
III.2.2.4. Dosage de l'uranium dans le cerveau :	95
III.2.2.5. Dosage de l'uranium dans les structures cibles :	96
III.2.3. Effets à long terme :	98
III.2.3.A. Contamination chronique de 6 mois.	98
III.2.3.A-1. Paramètres généraux :	98
III.2.3.A-2. Dosage des monoamines (hémisphère droit) après contamination UA :	103
III.2.3.A-3. Mesure de l'activité acétylcholinestérase après contamination UA :	103
III.2.3.A-4. Dosage de l'uranium dans le cerveau après contamination UE :	108
III.2.3.A-5. Dosage de l'uranium dans les structures cibles après contamination UA :	109
III.2.3.B. Contamination chronique de 9 mois.	110
III.2.3.B-1. Paramètres généraux :	110
III.2.3.B-2. Dosage des monoamines :	111
III.2.3.B-3. Mesure de l'activité acétylcholinestérase :	123
III.2.3.B-4. Dosage de l'uranium dans le cerveau :	123
III.2.3.B-4.a. <i>Dosage d'uranium cérébral après contamination chronique à l'UE :</i>	123
III.2.3.B-4.b. <i>Dosage d'uranium cérébral après contamination chronique à l'UA :</i>	124
III.2.3.B-5. Dosage de l'uranium dans les structures cibles :	125
III.2.4. Effets à très long terme : contamination chronique de 18 mois	127
III.2.4.1. Paramètres généraux :	127
III.2.4.3. Dosage des monoamines :	131
III.2.4.4. Mesure de l'activité acétylcholinestérase :	137
III.2.5. Résumé en tableau :	138

III – Partie 3. Synthèse des Résultats	139
CHAPITRE IV - DISCUSSION :	140
IV.1. Caractérisation de l'effet de l'uranium sur le cerveau :	140
IV.1.1. Contamination aigue	141
IV.1.2. Contaminations Chroniques	142
IV.1.2.1. Caractéristiques spécifiques des effets de l'uranium	142
IV.1.2.1.1. Effets de la contamination chronique sur le poids des animaux :	142
IV.1.2.1.2. Effets chronique et progressif de l'UA sur les monoamines :	142
IV.1.2.1.3. Effets à long terme de l'UE sur les monoamines : comparaison avec l'UA	143
IV.1.2.1.4. Effets précoces de l'uranium sur l'activité ChE :	144
IV.1.2.1.5. Distribution d'uranium dans le cerveau :	145
IV.1.2.1.6. Accumulation et élimination de l'uranium : un cycle dynamique	145
IV.1.2.1.7. Dosage d'uranium dans le cerveau : problème de discrimination entre les lots	146
IV.1.2.2. Interactions entre les paramètres étudiés	147
IV.1.2.2.1. Effets de l'accumulation d'U sur la neurotransmission monoaminergique :	147
IV.1.2.2.2. Effets de l'accumulation d'U sur l'activité ChE :	148
IV.1.2.2.3. Effets de l'activité radiologique de l'uranium accumulé sur l'activité ChE :	148
IV.1.2.3. Caractères généraux des effets de l'uranium	149
IV.1.2.3.1. Effets de l'U comparables aux métaux neurotoxiques :	149
IV.1.2.3.2. Effets multiforme et spécifique à chaque région :	149
IV.1.2.3.3. Effets non constants sur les différentes périodes de contamination :	149
IV.1.2.3.4. Subtilité des résultats et variabilité interindividuelle :	149
IV. 2. Causes potentielles des modifications biochimiques :	154
IV.2.1. Causes directs :	154
IV.2.1.1. La quantité d'uranium dans le cerveau	154
IV.2.1.2. La radioactivité de l'uranium	154
IV.2.1.3. La barrière hématoencéphalique.	155
IV.2.1.4. Les électrolytes : des éléments essentiels pour le fonctionnement du SNC.	156
IV.2.2. Causes indirects :	157
IV.2.2.1. Effet secondaire rénal.	157
IV.2.2.2. Hypothèse du nerf vague.	158
IV.2.2.3. Un ensemble de réponses biologiques : une toxicité systémique avant tout.	158
IV. 3. Conséquences des modifications biochimiques :	160
IV.3.1. Les conséquences physiologiques des modifications biochimiques observées	160
IV.3.1. Action de l'uranium sur le taux de prolactine et la locomotion	160
IV.3.2. Effets cognitifs de l'uranium : travaux ENVIRHOM.	162
IV.4. Synthèse de la Discussion	164
CHAPITRE V – CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES :	165
V.1. Conclusion Générale	165
V.2. Evaluation du risque pour l'uranium naturel	166
V.3. Perspectives	166
Communications :	169
Annexes :	171
Références bibliographiques :	190

Glossaire

Activité : Nombre de désintégrations nucléaires spontanées qui se produisent dans une quantité donnée de matière pendant un intervalle de temps convenablement petit, divisé par cet intervalle de temps.

Combustible nucléaire : Matière qui produit de la chaleur par transformation des noyaux des atomes (fission des atomes) et qui, placée dans un réacteur, permet d'y développer une réaction nucléaire en chaîne.

Céramique nucléaire : La céramique nucléaire d'UO₂ est un mélange d'oxyde (UO₂) et de sels métalliques d'uranium agglomérés puis mis en forme (formage) pour l'obtention d'un matériau présenté sous la forme de pastille d'UO₂ (petit cylindre de 7g, 1cm de long). Ces pastilles sont empilées dans une gaine métallique (hauteur 4m) pour former les crayons d'uranium. Ces crayons sont ensuite groupés en fagots (264 crayons = assemblage combustible) puis introduits dans un réacteur nucléaire pour fournir l'énergie nécessaire à son fonctionnement.

Radioactivité : Propriété que possèdent certains corps d'émettre, spontanément, des rayonnements directement ou indirectement ionisants. **Radioactivité naturelle** : Radioactivité manifestée par certains noyaux lourds instables, existant à l'état naturel. **Radioactivité artificielle** : Radioactivité obtenue en bombardant des particules (protons, neutrons, etc.). **Radioactif** : Qui est susceptible de se transformer, par désintégration, en un autre élément avec émission à la fois spontanée et continue de rayonnements corpusculaires ou électromagnétiques ; qui a rapport à la radioactivité. **Radioisotope** : Corps simple ayant le même numéro atomique, des propriétés chimiques presque identiques, mais une masse atomique différente. **Période radioactive / demie vie** : temps que met un radionucléide pour perdre la moitié de son activité. **Radiotoxicité** : Toxicité liée aux rayonnements ionisants émis par un élément radioactif présent dans l'organisme. Elle dépend de l'état physico-chimique de ce radionucléide, état qui en conditionne le métabolisme et l'élimination. **Contamination interne** : Contamination par des substances radioactives ayant pénétré dans l'organisme. **Irradiation** : Exposition d'un milieu matériel ou d'un organisme à un rayonnement. Action d'exposer une personne ou un objet aux rayonnements ionisants.

Syndrome : Ensemble de signes, de symptômes, de modifications morphologiques, fonctionnelles ou biochimiques de l'organisme, d'apparence parfois disparate mais formant une entité reconnaissable qui, sans présager obligatoirement des causes de ces manifestations, permettent d'orienter le diagnostic.

Toxicité : Propriété d'une substance qui peut empoisonner un organisme vivant. La toxicité est classiquement indiquée en unité de poids de la substance par kilogramme de poids vif. On distingue la toxicité aiguë, facile à mettre en évidence par des essais de courte durée et la toxicité chronique. La toxicité par sommation ou accumulation est une notion plus nouvelle de même que celle qui résulte de la concentration qui peut s'opérer chez les animaux domestiques, sans aucune conséquence pathologique pour eux, mais qui peut agir, au second degré, sur l'homme qui consomme le lait, la viande ou les œufs. **Toxique** : Produit d'origine animale, végétale ou minérale qui provoque l'intoxication, la destruction d'un organisme vivant.

Liste des abréviations

5HTergique : sérotoninergique
5HT : sérotonine
5HIAA : acide hydroxyindole acétique
3MT : 3 méthoxytyramine
ACh : acétylcholine
ChE : acétylcholinestérase
BuChE : butyrylcholinestérase
CE : cervelet
CO : cortex frontal / cortex complet
DA : dopamine
DAergique : dopaminergique
DL 50 : dose létale 50
DOPAC : acide dihydroxyphényl acétique
e.g. : *exempli gratia* / *p. ex.* : par exemple
GOT : transaminase glutamic oxalacetic
GPT : transaminase glutamic pyruvic
HI : hippocampe
HY : hypothalamus
HVA : Acide homovanillique
ICPMS : inductive coupled plasma mass spectrophotometry
i.e. : *id est* / *c.-à-d.* : c'est à dire
KPA : kinetic phosphorecence analysis
LOAEL : low observable adverse effect level
MeV : Mega-électron-volt
NOAEL : no observable adverse effect level
RAS : rien à signaler
SNC : système nerveux central
ST : striatum
Syst. : système
TE : témoin – animaux non contaminés
TGI : tractus gastro-intestinal
U : uranium
UA : uranium appauvri – animaux contaminés à l'uranium appauvri
UE : uranium enrichi – animaux contaminés à l'uranium enrichi

Liste des tableaux

Tableau n°01. Risques sanitaires associés aux métaux	25
Tableau n°02. Trois compositions isotopiques caractéristiques de l'uranium.....	26
Tableau n°03. Propriétés radiologiques de l'uranium	27
Tableau n°04. Synthèse des valeurs relatives à la toxicité de l'uranium	36
Tableau n°05. Synthèse des expositions chroniques humaines environnementales	39
Tableau n°06. Synthèse des expositions chroniques expérimentales chez l'animal	39
Tableau n°07. Caractéristiques de la sérotonine, la dopamine et l'acétylcholine	56
Tableau n°08. Composition de l'eau minérale naturelle utilisée comme soluté du nitrate d'uranyle....	69
Tableau n°09. Différents compartiments de contamination	72
Tableau n°10. Optimisation des volumes d'extraction tissulaire.....	75
Tableau n°11. Optimisation des volumes de reprise du culot d'extraction	75
Tableau n°12. Plan expérimental	759
Tableau n°13. Synthèse des effets d'une injection intra péritonéale ($70\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) d'uranium appauvri...	87
Tableau n°14. Observations des rats morts prématurément ou par anticipation.	127
Tableau n°15. Observations des rats euthanasiés le jour de l'expérimentation.	131
Tableau n°16. Synthèse des effets sur le système dopaminergique	138
Tableau n°17. Synthèse des effets sur le système sérotoninergique	138
Tableau n°18. Synthèse des effets sur le système cholinergique	138
Tableau n°19. Localisation de l'accumulation cérébrale d'uranium	138
Tableau n°20. Effets du manganèse	150
Tableau n°21. Effets du plomb.....	151
Tableau n°22. Effets du mercure	151

Liste des figures

Figure n°01. Représentation schématique de la biocinétique de l'uranium après contamination interne	29
Figure n°02. Schéma de l'anatomie du rein	32
Figure n°03. Schéma de transfert de l'uranium après ingestion.....	41
Figure n°04. Représentation schématique de l'inter connexion neuronale.....	42
Figure n°05. Représentation schématique du parenchyme cellulaire cérébral.....	43
Figure n°06. Représentation schématique de la concentration vésiculaire des neurotransmetteurs..	45
Figure n°07. Schéma de principe de la neurotransmission	46
Figure n°08. Schéma de la distribution des principaux neurones sérotoninergiques	47
Figure n°09. Métabolisme de la sérotonine.....	48
Figure n°10. Schéma de la distribution des principaux neurones dopaminergiques	50
Figure n°11. Métabolisme de la dopamine.....	51
Figure n°12. Schéma de la distribution des principaux neurones cholinergiques.....	53
Figure n°13. Métabolisme de l'acétylcholine.....	55
Figure n°14. Diagramme des espèces chimiques de l'uranium dans l'eau minérale en fonction du pH de l'eau (modélisation sur logiciel CHESS)	65
Figure n°15. Schéma de la localisation des structures cérébrales étudiées chez le rat.....	67
Figure n°16. Exemple de chromatogramme obtenu pour le dosage des monoamines et de leur métabolites dans le striatum après 1,5 mois de contamination chronique	76
Figure n°17. Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque), DTNB ou réactif d'Ellman.....	77

Figure n°18. Taux de monoamines en ng.mg^{-1} dans différentes structures cérébrales, après une injection i.p. d'UA, $70\mu\text{g.kg}^{-1}$	83
Figure n°19. Turnover des monoamines dans différentes structures cérébrales, après une injection i.p. d'UA, $70\mu\text{g.kg}^{-1}$	85
Figure n°20. Concentration cérébrale d'uranium en ng.g^{-1} , après une injection i.p. d'UA, $70\mu\text{g.kg}^{-1}$.	87
Figure n°21. Evolution de la consommation d'aliments et de boisson au cours d'une contamination chronique de 1,5 mois à l'uranium à 40mg.L^{-1}	89
Figure n°22. Evolution pondérale des animaux au cours d'une contamination chronique de 1,5 mois à l'uranium à 40mg.L^{-1}	90
Figure n°23. Taux de monoamines en ng.mg^{-1} dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique à l'uranium de 1,5 mois à 40mg.L^{-1}	92
Figure n°24. Turnover des monoamines dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique à l'uranium de 1,5 mois à 40mg.L^{-1}	94
Figure n°25. Activité de l'acétylcholinestérase dans différentes structures cérébrales après une contamination chronique à l'uranium de 1,5 mois à 40mg.L^{-1}	95

Figure n°26. Concentration cérébrale d'uranium en ng.g^{-1} , après une contamination à l'uranium chronique de 1,5 mois à 40mg.L^{-1}	97
Figure n°27. Concentration d'uranium en ng.g^{-1} dans les reins et les os, après une contamination chronique de 1,5 mois à l'uranium à 40mg.L^{-1}	97
Figure n°28. Evolution pondérale des animaux au cours d'une contamination chronique à l'uranium enrichi de 6 mois à 40mg.L^{-1}	99
Figure n°29. Evolution de la prise quotidienne de boisson et d'aliments au cours d'une contamination chronique à l'uranium enrichi de 6 mois à 40mg.L^{-1}	100
Figure n°30. Evolution pondérale des animaux au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri de 6 mois à 40mg.L^{-1}	101
Figure n°31. Evolution de la prise quotidienne de boisson et d'aliments au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri de 6 mois à 40mg.L^{-1}	102
Figure n°32. Taux de monoamines en ng.mg^{-1} dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique de 6 mois à l'uranium appauvri à 40mg.L^{-1}	105
Figure n°33. Turnover des monoamines dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique de 6 mois à l'uranium appauvri à 40mg.L^{-1}	107
Figure n°34. Activité de l'acétylcholinestérase dans différentes structures cérébrales après une contamination chronique à l'uranium de 6 mois à 40mg.L^{-1}	108
Figure n°35. Concentration cérébrale d'uranium en ng.g^{-1} , après une contamination chronique à l'uranium enrichi de 6 mois à 40mg.L^{-1}	109
Figure n°36. Concentration d'uranium en ng.g^{-1} dans les reins et les os, après une contamination chronique à l'uranium appauvri de 6 mois à 40mg.L^{-1}	109
Figure n°37. Evolution pondérale des animaux au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri ou enrichi de 9 mois à 40mg.L^{-1}	116
Figure n°38. Evolution de la consommation quotidienne de boisson au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri et enrichi de 9 mois à 40mg.L^{-1}	117
Figure n°39. Evolution de la consommation quotidienne d'aliments au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri et enrichi de 9 mois à 40mg.L^{-1}	118
Figure n°40. Evolution pondérale des animaux au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri ou enrichi de 9 mois à 40mg.L^{-1}	113
Figure n°41. Evolution de la consommation quotidienne d'aliments au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri et enrichi de 9 mois à 40mg.L^{-1}	114
Figure n°42. Evolution de la consommation quotidienne de boisson au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri et enrichi de 9 mois à 40mg.L^{-1}	115
Figure n°43. Taux de monoamines en ng.mg^{-1} dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique de 9 mois à l'uranium à 40mg.L^{-1}	120
Figure n°44. Turnover des monoamines dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique de 9 mois à l'uranium à 40mg.L^{-1}	122
Figure n°45. Activité de l'acétylcholinestérase dans différentes structures cérébrales après une contamination chronique de 9 mois à l'uranium à 40mg.L^{-1}	123

Figure n°46. Concentration d'uranium en ng.g^{-1} dans les structures cérébrales, après une contamination chronique de 9,5 mois à l'uranium enrichi à 40mg.L^{-1}	124
Figure n°47. Concentration d'uranium en ng.g^{-1} dans les structures cérébrales, après une contamination chronique de 9 mois à l'uranium appauvri à 40mg.L^{-1}	125
Figure n°48. Concentration d'uranium en ng.g^{-1} dans les reins et les os, après une contamination chronique de 9 mois à l'uranium à 40mg.L^{-1}	126
Figure n°49. Evolution pondérale des animaux au cours d'une contamination chronique à l'uranium enrichi de 18 mois à 40mg.L^{-1}	128
Figure n°50. Evolution de la consommation de boisson des animaux au cours d'une contamination chronique à l'uranium enrichi de 18 mois à 40mg.L^{-1}	129
Figure n°51. Evolution de la consommation quotidienne alimentaire des animaux au cours d'une contamination chronique à l'uranium enrichi de 18 mois à 40mg.L^{-1}	130
Figure n°52. Taux de monoamines en ng.mg^{-1} dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique de 18 mois à l'uranium enrichi à 40mg.L^{-1}	134
Figure n°53. Turnover des monoamines dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique de 18 mois à l'uranium enrichi à 40mg.L^{-1}	136
Figure n°54. Activité de l'acétylcholinestérase dans différentes structures cérébrales après une contamination chronique de 18 mois à l'uranium enrichi à 40mg.L^{-1}	137

Les illustrations présentes dans ce document ont été adaptées (auteurs et références indiqués) ou réalisées pour ce manuscrit par C. Bussy au moyen des logiciels Photofiltre, Paracell PathWorks V1.0, ChemOffice 2005, Microsoft Paint & Microsoft Powerpoint 2003.

Liste des annexes

Annexe 1. Données relatives à la contamination aiguë de $70\mu\text{g.g}^{-1}$	171
Annexe 2. Données relatives à la contamination chronique de 1,5 mois	172
Annexe 3. Données relatives à la contamination chronique de 6 mois	174
Annexe 4. Données relatives à la contamination chronique de 9 mois	175
Annexe 5. Données relatives à la contamination chronique de 18 mois	177
Annexe 6. Poids des reins et fémurs aux différents temps	178
Annexe 7. Paramètres de mesures pour les différentes techniques analytiques (critères-conditions d'acceptabilité des résultats).	179
Annexe 8. Exemple de données brutes de dosage électrochimique.	182
Annexe 9. Exemple de données brutes de mesure de l'activité ChE.	183
Annexe 10. Exemple de données brutes de dosage de l'uranium par ICP-MS.	184
Annexe 11. Procédures de microdissection de l'encéphale, adaptée de la méthode de Glowinski et Iversen 1966.	185
Annexe 12. Méthode de Glowinski et Iversen 1966.	186
Annexe 13. Procédures de fixation biologique par perfusion vasculaire intracardiaque.	187
Annexe 14. Protocole de fixation des cerveaux avant immunohistologie.	188
Annexe 15. Le combustible nucléaire	189

Introduction

Introduction générale

*« Tout est poison, rien n'est poison, seule la dose fait le poison »
Paracelse, alchimiste et médecin suisse.*

Actuellement, la question de l'augmentation de la prévalence de certaines maladies dans les pays industrialisés, telles que les cancers, les troubles de la reproduction, les maladies neurodégénératives ou les maladies du système immunitaire, est au cœur de l'actualité sociale et médiatique. Les résultats de la recherche scientifique laissent à penser que ces maladies pourraient être la conséquence d'une dégradation lente et progressive de notre environnement par l'utilisation de produits chimiques.

Si la question des risques sanitaires liés à l'environnement est émergente, la réponse, elle, est encore embryonnaire. En effet, lorsque l'on aborde l'impact de facteurs environnementaux sur la santé de la population, le plus souvent il s'agit de contamination chronique, à long terme et par des concentrations infimes de produits. Par ailleurs, cet impact sanitaire ne se mesure pas nécessairement dans l'immédiat, mais peut être décalé dans le temps. Pour mesurer ces risques émergents, il faut donc prendre en compte à la fois la substance, la quantité reçue, la répétition de l'exposition, la voie de contamination, l'âge de l'animal et envisager les synergies et interactions possibles entre plusieurs substances. Dans le cas des faibles quantités, voire très faibles quantités de produits, le temps d'exposition est un paramètre clef dans la détermination de la toxicité. C'est pourquoi, le risque à long terme de ces produits, présents en traces, reste encore très mal évalué, mais est au centre des préoccupations des toxicologues et des épidémiologistes.

Concernant les radionucléides naturels, présents eux aussi en traces dans notre environnement, l'évaluation du risque sanitaire pour la population est tout autant balbutiante. Certes, des normes internationales de limites d'exposition par ingestion et inhalation existent. Mais, elles font appel à des extrapolations réalisées à partir de données obtenues lors d'exposition aiguë et pour des travailleurs exposés du fait de leur activité professionnelle. Pour la population générale, les normes ne prennent donc pas en compte les valeurs réelles d'exposition et le risque potentiel des radionucléides de l'environnement.

Parmi ces radionucléides naturels, l'uranium est un métal lourd, faiblement radioactif, utilisé par l'industrie en raison de ses propriétés physiques et radioactives. Au cours des différentes étapes du cycle du combustible nucléaire, il représente une source de contamination potentielle pour les travailleurs, principalement par inhalation. Mais l'uranium, comme l'ensemble des radionucléides à vie longue, est aussi naturellement présent sur Terre et constitue donc un élément-trace environnemental pour l'ensemble de la population. Il peut donc être quantifié à l'état de traces aussi bien dans les roches, les sols, l'eau, l'air, les aliments que dans tout organisme vivant. Dans l'organisme humain, il y a en moyenne 90µg d'uranium. Toutefois, sa présence diffuse et ubiquitaire dans l'environnement ne suscitait jusqu'à présent qu'une considération minimale et les experts en radio-toxicologie n'avaient tout risque sanitaire au regard de sa concentration. Mais récemment, le questionnement de la société sur l'impact des facteurs environnementaux et l'exploitation anthropique croissante de ce radionucléide

qui a augmenté la probabilité d'une exposition humaine, a suscité un regain d'intérêt pour la connaissance des effets toxiques de l'uranium de l'environnement sur l'Homme.

La toxicité chimique immédiate de l'uranium est aujourd'hui relativement bien décrite dans la littérature. Le tropisme rénal de l'uranium est le critère de référence dans l'évaluation d'un risque sanitaire après contamination interne accidentelle. En effet, une intoxication aiguë ou chronique, avec une quantité importante d'uranium, peut conduire à une insuffisance rénale. Toutefois, là encore, les effets à long terme, surtout avec de faibles quantités, sont méconnus.

Bien que des effets neurologiques ait été évoqués très tôt lors de la recherche des effets toxiques potentiels d'une contamination à l'uranium (projet Manhattan, bombe atomique américaine, 1945-1949), ce n'est que récemment, avec l'apparition du syndrome de la guerre du Golfe, que de nombreuses associations de vétérans ont mis en cause l'usage d'armes blindées à l'uranium appauvri et les effets à long terme de l'uranium sur le système nerveux. En effet, les rares études en rapport avec les conséquences sanitaires de la guerre du Golfe ont montré que l'uranium métallique (implanté expérimentalement en grande quantité dans le tissu musculaire) pouvait non seulement pénétrer à l'intérieur du cerveau des modèles animaux, mais de surcroît, qu'il pouvait y provoquer des troubles neurobiologiques.

Dans ce mémoire, nous nous sommes donc attachés à décrire les premiers pas d'un domaine de recherche émergent : les effets de l'uranium sur le système nerveux central, en utilisant des concentrations d'uranium modérées mais supérieures à la teneur environnementale maximale. Plus particulièrement, les objectifs étaient (1) de savoir si une exposition chronique sur l'ensemble de la vie du modèle (entre 1 et 18 mois de contamination) par ingestion d'une eau supplémentée en nitrate d'uranyle pouvait induire une réponse neurotoxique au niveau central et dans l'affirmative (2) d'évaluer les effets de l'uranium sur le fonctionnement du cerveau de rat.

Trois compositions isotopique d'uranium peuvent être distinguées par leur activité spécifique : l'uranium enrichi en isotope ^{235}U , l'uranium naturel et enfin l'uranium appauvri en isotope ^{235}U . Dans ce travail de toxicologie descriptive, nous avons donc évalué les effets de deux de ces compositions isotopiques (enrichi et appauvri) afin de discriminer la part de toxicité radiologique et de toxicité chimique dans la toxicité globale de l'uranium après exposition chronique par ingestion.

En raison de la pauvreté de la littérature scientifique sur cette problématique au début de ce travail, le choix a été fait d'évaluer la neurotoxicité de l'uranium en s'attachant à décrire les effets éventuels de ce toxique rénal sur la neurotransmission centrale monoaminergique (dopamine et sérotonine) et cholinergique, après différents temps d'exposition chronique.

Après une brève présentation générale de l'uranium, les effets d'une contamination interne à l'uranium et notamment ceux d'une contamination chronique seront abordés. Dans une seconde partie, les résultats expérimentaux seront détaillés puis discutés au regard de la littérature. Enfin la dernière partie s'attChEra à faire un bilan, tirer les conclusions et entrevoir les principales perspectives de ce travail.

Chapitre I

- Etude Bibliographique -

« C'est ce que nous pensons déjà connaître qui nous empêche souvent d'apprendre. »

Claude Bernard, *physiologiste français*.

Chapitre I – Etude Bibliographique :

INTRODUCTION : le risque sanitaire de l'ingestion de métaux

Différents métaux sont naturellement présents à l'état de traces dans l'environnement sous forme organique ou inorganique. Pour les organismes vivants, certains métaux (*p. ex.* cuivre, fer, zinc, manganèse, chrome, magnésium, molybdène) appartiennent aux oligoéléments essentiels à la vie. A l'inverse, d'autres métaux, également présents à la fois dans l'environnement et la chaîne alimentaire (*p. ex.* mercure, plomb, cadmium, nickel ou uranium), sont non essentiels à la vie mais néanmoins constitutifs du vivant.

Cependant, lorsque leur concentration dans les aliments ou l'eau potable augmente, la toxicité intrinsèque de ces métaux peut devenir un risque sanitaire pour l'Homme. Les études toxicologiques passées ont mis en évidence que l'ensemble des systèmes physiologiques (respiratoire, digestif, vasculaire, hématopoïétique, immunitaire, reproducteur et nerveux) pouvait alors être concerné par les effets toxiques de ces métaux (cf. tableau 01). De plus, l'intensité et l'ampleur des effets de ces métaux sur la santé dépendent, comme tout toxique, de la voie de contamination, de la quantité reçue, de la répétition de l'intoxication et de la nature chimique du contaminant (spéciation).

Tableau n°01. Risques sanitaires associés aux métaux

Métal	Risque sanitaire
Arsenic	Syst. hématopoïétique, vasculaire / coloration de la peau / carcinogène
Cadmium	Reins / poumons / os / foie / intestin / Syst. nerveux / carcinogène
Mercure	Syst. nerveux / reins / tératogène / poumons / carcinogène chez l'animal
Plomb	Syst. nerveux central / syst. endocrinien (hypothalamo-hypophysaire) / reins / os / syst. reproducteur
Manganèse	Syst. nerveux central / syst. endocrinien (hypothalamo-hypophysaire)

D'après les fiches ATSDR 1999, « Toxicological profile for ... », disponibles sur <http://www.atsdr.cdc.gov/>

Qu'en est-il de l'uranium, autre métal naturellement présent à l'état de traces dans l'environnement, dans l'alimentation et dans les organismes vivants ?

I.1. L'INGESTION D'UN METAL PARTICULIER : L'URANIUM ($_{92}\text{U}$)

I.1.1. GENERALITES

Bien que l'uranium ait été découvert en 1789 par le chimiste allemand H. Klaproth dans le minerai de pechblende et classé parmi les métaux de transition, sa radioactivité¹ n'a été mise en évidence qu'en 1886 par H. Becquerel, créant par là même le principe de radioactivité.

Dans l'environnement, l'uranium naturel se compose de trois isotopes naturels ^{238}U (99,28%), ^{235}U (0,718%) et ^{234}U (0,0056%). La teneur en uranium dans les minerais est très variable, de l'ordre de 2 à 3 ppm (g par tonne) de roche en moyenne dans l'écorce terrestre et jusqu'à 10 voire 30 ppm dans les granites.

Jusqu'à la fin des années 1930, les utilisations de l'uranium se sont limitées à celui de pigment jaune, orange ou vert pour la céramique, la cristallerie, la faïence et la bijouterie. Par la suite, la découverte de ses propriétés nucléaires et mécaniques en a fait un candidat de choix pour le combustible des réacteurs nucléaires et l'industrie métallurgique.

Les premières étapes du cycle du combustible nucléaire (cf. annexe 15) permettent de transformer le minerai d'uranium naturel (0,7% d' ^{235}U) en uranium enrichi (UE, classiquement 3 à 5% d' ^{235}U dans les réacteurs) et en uranium appauvri (UA, 0,3% d' ^{235}U) (cf. tableau 02). Seul l'UE est utilisé dans les réacteurs pour entretenir la réaction en chaîne. L'UA est un sous-produit de l'industrie nucléaire et est utilisé, en raison des propriétés mécaniques de l'uranium, pour le blindage (tête d'obus perforants ou plaque de char d'assaut) ou le lestage (contreponds dans les quilles de bateaux ou les ailes d'avions). L'uranium est aussi utilisé pour les armes atomiques, dans la fabrication de chimiques photographiques, de contrastants de microscopie électronique, de verres fluorescents et d'écrans contre les rayons X.

Tableau n°02. Trois compositions isotopiques caractéristiques de l'uranium

nom	abréviation	% ^{235}U	Activité spécifique	Echelle de Radioactivité
uranium naturel	UN	0,7%	$2,5 \cdot 10^4 \text{ Bq.g}^{-1}$	++
uranium enrichi	UE	3%	$4,2 \cdot 10^4 \text{ Bq.g}^{-1}$	++++
uranium appauvri	UA	0,3%	$1,4 \cdot 10^4 \text{ Bq.g}^{-1}$	+

I.1.2. PROPRIETES CHIMIQUES, PHYSIQUES ET RADIOLOGIQUES DE L'URANIUM

Dans le tableau périodique de Mendeleïev, l'uranium est le dernier élément naturel. A ce titre, il possède le plus grand numéro atomique ($Z=92$) et la plus grande masse atomique ($A= 227$ à 240) des éléments naturels. Il appartient à la série des actinides ($Z= 89$ à 103) qui constitue une série de métaux de transition, tous radioactifs (thorium, neptunium, américium, plutonium,...) (ATSDR, 1999).

¹ radioactivité : transformation d'un atome (= transmutation) avec émission de rayonnements dits ionisants.

La configuration électronique de l'uranium confère à ce métal lourd (densité 19,04 soit 1,7 fois plus que le plomb) des propriétés réductrices qui conduisent à son oxydation à l'air (humide ou chaud). Il possède plusieurs degrés d'oxydation (principalement +III à +VI). En solution (acide ou aqueuse), le degré d'oxydation VI (U^{6+} , hexavalent) est le plus stable et existe sous la forme de cation uranyle UO_2^{2+} ; c'est aussi la forme la plus retrouvée dans la nature et les organismes vivants (Cothorn *et al.*, 1983b; La Touche *et al.*, 1987). Dans les fluides biologiques, les ions U^{6+} (forme cationique UO_2^{2+}) sont capables de former des complexes chimiques avec les carbonates, les phosphates ou les carboxyles (Voegtlin and Hodge, 1949; Hodge *et al.*, 1973).

Les isotopes d'uranium sont principalement émetteurs de particules alpha, mais certains sont aussi émetteurs de particules bêta et de rayons gamma (Craft *et al.*, 2004) (cf. tableau 03).

Tableau n°03. Propriétés radiologiques de l'uranium

Éléments radioactifs (instables)	Période de décroissance	Longueur de la chaîne de décroissance	Éléments stables finaux	Energie émise par désintégration
Uranium 238	4,5 milliards d'années	14 descendants	Plomb 206	4,15 MeV α
Uranium 235	0,7 milliards d'années	11 descendants	Plomb 207	4,29 MeV α + 0,19 γ
Uranium 234	0,25 milliards d'années	11 descendants	Plomb 206	4,78 MeV α

I.1.3. SOURCE D'EXPOSITION A L'URANIUM

I.1.3.1. Une exposition naturelle par l'eau de boisson et l'alimentation.

L'uranium est un radionucléide d'origine tellurique, présent sur Terre depuis son origine. Ubiquitaire, il peut donc être retrouvé aussi bien dans le sol, l'air, l'eau que l'ensemble de la chaîne alimentaire en raison de ce dépôt naturel. Pour une population moyenne, l'alimentation et l'eau potable constituent les deux principales sources d'exposition chronique à l'uranium (Cothorn and Lappenbusch, 1983a; Cothorn *et al.*, 1983b; Fisenne *et al.*, 1987). Pour un adulte de 70kg, l'ingestion quotidienne moyenne d'uranium serait de 1 à 3 μ g, les 2/3 provenant des aliments, le reste étant principalement apporté par l'eau de boisson (Hamilton, 1970; Hamilton, 1972; Fisenne *et al.*, 1987). Cependant, pour certaines populations, la teneur en uranium de l'eau potable mise à leur disposition, participe aux 3/4 de l'apport quotidien total en uranium (Cothorn and Lappenbusch, 1983a).

Alors que l'uranium présent dans les aliments est peu biodisponible en raison de liaisons stables avec des substances organiques, l'uranium de l'eau potable est naturellement biodisponible sous la forme d' UO_2^{2+} , du fait de ses propriétés physico-chimiques. Pour la population générale, la teneur en uranium des eaux potables sera donc un paramètre important dans l'évaluation du risque lié à l'exposition chronique à l'uranium.

La concentration d'uranium des eaux destinées à la consommation humaine peut varier de valeurs moyennes inférieures à 10 μ g.L⁻¹ (ppb) à plus de 14 voire 20mg.L⁻¹ (ppm) dans certaines eaux

souterraines (Juntunen, 1991; Huikuri and Salonen, 2000; Huikuri *et al.*, 2001). D'un individu à l'autre, l'apport quotidien moyen en uranium par l'eau de boisson dépendra donc de ses habitudes alimentaires : eau d'adduction publique (eau du robinet), eau de puits ou de source privés ou bien encore, eau embouteillée (de source ou minérale naturelle).

I.1.3.2. Une exposition du fait de l'activité humaine.

Depuis le 20^{ème} siècle, les activités humaines ont considérablement augmenté le nombre de sources d'exposition à l'uranium, tant pour les travailleurs que le grand public. En dehors des activités industrielles liées au cycle du combustible nucléaire qui exposent une population bien identifiée, les émissions des industries de retraitement (métallurgie, décontamination, transformation, ...) participent aussi à l'augmentation de l'exposition (ATSDR, 1999; Cantaluppi and Degetto, 2000).

Les engrais phosphatés, en raison de la très grande affinité des ions uranyles pour les groupes phosphates, peuvent atteindre jusqu'à 150mg d'uranium.kg⁻¹ d'engrais (5-50mg/kg en moyenne) et contaminer, en cascade, les nappes phréatiques (Paschoa, 1998; Cantaluppi and Degetto, 2000).

De plus, lors des derniers conflits internationaux (Golfe, Balkans, Afghanistan, Kosovo ...), l'usage croissant d'obus perforants, à tête constituée d'uranium appauvri, a également augmenté le taux de dissémination de cet élément dans l'environnement (Cantaluppi and Degetto, 2000; Priest, 2001).

La dissémination de l'uranium « industriel » dans l'environnement participe donc à l'augmentation du risque d'exposition de la population générale par contamination chronique.

I.1.4. BIO-CINETIQUE DE L'URANIUM APRES UNE CONTAMINATION INTERNE

Malgré son omniprésence dans l'environnement, l'uranium est considéré comme un élément non essentiel car n'ayant aucune fonction métabolique ou physiologique connue (WHO, 2004).

I.1.4.1. Voies d'entrées.

Différentes voies d'entrées peuvent être distinguées : l'inhalation, la contamination interne par blessure, le transfert materno-fœtal et enfin l'ingestion (cf. figure 01). L'inhalation et la blessure sont les voies de contamination accidentelles les plus fréquentes chez les travailleurs du cycle du combustible nucléaire. Les autres voies répondent à des conditions particulières et moins répandues de contamination, pour lesquelles les données sont très rares voire incomplètes (WHO, 2004).

L'inhalation est de loin, la voie la plus fréquente de contamination des travailleurs par l'uranium. En raison des systèmes de protection individuelle des travailleurs, la contamination est le plus souvent chronique (répétée) sur plusieurs années et avec de petites quantités à chaque fois. Les expositions sont donc en général accidentelles (ATSDR, 1999).

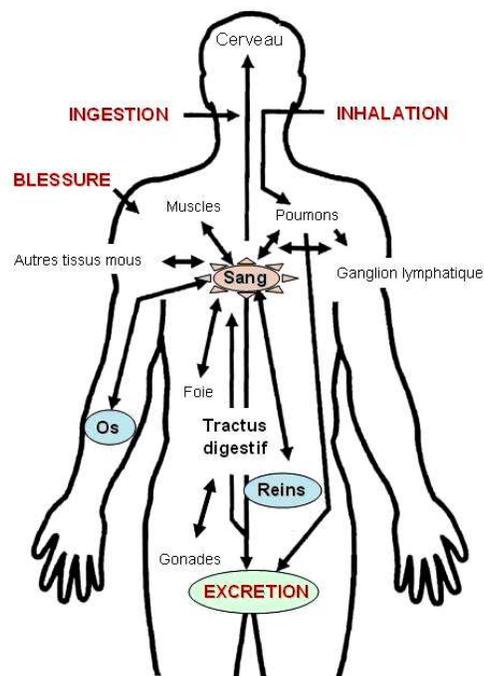
La contamination interne par blessure est aussi une préoccupation essentielle au poste de travail. En effet, en cas de lésion (blessure ouverte) ou même d'une simple abrasion suivie de dépôt d'uranium sur la peau, l'uranium pourrait traverser la « barrière » de la peau pour rejoindre la circulation sanguine (Ubios *et al.*, 1997; Tymen *et al.*, 2000; Petitot *et al.*, 2004). Si la peau reste saine, l'uranium ne représenterait pas un risque sanitaire important et doit être éliminé par lavage.

Le transfert materno-fœtal est une voie de contamination beaucoup plus improbable. Toutefois, quelques études expérimentales ont mis en évidence que des rongeurs femelles soumises à des contaminations aiguës ou chroniques à l'uranium pouvaient transférer *in utero* une partie de la quantité absorbée à leur descendance, probablement par voie sanguine (échange placentaire) (Sikov and Mahlum, 1968; Lestaevel, septembre 2005).

Figure n°01. Représentation schématique de la biocinétique de l'uranium après contamination interne.

Après son entrée dans la circulation sanguine, l'uranium diffuse dans l'ensemble de l'organisme ; en bleu, les organes cibles.

(illustration adaptée de Craft *et al.* 2004)



Enfin, l'ingestion est la voie principale d'exposition de la population générale, travailleurs compris, principalement en raison des traces d'uranium présentes dans les aliments et l'eau potable, l'eau potable étant le vecteur le plus sérieux au regard de la toxicité. Chez un adulte, seul 0,2% (composé insoluble) à 2% (composé soluble), en moyenne, de la quantité d'uranium ingéré sont absorbés au niveau du tractus gastro-intestinal (Leggett and Harrison, 1995). Une étude épidémiologique portant sur une cohorte de 60 personnes (contamination chronique par ingestion d'eau contaminée) a rapporté des taux d'absorption gastro-intestinale allant de 0,1 à 4 % (Limson Zamora *et al.*, 1998 ; Karpas *et al.*, 1998). Le taux d'absorption intestinale est directement influencé par les caractéristiques des sels d'uranium, la solubilité du composé d'uranium, la quantité absorbée et la consommation conjointe d'aliments (Cothorn *et al.*, 1983b; La Touche *et al.*, 1987). En effet, de la

spéciation des espèces uranifères présentes dans le bol alimentaire, dépendront la biodisponibilité, le taux de transfert et donc la toxicité des composés (Denison, 2004). Par ailleurs, il a été constaté que ce taux d'absorption est supérieur chez le nouveau-né par rapport à l'adulte (ICRP, 1991; Leggett, 1994; ICRP, 1995) et augmente lorsque le régime alimentaire est pauvre en fer (Sullivan and Ruemmler, 1988).

I.1.4.2. Transfert aux organes cibles.

Après translocation dans la circulation sanguine, la pharmacocinétique de l'uranium semble être la même quelles que soient la forme incorporée et la voie d'absorption : l'uranium circule et diffuse dans tout l'organisme (Fisene and Perry, 1985; La Touche *et al.*, 1987; Leggett and Harrison, 1995)(cf. figure 01). Dans le plasma, en raison de leur affinité pour les groupes phosphates et carbonates, les ions uranyles UO_2^{2+} se combinent facilement aux protéines (*p. ex.* transferrine, albumine ou lipoprotéines des hématies) pour former des complexes stables (Dounce 1949 cité dans (Hodge *et al.*, 1973; Durbin and Wrenn, 1976)). La stabilité des complexes dépend du pH du liquide biologique dans lequel ils se trouvent (Voegtlin and Hodge, 1949). Soixante pour cent seraient liés aux carbonates et les 40% restants à la transferrine (Voegtlin and Hodge, 1949). L'uranium est ensuite rapidement éliminé du compartiment sanguin et s'accumule essentiellement au niveau du cortex rénal et à la surface des os (La Touche *et al.*, 1987; Kurtio *et al.*, 2005). Dans le squelette, site principal d'accumulation de l'uranium à long terme (Wrenn *et al.*, 1985), l'ion uranyle UO_2^{2+} s'accumule surtout dans les régions les plus vascularisées et remplacerait le calcium Ca^{2+} dans le complexe osseux des cristaux d'hydroxyapatite (Hamilton, 1971).

I.1.4.3. Rétention et excrétion.

L'uranium hydrosoluble qui circule dans le sang est rapidement filtré au niveau des glomérules rénaux et éliminé par les voies urinaires. L'excrétion biliaire constitue une voie d'élimination complémentaire *via* les fèces (Hodge *et al.*, 1973; Spencer *et al.*, 1990).

Après contamination aiguë, 67% de l'uranium absorbé sont éliminés dès le 1^{er} jour sans aucun dépôt dans les organes, et 75% du restant dans les 5 jours qui suivent (Durbin and Wrenn, 1976; ICRP and Protection, 1994). Il resterait environ 8% de la quantité absorbée, probablement dans les os, qui s'élimineraient dans les mois et les années suivant la contamination (Leggett, 1989; ICRP and Protection, 1994). Wrenn *et al.* ont rapporté pour les rats des demi-vies de 15 jours dans les reins et de 300 à 5000 jours dans les os (Wrenn *et al.*, 1985). Il n'est donc pas rare de retrouver, très longtemps après une exposition, des quantités non négligeables d'uranium dans les urines dues au « relargage » osseux (Orloff *et al.*, 2004). Pour l'Homme, la demi-vie de l'uranium dans les os a été estimée à 20 ans. Un organisme humain adulte contient en moyenne 40 à 90 µg d'uranium pondéral (Wrenn *et al.*, 1985 ; WHO, 2001) : 66% dans le squelette, 16% dans le foie, 8% dans les reins et 10% dans les autres tissus mous (WHO, 2001).

I.1.5. EFFETS TOXIQUES AIGUS OU SUB-CHRONIQUES DE L'URANIUM

(pour revue, ATSDR 1999 et Craft *et al.* 2004)

I.1.5.1. Evaluation du risque sanitaire :

L'étude de la toxicité de l'uranium a commencé dès 1824 par CG. Gmelin (Hodge *et al.*, 1973). Cette toxicité résulterait d'une fine combinaison des propriétés chimiques (en tant que métal) et radiologiques (émetteur de rayonnements ionisants) de ce radionucléide.

Lorsqu'il s'agit d'uranium naturel ou appauvri, la toxicité serait avant tout chimique (Wrenn *et al.*, 1985; Wrenn *et al.*, 1987; Leggett, 1989; Taylor and Taylor, 1997), aucune toxicité radiologique chez les êtres humains ou les animaux n'ayant été observée à ce jour, probablement en raison de leurs faibles activités spécifiques ($2,5 \cdot 10^4$ Bq.g⁻¹ pour l'uranium naturel et $1,4 \cdot 10^4$ Bq.g⁻¹ pour l'uranium appauvri 0,3%). Dans le cas de l'uranium enrichi, la radioactivité du composé n'étant plus négligeable, une éventuelle toxicité radiologique doit être considérée au même titre que la toxicité chimique qui s'exerce toujours.

En tant que radionucléide, la réglementation internationale préconise une limite d'exposition fixée à 1mSv/an sur la base de critères radiologiques. Cependant, même pour des expositions inférieures à 1mSv, une toxicité chimique a été observée tant chez les animaux que les êtres humains (Kocher, 1989). L'évaluation du risque sanitaire de l'uranium repose donc le plus souvent sur des critères chimiques. Pour la population générale, en l'absence d'études épidémiologiques à long terme, la concentration maximale acceptable dans l'eau de boisson a été calculée sur la base des résultats d'études sub-chroniques (ingestion chronique pendant 91 jours d'uranium contenu dans l'eau de boisson) (Gilman *et al.*, 1998) et a été établie le plus souvent à 20µg.L⁻¹. La valeur guide actuelle préconisée par l'OMS est de 15µg.L⁻¹ (WHO, 2004).

I.1.5.2. Toxicité chimique de l'uranium :

I.1.5.2.1. Effets sur le rein (pour revue, Diamond *et al.*, 1989).

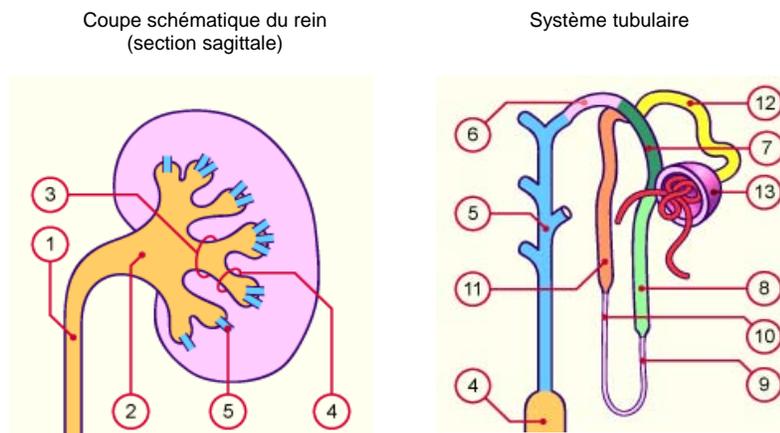
La toxicité aiguë de l'uranium (exposition à de très fortes quantités d'uranium naturel, 204mg.kg⁻¹, dose létale à 14 jours) se manifeste cliniquement chez le Rat par une importante perte de poids, une hémorragie au niveau des yeux, des pattes et du museau ainsi qu'une piloérection générale et des signes cliniques d'atteinte du système nerveux central (Domingo *et al.*, 1987). Bien que l'ensemble de l'organisme semble pouvoir être touché par la toxicité de l'uranium, les reins sont le siège d'effets délétères prédominants, comme le reflète l'abondante littérature relative aux effets rénaux de l'uranium (Hursh *et al.*, 1969; Hodge *et al.*, 1973; Leggett, 1989; Leggett and Harrison, 1995; Limson Zamora *et al.*, 1998; Kurtio *et al.*, 2002; Limson Zamora *et al.*, 2003; Kurtio *et al.*, 2005).

Les composés les plus solubles dans l'eau (nitrate d'uranyle hexa-hydraté, acétate d'uranyle, fluorure d'uranyle et UO_4) ont une toxicité rénale supérieure à celle des composés peu solubles dans l'eau (UO_2 , U_3O_8 , UO_3) ((Maynard *et al.*, 1949).

Dans l'organisme, et plus particulièrement dans les fluides biologiques aqueux, l'U est présent sous la forme de cations UO_2^{2+} (constitués de l'ion hexavalent U^{6+}), forme ionique la plus stable mais aussi la plus soluble donc la plus toxique (Cothorn and Lappenbusch, 1983a). L'uranium hydrosoluble, qui a rejoint le sang circulant, est d'abord filtré au niveau des glomérules, puis il gagne la lumière des tubules rénaux où il s'accumule avant d'être éliminé dans les canaux collecteurs de l'urine (cf. figure 02). La toxicité chimique de l'uranium affecte la fonctionnalité des néphrons par lésion des cellules épithéliales des tubules contournés proximaux (Diamond *et al.*, 1989; Leggett, 1989; ATSDR, 1999). Cette atteinte rénale a été rapportée pour toutes les espèces animales testées, Homme compris (Maynard *et al.*, 1949; Diamond *et al.*, 1989).

Figure n°02. Schéma de l'anatomie du rein.

(Département de Médecine, Division d'Histologie, Université de Fribourg, www.unifr.ch/histologie/)



© A Web-Based Training in Medical Embryology,

- | | | |
|--------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 1. uretère | 7. tube contourné distal | 11. tube droit proximal |
| 2. bassinet | 8. tube droit distal | 12. tube contourné proximal |
| 3. grand calice | 9. partie ascendante du tube | 13. capsule de Bowman = |
| 4. petit calice | intermédiaire | glomérule |
| 5. tube collecteur | 10. partie descendante du tube | |
| 6. segment d'union | intermédiaire | |

L'altération des tubules contournés proximaux se traduit par une cytotoxicité épithéliale, aboutissant à une nécrose cellulaire. Des atteintes glomérulaires ont aussi été rapportées. Le corollaire de ces deux atteintes est une insuffisance rénale aiguë (Domingo *et al.*, 1987; Diamond *et al.*, 1989).

En milieu acide, il a été montré que les complexes uranyl-carbonate (présents dans le sang) se décomposent en ions carbonates et ions uranyles. Cette décomposition ionique provoque des perturbations de la fonction glomérulaire (filtration du sang), des sécrétions tubulaires (lactate et citrate ...) et de la réabsorption du glucose et des acides aminés au niveau des néphrons (Diamond *et al.*, 1989). Au niveau cellulaire, les ions uranyles dissous s'accumulent dans les lysosomes des cellules épithéliales des tubes proximaux pour former des aiguilles de phosphate d'uranyle (complexes stables et inertes également observables dans les cellules épithéliales pulmonaires après inhalation) qui seront ensuite éliminées dans les urines après nécrose cellulaire (Galle, 1974; Galle and Berry, 1980; Diamond *et al.*, 1989).

Lorsque l'atteinte n'est pas trop importante et que l'exposition cesse, le rein se régénérant naturellement, la fonction rénale peut recouvrer son état initial. Toutefois, sur un plan histologique, certaines zones fibrosées persistent, indiquant un renouvellement imparfait de l'épithélium (Wrenn *et al.*, 1985; Leggett, 1989). L'exposition répétée à l'uranium peut également induire une tolérance à la toxicité (Durbin and Wrenn, 1976). Mais là encore, la chimiotoxicité rénale, même discrète, s'exerçant toujours, l'épithélium se renouvelle de façon imparfaite.

I.1.5.2.2. Effets sur les os (pour revue Craft *et al.*, 2004).

Très peu d'études ont évalué les effets de l'uranium sur le tissu osseux alors qu'il en est le principal site d'accumulation à long terme (Pellmar *et al.*, 1999 a). Miller *et al.* ont montré qu'une intoxication aiguë par l'uranium ($0,8\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ poids) conduisait à une baisse de la formation osseuse et à une hausse de la résorption osseuse (Miller *et al.*, 2001a; Miller *et al.*, 2001b). De même, Ubios *et al.*, après une étude équivalente à plus forte dose ($2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ poids) ont montré une nette diminution de la formation d'os cortical et ont suggéré que l'uranium pouvait contribuer à l'ostéoporose (Ubios *et al.*, 1991).

I.1.5.2.3. Effets sur les poumons (pour revue Leach *et al.*, 1973).

Les effets pulmonaires de l'uranium sont la résultante d'une inhalation de composés volatiles et particulaires d'uranium. Plus les particules sont fines, plus elles pénètrent profondément l'arbre bronchique. Seules les particules les plus fines atteignent les alvéoles pulmonaires. Au même titre que les cellules épithéliales pulmonaires, les macrophages alvéolaires qui participent à la rétention et à l'élimination des particules, sont les cibles privilégiées de la toxicité pulmonaire de l'uranium.

Dans le cas de composés solubles, l'uranium présent dans les poumons pourra rejoindre la circulation sanguine et être éliminé peu à peu par les reins, comme pour les autres voies de contamination. A l'inverse, les composés insolubles persistent dans le système respiratoire et peuvent être responsables d'une irradiation locale et interne des poumons. La contamination par inhalation pourra donc être à l'origine, là encore d'effets chimiotoxiques sur le rein mais aussi d'effets sur les poumons (Leach *et al.*, 1973). *In situ*, des effets cytotoxiques et génotoxiques ont été démontrés dans

des cellules épithéliales pulmonaires et des macrophages alvéolaires (Leach *et al.*, 1973; Gazin *et al.*, 2004).

I.1.5.2.4. Effets sur le système reproducteur (pour revue Arfsten *et al.*, 2001).

Divers effets indésirables sur la reproduction (baisse du nombre de portées et du nombre de petits par portée) ont été rapportés dès 1949 après 7 mois d'ingestion de nitrate d'uranyle hexahydraté pour différentes espèces animales (Maynard *et al.*, 1949).

Domingo *et al.* ont rapporté une baisse de la prise de poids, de la consommation d'aliments et du poids du foie chez des souris femelles après gavage au cours de leur gestation (gavage par 2 à 28 mg d'uranium par kg de poids corporel par jour) (Domingo *et al.*, 1989). Chez les fœtus, une baisse du poids et de la longueur ainsi que de nombreuses malformations externes et internes (différences dans les stades de développement) ont été constatées. Dans une seconde étude, Domingo *et al.* ont évalué l'effet de l'uranium sur les dernières étapes du développement foetal, la parturition, la lactation et la viabilité postnatale (gavage par 0,028 à 28 mg d'uranium.kg⁻¹ poids.jour⁻¹) (Domingo *et al.*, 1989). Dans cette étude, des décès ont été enregistrés chez les femelles et attribués à l'uranium. A l'inverse, aucun changement de poids corporel ou de consommation alimentaire n'a été noté. La viabilité des nouveaux-nés (baisse de la taille des portées, de la viabilité et de lactation) a été affectée. La même équipe a évalué les effets sur la reproduction, la gestation et la survie postnatale chez la Souris après contamination chronique (2 à 14 mg d'uranium.kg⁻¹ poids.jour⁻¹ via l'eau de boisson) (Paternain *et al.*, 1989). L'exposition des femelles était maintenue jusqu'au sevrage des portées. Aucun effet sur l'accouplement ou la fertilité n'a été observé. Pour les doses élevées, la létalité chez les nouveaux-nés a augmenté. Pour la dose la plus élevée, le nombre de foetus vivants, la croissance et le développement des nouveau-nés ont été considérablement affectés.

Enfin, Llobet *et al.* ont rapporté des altérations des cellules de Leydig (cellules de soutien dans les testicules) chez des souris mâles (ingestion d'uranium par eau de boisson pendant 64 jours, à des doses de 5,6 à 44,8 mg d'uranium.kg⁻¹ poids.jour⁻¹) (Llobet *et al.*, 1991).

I.1.5.2.5. Effets mutagènes, génotoxiques (pour revue ATSDR 1999 et Craft *et al.* 2004).

Des aberrations chromosomiques ont été observées dans des cellules germinales de souris mâles exposées à du fluorure d'uranyle. Toutefois, dans cette étude, la radioactivité du composé utilisé semble pouvoir être mise en cause (Hu and Zhu, 1990).

Lin *et al.*, ont rapporté que le nitrate d'uranyle avait eu *in vitro* des effets cytotoxiques (baisse de la viabilité cellulaire, ralentissement du cycle cellulaire) et génotoxiques (augmentation du nombre de micronoyaux, d'échanges de chromatides soeurs et d'aberrations chromosomiques) sur des cellules d'ovaires de hamsters chinois (Lin *et al.*, 1993). Une relation dose-effet a été mise en évidence pour des concentrations allant de 0,01 à 0,3 mmol.L⁻¹. Les effets génotoxiques observés seraient attribuables à la liaison de l'uranium aux groupements phosphate de l'ADN (Lin *et al.*, 1993).

Plus récemment, Miller *et al.* ont démontré *in vitro* que l'uranium appauvri augmentait le taux d'aberrations chromosomiques et le nombre de micronoyaux dans des cellules d'ostéoblastes

humains immortalisés (exposition de 24h, à $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'UA)(Miller *et al.*, 2002b; Miller *et al.*, 2003). A quantité égale et pour différentes compositions isotopiques d'uranium, ces auteurs ont aussi montré que l'augmentation de l'activité spécifique de l'uranium était corrélée à une augmentation de la fréquence de transformation néoplasique, suggérant un rôle possible de la faible radioactivité de l'uranium appauvri dans l'apparition d'effets biologiques et génotoxiques, au moins *in vitro* (Miller *et al.*, 2002b).

Pour les études sur l'Homme, des échanges de chromatides soeurs ainsi que des aberrations chromosomiques ont aussi été mis en évidence *in vitro* sur des cultures de lymphocytes circulants issus de travailleurs du cycle du combustible (Martin *et al.*, 1991).

I.1.5.2.6. Effets carcinogènes (pour revue ATSDR 1999 et Craft 2004).

Les preuves expérimentales de la carcinogénicité de l'uranium se limitent à des composés d'uranium très insolubles (rétention plus longue dans l'organisme) ou enrichis administrés par inhalation ou par injection (Batchelor *et al.*, 1980; Hu and Zhu, 1990). Toutefois, jusqu'à présent, aucun effet carcinogène n'a été mis en évidence après ingestion ou blessure, quelle que soit la composition d'uranium utilisée (ATSDR, 1999; Craft *et al.*, 2004).

Pourtant, des études américaines ont mis en évidence *in vitro* que l'UA pouvait transformer des cellules ostéoblastiques humaines en cellules cancéreuses (croissance indéfinie, formation de tumeur si greffe animale, production d'oncogènes et baisse des protéines suppressives de tumeur, échanges de chromatides sœurs) (Miller *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2002a; Miller *et al.*, 2002b; Miller, 2004). Le risque cancérigène mesuré serait aussi élevé que celui d'autres métaux lourds reconnus cancérogènes, comme le nickel (Miller *et al.*, 2002b).

I.1.5.2.7. Autres effets répertoriés.

Des atteintes des systèmes cardiovasculaire et hématopoïétique (Gilman *et al.*, 1998a; Gilman *et al.*, 1998b), du système immunitaire, des yeux, du foie (Pasanen *et al.*, 1995; Gilman *et al.*, 1998c), de la thyroïde (Gilman *et al.*, 1998a-c) et des glandes surrénales ont aussi été rapportées dans diverses études dispersées (ATSDR, 1999; Craft *et al.*, 2004).

I.1.5.3. Toxicité radiologique de l'uranium :

La radiotoxicité de l'uranium semble se cantonner aux poumons et aux os, probablement en raison d'une rétention plus longue dans ces organes et de la décroissance atomique de l'uranium en radon et autres radio-isotopes avec émission de rayonnements ionisants (irradiation locale interne) (Leach *et al.*, 1973; Ubios *et al.*, 1991). En effet, comme tout émetteur de rayonnements ionisants, l'uranium est capable de provoquer des lésions de l'ADN qui dans certains cas (absence de réparation et de processus de mort cellulaire) peuvent aboutir à la formation de mutations à l'origine des cancers (Roscoe, 1997; Hornung *et al.*, 1998; Tirmarche *et al.*, 2004).

Lors d'inhalation, les composés d'uranium insolubles persistent dans le système respiratoire et peuvent être responsables d'une irradiation locale et interne des poumons (Leach *et al.*, 1973)). Dans les poumons, l'action radiotoxique de l'uranium serait avant tout carcinogène : la formation de fibroses pulmonaires et la transformation néoplasique sont les deux effets les plus connus à long terme (Leach *et al.*, 1973). Cependant, dans le cas concret d'exposition du travailleur, la présence concomitante d'uranium et de radon (gaz radioactif et radiotoxique, issu de la chaîne de décroissance de l'uranium) rend difficile l'identification d'un lien de causalité unique dans la survenue de cancer, lors d'exposition à l'uranium (Roscoe, 1997; Hornung *et al.*, 1998; Tirmarche *et al.*, 2004).

Même si ces observations ne semblent pas pertinentes dans le cas de l'ingestion d'uranium naturel, les risques découlant de l'exposition au radium ^{226}Ra (cancer des os radio-induits en raison d'une accumulation osseuse) incitent la communauté scientifique à considérer le risque connexe pour l'uranium (radioactivité naturelle et tropisme naturel pour le tissu osseux) d'induction de cancer des os. Pour différentes compositions isotopiques d'uranium et à quantité égale d'exposition, Miller *et al.* ont démontré *in vitro* que l'augmentation de l'activité spécifique de l'uranium était corrélée à une augmentation de la fréquence de transformation néoplasique dans des cellules d'ostéoblastes humains immortalisés. Les auteurs soulignent le rôle potentiel de la faible radioactivité de l'uranium appauvri dans l'apparition d'effets génotoxiques et carcinogènes, au moins *in vitro* (Miller *et al.*, 2002b).

Tableau n°04. Synthèse des valeurs relatives à la toxicité de l'uranium

	Homme	Rat
Taux de transfert intestinal	0,1 à 4% (Limson Zamora <i>et al.</i> 1998)	0,01 à 0,07 % (Wrenn <i>et al.</i> 1985)
NOAEL (reins)	0,1 à 0,3 mg d'U/kg (Hodge <i>et al.</i> 1973)	
LOAEL (reins)		0,06 mg d'U/kg/jour (Gillman <i>et al.</i> 1998c)
Seuil de toxicité rénal	Au dessus de 0,12µg d'U excrété dans les urines /jour et 0,003 mg d'U/g de rein (Diamond <i>et al.</i> , 1989)	0,0012 mg d'U/g de rein (Diamond <i>et al.</i> 1989)
DL 50 (à 14 Jours)	1 à 2 mg/kg en ingestion (calcul)	204 mg/kg en ingestion (Domingo <i>et al.</i> 1987)
Limite d'ingestion	0,001à 0,003 mg d'U/kg/jour (ATSDR, 1999; US-EPA, 2000)	

I.1.6. EFFETS TOXIQUES D'UNE INGESTION CHRONIQUE D'URANIUM

I.1.6.1. Etudes sur l'Homme (épidémiologiques et expérimentales) (cf. tableau 05) :

Très peu de données existent pour évaluer et mesurer le risque sanitaire que représente l'exposition chronique des êtres humains à l'uranium naturellement présent dans l'environnement, malgré un risque chimique pour les reins reconnu aussi bien pour les modèles animaux expérimentaux que les êtres humains contaminés (Hodge *et al.*, 1973; Hursh and Spoor, 1973).

Moss *et al.* ont montré chez des personnes consommant l'eau de leurs puits (jusqu'à 0,7 mg d'uranium.L⁻¹) une augmentation de la β_2 -microglobuline dans les urines, signe d'une altération des tubules proximaux (Moss *et al.*, 1983). Quelques années plus tard, Mao *et al.* ont démontré qu'il existait une corrélation statistique entre la présence d'uranium dans les urines et une augmentation de l'albumine dans les urines, autre signe d'altération des tubules proximaux (Mao *et al.*, 1995). Limson Zamora *et al.* ont montré que l'augmentation de la teneur en uranium dans l'eau potable pouvait être corrélée à des signes d'atteinte rénale et plus particulièrement d'altération des tubules proximaux (Limson Zamora *et al.*, 1998). Toutefois, dans ces études, les reins ne présentaient pas de dysfonctionnements graves (Moss *et al.*, 1983; Mao *et al.*, 1995; Limson Zamora *et al.*, 1998).

Récemment des auteurs ont évalué les effets chimiques des ingestions chroniques sur le second tissu d'accumulation de l'uranium : l'os. Kurttio *et al.* ont démontré, pour les participants masculins, des indications de corrélation (non significative) entre la résorption du tissu osseux et le taux d'uranium dans l'eau potable. La tendance n'existait pas dans la cohorte féminine (Kurttio *et al.*, 2005).

Enfin, d'autres auteurs se sont intéressés aux effets de l'ingestion chronique d'uranium naturel via l'eau de boisson sur la prévalence des cancers. Auvinen *et al.* ont rapporté ne pas avoir constaté d'augmentation du risque de leucémies ou de cancer de l'estomac (Auvinen *et al.*, 2002; Auvinen *et al.*, 2005).

I.1.6.2. Etudes expérimentales - partie A - (cf. tableau 06) :

Lors de contaminations chroniques par ingestion d'uranium contenu dans l'eau potable pendant 4 semaines (1,1 à 9,0 mg d'U.kg poids⁻¹.jour⁻¹), des rats mâles Sprague-Dawley ont manifesté diverses altérations biochimiques en liaison avec la fonction rénale (glucose, protéines totales, GOT et GPT modifiés ; mais créatinine, albumine, β_2 -microglobuline inchangés) et les constantes hématologiques (hématocrite, taux d'hémoglobine, taux d'hématie) pour la dose la plus élevée (Ortega *et al.*, 1989).

De même, chez des rats mâles et femelles Sprague-Dawley contaminés pendant 91 jours par ingestion de nitrate d'uranyle hexahydraté à des concentrations allant de 0,96 à 600 mg/L (Gilman *et al.*, 1998c), des lésions histopathologiques ont été identifiées dans le foie, la thyroïde et les reins (tubules proximaux), mais pas dans le cerveau. Chez les mâles comme chez les femelles, les lésions

rénales étaient présentes à toutes les doses étudiées. Aucun effet sur les paramètres hématologiques ou biochimiques n'a été noté. Une différence de sensibilité entre les mâles (plus sensibles) et les femelles (plus résistantes) a été constatée mais reste inexpliquée. Une étude complémentaire sur des lapins « New Zealand », à des concentrations équivalentes et pour la même durée, a apporté des résultats identiques (Gilman *et al.*, 1998a). De plus, pour ce modèle animal, une relation dose–effet a pu être mise en évidence concernant les lésions affectant les tubules contournés proximaux.

Plus récemment, des auteurs ont évalué les effets de la radiotoxicité de l'uranium sur le tissu osseux après 60 jours de contamination chronique. Pour les doses élevées (20 et 100mg/kg d'aliments), du sang a été retrouvé dans les urines, démontrant une atteinte grave des reins (Arruda-Neto *et al.*, 2004). Hormis pour les doses les plus faibles (0,5 et 2mg/kg d'aliments), les auteurs suggèrent que les cellules osseuses subiraient des dommages dus à la radiotoxicité de l'uranium.

Résumé de la toxicité « immédiate » de l'uranium	
Toxicité aiguë :	reins
Toxicité sub-chronique :	reins
Toxicité chronique :	reins + poumons et os dans le cas de composés enrichis en ²³⁵ U ou insolubles

Tableau n°05. Synthèse des expositions chroniques humaines environnementales

Effets Observés / Mesurés	Exposition	Référence bibliographique
Reins	Jusqu'à 0,7 mg/L (source privée)	Moss et al. 1983
Reins (mesure d'un indicateur = albumine)	70 habitants de 3 localités canadiennes : 0,71µg d'U/L comparé avec 14,7 et 19,6 µg d'U/L (puits privés)	Mao et al. 1995
Reins	50 personnes : 2 à 781 µg d'U/L (puits privés) ou < 1µg d'U/L (adduction publique)	Zamora et al. 1998
Reins (fonction tubulaire)	325 personnes finlandaises : 6 à 1920 µg d'U/L moyenne à 28µg/L	Kurttio et al. 2002
Rétention d'U	105 personnes : 620µg d'U/L	(Orloff <i>et al.</i> , 2004)
Biocinétique : Absorption / rétention / taux de transfert intestinal	205 personnes finlandaises : 0,02 à 1600 µg d'U/L	(Karpas <i>et al.</i> , 1998)}
Risque de leucémie	Cohorte de 144627 personnes finlandaises : 0,27 à 0,45 Bq/L	Auvinen et al. 2002
Risque de cancer de l'estomac	Cohorte de 144627 personnes finlandaises : 0,27 à 0,45 Bq/L	Auvinen et al. 2005
Os	288 personnes finlandaises : 0,001 à 1920 µg d'U/L moyenne à 28µ/L pendant 13 ans	(Kurttio <i>et al.</i> , 2005)

Tableau n°06. Synthèse des expositions chroniques expérimentales chez l'animal

Effets Observés / Mesurés	Exposition	Référence bibliographique
Etude exhaustive (ensemble des fonctions physiologiques et organes)	Diverses espèces, doses et durées	Maynard et al. 1949
Etude globale (reins, hématologie, biocinétique, biochimie, foie, thyroïde, cerveau,...)	0,96 à 600 mg/L (nitrate d'uranyle hexahydraté) pendant 28 ou 91 jours soit 0,06 à 36,73 mg d'U/kg poids/jour chez les mâles et 0,09 à 53,56 mg d'U/kg de poids/jour chez les femelles (rat et lapin)	Gilman 1998 a, b, c
Reproduction	2 à 14 mg d'U/kgs/jour pendant 60 jours (rat)	Paternain et al 1989
Reproduction	5,6 à 44,8 mg d'U/kg/jour pendant 64 jrs (rat)	Llobet et al. 1991
Biocinétique : Absorption / rétention / calcul de taux de transfert intestinal	0,96 à 600 mg/L pendant 28 ou 91 jours (rat)	(Tracy <i>et al.</i> , 1992)
Reins / hématologie / biocinétique d'accumulation	2 à 16 mg/kg/jour (éthanoate d'uranium dihydraté) pendant 4 semaines soit 1,1 à 9,0 mg d'U/kg poids/ jour (rat)	Ortega et al. 1989
Génome du Rein	80 et 160 mg/L pendant 4 mois (souris)	Taulan et al. 2004
Os (évaluation de la radiotoxicité)	0,5 à 100mg/kg de nourriture (nitrate d'uranyle) pendant 60 jours soit 0,24 à 47,4 mg d'U/kg de nourriture (rat)	Arruda-netto et al. 2004

I.1.6.3. Etudes expérimentales - partie B - (programme de recherche ENVIRHOM) :

Les résultats présentés ci-dessous sont une synthèse des données expérimentales qui ont pu être acquises dans le cadre d'un programme de recherche de l'IRSN (ENVIRHOM) auquel appartient ce sujet de thèse et qui avait pour but d'évaluer la bioaccumulation de l'uranium et ses conséquences biologiques sur différents organes ou systèmes après ingestion chronique.

Les études menées au laboratoire de radiotoxicologie expérimentale (LRTOX) de l'IRSN, au cours de ces trois dernières années, ont mis en évidence que parmi les différentes parties du tractus gastro-intestinal, l'intestin grêle était le principal site d'absorption de l'uranium et de transfert depuis le bol alimentaire vers les organes internes (Dublineau *et al.*, 2005) (cf. figure 03). Sur un plan histologique, l'épithélium intestinal serait le lieu de passage de l'uranium vers le compartiment sanguin alors que les plaques de Peyer² constitueraient un réservoir d'uranium, après une ingestion chronique d'uranium (nitrate d'uranyle dilué à 40mg d'U.L⁻¹ d'eau de boisson, pendant 1, 3, 6 ou 9 mois) (*communication personnelle I. Dublineau*).

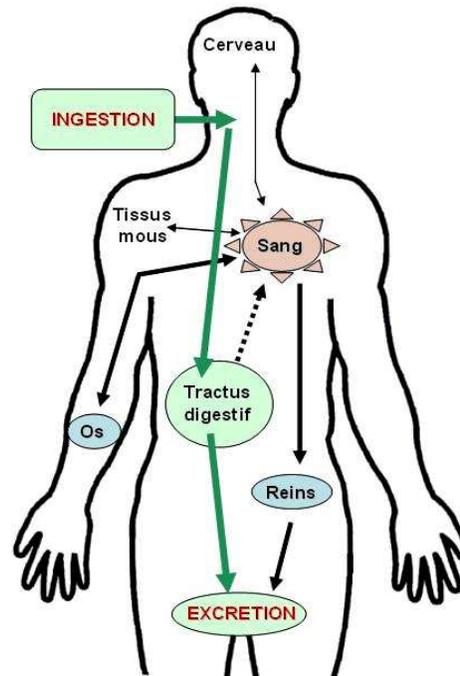
Une fois dans l'organisme, la teneur en uranium des différents organes évolue avec la durée de la contamination chronique et ne suit pas une augmentation graduelle dans le temps, avec pallier de saturation, comme il avait été présumé dans les modèles de la Commission Internationale de Protection Radiologique (ICRP, 1995). Les études biocinétiques ont par ailleurs mis en évidence une accumulation d'uranium dans des tissus non reconnus jusqu'alors dans les modèles : le cerveau et les dents (Paquet *et al.*, 2005). Au sein du programme ENVIRHOM, considérant les concentrations d'uranium utilisées (40mg.L⁻¹ soit 1mg.jour⁻¹.rat⁻¹, valeur très modérée par rapport à la littérature), il est probable que l'uranium soit présent dans les tissus sous une forme soluble. En effet, aucune forme de précipité connu (*c-à-d.* les aiguilles de phosphate d'uranium, (Galle, 1974; Galle and Berry, 1980; Carrière *et al.*, 2005)) n'a pu être mise en évidence lors d'une étude approfondie de micro-localisation de l'uranium dans le rein (microscopie électronique couplé à une détection X). Toutefois une présence diffuse d'uranium a été détectée par analyse SIMS (analyse par spectrométrie de masse d'ions secondaires) (Amaral *et al.*, 1998), au moins dans le rein (*communication personnelle, M. Claraz*).

Même lors d'exposition chronique modérée, les tubules contournés proximaux des systèmes tubulaires rénaux restent une cible privilégiée des effets de l'uranium (Taulan, 2004). Ces altérations se caractérisent par la présence de débris cellulaires dans la lumière tubulaire, une augmentation du nombre de vésicules intra-cytoplasmiques et une augmentation, graduelle avec la durée d'exposition, d'inclusions d'oxydes ferriques (*communication personnelle, M. Claraz et al.*). Au niveau moléculaire, une étude globale du génome a mis en évidence que les profils génétiques des cellules rénales des animaux contaminés étaient altérés (Taulan *et al.*, 2004 b).

² Plaques de Peyer : follicules lymphoïdes impliqués dans la fonction immunitaire de l'intestin.

Figure n°03. Schéma de transfert de l'uranium après ingestion. L'uranium est transféré depuis la porte d'entrée (intestin grêle) jusqu'aux différents tissus de l'organisme par la circulation sanguine.

(illustration adaptée de Craft *et al.* 2004)



L'ingestion chronique d'uranium sur une période de 48 jours affecte également le système reproducteur chez la souris femelle ; la morphologie des ovocytes (espace péri-vitellin, globule polaire et vitellus) est perturbée. Une relation dose-effet a aussi été constatée pour le taux d'apoptose des cellules du cumulus oophorus (*communication personnelle, M.S. Kundt et al.*).

Par ailleurs, l'uranium semble aussi altérer le métabolisme des xénobiotiques dans le foie, les reins et le cerveau et plus particulièrement les cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des médicaments (Souidi *et al.*, 2005).

Enfin, une contamination chronique par ingestion d'uranium affecte le métabolisme de la vitamine D3 et du cholestérol dans le foie et les reins (*communication personnelle, M. Souidi, E. Tissandié et al.*).

Avant de parcourir les connaissances scientifiques relatives aux effets de l'intoxication à l'uranium sur le système nerveux, nous allons procéder à un bref rappel de la physiologie du système nerveux central en particulier celle de certains systèmes de neurotransmission afin de mieux cerner les objectifs des travaux présentés dans ce manuscrit.

I.2. Le Système Nerveux Central

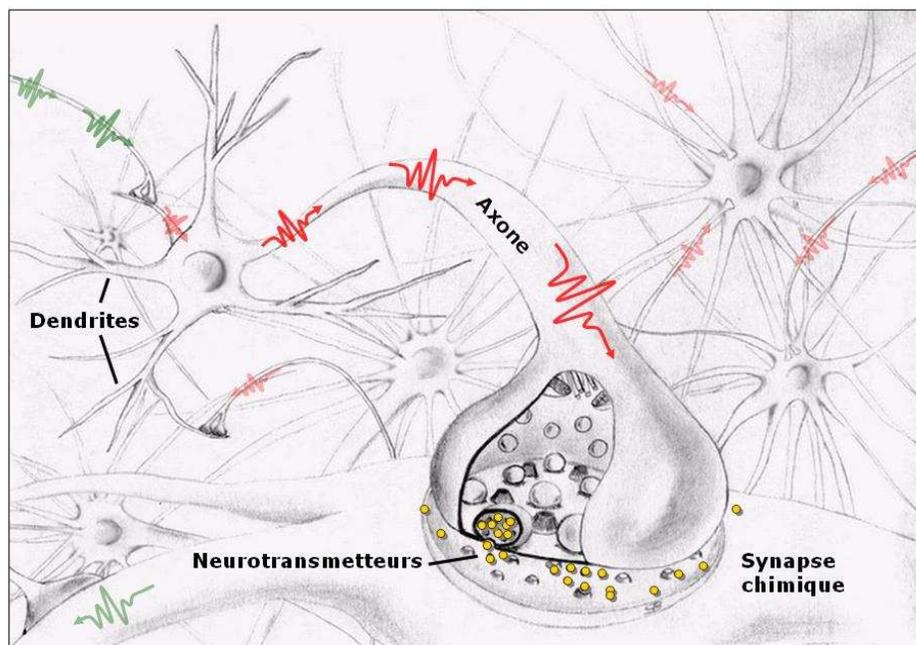
I.2.1. PRESENTATION GENERALE

Le système nerveux central (SNC) régule et contrôle l'ensemble des activités du corps par l'intermédiaire de messages nerveux. Il relaie les informations nerveuses entre le cerveau et la périphérie de l'organisme. Il se caractérise aussi par une structure cavitaire contenant le liquide céphalo-rachidien (LCR ou liquide cérébro-spinal) qui s'étend de la moelle (canal de l'épendyme) aux ventricules cérébraux.

La fonctionnalité de ce grand système physiologique, au carrefour de tous les autres systèmes, repose sur un type cellulaire hautement spécialisé : le neurone. La principale fonction des neurones est de recevoir, traiter et transmettre des informations au sein d'un réseau de cellules qui s'articulent les unes avec les autres (cf. figure 04). En pratique, les neurones, cellules polarisées, reçoivent un signal électrique au niveau des zones de réception (dendrites et corps cellulaires ou soma) et propagent ce message nerveux vers l'extrémité d'un prolongement : l'axone. L'information nerveuse est alors transmise à la cellule adjacente au travers d'une jonction intercellulaire spécialisée, appelée synapse, sous la forme d'un signal chimique. Les neurotransmetteurs sont les molécules chimiques informationnelles support de ce message nerveux : ils assurent le relais et la transmission du message au travers de la synapse.

Figure n°04. Représentation schématique de l'interconnexion neuronale.

Le potentiel d'action arrive par les dendrites et se propage jusqu'à la synapse suivante par l'axone.



La transmission synaptique chimique est le modèle de neurotransmission le plus fréquent, mais des synapses électriques existent également. Au sein de ces synapses, le message nerveux est conduit sous la forme d'un influx électrique qui se propage d'un neurone à l'autre, sans l'intermédiaire d'un relais chimique.

D'autres cellules constituent le tissu cérébral : les cellules gliales (cf. figure 05). L'ensemble de ces cellules participe à la protection et la régulation de la fonction neuronale. Parmi celles-ci, différents types existent :

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

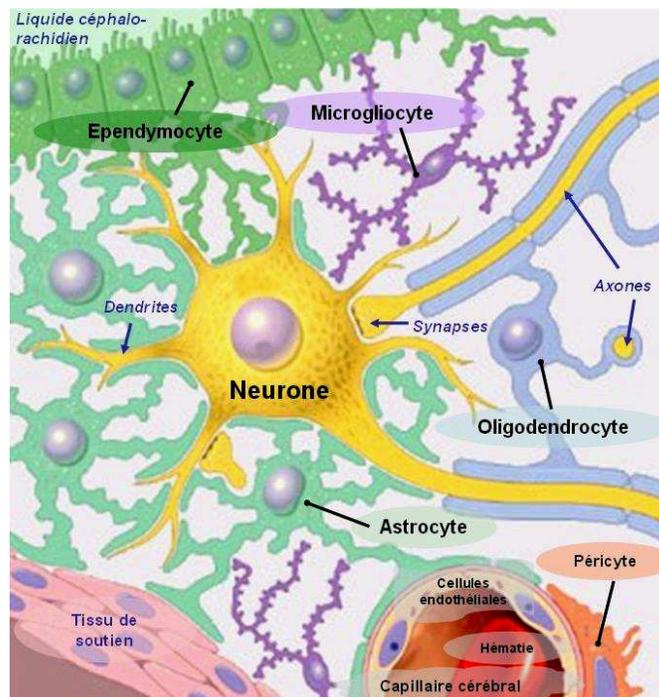
(ii) Les **oligodendrocytes**, en contact avec les prolongements axonaux ; ils assurent la conduction de l'influx électrique ;

(iii) Les **microgliaires**, sortes de macrophages du SNC ;

(iv) et enfin, les **épendymocytes** qui constituent l'épithélium des cavités liquidiennes cérébrales et sont responsables de la synthèse du liquide céphalo-rachidien.

Figure n°05. Représentation schématique du parenchyme cellulaire cérébral. Les neurones sont entourés de cellules gliales, parmi lesquelles les astrocytes constituent un partenaire privilégié dans la régulation de la fonction neuronale.

(adaptation du dessin de J.A. Perkins, consultable sur www.netterimages.com)



I.2.2. LA SYNAPSE CHIMIQUE ET LES NEUROTRANSMETTEURS

Sources documentaires:

- Bellen, 1999 : Neurotransmitters release.
- Friede, 1966 : Topographic brain chemistry.
- Von Böhlen und Halbach and Dermitzel, 2002 : Neurotransmitters and neuromodulators, Hanbook of receptors and biological effects.

I.2.2.1. Organisation de la synapse chimique :

La synapse chimique est un espace intercellulaire étroit (20 à 50 nm) et fonctionnalisé, par lequel l'axone d'un neurone s'articule avec un dendrite d'un autre neurone. La synapse se décompose en trois éléments : l'élément présynaptique, la fente synaptique et l'élément post-synaptique.

L'élément présynaptique se caractérise par la présence intracytoplasmique de nombreuses mitochondries et de vésicules qui stockent les neuromédiateurs. A la face interne de la membrane présynaptique, le cytosquelette s'organise de telle sorte qu'il facilite l'exocytose des vésicules synaptiques.

L'élément post-synaptique se distingue par la présence de nombreux récepteurs de nature protéique enchâssés dans sa membrane. Le cytosquelette qui sous-tend cette membrane est lui aussi organisé de façon particulière pour permettre la transmission unidirectionnelle du message nerveux.

I.2.2.2. Biochimie de la transmission synaptique : (cf. figure 07)

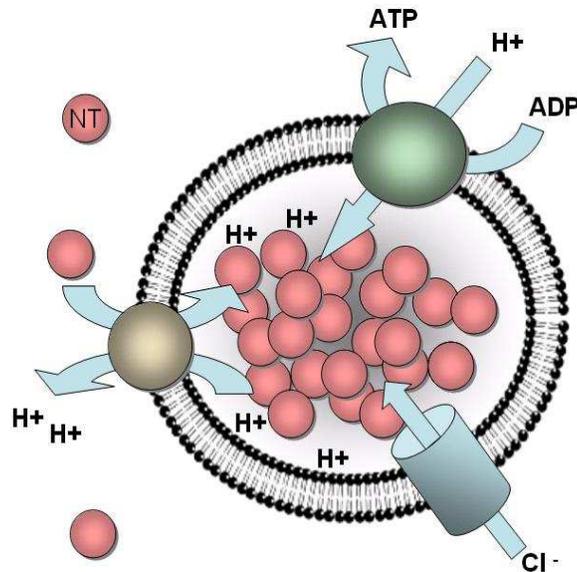
Un neuromédiateur ou neurotransmetteur est une substance chimique de nature variable sécrétée par un neurone et reconnue par des récepteurs présents sur le neurone distal. Comme l'indique son nom, sa fonction principale est de relayer le message nerveux au niveau de la synapse.

La **synthèse** de ces médiateurs chimiques prend place, le plus souvent, dans le cytoplasme des terminaisons axonales. Pour les monoamines et l'acétylcholine, les neurotransmetteurs sont ensuite **accumulés** dans des vésicules synaptiques grâce à une externalisation de protons (cf. figure 06) (deux protons contre une molécule de neurotransmetteur et jusqu'à 10000 molécules par vésicules, (Nguyen *et al.*, 1998)), concentrés au préalable dans ces vésicules par un système de pompe ATPase magnésium dépendante, régulée par le taux d'ions chlorures (Clarkson *et al.*, 1993; Parsons *et al.*, 1993).

La sécrétion ou **libération** de neurotransmetteurs est consécutive à l'arrivée d'un influx électrique nerveux (potentiel d'action) jusqu'à la terminaison axonale pré-synaptique qui provoque une entrée massive d'ions calcium par des canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée d'ions calcium induit l'exocytose de vésicules synaptiques contenant les neuromédiateurs par fusion avec la membrane présynaptique dans une zone privilégiée (zone active). La libération de neurotransmetteurs

dans la synapse ainsi que la synthèse des neuromédiateurs peuvent aussi être régulées par des auto-récepteurs présents à la surface présynaptique.

Figure n°06. Représentation schématique de la concentration vésiculaire des neurotransmetteurs (NT). Les neurotransmetteurs sont concentrés à l'intérieur de vésicules par des processus actifs qui engagent des mouvements d'ions et des systèmes ATP dépendants.



Une fois libérés dans l'espace interneuronal (ou fente synaptique), les neuromédiateurs peuvent se fixer à des **récepteurs** de nature protéique qui leurs sont spécifiques (protéine canal ou protéine liée à des protéines G). La liaison au récepteur change la conformation tridimensionnelle du récepteur, ce qui modifie la perméabilité ionique de la membrane post-synaptique et déclenche le processus post-synaptique. Selon le nombre de récepteurs par unité de surface, et le nombre de liaison neuromédiateur-récepteur, cette fixation entraîne ou non une dépolarisation de la membrane post-synaptique par modification des concentrations ioniques intra-cytoplasmiques. Cette dépolarisation est le point de départ de la propagation d'un nouveau potentiel d'action.

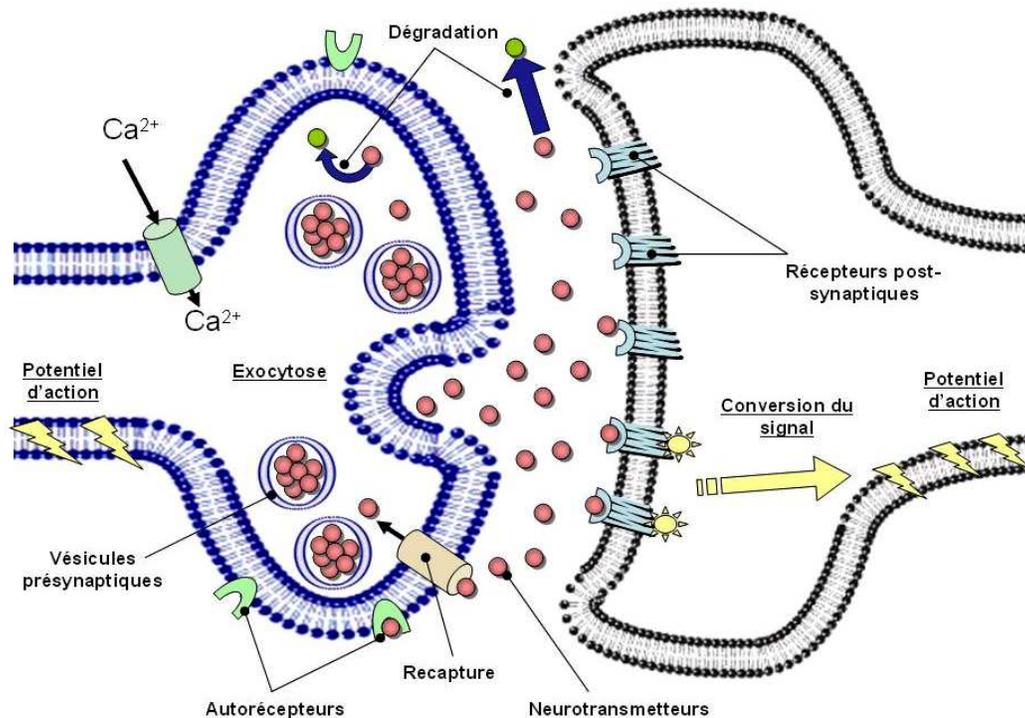
Dans le même temps, les complexes neurotransmetteurs-récepteurs sont **dégradés** au fur et à mesure de leur fabrication, par recyclage de la membrane post-synaptique.

Dans la fente synaptique, les neuromédiateurs libérés peuvent être **re-capturés** par le neurone présynaptique au moyen de processus actifs engageant des transporteurs spécifiques des neurotransmetteurs (p.ex. systèmes dépendants de flux Na^+/Cl^- pour la dopamine, Iversen and Snyder, 1968) puis dégradés ou restockés en interne. Ou bien ils peuvent être **dégradés** dans l'espace synaptique par des enzymes spécifiques.

L'ensemble des processus dynamiques (synthèse, libération, recapture, dégradation) qui contribuent au renouvellement du pool de neurotransmetteurs constitue le **turn-over** du neurotransmetteur. Ce renouvellement peut être évalué en réalisant le produit mathématique de la quantité de métabolites sur la quantité de neurotransmetteurs.

Figure n°07. Schéma du principe de la neurotransmission.

L'arrivée d'un potentiel d'action déclenche l'exocytose des vésicules pré-synaptiques. Après diffusion dans la fente synaptique, les neurotransmetteurs peuvent se fixer à des récepteurs spécifiques. La fixation déclenche le processus post-synaptique de transduction du signal.

**I.2.2.3. Transmission synaptique mono-aminergique :**

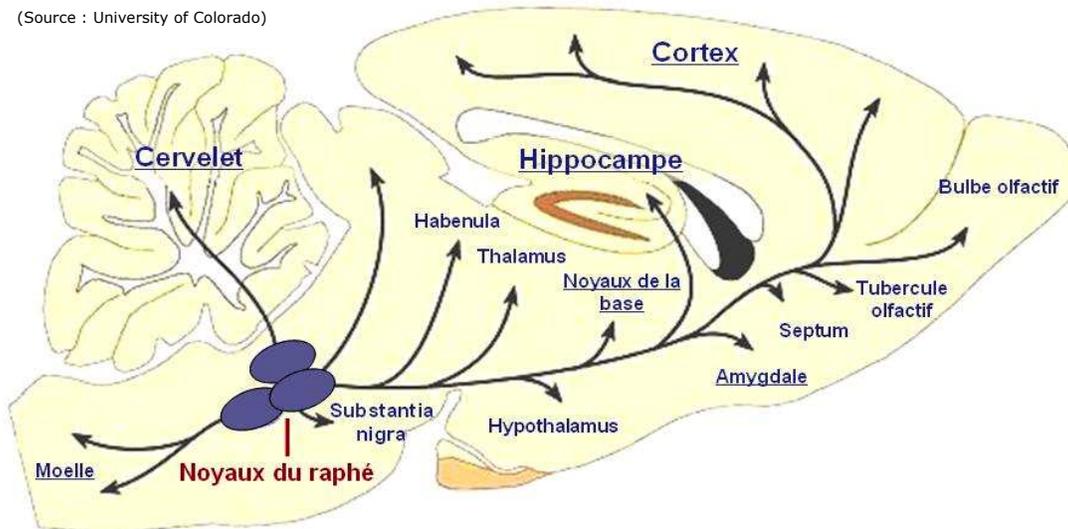
Les deux systèmes de neurotransmetteurs **dopaminergique et sérotoninergique** présentés ci-dessous se classent par leur nature chimique dans les amines biogènes (indol-amines ou monoamines).

I.2.2.3.1. La neurotransmission sérotoninergique : neurones à sérotonine.

I.2.2.3.1.1. Localisation des neurones : les techniques d'histochimie par fluorescence, d'immuno-histochimie et d'autoradiographie ont permis d'établir des cartes de localisation cérébrale des différents neurones sérotoninergiques (5HTergique) (cf. figure 08). Neufs faisceaux de neurones qui prennent naissance au niveau de noyaux appelés noyaux du raphé, peuvent être distingués (B1 à B9). Ils se localisent tous dans le plan sagittal du tronc cérébral. L'innervation 5HTergique est très diffuse dans le SNC : les terminaisons 5HTergiques se localisent un peu partout mais en densité relativement faible. Les plus fortes densités sont présentes dans le cortex, l'hippocampe, l'amygdale, les ganglions de la base, le noyau géniculé latéral, le noyau supra-chiasmatique, la *substantia gelatina* et dans la corne antérieure de la moelle.

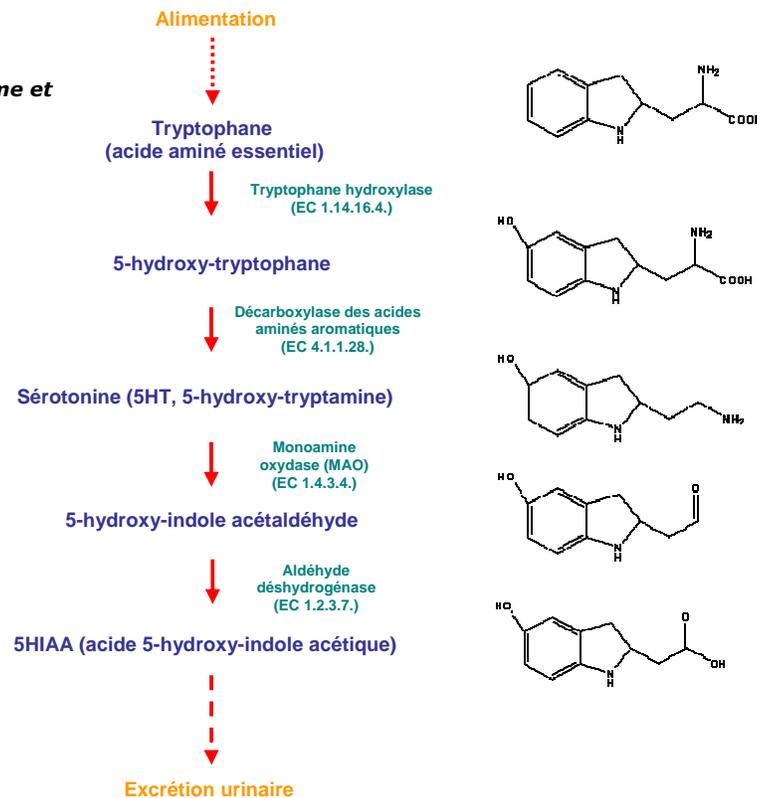
Figure n°08. Schéma de la distribution des principaux neurones sérotoninergiques chez le rat.

(Source : University of Colorado)



I.2.2.3.1.2. Anabolisme : la sérotonine est le produit final d'une chaîne de réaction enzymatique qui engage un précurseur provenant de l'alimentation : le tryptophane qui est un acide aminé (a.a.) essentiel (cf. figure 09). Cet a.a. circule dans le sang, passe la barrière hémato-encéphalique et parvient jusqu'aux terminaisons axonales des neurones. La concentration sanguine en tryptophane dans le sang et donc sa disponibilité, seront les facteurs limitants de la synthèse de sérotonine. Le tryptophane passe la barrière hémato-encéphalique par un processus actif de transport des acides aminés : le tryptophane entre alors en compétition avec d'autres a.a. comme la leucine, la lysine ou la méthionine. De plus, l'entrée du tryptophane dans les terminaisons axonales est aussi dépendante d'un processus de transport actif spécifique des a.a. neutres (compétition avec la phénylalanine). En présence d'oxygène moléculaire et de tétrahydroptérine (donneur de protons), le tryptophane est converti en 5-hydroxytryptophane (5HTP) par la tryptophane hydroxylase. Cette enzyme est spécifique des neurones 5HTergiques (permet la localisation anatomique des noyaux) à l'inverse de la décarboxylase des acides aminés qui transforme le 5HTP en sérotonine (5HT) et intervient aussi dans la biosynthèse de la dopamine.

Figure n°09.
Métabolisme de la
sérotonine : anabolisme et
catabolisme.



I.2.2.3.1.3. Fixation : différents types de récepteurs de la sérotonine ont été identifiés : 5HT1 (1A, 1B, 1D, 1E, 1F, 1P et 1S), 5HT2, 5HT3, 5HT4, 5HT6 et 5HT7. Tous ces récepteurs, hormis 5HT3 (récepteurs-protéines canal Na^+/K^+), sont couplés à des protéines G et peuvent donc agir négativement ou positivement sur l'adénylate cyclase.

Les récepteurs 5HT1 (1A, 1B, 1D, 1E, 1F, 1P, 1S) inhibent l'entrée de potassium et conduisent à la fermeture des canaux calciques. Les récepteurs 5HT1A ont été classés dans la catégorie des autorécepteurs. Les récepteurs 5HT1B, 1E, 1F sont couplés négativement à l'adénylate cyclase. Les récepteurs 5HT2 (A, B et C) sont excitateurs et couplés aux phospholipases C. Les récepteurs 5HT3 sont des protéines canaux, ils sont excitateurs et ne sont exprimés que dans les neurones de l'*area postrema*, le cortex entorhinal et l'amygdale. Les récepteurs 5HT5 sont exprimés dans le cortex, le bulbe olfactif, l'hippocampe, le cervelet et l'*habenula* ; les récepteurs 5HT6 sont présents dans le cortex, l'hippocampe, le striatum, l'amygdale, le noyau *accumbens*, et le tubercule olfactif ; enfin les 5HT7 ont été retrouvés dans le cortex, l'hippocampe, le septum, le thalamus, l'hippocampe, l'amygdale et les *colliculi* supérieurs.

I.2.2.3.1.4. Catabolisme : l'inactivation de la sérotonine commence par sa re-capture depuis la fente synaptique. Cette capture engage un transporteur dépendant d'un gradient entrant de sodium et sortant de potassium. La seconde étape consiste en la dégradation enzymatique de la 5HT par la monoamine-oxydase de type A (MAO-A) couplée à l'aldéhyde déshydrogénase, enzyme présente à la

face externe des mitochondries. A notre connaissance, il n'existe pas de catabolisme dans la fente synaptique. Son produit de dégradation, le 5HIAA, est éliminé dans les urines après passage dans le LCR.

I.2.2.3.1.5. Action / rôle : en raison de la grande variété de ses récepteurs, les fonctions biologiques du système 5HTergique sont très variées. La sérotonine intervient dans les processus de mémoire, d'apprentissage, de comportement sexuel et de comportement alimentaire. Ce neuromédiateur régule aussi le comportement d'agressivité, l'état émotionnel, la nociception ou le sommeil. Le neurotransmetteur 5HTergique agit sur le complexe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, notamment sur les taux de corticostérone, d'adréno-corticotropine et corticotropine. Toutefois, cette action est encore mal connue. La 5HT agirait également sur le taux de prolactine et de gonadotropines.

L'altération des neurones 5HTergiques provoque anxiété, désordre affectif (humeur), désordre alimentaire, désordre du sommeil, migraine, dépression (baisse du taux de sérotonine) ou encore phobie (hausse du taux de sérotonine) (Meltzer *et al.*, 1998). Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la dégénérescence des neurones 5HTergiques et la baisse de la densité des récepteurs 5HT1A et 5HT2A dans le cortex ont été mises en évidence (Celada *et al.*, 2004). Une baisse de la densité en récepteurs 5HT1D dans la *substantia nigra* a été observée dans la chorée de Huntington (cf. tableau 07).

I.2.2.3.2. La neurotransmission dopaminergique : neurones à dopamine.

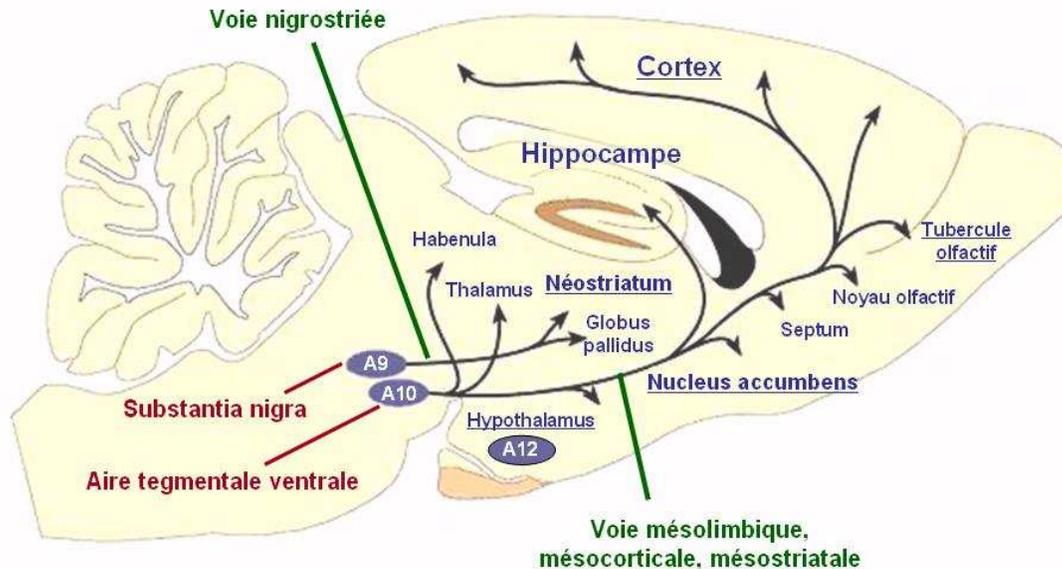
I.2.2.3.2.1. Localisation des neurones : deux noyaux principaux se distinguent dans le système dopaminergique méso-télencéphalique : le noyau A9 localisé dans la substance noire (*substantia nigra*) et le noyau A10 présent dans l'aire tegmentale ventrale (cf. figure 10). Les neurones A9 se projettent vers le néostriatum (*putamen* et noyau caudé). Les projections des neurones A10 innervent le cortex frontal (faisceau mésocortical), le système limbique (faisceau mésolimbique = *septum* et amygdale) et les noyaux de la base (faisceau mésostriatal = *putamen* et noyau *accumbens*).

Les autres noyaux possèdent des projections beaucoup plus courtes. Deux noyaux à prolongement ultra court sont présents dans la rétine et le bulbe olfactif. D'autres ont des prolongements un peu plus longs (A11, A12, A13, A14). Le noyau A12 se localise dans le noyau arqué de l'hypothalamus et se projette vers l'hypophyse et l'éminence médiane. Le noyau A11 de l'hypothalamus postérieur se projette vers la moelle. Le noyau A13 est présent dans la *zona incerta*. Enfin le noyau A14 (noyau paraventriculaire de l'hypothalamus) innerve le thalamus.

Les neurones dopaminergiques se distinguent par des axones qui forment de nombreuses collatérales porteuses de varicosités entrant en contact avec les dendrites adjacents par des synapses (jusqu'à 100 000 varicosités pour un axone).

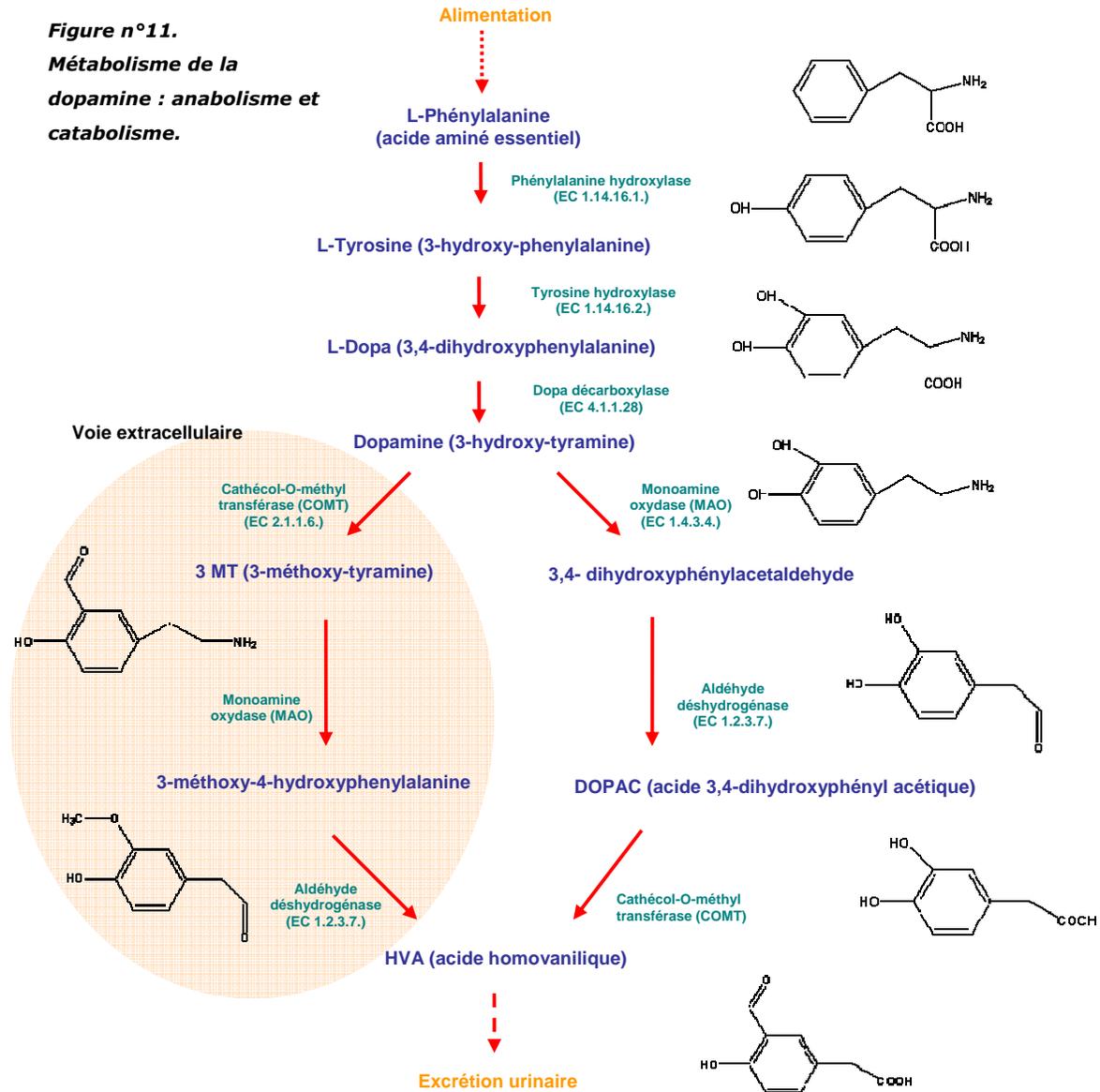
Figure n°10. Schéma de la distribution des principaux neurones dopaminergiques chez le rat.

(Source : University of Colorado)



I.2.2.3.2.2. Anabolisme : la dopamine est synthétisée à partir de la phénylalanine (cf. figure 11), acide aminé essentiel provenant de l'alimentation. Ce précurseur est dégradé par la phénylalanine hydroxylase en tyrosine qui circule dans le sang, passe la barrière hémato-encéphalique et parvient jusqu'aux terminaisons axonales des neurones dopaminergiques via un système de transport actif couplé à celui des ions sodium, symport Na^+ . Une fois dans le cytoplasme des neurones, la première étape est l'hydroxylation de la tyrosine en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase, enzyme limitante qui fonctionne constamment au maximum de sa capacité catalytique en présence de deux co-facteurs : l'oxygène moléculaire et la tétrahydrobioptérine. La tyrosine hydroxylase est régulée par de nombreux facteurs notamment les produits finaux (dopamine ou autres catécholamines). La seconde étape fait intervenir l'enzyme cytosolique, la dopa-décarboxylase (décarboxylase des a.a. qui intervient également dans la voie de bioynthèse de la sérotonine) et conduit à la formation de dopamine (DA). La dopamine est ensuite concentrée dans des vésicules synaptiques par un système de transport spécifique afin de protéger le neurotransmetteur de l'action catalytique de la monoamine oxydase (MAO) mitochondriale.

Figure n°11.
Métabolisme de la
dopamine : anabolisme et
catabolisme.



1.2.3.2.3. Fixation aux récepteurs : différents récepteurs ont été identifiés : les récepteurs D1-like et les D2-like. Les récepteurs D1 et D5 appartiennent à la première catégorie ; ils sont couplés positivement à l'adénylate-cyclase par l'intermédiaire de protéines G excitatrices qui augmentent la synthèse d'AMPc. Les récepteurs D1 sont exprimés dans le striatum, l'amygdale, le thalamus, l'hypothalamus, le mésencéphale et le tronc cérébral alors que les récepteurs D5 ne sont exprimés que dans l'hippocampe et le thalamus.

A l'inverse, les récepteurs D2 et D4 (D2-like) sont couplés à des protéines G inhibitrices qui abaissent le taux d'AMPc. Les récepteurs D2 sont présents dans le striatum, le mésencéphale, la moelle, l'hypothalamus et l'hippocampe. Les récepteurs D4 ont été retrouvés dans le cortex frontal, l'hippocampe, le thalamus, le striatum et le cervelet. Le récepteur D3 n'interagit pas avec une protéine

G ; toutefois il inhibe le taux d'AMPc. Il est présent dans le tronc cérébral, le tubercule olfactif, le noyau accumbens, le striatum et la *substantia nigra*.

I.2.2.3.2.4. Catabolisme : la dopamine peut être dégradée selon deux voies, l'une extracellulaire, dans la fente synaptique, et l'autre intracellulaire après recapture par le neurone présynaptique. Dans la fente synaptique, la dopamine est dégradée en 3-méthoxy-tyramine (3MT) par la catéchol-O-méthyl-transférase (COMT), présente à la surface du neurone post-synaptique. D'autre part, un processus actif de re-capture de la dopamine libérée (80% des médiateurs libérés) participe à l'élimination des neurotransmetteurs de la fente synaptique. Un transporteur glycoprotéique (12 motifs transmembranaires dépendant de co-transport ionique sodium-chlore) intervient dans ce processus. Il régule directement la durée (demie-vie) de la dopamine dans la fente synaptique. Après recapture, la dopamine est dégradée dans la terminaison axonale en acide di-hydroxy-phényl acétique (DOPAC) par la monoamine-oxydase (MAO, enzyme mitochondriale) couplée à l'aldéhyde désydogénase.

Les deux métabolites, 3MT et DOPAC, sont alors eux-mêmes dégradés par les deux enzymes COMT et MAO en acide homovanillique (HVA) qui est éliminé dans les urines après passage dans le LCR. Des autorécepteurs présynaptiques participent également à l'inactivation du neuromédiateur. Ils régulent la synthèse de dopamine en agissant sur la tyrosine hydroxylase et la libération vésiculaire.

I.2.2.3.2.5. Action / Rôle : le système dopaminergique dans sa globalité est impliqué dans les processus d'anxiété, de circulation sanguine et d'apprentissage. Le système nigrostriatal est relié au comportement neuromoteur. Les systèmes mésolimbique et mésocortical sont associés au mouvement dirigé, au comportement dépendant de la volonté et à celui de la récompense. Le système tubéroinfundibulaire serait impliqué dans la régulation de l'hypophyse et de l'hypothalamus (inhibe la sécrétion de prolactine) (cf. tableau 07).

Les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, sont associées à un déficit du système dopaminergique (Winblad *et al.*, 1985; Gottfries, 1990; Corti *et al.*, 2005). Dans le cas de la maladie de Parkinson, la perte des neurones du système nigrostriatal induit des troubles du comportement neuromoteur (tremblements et mouvement désordonné).

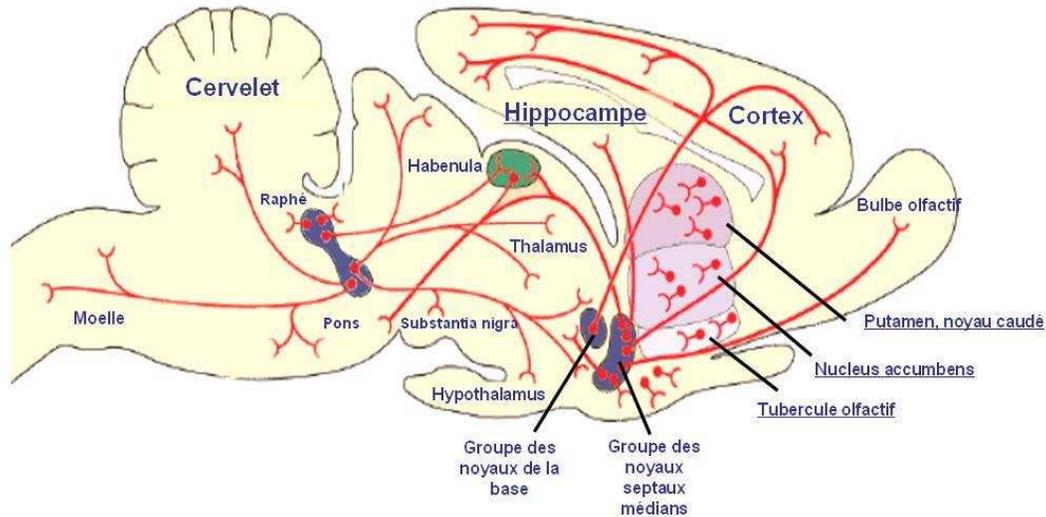
I.2.2.4. Transmission synaptique cholinergique : neurones à acétylcholine.

I.2.2.4.1. Localisation des neurones : les neurones cholinergiques naissent principalement dans le tronc cérébral, le septum et le striatum et se projettent respectivement vers le cortex, l'hippocampe et le striatum (cf. figure 12). Selon la nomenclature établie par Mesulam *et al.* en 1983 (neurosciences), 8 groupes peuvent être distingués : CH1 à CH8 (Mesulam *et al.*, 1983). CH1 naît dans le plan sagittal du septum et se projette dans l'hippocampe tout comme CH2 qui naît dans la bande diagonale de Broca. CH3 localisé dans la bande horizontale de Broca innerve le bulbe olfactif. CH4 se projette dans le cortex et l'hypophyse. CH5 et CH6 qui naissent dans le tronc cérébral ont des projections ascendantes vers le thalamus et l'hypothalamus et des projections descendantes vers

la moelle. CH7 innerve le noyau interpédonculaire et CH8 se projette vers les *colliculi* supérieurs (antérieurs).

Figure n°12. Schéma de la distribution des principaux neurones cholinergiques chez le rat.

(Source : University of Colorado)



I.2.2.4.2. Anabolisme : la synthèse de l'acétylcholine (ACh) se déroule dans le cytoplasme des terminaisons axonales des neurones cholinergiques à partir d'acétyl coenzyme A (provenant du pyruvate issu du métabolisme du glucose dans les mitochondries) et de choline, grâce à la choline acétyl transférase, enzyme cytosolique spécifique des neurones cholinergiques. La choline peut provenir soit de l'alimentation, soit de la dégradation des phospholipides membranaires (phosphatidylcholine) ou bien encore de la dégradation de l'acétylcholine re-captée (cf. figure 13).

I.2.2.4.3. Fixation : l'acétylcholine libérée peut se fixer à deux types de récepteurs : les récepteurs nicotiques et muscariniques. Pour transmettre le message nerveux, le récepteur nicotinique agit sans second messenger par modification des mouvements ioniques transmembranaires : c'est un récepteur protéique « canal ionique ». Cet hétéro-oligomère se compose de 5 sous-unités (2α , β , γ , δ). En raison de l'existence de plusieurs isoformes de ces sous unités, sa distribution est hétérogène et la réponse qu'il induit également. En pratique deux molécules d'acétylcholine se lient aux sous unités α , ce qui provoque un changement de conformation et l'ouverture du canal ionique. Ce récepteur est avant tout présent dans les muscles mais il est aussi présent dans l'hippocampe, le cortex, le thalamus, l'hypothalamus et les colliculi supérieurs en quantité faible par rapport au récepteur muscarinique. Il est excitateur et régule la libération d'autres neurotransmetteurs, tels la dopamine dans le striatum ou la noradrénaline, le GABA ou la sérotonine dans l'hippocampe.

Le récepteur muscarinique est lui métabotrope, il fait intervenir une protéine G inhibitrice de l'adénylate-cyclase. C'est un monomère à 7 domaines transmembranaires (extrémité N-terminale à l'extérieur de la cellule). Il existe deux sous-classes de récepteurs : M1 (m1, m3, m5) et M2 (m2, m4). Les récepteurs M1 effectuent la transduction du signal par l'intermédiaire de phospholipases C ; ce signal va générer deux seconds messagers : le diacylglycérol (action sur les protéines kinases C) et l'inositol triphosphate (libération de calcium). Les récepteurs M1 sont présents dans le cortex, l'hippocampe, le noyau accumbens, le striatum et l'amygdale. Les récepteurs M2 inhibent l'adénylate-cyclase et sont exprimés dans le thalamus, les colliculi supérieurs, le bulbe olfactif et le tronc cérébral.

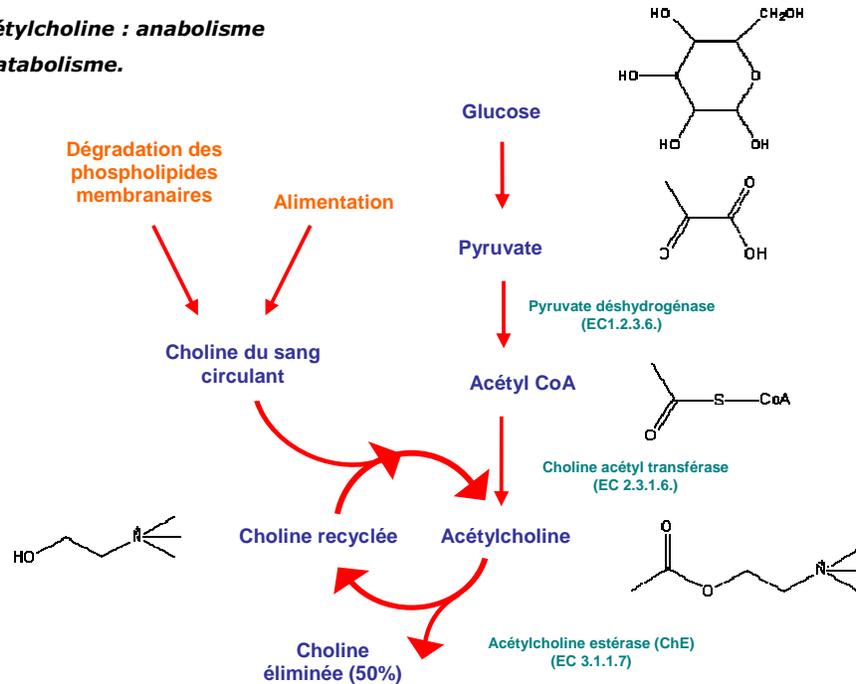
I.2.2.4.4. Dégradation : l'acétylcholine présente dans la synapse est dégradée par des enzymes synthétisées au niveau du soma des neurones cholinergiques : l'acétylcholinestérase (ChE) et la butyrylcholinestérase (pseudocholinestérase, BuChE).

L'ChE est non spécifique des neurones cholinergiques et présente dans les neurones cholinocéptifs centraux, les cellules musculaires et les cellules hématopoïétiques (hématies), alors que la BuChE serait surtout présente dans le foie, le pancréas et la muqueuse intestinale. Darvesh *et al.* ont mis en évidence que l'ChE était présente dans le neuropile (zone de transmission des signaux nerveux = synapses) au niveau de l'amygdale, et dans le neuropile mais aussi le corps cellulaire au niveau de l'hippocampe (Darvesh *et al.*, 1998). Dans le même temps, la BuChE était surtout présente dans les neurones et les dendrites au niveau de l'amygdale et dans les neurones pour l'hippocampe. L'activité BuChE était absente des axones (Darvesh *et al.*, 1998). Une autre étude a démontré que ChE et BuChE avaient le même profil d'expression au niveau des neurones mais que la BuChE était moins présente que l'ChE (Mis *et al.*, 2003). En 2003, Darvesh *et al.* ont également montré qu'au sein du thalamus, ces deux enzymes pouvaient avoir une distribution identique ou complémentaire (Darvesh and Hopkins, 2003). Dans l'hypothalamus et les noyaux subthalamiques, c'est l'ChE qui prédomine. Les auteurs concluent que la BuChE aurait un rôle tout aussi important que l'ChE dans le cerveau (Darvesh and Hopkins, 2003).

L'ChE serait synthétisée par les neurones alors que la BuChE serait le produit des cellules gliales (Mesulam *et al.*, 2002). BuChE et ChE sont bien présentes dans les mêmes structures mais leur distribution cellulaire est différente. De plus, l'ChE ne serait pas uniquement présente au sein des neurones en tant qu'enzyme synaptique de dégradation de l'ACh : elle aurait une autre fonction encore mal définie (Mesulam *et al.*, 2002).

Plusieurs isoformes d'ChE existent : G1 (monomère cytosolique), G2 (dimérique transmembranaire), G4 (tétramérique) et des formes asymétriques liées au collagène (A4, A8 et A12). Dans le SNC, c'est la forme G4 qui prédomine. La demie-vie de l'ACh dans la fente synaptique serait de 50 μ s. pour un kcat de $1,36 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. La choline, produit de dégradation de l'acétylcholinestérase, est re-captée pour partie (50%) par un transporteur sodium dépendant hautement spécifique de son ligand. La choline est réutilisée par la terminaison présynaptique pour synthétiser à nouveau de l'acétylcholine.

Figure n°13.
Métabolisme de
l'acétylcholine : anabolisme
et catabolisme.



1.2.2.4.5. Action / rôle : au sein du système nerveux, la neurochimie de l'acétylcholine, classée dans les esters azotés, intervient dans la stimulation des systèmes végétatifs (sympathiques, parasympathiques et musculaires) au niveau périphérique. Ainsi, l'ACh régule le rythme cardiaque, la contraction des muscles lisses et la vasodilatation (cf. tableau 07). Au niveau central, les effets muscariniques sont complexes et encore mal connus. Selon les conditions, la stimulation des récepteurs muscariniques post-synaptiques provoque une dépolarisation ou une hyperpolarisation. Chez l'animal, leur stimulation entraîne une facilitation de l'apprentissage et de la mémoire (au niveau de l'hippocampe) mais aussi une hypothermie, des tremblements, des convulsions. Chez l'Homme, une déficience cholinergique est observée dans la maladie d'Alzheimer, démence marquée par des troubles de la mémoire. Les différentes phases de progression de la maladie s'accompagneraient d'une baisse de l'activité acétylcholinestérase dans le cortex, l'hippocampe, et l'amygdale. Puis survient une baisse de la biosynthèse d'acétylcholine, de la re-capture de la choline ; une baisse du nombre de neurones cholinergiques (*nucleus basalis* de Meynert) et enfin une diminution du nombre de récepteurs nicotiniques dans le cortex et l'hippocampe. Le système cholinergique semble également impliqué au niveau du striatum dans les maladies de Parkinson et d'Huntington.

Tableau n°07. Caractéristiques de la sérotonine, la dopamine et l'acétylcholine

Neurotransmetteurs	Récepteurs	Fonction assurée	Symptômes ou pathologies associés à un déficit	Symptômes ou pathologies associés à un excès
Sérotonine	5HT1a 5HT1d 5HT2 5HT2a 5HT3 5HT4	Sommeil Perception de la douleur Humeur Température Libido Régulation des agressions	Irritabilité Hostilité Dépression Schizophrénie Trouble obsessionnel compulsif Troubles du sommeil Perte d'appétit Perte de libido	Affaiblissement Agressivité
Dopamine	D1-like D2-like	Réflexion Processus décisionnel Comportement lié à la récompense Action musculaire fine Apprentissage	Parkinson Perturbation endocrinienne Mouvement désordonné Perte des repères spatiaux Perte de relativité	Anxiété Désorganisation de la pensée Perte des associations Tics Schizophrénie Comportement stéréotypé Hyper vigilance Paranoïa Baisse de l'appétit
Acétylcholine	Nicotinique Muscarinique	Attention Soif Mémoire Régulation de l'humeur Sommeil Comportement sexuel Tonicité musculaire	Absence ou baisse de l'inhibition Perte de mémoire Alzheimer Euphorie Comportement antisocial Baisse du langage	Sur-inhibition Anxiété Dépression Maladie somatique Repli sur soi

I.3. Les Effets sur le SNC d'une Intoxication à l'Uranium

L'étude des effets de l'uranium sur le SNC a, semble t'il, débuté dès 1888 par Chittenden *et al.* (cité dans Hodge, 1973). Depuis, les études sont rares et il a fallu attendre les derniers conflits (Golfe, Kosovo, Balkans, ...) et l'exposition de soldats à l'uranium appauvri au cours des combats pour susciter un regain d'intérêt.

En effet, à la suite de la guerre du Golfe, les vétérans ont exprimés divers symptômes, notamment neurologiques, qui ont été rassemblés sous la terminologie de « syndrome de la guerre du Golfe ». La recherche étiologique de ce syndrome a souligné le caractère pluraliste des causes potentielles : agents chimiques toxiques, vaccins, traitement pharmaceutique prophylactique, tempête de sable, vent du désert, feux et fumées d'hydrocarbures, blessure et rétention organique de fragments d'obus à l'uranium appauvri ou encore stress du combat. Il est aujourd'hui admis que ce syndrome résulterait d'une synergie complexe de plusieurs de ces facteurs et ne serait pas imputable à la seule exposition à l'uranium (RAND *et al.*, 1999).

L'évaluation du lien de causalité, entre l'exposition à l'uranium appauvri (respiration d'uranium volatilisé à l'impact ou rétention de fragments non extractables sans lésions post-opératoires) et les perturbations neurologiques dont souffrent les vétérans, a souligné combien la littérature scientifique était pauvre dans le domaine et la nécessité d'actualiser et d'enrichir les données toxicologiques.

I.3.1. ACCUMULATION D'URANIUM DANS LE TISSU CEREBRAL

I.3.1.1. Accumulation dans le cerveau entier :

Ferreti et Schwartz ont été les premiers à rapporter des concentrations élevées d'uranium dans le SNC après des injections répétées (cités dans Hodge, 1973, quantité et mode d'exposition non indiquée).

Chez le Rat, après ingestion chronique d'uranium par l'eau de boisson (2 à 16 mg. kg de poids⁻¹.jour⁻¹ pendant 4 semaines), il a été démontré que l'uranium pouvait s'accumuler dans le cerveau pour les doses les plus élevées (478±110 ng.g⁻¹ pour 8mg.kg⁻¹.jour⁻¹ ; 588±100 ng.g⁻¹ pour 16 mg.kg⁻¹.jour⁻¹) (Ortega *et al.*, 1989). De même, une autre étude a confirmé la présence d'uranium dans le cerveau après contamination chronique par l'eau de boisson (0,06 à 36,73 mg d'U.kg poids⁻¹.jour⁻¹ pendant 28 ou 91 jours) : les teneurs étaient équivalentes à la moitié de celles mesurées dans l'os, second organe d'accumulation pour l'uranium (Gilman *et al.*, 1998c) soit 430 ng.g⁻¹ de cerveau pour l'exposition la plus élevée.

Dans une troisième étude d'exposition chronique (10, 20 et 40 mg d'U.kg poids⁻¹.jour⁻¹ pendant 3mois), des auteurs ont mesuré des teneurs en uranium dans le cerveau de 4,97±2,35 ng.g⁻¹ (mesure globale réalisée sur 500 mg de tissu, pour une exposition à 10 mg.kg⁻¹.jour⁻¹), 2,32±1,39 ng.g⁻¹ (pour 20 mg.kg⁻¹.jour⁻¹) et 13,89±9,37 ng.g⁻¹ (pour 40 mg.kg⁻¹.jour⁻¹)(Bellés *et al.*, 2005). Les auteurs n'expliquent pas l'absence de relation dose d'uranium / concentration dans le cerveau.

En 2003, une étude française confirmait *in vivo* le passage de l'uranium au travers de la barrière hémato-encéphalique, après perfusion d'une solution d'uranium naturel (5.10^{-6} mol.L⁻¹) directement dans l'artère carotide interne (Lemercier *et al.*, 2003).

I.3.1.2. Accumulation dans les structures cérébrales :

Chez le Lapin, Esser *et al.* ont montré que l'uranium se distribuait dans les cornes antérieures de la moelle et les cellules du cortex après intoxication aiguë (cités dans Cantril *et al.* 1951, quantité et mode d'exposition non indiquée).

Pour des animaux implantés avec des petits fragments d'uranium appauvri (4 à 20 fragments de 1mm par 2mm implantés dans les pattes arrières qui se dégradent lentement *in situ*), des équipes américaines ont démontré que l'accumulation cérébrale était dépendante de la quantité d'uranium implantée (Pellmar *et al.*, 1998; Pellmar *et al.*, 1999 a; Pellmar *et al.*, 1999 b). L'augmentation de la teneur cérébrale en uranium était significative dès 1 mois après l'implantation ($32,4 \pm 11,8$ ng.g⁻¹; dosage réalisé sur un seul hémisphère cérébral) (Pellmar *et al.*, 1998; Pellmar *et al.*, 1999 a). Dix-huit mois après le début de l'implantation, pour la dose la plus élevée (20 fragments), la distribution de l'uranium était la suivante : cortex moteur ($25,9 \pm 11,1$ ng.g⁻¹), cortex frontal ($38,9 \pm 7,4$ ng.g⁻¹), hippocampe ($40,4 \pm 7,7$ ng.g⁻¹), vermis ($47,2 \pm 24$ ng.g⁻¹), mésencéphale ($50,9 \pm 16,6$ ng.g⁻¹) et restant du cervelet ($96,3 \pm 42,6$ ng.g⁻¹) démontrant une distribution cérébrale hétérogène (Pellmar *et al.*, 1999 a).

Lors d'une étude de biocinétique d'élimination de l'uranium après contamination aiguë (1mg d'uranium appauvri.kg de poids⁻¹, en i.p.), Barber *et al.* ont montré une hétérogénéité de la distribution de l'uranium dans 4 structures cérébrales (Barber *et al.*, 2005). Huit heures après l'injection, l'uranium se répartissait selon l'ordre décroissant suivant : striatum (ST ; $17,7 \pm 3,0$ ng.g⁻¹), hippocampe (HI ; $9,8 \pm 1,9$ ng.g⁻¹), cervelet (CE ; $6,1 \pm 0,9$ ng.g⁻¹) et cortex (CO ; $4,2 \pm 0,8$ ng.g⁻¹). Vingt-quatre heures après l'injection, la répartition devenait la suivante : CE ($16,5 \pm 1,5$ ng.g⁻¹), HI ($8,3 \pm 0,8$ ng.g⁻¹), ST ($2,6 \pm 0,4$ ng.g⁻¹), CO ($1,5 \pm 0,4$ ng.g⁻¹). Sept jours après l'exposition, les concentrations étaient encore significativement différentes de celles des témoins mais la distribution n'était plus significativement différente entre les 4 structures : HI ($9,1 \pm 1,9$ ng.g⁻¹), CO ($7,6 \pm 0,6$ ng.g⁻¹), CE ($6,5 \pm 2,3$ ng.g⁻¹), ST ($5,7 \pm 1,5$ ng.g⁻¹). Trente jours après l'intoxication, les cerveaux des rats contaminés présentaient des teneurs en uranium équivalentes à celles des témoins, c'est à dire les teneurs naturelles d'uranium.

I.3.2. EFFETS SUR L'HOMME :

I.3.2.1. Toxicité aiguë :

Lors du projet Manhattan (fabrication de la bombe atomique américaine), un mémorandum daté du 29 Avril 1944 adressé au colonel Stafford Warren, chef de la section médicale, soulignait les effets cliniques d'une exposition à l'héxafluorure d'uranium (UF6). Toutefois les effets étaient attribués empiriquement au fluor en absence de toute démonstration expérimentale.

JW Holland indique dans une étude de cas que plusieurs personnes potentiellement contaminées à l'uranium (accident de travail, évaluation de l'exposition non rapportée) ont manifesté un comportement nerveux, de l'appréhension, une hyperactivité motrice et d'élocution langagière et une exagération des événements survenus (réaction au delà du choc émotionnel normal après ce type d'accident) (cité dans Voegtlin and Hodge, 1949).

I.3.2.2. Toxicité chronique :

Goasguen rapporte dans une étude de cas clinique, qu'un homme de 48 ans manifestait depuis 6 ans des troubles neurologiques (crampes puis myalgies des membres inférieurs, troubles de la marche) sans explication apparente (Goasguen *et al.*, 1982). Les troubles ont été attribués, sans autre preuve étiologique, à une contamination chronique à l'uranium, due à la manipulation quotidienne, pendant 3 années, d'une barre d'uranium appauvri métallique utilisée comme presse-papier. Des quantités anormalement élevées d'uranium avaient été retrouvées dans ses selles. Le suivi médical de ce patient n'a pas fait l'objet d'autre communication.

Dans une autre étude de cas, McDiarmid *et al.* rapportent que 29 vétérans blessés au combat et porteurs de fragments d'obus à l'UA ont présenté, 7 ans après leurs blessures, de mauvaises performances à des tests neurocognitifs automatisés par rapport à une population témoin, sans pour autant montrer de troubles neurologiques spécifiques et significatifs (McDiarmid *et al.*, 2000). La baisse de performance a été corrélée statistiquement avec l'uranium excrété dans les urines de ces vétérans. Toutefois, lors d'une étude ultérieure, assurée dans le cadre du suivi médical de ces patients, les auteurs indiquent que les patients continuaient d'excréter de l'uranium appauvri dans leurs urines, mais ce résultat n'était plus, ni corrélé, ni concomitant, à une baisse de performance aux mêmes tests cognitifs (McDiarmid *et al.*, 2004).

A notre connaissance et pour le moment, il n'existe pas d'études épidémiologiques évaluant les effets sur le SNC d'une contamination chronique à l'uranium naturel par eau de boisson.

I.3.3. EFFETS CLINIQUES ET COGNITIFS EXPERIMENTAUX :

I.3.3.1. Toxicité aiguë :

Des lapins soumis à de fortes doses d'uranium (létales) ont manifesté, juste avant leur mort, des symptômes de prostration, de paralysie des pattes arrières, de perte de la vue, des convulsions et une perte de la coordination motrice (Chittenden *et al.* 1888, Chittenden et Lambert 1888, Garner et Marek 1931, Esser *et al.* 1937, cité par Hodge, 1973, quantité non spécifiée).

Purjesz *et al.*, après injection d'une très forte dose (létale en quelques minutes), ont déclenché une inflammation et une dégénérescence de l'épithélium des plexus choroïdes et des hémorragies des capillaires cérébraux, ainsi qu'une atteinte grave de la fonction rénale chez des chiens (Purjesz *et al.* 1930 cité dans Goasguen *et al.*, 1982).

Des signes cliniques de neurotoxicité importante de l'uranium ont aussi été démontrés après gavage de rats mâles (dose unique de 11 à 717 mg d'U.kg⁻¹). Piloérection, hypothermie, tremblements, rougeurs, exophtalmie et diminution de la taille des pupilles ont été rapprochés d'une atteinte grave du système de neurotransmission cholinergique (Domingo *et al.*, 1987).

En 2005, Lestaevel *et al.* ont montré qu'une injection d'uranium appauvri sub-néphrotoxique (inférieur à 3µg.g⁻¹ d'uranium retrouvé dans le rein) (i.p., 144µg.kg⁻¹) abaissait la quantité de sommeil paradoxal le troisième jour après l'injection (Lestaevel *et al.*, 2005 a). Avec une quantité moindre (70 µg.kg⁻¹), aucun effet n'a pu être observé.

I.3.3.2. Toxicité chronique :

Après des injections répétées d'uranium (i.p., 1,7 à 3,6 g au final) sur des périodes de 3 à 5 mois, Verne *et al.* ont montré que les troubles du SNC étaient tardifs, survenant seulement après 3 semaines de traitements (Verne *et al.* 1931 cité par Hodge, 1973). Les lapins se montraient incapables d'avoir une posture normale en raison d'une paralysie des pattes arrières. Ces auteurs rapportent également des changements histo-pathologiques des corps de Nissl (réticulum endoplasmique) dans les cellules pyramidales du cortex et de Purkinje du cervelet. Les cellules affichaient une rétraction de leurs prolongements dendritiques. Certaines fibres nerveuses étaient totalement dégénérées (Verne *et al.* 1931 cité par Hodge, 1973 et Verne *et al.* 1955 cité par Angelova and Manolov, 1966). De plus, Angelova *et al.* ont aussi rapporté l'observation d'une baisse du nombre de cellules de Purkinje du cervelet, concomitante à des troubles du mouvement des extrémités et des capacités de maintien de l'équilibre après des empoisonnements chroniques avec du nitrate d'uranyle (Angelova *et al.* 1965 cité par Angelova and Manolov, 1966).

Trente jours après des injections répétées d'acétate d'uranyle (0,1 ou 1 mg d'U.kg⁻¹.jour⁻¹ pendant 7 jours), des auteurs ont rapporté des perturbations du comportement sensorimoteur (Abou-Donia *et al.*, 2002). Les différents troubles du comportement observés (temps de passage sur une poutre et sur un plan incliné) pouvant être reliés à de très nombreuses causes cellulaires ou moléculaires (oxyde nitrique, acétylcholine, ...), les auteurs suggèrent que l'action de l'uranium sur le SNC emprunterait plusieurs voies.

En 2005, Briner *et al.* ont rapporté une augmentation de l'activité locomotrice (mouvements horizontaux et verticaux mesurés dans un actimètre (open field)), dès 2 semaines d'intoxication chronique à l'uranium appauvri par ingestion d'eau (75 et 150 mg d'U.L⁻¹), chez des rats mâles, pour la dose la plus élevée (Briner and Murray, 2005). Après 6 mois de contamination chronique à 150mg.L⁻¹, des modifications identiques ont été observées (Briner and Murray, 2005). A 75 mg d'U.L⁻¹ après 6 mois d'intoxication, les résultats suivent la même tendance mais restent non significatifs. Par ailleurs, des femelles soumises aux mêmes intoxications se sont avérées plus résistantes : les femelles n'ont manifesté aucun des symptômes de motricité rapportés pour les mâles (Briner and Murray, 2005). Les auteurs concluent, pour les mâles, à un effet neurotoxique de l'uranium à la fois

cumulatif (plus le temps d'exposition augmente, plus les effets sont prononcés) et dose dépendant (en augmentant la dose, les effets s'amplifient) (Briner and davis, 2002).

Après contamination chronique de 3 mois par ingestion d'uranium naturel dans l'eau (10, 20 et 40 mg d'U.kg de poids⁻¹.jour⁻¹), des auteurs ont aussi montré une augmentation de l'activité locomotrice (totalité des mouvements horizontaux) à 10 mg.kg⁻¹.jour⁻¹ dans un actimètre et à 20 mg.kg⁻¹.jour⁻¹ dans le test de la piscine de Morris (morris water maze)(Bellés *et al.*, 2005). Les auteurs plaident pour un effet modéré de l'uranium sur le SNC aux doses utilisées, puisque toutes les doses n'ont pas induit d'effets et que la dose la plus forte n'a pas induit l'effet le plus important (Bellés *et al.*, 2005).

Les résultats rapportés dans cette dernière étude démontrent la complexité d'interprétation des effets sur le comportement à des quantités relativement modérées d'intoxication. De plus, ces résultats soulignent l'importante régulation qui siège dans le cerveau pour maintenir l'homéostasie et qui pourrait expliquer les différences d'effets selon les concentrations utilisées.

Au sein du programme de recherche ENVIRHOM, évoqué au paragraphe 1.6.3., une place singulière, tant par sa thématique que par son approche pluridisciplinaire (étude clinique du comportement, du sommeil, études tissulaires, cellulaires et moléculaires), a été consacrée aux études des effets de l'uranium sur le système nerveux central et plus particulièrement sur le cerveau après ingestion chronique d'uranium à la teneur de 40mg.L⁻¹ d'eau de boisson.

Les résultats de ces études montrent qu'après contamination chronique par ingestion (40mg d'U.L⁻¹, pendant 45 jours), l'uranium appauvri n'induit pas d'effets significatifs sur le comportement ou les différentes phases du sommeil chez le Rat (Houpert *et al.*, 2005). A l'inverse, l'uranium enrichi à 4,26% en ²³⁵U provoque une augmentation du sommeil paradoxal, pendant la phase diurne, ainsi qu'une baisse de la mémoire spatiale de travail (mémoire à court terme) et une hausse de l'anxiété (labyrinthe en croix surélevé) sans modification du comportement général des animaux (Houpert *et al.*, 2005; Lestaevel *et al.*, 2005 b). La différence d'effets observés entre les deux compositions isotopiques d'uranium a été attribuée à l'activité radiologique supérieure de l'uranium enrichi.

I.3.4. CAS PARTICULIER DES EFFETS INDUITS SUR LE SNC APRES INHALATION D'URANIUM :

I.3.4.1 Etude humaine :

Chez l'Homme, après un cas d'inhalation accidentelle de tetrafluorure d'uranium enrichi UF₄, Lu et Zhao ont décrit des symptômes d'anorexie et de vertiges 6 jours après l'exposition (Lu and Zhao, 1990). Aucun résultat du même type n'a cependant été rapporté depuis, malgré d'autres accidents d'inhalation d'UF₆.

I.3.4.2 Etude expérimentale :

Après inhalation de composés uranifères, des effets neurologiques ont été observés chez des chats et des chiens (Dygert, 1949; Roberts, 1949; Rothstein, 1949). Des chiens exposés pendant 30 jours à un gaz d'hexafluorure d'uranium UF_6 ($18\text{mgU}\cdot\text{m}^{-3}$) ont présenté une anorexie, des troubles musculaires et une démarche incertaine dès le 13^{ème} jour (Dygert, 1949). Pour le même traitement, des chats ont manifesté les mêmes symptômes dès le 7^{ème} jour (Dygert, 1949). Rothstein *et al.* ont observé des symptômes similaires après une inhalation d' UF_6 moins importante ($9,2\text{ mg d'U}\cdot\text{m}^{-3}$) (Rothstein, 1949). Enfin, lors d'une étude menée avec du nitrate d'uranyle hexahydraté inhalé pendant 30 jours ($9,5\text{ mgU}\cdot\text{m}^{-3}$), des chiens ont aussi été victimes d'anorexie (Roberts, 1949).

Des études d'inhalations répétées d'uranium ($190\text{ mgUO}_2\cdot\text{m}^{-3}$, 4 jours par semaine, pendant 3 semaines) ont mis en évidence la présence d'uranium dans le cerveau, en quantités non négligeables, après ce type de contamination (Monleau *et al.*, 2005). Après inhalation, comme pour d'autres voies d'exposition, à savoir des implants musculaires d'UA, (Pellmar *et al.*, 1999 a; Pellmar *et al.*, 1999 b), une injection i.p. (Barber *et al.*, 2005) ou une ingestion chronique (Paquet *et al.*, 2005), l'hippocampe semble être une zone privilégiée de concentration de l'uranium (Monleau *et al.*, 2005). Cependant, les quantités d'uranium retrouvées dans les différentes structures cérébrales (bulbe olfactif, hippocampe, cortex et cervelet) semblent supérieures à ce qu'elles auraient dû être si le transfert au cerveau ne s'était effectué que par la voie sanguine, comme dans le cas de contamination par ingestion. Les auteurs suggèrent que l'uranium aurait pu passer directement de la face interne des fosses nasales vers le bulbe olfactif probablement en empruntant les nerfs olfactifs. L'uranium se serait ensuite propagé d'avant en arrière du cerveau par diffusion, avec un apport complémentaire par le sang dû à l'uranium solubilisé au niveau pulmonaire. Enfin, ces dépôts loco-régionaux d'uranium sont concomitants au développement d'altérations comportementales semblables à celles rapportés après ingestion (augmentation de la locomotion spontanée) (Bellés *et al.*, 2005; Briner and Murray, 2005; Monleau *et al.*, 2005)). Une baisse de la mémoire à court terme a également été constatée dans le cadre de cette étude (Monleau *et al.*, 2005).

Des études américaines (JL. Lewis, University of New Mexico) menées pour rechercher les effets neurologiques d'inhalations d'uranium appauvri, inhalations qui ont pu avoir lieu au cours de la guerre du Golfe, semblent aboutir à des résultats similaires. Dans une interview au Daily Press, JL. Lewis, évoque également l'hypothèse d'un transfert direct de l'uranium par les nerfs olfactifs et rapporte une augmentation de l'immuno-réactivité du marquage GFAP, ce qui est classiquement l'indication d'une réponse astrocytaire et d'une souffrance neuronale (Evans, December 12, 2004). Ces résultats préliminaires devraient bientôt faire l'objet de publications.

I.3.5. EFFETS BIOLOGIQUES / MECANISME D'ACTION :

Les mécanismes d'entrées dans le SNC et d'action de l'uranium sont encore largement inconnus aussi bien pour le système nerveux central que périphérique. Ci-dessous sont néanmoins rapportées les rares études pouvant apporter des éléments de compréhension des effets rapportés plus haut.

I.3.5.1. Histopathologie :

Gillman *et al.* ont rapporté n'avoir identifié aucun signe histopathologique sur le cerveau (3 plans de coupes seulement, non spécifiés) après contamination chronique pendant 28 jours par ingestion d'uranium contenu dans une eau de boisson (0,96 à 600 mg.L⁻¹)(Gilman *et al.*, 1998).

I.3.5.2. Effets de l'uranium sur l'électrophysiologie de l'hippocampe :

Sur des rats implantés avec des fragments d'uranium appauvri (4 à 20 fragments de 1 mm par 2 mm), des équipes américaines ont mis en évidence *ex-vivo* une baisse de l'excitabilité des neurones de l'hippocampe, dès le 6^{ème} mois post-implantation (Pellmar *et al.*, 1998; Pellmar *et al.*, 1999 b). Cette baisse se poursuit à 12 mois et disparaît à 18 mois, probablement en raison d'une convergence des effets de l'âge et de l'uranium (Pellmar *et al.*, 1999 b). Les auteurs suggèrent l'apparition potentielle de troubles cognitifs discrets, à long terme, en raison du rôle prépondérant de l'hippocampe dans les processus de mémoire et d'apprentissage.

Pourtant, les mêmes auteurs indiquent n'avoir relevé aucun effet sur le comportement, tout en mettant en cause un manque de puissance des tests utilisés dans leurs études (Pellmar *et al.*, 1998; Pellmar *et al.*, 1999 b). Les auteurs ont suggéré que les effets constatés sur l'électrophysiologie de l'hippocampe, après implantation d'UA, pouvaient être une conséquence directe de l'accumulation d'uranium dans cette structure (Pellmar *et al.*, 1999 a; Pellmar *et al.*, 1999 b) (cf. paragraphe I.3.1.2.).

I.3.5.3. Un transporteur cérébral potentiel de l'uranium :

Concernant l'entrée de l'uranium dans le cerveau, l'hypothèse d'une équipe américaine était que DMT-1, transporteur des ions Fe²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, et Pb²⁺, pouvait aussi être le transporteur de l'uranium au travers de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (en postulant une forme chimique UO²⁺ au niveau cérébral). En effet, pour passer la BHE, l'uranium doit avoir soit une très haute solubilité lipidique soit une grande affinité pour des transporteurs (*c-à-d.* les DMT, divalent metal transporter). Les résultats préliminaires de cette étude, présentés dans un rapport technique indiquent que le transporteur DMT-1 n'est pas le transporteur cérébral de l'uranium (Aschner, 2003) après contamination *in vivo*.

I.3.5.4. Effets du stress :

Deux équipes de recherche ont mis en évidence en 2005 un effet du stress à la fois sur la distribution d'uranium dans le cerveau (Barber *et al.*, 2005)(cf. paragraphe I.3.1.2.) et sur le comportement (Bellés *et al.*) (cf. paragraphe I.3.3.2.). Vingt-quatre heures après une injection intrapéritonéale (1mg.kg⁻¹), les taux d'uranium dans l'hippocampe et le cervelet sont fortement abaissés lorsque, dans le même temps, les animaux sont soumis à un stress de nage forcée (Barber *et al.*, 2005). Sept jours après injection i.p., le stress diminue le taux d'uranium dans le striatum et l'hippocampe (Barber *et al.*, 2005).

Dans la seconde étude, un stress de contention n'a pas modifié le taux global d'uranium dans le cerveau quelle que soit la dose ingérée (10, 20 ou 40 mg d'U. kg de poids⁻¹ .jour⁻¹ pdt 3mois) et n'a altéré que certains des paramètres neuro-comportementaux évalués à 10 et 20 mg.kg⁻¹.jour⁻¹ (Bellés *et al.*). Les auteurs concluent que le stress n'a qu'un effet modéré, voire nul, sur les effets comportementaux induits par l'uranium (Bellés *et al.*). Dans cette étude, il faut cependant souligner que les effets comportementaux induits par l'uranium étaient eux aussi modérés.

I.3.5.5. Effets sur la peroxydation lipidique et la régulation hormonale :

Lors d'une étude comportementale, des auteurs ont démontré chez le rat mâle, en plus d'effets sur la locomotion (cf. para graphe I.3.3.2.), une augmentation de la peroxydation lipidique dans le cerveau après contamination chronique par ingestion pendant 2 semaines (150mg d'U.L⁻¹), suggérant une atteinte des membranes cellulaires par augmentation du stress oxydant et des radicaux libres (Briner and Murray, 2005). L'augmentation de la peroxydation lipidique, après 2 semaines d'intoxication, a été corrélée statistiquement avec les effets comportementaux. Après 6 mois de contamination, les effets sur la peroxydation étant moins prononcés, les auteurs ont suggéré l'émergence d'un phénomène de compensation au cours de la contamination chronique. Dans la même étude, chez le rat femelle, la peroxydation lipidique n'apparaissait qu'après 6 mois de contamination chronique à 150mg d' U.L⁻¹.

Les auteurs suggèrent donc que la résistance des femelles à l'intoxication pourrait être due à une différence de régulation hormonale (Briner and Murray, 2005). Sur la base de cette hypothèse, les auteurs évoquent une atteinte potentielle de l'axe hypothalamo-hypophysaire qui pourrait conduire à une dérégulation du taux de prolactine, comme il avait été constaté chez des hommes blessés par des fragments d'obus à l'UA (augmentation du taux plasmatique chez les vétérans de la guerre du Golfe,(McDiarmid *et al.*, 2000)). En effet, la prolactine est synthétisée par l'anté-hypophyse et sa sécrétion est régulée par la dopamine qui agit sur un facteur (prolactin inhibiting factor) synthétisé par l'hypothalamus. Les auteurs suggèrent que la dérégulation hormonale serait la conséquence d'une modification des taux de dopamine par l'uranium (Briner and Murray, 2005). Dans cette hypothèse, si les taux de dopamine sont abaissés par l'uranium, le taux de prolactine aurait tendance à augmenter.

I.3.5.6. Effet indirect / direct :

Malgré le tropisme rénal de la toxicité chimique de l'uranium, la plupart des auteurs écartent l'hypothèse d'un effet indirect de l'uranium sur le SNC *via* la toxicité rénale (Pellmar *et al.*, 1999 b; Barber *et al.*, 2005; Briner and Murray, 2005) et attribuent les effets constatés à l'augmentation de la concentration d'uranium dans le cerveau (Pellmar *et al.*, 1999 b; Bellés *et al.*).

I.3.5.7. Effets de l'uranium sur le système nerveux périphérique :

Des auteurs ont montré que l'uranium sous la forme d'ion uranyle UO_2^{2+} était capable de prendre la place de l'ion divalent Ca^{2+} dans la jonction neuromusculaire (Lin-Shiau *et al.*, 1979).

Dans une autre étude, il a été démontré que l'ion uranyle (à l'inverse d'autres ions métalliques divalents : cobalt, zinc, cadmium, nickel et cuivre) augmentait la durée du potentiel d'action présynaptique et le contenu quantique de plaque motrice au niveau du muscle de Grenouille, même en présence d'une concentration normale de calcium (Mambrini and Benoit, 1968).

En outre, plusieurs études suggèrent une action pluraliste de l'ion uranyle sur la jonction neuromusculaire et notamment sur la libération d'acétylcholine dans la synapse (Sokoll and Thesleff, 1968; Lin-Shiau *et al.*, 1979; Fu and Lin-Shiau, 1985; Lin-Shiau and Fu, 1986). Une autre étude indique que l'injection de nitrate d'uranyle potentialise les contractions musculaires du diaphragme de la souris après stimulation électrique (pas de retour au repos, augmentation de la durée du potentiel d'action)(Lin *et al.*, 1988). Les auteurs suggèrent une atteinte de l'enzyme acétylcholinestérase ou des récepteurs cholinergiques (muscariniques ou nicotiniques) qui conduirait à une persistance de l'acétylcholine dans la synapse. Enfin, des études bulgares ont démontré que le nitrate d'uranyle pouvait agir sur l'activité de l'ChE dans la jonction neuromusculaire du diaphragme et la corne antérieure de la moelle chez le Rat après contamination chronique *per os* à la concentration de $6mg.kg^{-1}$ pendant 7 mois (Angelova and Manolov, 1966; Galabov *et al.*, 1966).

I.3.5.8. Effets de l'uranium sur la neurotransmission dans le système nerveux central :

Lors d'une étude comportementale chez le Rat (cf. paragraphe I.3.3.2.), après injection intramusculaire d'acétate d'uranyle ($0,1$ ou $1mg.kg^{-1}$ tous les jours pendant 7 jours), des auteurs ont montré une augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase dans le cortex (pour la dose de $1mg.kg^{-1}$) sans modification de la densité des récepteurs muscariniques (Abou-Donia *et al.*, 2002). Une augmentation de la quantité de monoxyde d'azote NO (neurotransmetteurs) dans le cortex et le mésencéphale (pour la dose de $0,1mg.kg^{-1}$) et une baisse de NO dans le cervelet et le télencéphale ont aussi été observées (Abou-Donia *et al.*, 2002). Néanmoins, en absence de preuve directe, les auteurs n'ont pas attribué les effets constatés sur le comportement sensorimoteur à ces perturbations de la neurotransmission.

Il n'existe pas d'autre étude à notre connaissance décrivant après contamination aiguë ou chronique les effets de l'uranium sur la neurotransmission du système nerveux central.

I.4. Synthèse de la bibliographie

En résumé, l'uranium est un métal qui présente une toxicité chimique et radiologique. Après contamination interne, il diffuse dans l'ensemble de l'organisme et peut s'accumuler dans le cerveau.

L'analyse de la bibliographie démontre qu'il existe peu d'études relatives aux effets à long terme sur le SNC d'une exposition chronique à l'uranium. Dans le même temps, les indices et les preuves d'un effet de l'uranium sur le SNC, notamment sur le comportement, s'accumulent aussi bien après intoxication aiguë que chronique et même pour des expositions modérées.

Considérant la place prépondérante des neurotransmetteurs dans la régulation des processus neuro-comportementaux, une étude des effets de l'uranium sur la neurotransmission au niveau central semble nécessaire. A notre connaissance, une seule étude a évalué l'impact d'une exposition à l'uranium sur la neurotransmission synaptique centrale dans le but de comprendre les phénomènes comportementaux qui avaient été observés (Abou-Donia *et al.*, 2002).

Afin de répondre à ces lacunes et de tenter d'expliquer les effets constatés au laboratoire sur le comportement après ingestion chronique d'uranium, nous avons choisi d'étudier les effets de l'uranium sur la neurotransmission dopaminergique, sérotoninergique et cholinergique. Ces choix ont été motivés par l'observation de perturbations de la fonction motrice (en lien avec la dopamine) (Goasguen, 1982), d'atteinte du sommeil (pouvant être reliée à la sérotonine) (Lestaevel *et al.*, 2005 a) et d'altération du système cholinergique central ou périphérique (Lin-Shiau *et al.*, 1979; Domingo *et al.*, 1987; Abou-Donia *et al.*, 2002) après intoxication à l'uranium.

Chapitre II

- Matériels et Méthodes -

Chapitre II - Matériels et Méthodes :

L'ensemble des produits chimiques utilisés, hors notification particulière, provient de Sigma-Aldrich Chimie SARL, Saint Quentin Fallavier, France.

II.1. MODELE ANIMAL

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés chez le rat mâle adulte, Sprague-Dawley, souche OFA (Charles River, L'arbresle, France), pesant entre 220 et 250g à l'arrivée, soit un âge moyen de 7 semaines.

Les animaux sont placés par deux dans des cages traditionnelles et hébergés dans une pièce avec un cycle lumière/obscurité de 12-12h (08h00/20h00), une température ambiante de $22\pm 4^{\circ}\text{C}$ et une hygrométrie relative moyenne de 60%. L'eau (eau minérale naturelle du commerce, teneur en uranium total³ = $1,42\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; cf. tableau 08 et figure 14) et la nourriture (alimentation standard à base de céréales, de tourteaux de soja et de poisson, SAFE, Le Genest St Isle, France, teneur en uranium total⁴ = $1,46\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) sont dispensées à volonté. Les rats sont acclimatés 15 jours avant toute manipulation. Les paramètres généraux de santé (poids, prise alimentaire et de boisson) sont mesurés une fois par semaine.

Toutes les expériences sont conduites en accord avec la législation française sur la protection des animaux et en respect des recommandations du comité d'éthique de l'IRSN.

II.2. MODALITES DE CONTAMINATION

L'ensemble des expérimentations (manipulation de radioéléments et d'échantillons contaminés) a été réalisé conformément à la législation française et en respect des consignes de sécurité et de radioprotection en vigueur au sein de l'IRSN et celles propres au laboratoire LRTOX de Pierrelatte.

La concentration en uranium (nommée dans le document uranium total ou uranium pondéral) représente la somme des concentrations des trois isotopes principaux ($^{238}\text{U} + ^{235}\text{U} + ^{234}\text{U}$).

³ Mesure réalisée au laboratoire par ICPMS

⁴ Mesure réalisée au laboratoire par ICPMS

II.2.1. Contamination Aiguë

Quarante rats ont été utilisés pour mener à bien cette expérience. Les rats pesant en moyenne 300 g au moment de l'expérience, l'injection intra péritonéale (i.p.) est de 21µg d'uranium (238 g.mol^{-1}) appauvri à 0,255% d' ^{235}U par rat, afin d'obtenir la concentration finale de 70µg d'uranium total. kg^{-1} de rat. La source d'uranium se présente sous la forme de nitrate d'uranyle hexahydraté ($502,13 \text{ g.mol}^{-1}$) appauvri à 0,255% d' ^{235}U . La dissolution se fait dans une solution saline de NaCl 0,9%, en ajoutant peu à peu le solvant (solution NaCl) sur le soluté (nitrate d'U). Dans le même temps, le pH de la solution finale est ajusté à 4,75 avec de la soude $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pour éviter la précipitation des sels d'uranium. Les rats témoins reçoivent une injection i.p. de NaCl 0,9%, pH ajusté à 4,75 avec de la soude $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. L'injection i.p. est réalisée avec un petit volume d'injectât : maximum de 200µL par rat, réchauffé *dans le creux de la main* juste avant l'injection. Les injections sont réalisées en alternance : deux rats témoins suivent deux rats contaminés, etc...

Les rats sont euthanasiés par décapitation 6 heures après l'injection i.p., ce qui correspond à un temps précoce pour lequel des effets comportementaux (associés à une régulation monoaminergique) ont été observés après irradiation gamma à 2,5Gy (Alaoui *et al.*, 1995). Le striatum droit, l'hippocampe droit, le cortex frontal droit, la partie droite du cervelet et l'hypothalamus sont utilisés pour le dosage de monoamines. Les parties gauches des mêmes structures (striatum, hippocampe, cortex frontal et cervelet) sont utilisées pour le dosage d'uranium.

En raison du nombre d'animaux et du respect du cycle circadien, l'expérience a été réalisée sur deux jours avec 20 rats par jour.

II.2.1. Contamination Chronique

Deux types de contamination ont été étudiées : une contamination à l'uranium appauvri UA (nitrate d'uranyle hexahydraté à 0,255% d' ^{235}U) et une à l'uranium enrichi UE (nitrate d'uranyle hexahydraté à 5,15% puis 4,25% d' ^{235}U , en raison des difficultés d'approvisionnement). La contamination à l'UA avait pour but de mettre en évidence les effets chimiotoxiques de l'uranium, sans toutefois pouvoir négliger totalement la radiotoxicité résiduelle du toxique. La contamination à l'UE repose sur une démarche, plus fondamentaliste, d'exploration des effets radiotoxiques d'une contamination interne par une faible concentration d'uranium dilué dans une eau de boisson (recherche d'effets radiotoxiques non cancérogènes).

Dans le respect d'une démarche éthique et économique, la réalisation de contaminations internes par un métal neurotoxique (p.ex. cadmium ou plomb), par un sel de nitrate et d'expositions externes par irradiation (équivalente en activité à celle que nous avons pu obtenir par contamination interne), n'a pas été mise en œuvre.

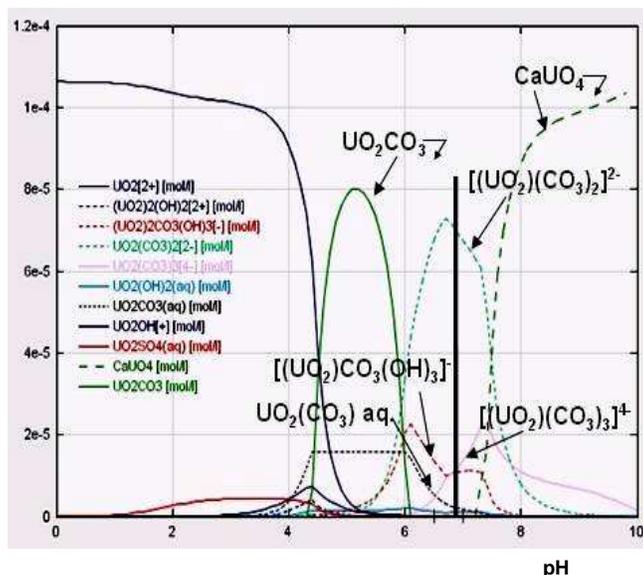
Les contaminations chroniques sont réalisées par ingestion libre d'une eau minérale naturelle (composition physico-chimique connue et composition minérale stable dans le temps, cf. tableau 08 et figure 14) supplémentée en uranium à la concentration unique de 40 mg d'uranium par litre d'eau pour

des périodes allant de 1 à 18 mois (cf. tableau 12). Ce qui correspond à 4mg.kg^{-1} au début de la contamination interne pour un rat de 300g buvant 30mL et seulement $1,5\text{mg.kg}^{-1}$ après 9mois pour un poids moyen de 650g. Cette concentration en uranium total a été calculée pour rester inférieure au seuil de néphrotoxicité (chez le rat = $1,2\mu\text{g.kg}^{-1}$, Diamond *et al.* 1989), même si le rat était amené à consommer cette boisson pendant deux années consécutives, considérant un facteur de transfert gastrique vers le compartiment sanguin de 2% (Wrenn *et al.*, 1985; Leggett, 1989). Elle représente également deux fois la plus forte concentration jamais retrouvée sur Terre, dans des eaux souterraines, au sud de la Finlande (Asikainen and Kahlos, 1980).

Minéraux	Concentration en mg.L^{-1}
Calcium	78
Magnésium	24
Sodium	5
Potassium	1
Bicarbonates	357
Chlorures	4,5
Nitrates	3,8
Silice	13,5
Sulfates	10
Uranium	0.00142 *
Résidu sec 180°C	309
pH à 20°C	7,2
Température à la source	11,6°C

Tableau n°08. Composition de l'eau minérale naturelle utilisée comme soluté du nitrate d'uranyle.

Figure n°14. Diagramme des espèces chimiques de l'uranium dans l'eau minérale en fonction du pH de l'eau (modélisation logiciel CHES) Frelon *et al.* 2005



* dosage ICPMS du laboratoire IRSN / LRTOX, hors info producteur.

Pour s'assurer du maintien des conditions physico-chimiques de l'uranium dans l'eau (stabilité des espèces chimiques de l'uranium), un suivi de pH est réalisé chaque semaine à la fois sur l'eau minérale et sur l'eau supplémentée, avant délivrance aux animaux. Dans l'eau entre pH 7 et pH 10, le nitrate d'uranyle hexahydraté utilisé $[\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ se décompose en oxyde d'uranium et se stabilise en majorité sous forme de complexes carbonatés d' UO_2^{2+} $[\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ ou $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}]$ (White and Bondietti, 1983 ;Frelon *et al.*, 2005).

Une mesure hebdomadaire de l'uranium pondéral présent dans les solutions d'eau supplémentée est également réalisée en Kinetic Phosphorescence Analysis (KPA) afin de vérifier la concentration en uranium (= 40mg.L^{-1}).

II.2.1.1. Contamination chronique à l'uranium appauvri (UA) :

La source d'uranium se présente sous la forme d'une poudre jaune de nitrate d'uranyle hexahydraté [PM=502,13g.mol⁻¹] (soit une teneur en uranium [PM=238g.mol⁻¹] de 47,4mg d'uranium pour 100mg de poudre). Les études ont été menées à l'aide de deux sources d'uranium appauvri à 0,255% d'²³⁵U : une source commerciale Prolabo® qui se présente sous la forme de poudre de nitrate d'uranyle hexahydraté (activité spécifique = 1,44.10⁴ Bq.g⁻¹), puis une source industrielle AREVA-COGEMA, usine TU2-Pierrelatte qui se présente sous la forme d'une poudre de nitrate d'uranyle hexahydraté obtenue au laboratoire à partir de pastilles d'UO₂ (activité spécifique = 1,47.10⁴ Bq.g⁻¹). Les durées des contaminations chroniques étaient de 1,5 mois, 6 mois et 9 mois (cf. tableau 12).

II.2.1.2. Contamination chronique à l'uranium enrichi (UE) :

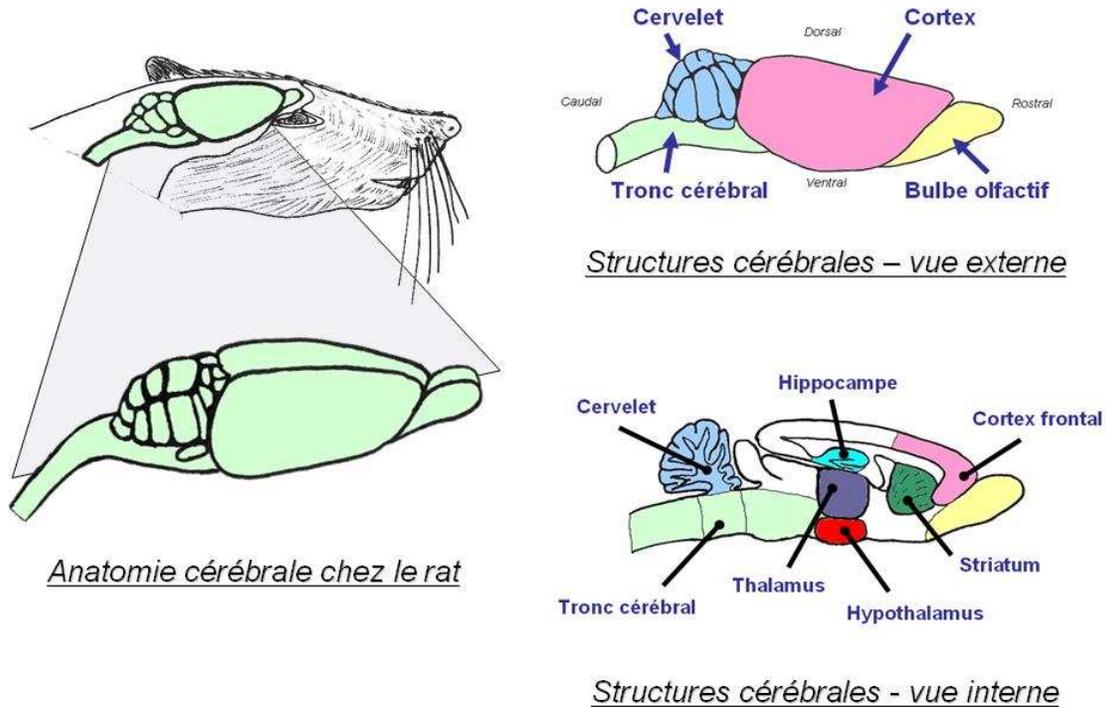
La source d'uranium se présente sous la forme d'une solution jaune de nitrate d'uranyle hexahydraté [PM=502,13g.mol⁻¹]. Les études ont été menées à l'aide de deux sources d'uranium enrichi en ²³⁵U fournies par le laboratoire central d'AREVA-COGEMA Pierrelatte. Première source : solution de nitrate d'uranyle hexahydraté, à 120g d'uranium total.L⁻¹ (en solution dans de l'acide nitrique 7 mol.L⁻¹), obtenue à partir d'UO₂ enrichi à 5,45% d'²³⁵U, activité spécifique = 1,30.10⁵ Bq.g⁻¹; utilisée pour les contaminations chroniques de 6 mois (dosage d'uranium), 9 mois (dosage d'uranium, monoamines et activité ChE) et 18 mois (monoamines et activité ChE). Seconde source : solution de nitrate d'uranyle hexahydraté, à 100g d'uranium total.L⁻¹ (en solution dans de l'acide nitrique 7 mol.L⁻¹), obtenue à partir d'U₃O₈ enrichi à 4,25% d'²³⁵U, activité spécifique = 6,63.10⁴ Bq.g⁻¹; utilisée pour les contaminations chroniques de 1,5 mois (dosage d'uranium, monoamines et activité ChE) et 9 mois (histologie, *travail en cours et non présenté ici*) (cf. tableau 12).

II.3. MATERIELS BIOLOGIQUES :

II.3.1. Prélèvements de structures cérébrales pour les dosages biochimiques (neurotransmetteurs + activité enzymatique) :

Au terme des périodes de contamination, les rats sont euthanasiés par décapitation. Les cerveaux sont rapidement extraits de la boîte crânienne et placés sur un support en verre en contact avec de la glace (+4°C). Différentes structures cérébrales (hippocampe, striatum, cervelet, hypothalamus et cortex frontal ; cf. figure 15) sont prélevées par microdissection selon une adaptation de la méthode de Glowinski et Iversen (Glowinski and Iversen, 1966) (cf. annexe 11 et 12), à l'aide de disséqueurs en verre, réalisés à façon pour ces expérimentations. L'usage de disséqueur en verre est préconisé afin de minimiser les interférences potentielles des instruments métalliques avec le détecteur électrochimique. Toutes les structures cérébrales, hors hypothalamus, sont séparées en deux lots d'échantillons (droit et gauche) avant d'être congelées immédiatement à -80°C (partie droite+ hypothalamus) ou en azote liquide (partie gauche), jusqu'à utilisation.

Figure n°15. Schéma de la localisation des structures cérébrales étudiées chez le rat.



II.3.2. Prélèvements de structures cérébrales pour le dosage de l'uranium :

Lorsque les cerveaux ne sont utilisés que pour l'évaluation de la teneur en uranium, les rats sont anesthésiés par anesthésie gazeuse à l'isoflurane (AErrna[®], Baxter SA, France, sur système de chez T.E.M., Bordeaux, France) puis euthanasiés par ponction cardiaque (exsanguination). La microdissection cérébrale suit la même procédure que celle décrite ci-dessus. Toutefois un plus grand nombre de structures cérébrales a parfois été prélevé (cf. figure 47 dans Chapitre III). L'uranium n'étant présent qu'en trace infime (ppb = ng.g⁻¹) dans le cerveau, une attention particulière doit être portée à la réalisation des dissections des rats témoins avant celles des rats contaminés afin de ne pas induire de contamination des cerveaux témoins.

II.3.3. Prélèvements des autres parties du corps, différents compartiments de contamination :

Les méthodes de dissection utilisées pour récupérer les différentes parties du corps sont conformes aux méthodes décrites dans l'ouvrage de B.D. Wingerd (Wingerd, 1988).

Les pattes, la peau et la queue (= C1) (cf. tableau 09) des rats constituent la contamination externe de l'animal qui évolue dans un espace réduit et entre en contact avec ses déjections, ses urines et l'eau des biberons qui peut s'en écouler et se répandre sur le pelage. Le tractus gastro-intestinal (=C2), depuis l'œsophage jusqu'à l'anus, constitue le compartiment le plus contaminé puisque c'est le compartiment en contact direct avec le contaminant présent dans le bol alimentaire. Le restant du corps est le compartiment interne (C3) où l'uranium est présent après absorption au niveau de l'intestin et diffusion dans l'ensemble du corps par voie sanguine. Ces trois compartiments doivent donc être disséqué séparément avec le plus grand soin afin d'éviter les contaminations croisées (Wingerd, 1988) (cf. tableau 09).

Concernant le compartiment interne, les reins et les fémurs (représentant le squelette) (=C3 bis) constituent les deux tissus cibles de l'uranium et sont donc prélevés séparément. Les reins sont débarrassés de la graisse qui les entoure. Les fémurs sont prélevés avec le minimum de muscles.

Tableau n°09. Différents compartiments de contamination

Compartiment de contamination	Organes correspondants
C1, externe	Peau + pattes + queue
C2, interne et digestif	Œsophage + estomac + intestin + colon + rectum
C3, interne, restant du corps hors C3 bis	Restant du corps, tissus mous + squelette
C3 bis, interne, organes cibles	Reins + fémurs

II.4. DOSAGE DE L'URANIUM :

II.4.1. Préparation des échantillons biologiques (Ejnik *et al.*, 2000) :

Les deux pendants des structures cérébrales symétriques (striatum, hippocampe et cortex frontal) sont réunis pour avoir assez de matière. Reins et fémurs sont aussi réunis par paires.

Les échantillons biologiques, cerveaux et autres parties du corps conservés à -20°C, sont placés dans un récipient en pyrex, passés au four (four à moufle) à 100°C pour déshydratation pendant 24h, puis calcinés à 300°C pendant 24h, et enfin 600°C pendant 48h. A la sortie du four, les échantillons sont minéralisés par reprise en acide nitrique HNO₃ fumant 65% (13,5 mol.L⁻¹), en présence de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ 30%, et sont évaporés sur plaque à 100°C. La reprise en acide + H₂O₂ est répétée autant de fois que nécessaire pour obtenir un reliquat blanc (indispensable pour le dosage en KPA).

II.4.2. Dosage par KPA : Kinetic Phosphorescence Analyser

Les mesures ont été réalisées sur un Kinetic Phosphorescence Analyser (KPA-11, Chemchek, USA, cf. annexe 7) avec une gamme préparée en acide nitrique conformément à des techniques déjà décrites (Hedaya *et al.*, 1997; Ejnik *et al.*, 2000; Ejnik *et al.*, 2005). La détermination de la concentration d'uranium repose sur la mesure des paramètres caractéristiques de la cinétique de décroissance de la phosphorescence de l'uranium après excitation LASER à 425 nm. Les mesures sont effectuées en simultané sur une cellule de référence à la concentration de $250\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pour palier les déviations instrumentales. La limite de détection théorique est fixée à : $1\cdot 10^{-2}\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Cette technique de mesure a été utilisée afin de quantifier l'uranium dans les reins et les fémurs. Les résultats sont exprimés en ng d'uranium total par g de poids frais.

Les résidus secs blanchis sont repris dans de l'acide nitrique $2,5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (sol. mère JT Baker 65%), homogénéisés sur plaque à rotation orbitale, puis dilués pour se retrouver en acide nitrique $1,25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (sol. mère JT Baker 65%). Le diluât est alors dosé en duplicate.

II.4.3. Dosage par ICPMS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer

Les mesures ont été réalisées sur un Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICPMS -VG PQ Excell, Thermoelectron, France, cf. annexe 7) avec le bismuth pour étalon interne ($1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Le dosage par ICPMS est fondé sur le couplage d'une torche à plasma qui atomise puis ionise les échantillons après leur nébulisation dans une source d'argon, et un spectromètre de masse qui sépare ces ions selon leur masse atomique. Ici ^{238}U et ^{235}U sont les deux ions quantifiés pour aboutir à une valeur en uranium total. Chaque échantillon est dosé 5 fois à partir d'une même dilution. La limite de détection théorique est fixée à : $1,07\cdot 10^{-4}\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Cette technique de mesure a été utilisée pour abaisser le seuil de détection de l'uranium présent en traces dans les structures cérébrales. Afin de procéder à l'analyse isotopique de l'uranium quantifié, reins et fémurs ont parfois également été dosés en ICPMS (cf. annexe 10).

Les méthodes spécifiques de dosage des échantillons de cerveaux, de reins et de fémurs ont été mises au point et validées au laboratoire LRTOX à partir d'études réalisées pour des urines humaines (Baglan *et al.*, 1999; Baglan *et al.*, 2001). En pratique, les résidus secs blanchis sont repris la veille du dosage dans de l'acide nitrique ultrapur à 20% (sol. mère JT Baker 70% ultrapur) puis homogénéisés toute la nuit sur plaque à rotation orbitale.

Le striatum, l'hypothalamus, le cervelet, le cortex frontal, l'hippocampe sont dilués au $1/17^{\text{ème}}$ pour être ramenés en acide nitrique 2% ultrapur en présence de bismuth ($1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ final). Le cortex entier ou le tronc cérébral ont été dilués au $1/50^{\text{ème}}$ pour obtenir un meilleur rendement sur les 5 mesures de chaque échantillon. Avant dilution, les homogénats sont passés aux ultrasons (10 sec.). Les résultats sont exprimés en ng d'uranium total par g de poids frais.

II.5. DOSAGE DES MONOAMINES (DOPAMINERGIQUES ET SEROTONINERGIQUES) CÉRÉBRALES :

Les dosages sont effectués sur l'hypothalamus et les parties droites des prélèvements (hippocampe, striatum, cervelet et cortex frontal), conservés à -80°C jusqu'au moment du dosage.

La méthode de dosage décrite ci-dessous est un transfert de méthodologie, mise au point au centre de recherches Emile Pardé du service de santé des armées (CRSSA) (Martin *et al.*, 2001) et adaptée de la méthode décrite par Aymard (Aymard *et al.*, 1983) (cf. annexe 7 et 8).

Les concentrations des monoamines cérébrales, neurotransmetteurs et produits de dégradation enzymatique (métabolites) des systèmes dopaminergique et sérotoninergique ont été mesurées *post-mortem* sur broyats tissulaires de cinq structures cérébrales d'intérêt : striatum (ST), hippocampe (HI), cervelet (CE), cortex frontal (CO) et hypothalamus (HY). Les taux mesurés de dihydroxyphénylacétate (DOPAC), de 3-méthoxytyramine (3MT), d'acide homovanilique (HVA), de dopamine (DA), d'acide 5-hydroxyindoleacétique (5HIAA) et de 5-hydroxytryptamine (= sérotonine, 5HT) rendent compte non seulement du taux synaptique mais aussi du taux intracellulaire de ces composés neurochimiques.

II.5.1. Principe du dosage électrochimique après séparation en chromatographie liquide haute performance :

La chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC), phase inverse, utilisée en amont du dosage constitue la méthode de séparation des différents composants (composés neurochimiques) présents au sein de l'échantillon. La phase stationnaire du système se compose d'une silice apolaire greffée de ligands hydrophobes (chaîne aliphatique C18). La phase mobile, polaire et hydrophile, qui entraîne l'échantillon, se compose ici d'une solution aqueuse de phosphate et de méthanol (13%). La séparation au sein de la colonne de silice greffée dépend de l'affinité du composé, entraîné par la phase mobile, pour la phase stationnaire : plus le composé est polaire, plus son temps de rétention dans la colonne sera grand.

La détection neurochimique repose sur le principe d'électrolyse du soluté, où la phase mobile est un éluant conducteur et l'échantillon, un soluté conducteur électro-actif. L'électrolyse se déroule entre les deux électrodes de la cellule de travail, portées à des potentiels déterminés pour obtenir une réponse optimale. L'enregistreur couplé au détecteur électrochimique reçoit un signal constant (la ligne de base = phase mobile) entrecoupé de pics correspondant à l'élution des différents composés neurochimiques de l'échantillon. Le courant ou aire du pic rend compte de la concentration du composé par rapport à une courbe d'étalonnage et à un étalon interne dosé avec chaque échantillon.

II.5.2. Préparation tissulaire :

Les échantillons cérébraux, conservés à -80°C , sont broyés à 4°C dans un homogénéiseur en verre (Kontes Glass, Duall) en présence d'une solution d'extraction (HClO_4 , $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$; EDTA, 0,1% ; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 0,1%) contenant un étalon interne : 3,4 DHBA ($3,4$ dihydroxybenzylamine, à $4.10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$). Les broyats tissulaires sont centrifugés à 4500g , pendant 10 min, à 4°C .

Le surnageant est dilué au demi dans la phase mobile (NaH_2PO_4 , 6g.L^{-1} ; EDTA, 1g.L^{-1} ; Pic B7 (contre ions, Waters), 0,5% ; Méthanol pour HPLC, 13%), puis filtré sur $0,45\mu\text{m}$ (filtre seringue SGE, Interchim, France) et enfin réparti en 3 à 6 aliquotes dans des micro-tubes HPLC (chromacol, Interchim, France). Ces aliquotes sont conservés à -80°C jusqu'au jour du dosage HPLC-ECD.

Le culot est repris pendant 24h à 4°C dans une solution de NaOH 5mol.L^{-1} (pour dissoudre les protéines), en présence de DMSO, puis passé aux ultrasons et au vortex pour obtenir un homogénat. Ces homogénats sont conservés à -20°C jusqu'au dosage protéique.

Les volumes de solution d'extraction ont été optimisés pour obtenir des concentrations élevées en monoamines et obtenir un bon signal électrochimique (cf. tableau 10). Il en est de même pour la solubilisation des culots en vu du dosage protéique (cf. tableau 11).

Tableau n°10. Optimisation des volumes d'extraction tissulaire

Volume de solution d'extraction en μL	Structure
1500	ST
800	HI
400	HY
1000	CO
2000	CE

Tableau n°11. Optimisation des volumes de reprise d u culot d'extraction

Volume de NaOH	Volume de DMSO	structure
2mL	500 μL	ST
2mL	500 μL	HI
750 μL	250 μL	HY
2mL	500 μL	CO
2mL	500 μL	CE

II.5.3. Dosage électrochimique après séparation HPLC :

Les concentrations de monoamines cérébrales sont déterminées par détection électrochimique (ECD) après séparation sur colonne de type C18 (modulo-cart Uptisphère, UP3ODB-15T, Interchim, France ; muni d'une précolonne, CH185840, Interchim, France) (granulométrie $3\mu\text{m}$, diam. interne $4,6\text{mm}$, long. 150mm) maintenue à 30°C (four colonne, Croco-CIL, C.I.L, Sainte-Foy-la-Grande, France), en chromatographie liquide haute pression (HPLC) phase inverse dans une pièce climatisée à $19-20^{\circ}\text{C}$.

Le système chromatographique se compose d'une pompe (modèle 582, ESA, Eurosep instruments, France) utilisée en mode isocratique au débit constant de $1,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ et d'un injecteur automatique (CMA200 monté avec vanne VICI, Phymep, France) équipé d'une boucle de chargement de $250 \mu\text{L}$. La détection est réalisée au moyen d'un détecteur coulométrique (Coulochem II, ESA, Eurosep instruments, France) possédant une cellule de travail (modèle 5011, ESA, Eurosep instruments, France) à deux électrodes (E1 et E2), portées à des potentiels déterminés pour obtenir une réponse optimale (E1 = +100mV et E2 = + 400mV). Le logiciel Borwin (Borwin 5.0, Le Fontanyl, France) est utilisé pour acquérir et traiter les données. L'ensemble des systèmes électriques est placé sur onduleur pour stabiliser le courant. La phase mobile se compose de NaH_2PO_4 ($6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), d'EDTA ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) de Pic B7 (contre ions, Waters, 0.5%) et de méthanol pour HPLC (13%). La phase mobile est dégazée par filtration sous vide à $0,45 \mu\text{m}$ (filtre HVLP, Millipore, France) sur une unité de filtration Millipore (Millipore, France) et maintenue à pH 3,95. Les conditions adoptées permettent la séparation et le dosage des 7 composés (3,4DHBA, DA, DOPAC, 3MT, HVA, 5HIAA et 5HT) en moins de 30 minutes (cf. figure 16 et annexe 7 et 8).

Pour l'ensemble des expérimentations, le dosage du métabolite 3MT de la dopamine n'a été réalisé que dans le striatum en raison de difficultés techniques pour obtenir un dosage optimal dans les autres structures cérébrales. En effet, dans le reste du cerveau, la concentration de 3MT est trop faible pour permettre de distinguer convenablement sur le chromatogramme, le pic d'élution de ce composé de celui de la sérotonine (temps d'élution très proche).

Les concentrations obtenues par HPLC-ED sont rapportées au taux de protéines totales du culot d'extraction et corrigées par le rendement d'extraction de l'étalon interne 3,4 DHBA. Les résultats sont exprimés en ng de monoamines par g de protéines.

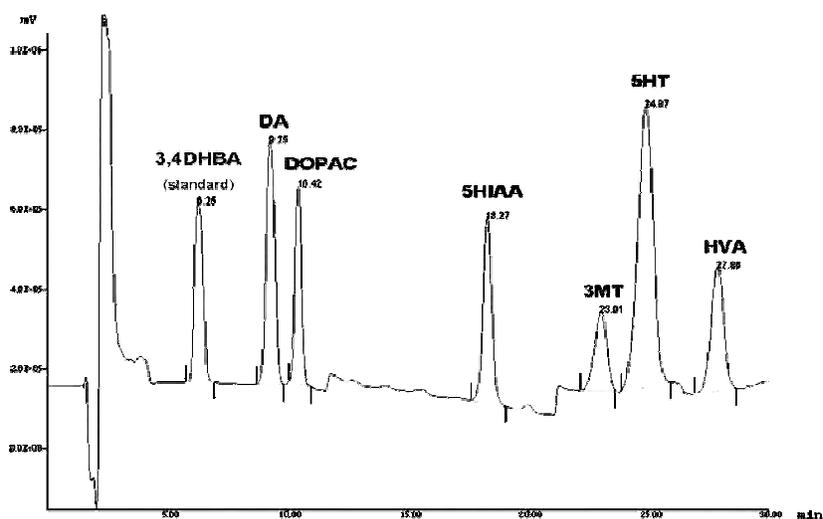


Figure n° 16. Exemple de chromatogramme obtenu pour le dosage des monoamines et de leurs métabolites dans le striatum après 1,5 mois de contamination chronique.

Colonne : Uptisphère, C18, $3 \mu\text{m}$, \varnothing 4,6 mm, 150 mm, Interchim
 Phase mobile : NaH_2PO_4 ($6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), EDTA ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), Pic B7 (0.5%), méthanol (13%)
 Débit : $1,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ Volume d'injection : $23 \mu\text{L}$
 Concentration du standard interne : $4 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

II.5.4. Dosage des protéines :

La détermination de la quantité de protéines dans un homogénat tissulaire peut-être réalisée par différentes techniques qui reposent le plus souvent sur le virage colorimétrique du réactif de dosage en fonction du taux de protéines en présence (Lowry *et al.*, 1951). Ici, la technique BCA utilise le pouvoir réducteur des protéines en milieu alcalin pour transformer les ions cuivre II en ions cuivre I qui se complexent alors avec l'acide bincinchonique (réaction du biuret, (Smith *et al.*, 1985)).

Le taux de protéines est mesuré à 562nm (spectrophotomètre DU 7500, Beckman Coulter, France, cf. annexe 7) sur les culots d'homogénats d'extraction tissulaire par la méthode photométrique à l'acide bincinchonique (BCA protein assay reagent kit, Uptima, Interchim, France) en utilisant la sérum-albumine bovine comme standard.

II.6. MESURE DE L'ACTIVITE DES CHOLINE ESTERASES (ChE) CEREBRALES

Les dosages sont effectués sur les parties gauches des prélèvements (ST/ CO/ CE/ HI), conservés en azote liquide jusqu'au moment du dosage. Nota Bene : En absence d'inhibiteurs spécifiques, la méthode classique décrite ci-dessous mesure l'activité totale des choline-estérase cérébrales (acétyl-, butyryl-,) sans mesurer uniquement celle de l'activité de l'acétylcholine-estérase.

II.6.1. Principe de la technique : méthode d'Ellman par spectrophotométrie (Ellman *et al.*, 1961)

La mesure de l'activité enzymatique ChE repose sur la méthode d'Ellman par spectrophotométrie. Le substrat de l'enzyme dont on veut mesurer l'activité est constitué par l'acétylthiocholine. Le DTNB (acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)) ou réactif d'Ellman est un chromogène⁵ dans une réaction d'oxydo-réduction consécutive à la réduction enzymatique de l'acétylthiocholine en thiocholine. Le groupement thiol de la thiocholine réduit le DTNB en TNB (acide 5-thio (2-nitrobenzoïque)), composé jaune qui possède une absorbance maximale à 412-415 nm. L'augmentation de la coloration dans le temps indique la formation de thiocholine qui est le reflet de l'activité de l'enzyme.

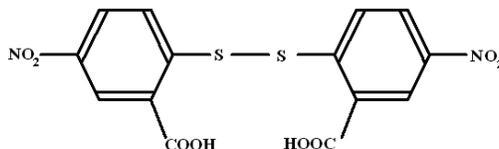


Figure n°17. Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque), DTNB ou réactif d'Ellman.

⁵ Chromogène : composé incolore qui après réaction chimique se transforme en composé doué de propriétés chromatiques.

II.6.2. Préparation de l'homogénat de cerveau :

Le jour du dosage, les structures cérébrales prélevées puis conservées en azote liquide sont homogénéisées à 4°C dans 20 volumes de tampon Tris/HCl (50mmol.L⁻¹, pH7,4)-sucrose (0,32 mol.L⁻¹) dans un homogénéiseur en verre (Kontes Glass, Duall). Le broyat est centrifugé à 1000g, pendant 15 min, à 4°C. Après centrifugation, les surnageants sont récupérés pour effectuer la mesure de l'activité ChE et le taux de protéines.

II.6.3. Mesure de l'activité ChE :

La solution de substrat (acétylthiocholine, 1,9mmol.L⁻¹) est préparée le jour du dosage. La solution de chromogène (DTNB, 0,33mmol.L⁻¹) est conservée à -20°C en aliquotes. Le mélange réactionnel est réalisé directement dans la cuve de dosage. L'activité est évaluée contre un blanc à 25°C, pH7, dans un tampon phosphate de sodium (0,1mol.L⁻¹, pH7) en présence du substrat (40µL), du chromogène (100µL) et de 100µL d'échantillon. L'absorbance est mesurée à 412nm pendant 10min avec un intervalle de 60s entre chaque mesure sur un spectrophotomètre (DU 7500, Beckman Coulter, France, cf. annexe 7 et 9).

Le taux de protéines du surnageant est évalué à 562nm (spectrophotomètre DU 7500, Beckman Coulter, France, cf. annexe 7) sur les surnageants d'homogénats d'extraction tissulaire par la méthode à l'acide bicinchonique (BCA protein assay reagent kit, Uptima, Interchim, France) avec la sérum albumine bovine comme standard (Lowry *et al.*, 1951; Smith *et al.*, 1985) afin de ramener la valeur en µmoles de groupement thiol, par min et par mg de protéine.

II.7. ANALYSE STATISTIQUE

Les séries de données ont été comparées lot à lot (témoins *versus* contaminés) et les différences ont été analysées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney (test de rangs) sur le logiciel Stat View 5.0. Lorsqu'il y avait plus de deux lots à comparer (1,5 et 9 mois), une analyse complémentaire entre les trois séries de données a été menée à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis (test de rangs). Les différences sont considérées comme significatives pour $p < 0,05$, très significatives pour $p < 0,01$ et indicatives pour $p < 0,1$.

Tableau n°12. Plan expérimental

	<u>Temps de contamination</u>		<u>Paramètres mesurés</u>			<u>Age du rat en mois</u>
			<i>Dosage d'uranium cérébral</i>	<i>Dosage des monoamines</i>	<i>Mesure de l'activité ChE</i>	
	Aiguë UA		<input checked="" type="checkbox"/> n = 20	↔ <input checked="" type="checkbox"/> n = 20	<input type="checkbox"/>	2 / 2,5 m.
	1,5 mois UA	Inter comparaison entre deux types de contaminations	<input checked="" type="checkbox"/> n = 10	<input checked="" type="checkbox"/> n = 12 ↔ <input checked="" type="checkbox"/> n = 12	<input checked="" type="checkbox"/> n = 12	3,5 / 4 m.
	1,5 mois UE		<input checked="" type="checkbox"/> n = 10	<input checked="" type="checkbox"/> n = 12 ↔ <input checked="" type="checkbox"/> n = 12		
	6 mois UA		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> n = 8 ↔ <input checked="" type="checkbox"/> n = 8	<input type="checkbox"/>	8 / 8,5 m.
	6 mois UE		<input checked="" type="checkbox"/> n = 10	<input type="checkbox"/>		
	9 mois UA	Inter comparaison entre deux types de contaminations	<input checked="" type="checkbox"/> n = 10	<input checked="" type="checkbox"/> n = 12 ↔ <input checked="" type="checkbox"/> n = 12	<input checked="" type="checkbox"/> n = 12	11 / 11,5 m.
	9 mois UE		<input checked="" type="checkbox"/> n = 08	<input checked="" type="checkbox"/> n = 10 ↔ <input checked="" type="checkbox"/> n = 10		
	18 mois UE		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> n = 12 ↔ <input checked="" type="checkbox"/> n = 12	<input checked="" type="checkbox"/> n = 12	20 / 20,5 m.

<input type="checkbox"/>	Contamination uranium appauvri	<input checked="" type="checkbox"/>	Expérimentation réalisée
<input type="checkbox"/>	Contamination uranium enrichi	<input type="checkbox"/>	Expérimentation non réalisée
<input type="checkbox"/>	Inter comparaison entre deux types de contaminations	N = X	Nombre de rats par point
		↔	Rats identiques

Pour des raisons éthiques (régulation du nombre d'animaux contaminés), le dosage d'uranium dans les différentes structures cérébrales n'a pas été réalisé à 6 mois (UA) et à 18 mois (UE).

A 6 mois (UE), les échantillons cérébraux avaient été destinés aux dosages biochimiques (monoamines et ChE). Mais en raison de problèmes techniques et d'une dégradation possible des structures, le protocole initial a été reconverti en dosage d'uranium cérébral.

A 18 mois, les dosages d'uranium dans les tissus cibles (reins et fémurs) n'ont pas été réalisés, à ce jour, car les animaux utilisés dans cette étude (uranium enrichi et témoin) ont été comparés à un troisième lot d'animaux, contaminés avec un autre radionucléide, pour lequel des dosages physico-chimiques (préliminaire à la calcination/minéralisation) sont en cours de traitement.

Chapitre III

- RESULTATS -

« A la source de toute connaissance, il y a une idée, une pensée, puis l'expérience vient confirmer l'idée. »

Claude Bernard, *physiologiste français*.

Chapitre III - RESULTATS :

III - Partie 1. Contamination Aiguë

Le but des études de toxicité aiguë est classiquement de renseigner sur le choix des doses à utiliser pour la phase d'étude à long terme (détermination de la DL50 et des effets immédiats de l'empoisonnement). Ici, la DL50 étant connue par la littérature (~200mg.kg⁻¹), nous avons choisi d'utiliser une dose de 70µg.kg⁻¹ de poids corporel (dose non néphrotoxique) (Houpert et al. 2003) afin de valider la technique de dosage des neurotransmetteurs par détection électrochimique après séparation HPLC, avant de réaliser les contaminations chroniques, principaux objectifs de ce travail de thèse.

Rappel des paramètres mesurés 6 heures après un injection i.p. d'UA (70µg.kg⁻¹):

- ❑ Suivi hebdomadaire de l'évolution pondérale, de la prise alimentaire et de boisson avant la contamination = 15 jours avant l'expérimentation (40 rats),
- ❑ Dosages des monoamines par HPLC-ECD dans la partie droite du cerveau des 40 rats (striatum, hippocampe, cervelet, cortex frontal et hypothalamus),
- ❑ Dosage d'uranium par ICPMS dans la partie gauche du cerveau de ces mêmes 40 rats (striatum, hippocampe, cervelet et cortex frontal).

III.1.1. PARAMETRES GENERAUX :

Au cours de la phase de « quarantaine », c-à-d. 15 jours, et avant l'expérimentation, les rats n'ont manifesté aucun trouble particulier lors de leur séjour à l'animalerie. Leur poids a évolué de 234 ± 6,25g à 336 ± 15,55g, soit un gain de poids quotidien moyen de 9,0 ± 1,5g par rat. Les consommations quotidiennes d'aliments et de boisson ont été respectivement de 25,2 ± 4,4g et 27,0 ± 5,9g. Ces données correspondent aux caractéristiques de l'espèce Sprague Dawley pour des rats du même âge, c-à-d. 9 semaines (données biologiques Charles River Laboratories, rat OFA-SD, mars 1997).

Après l'injection de nitrate d'uranyle ($70\mu\text{g.kg}^{-1}$), aucune modification du comportement général des animaux n'a été constatée durant les 6 heures post-i.p. (observation vétérinaire). Les reins des rats contaminés pesaient $2,50 \pm 0,28\text{g}$ contre $2,47 \pm 0,25\text{g}$ pour les témoins. Ce dernier résultat est en accord avec les données biologiques pour des rats Sprague Dawley du même âge (données biologiques Charles River Laboratories, rat OFA-SD, mars 1997). Six heures après une injection i.p. d'uranium à la dose de $70\mu\text{g.kg}^{-1}$, aucun effet n'a été observé sur le poids des reins, organe d'accumulation immédiate de l'uranium après contamination aiguë.

III.1.2. DOSAGE DES MONOAMINES (HEMISPHERE DROIT) :

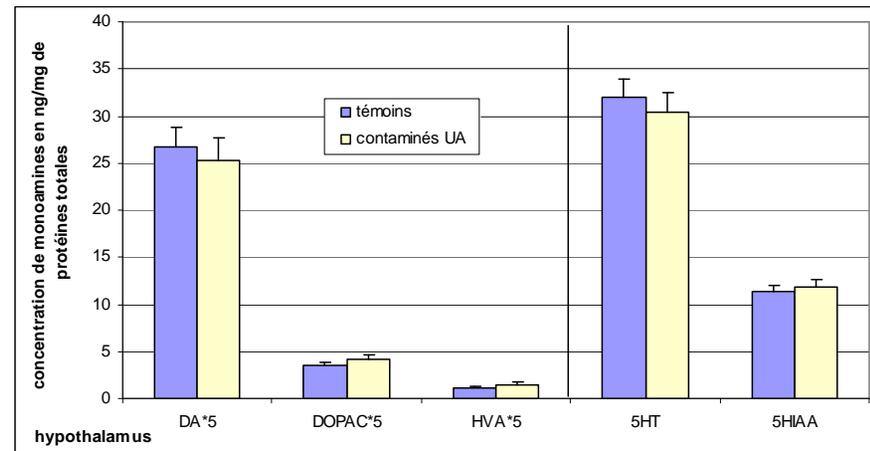
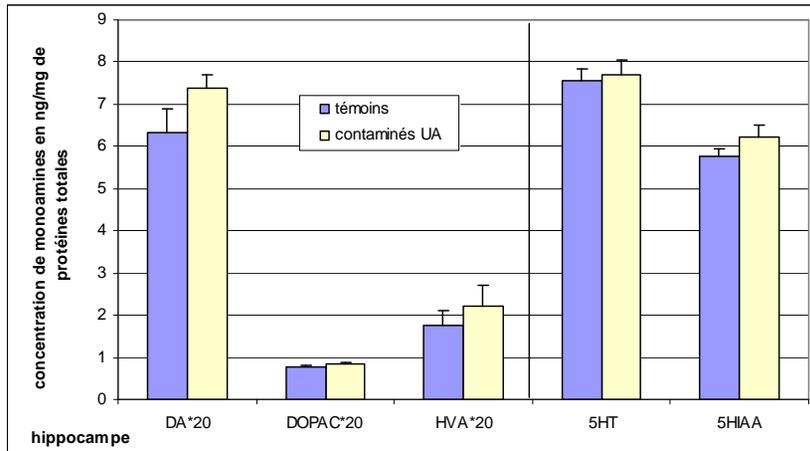
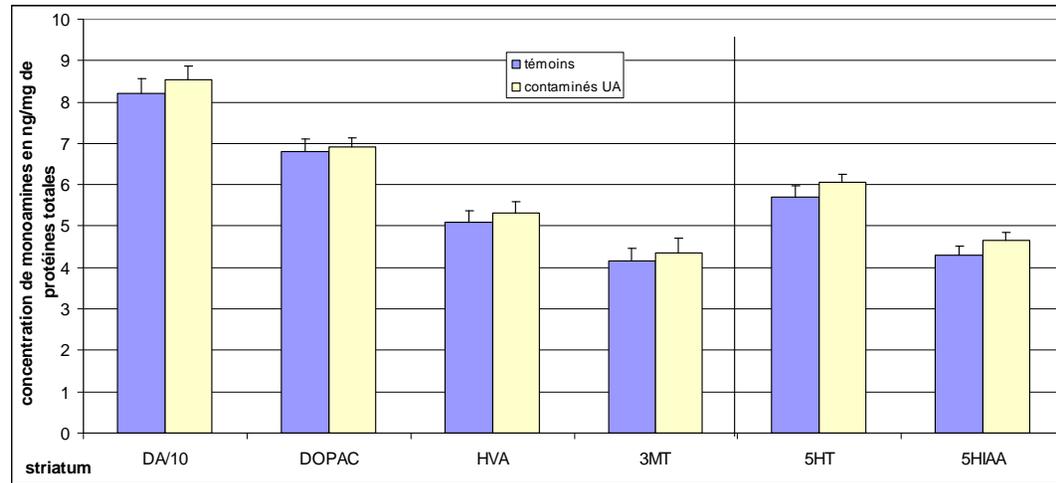
Les résultats de dosage électrochimique après séparation HPLC des monoamines (dopamine et sérotonine) ainsi que leurs principaux métabolites sont présentés dans la série d'histogrammes de la figure n°18. Ces dosages sont réalisés dans la partie droite de quatre structures cérébrales, c-à-d. hippocampe, striatum, cortex frontal, cervelet, et dans l'hypothalamus, après une injection i.p. de nitrate d'uranyle à la dose de $70\mu\text{g.kg}^{-1}$. L'analyse statistique des dosages indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les rats soumis à une contamination à l'uranium et les rats témoins quelle que soit la structure cérébrale considérée ($p > 0,05$).

Les calculs de turnover des systèmes dopaminergique et sérotoninergique sont représentés dans la série d'histogramme de la figure n°19.

Dans l'hypothalamus, l'analyse statistique montre qu'il existe une hausse significative du turnover sérotoninergique ($p=0,04$) ainsi qu'une hausse indicative du turnover dopaminergique [pour rappel (DOPAC+HVA) / DA] ($p=0,05$) accompagnée d'une hausse significative du rapport DOPAC/ DA ($p=0,04$). L'augmentation du turnover 5HTergique semble pouvoir être expliquée par une légère baisse de 5HT (-5%) et une hausse de 5HIAA (+5%), ce qui correspondrait à une augmentation de la dégradation de la sérotonine chez les rats contaminés par rapport aux rats témoins. Le rapport DOPAC/DA est un reflet du taux de dégradation de la dopamine par la voie intracellulaire. Cette dégradation serait donc elle aussi plus importante chez les animaux contaminés par rapport à leurs équivalents témoins (-5% de dopamine pour +19% de DOPAC, chez les rats contaminés).

Dans l'hippocampe, les données statistiques indiquent une baisse significative du rapport DOPAC/DA ($p < 0,001$) et une hausse indicative du turnover 5HTergique ($p=0,08$). La baisse du turnover DAergique est la conséquence d'une hausse globale des taux des divers composés dopaminergiques (+16% pour DA, +9% pour DOPAC et +26% pour HVA). De même, la hausse du turnover 5HTergique est aussi le résultat d'une hausse globale des composés sérotoninergiques mais avec une augmentation prépondérante du taux de 5HIAA (+8%) par rapport à celui du neurotransmetteur (+2%).

Pour les autres structures, mêmes si quelques tendances pourraient être évoquées (augmentation de l'anabolisme des deux monoamines dans le striatum, baisse de l'anabolisme des deux monoamines dans le cortex frontal, hausse de l'anabolisme dopaminergique et hausse du catabolisme sérotoninergique dans le cervelet) (cf. figures 18 et 19), aucune donnée statistique ne confirme ces observations.



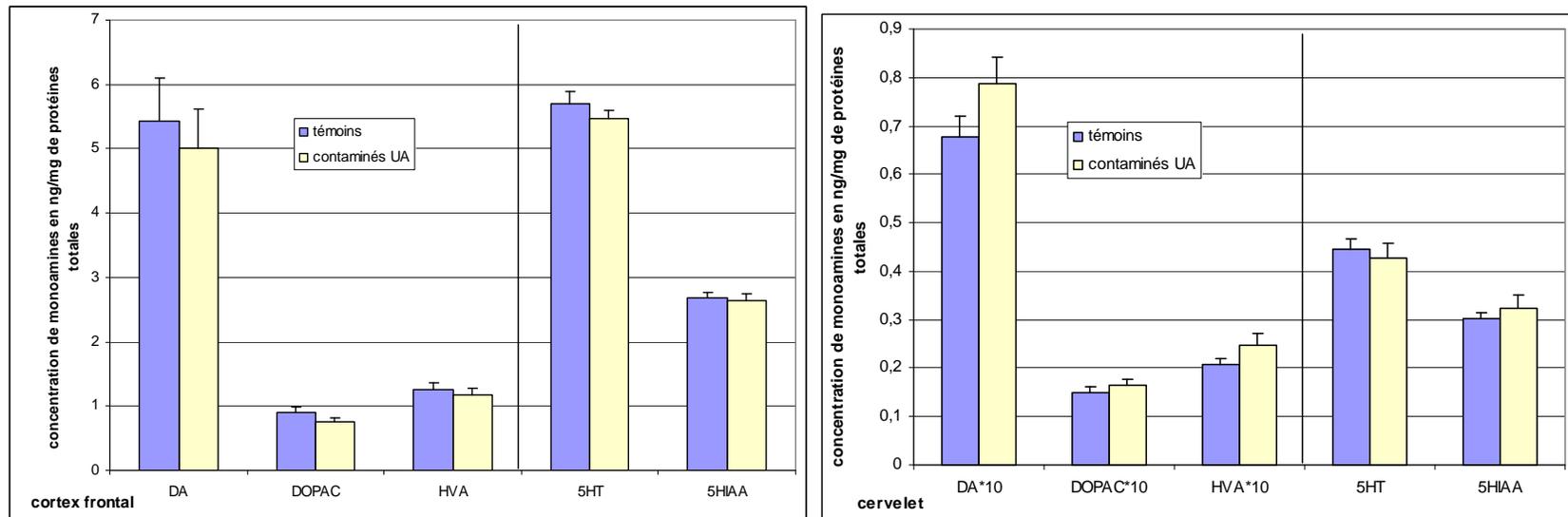
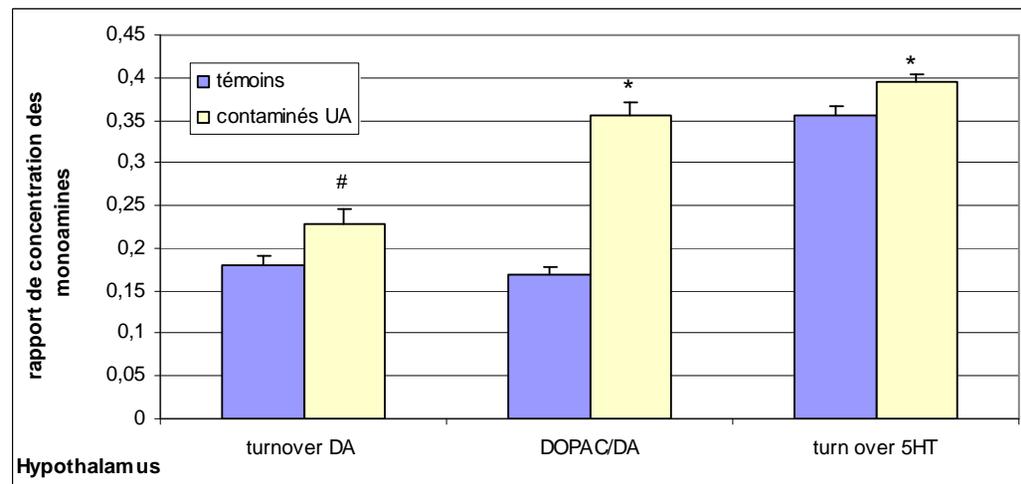
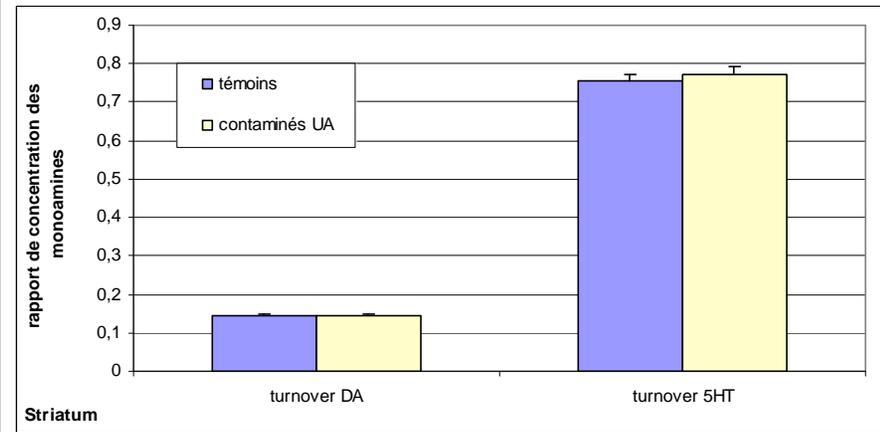
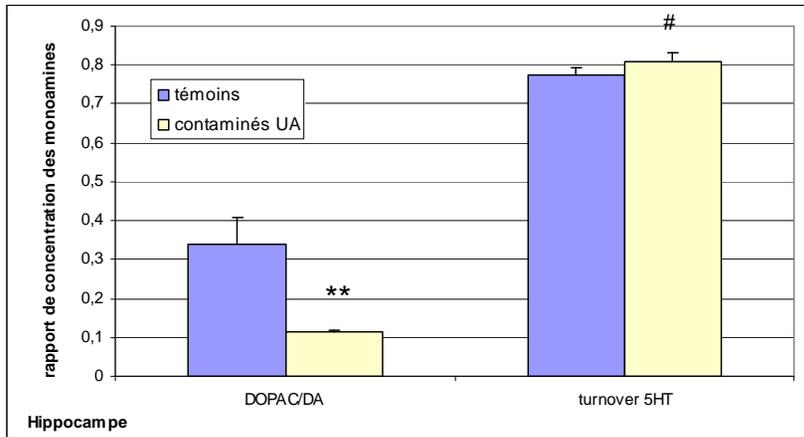


Figure n°18. Taux de monoamines en ng.mg^{-1} de protéines totales dans différentes structures cérébrales, après une injection i.p. d'UA, $70\mu\text{g.kg}^{-1}$ (cf. annexe 1, taux de protéines).

Métabolisme dopaminergique : dopamine (DA), acide 3,4-dihydroxyphényl acétique (DOPAC), 3-méthoxydopamine (3MT) et acide homovanillique (HVA). Métabolisme sérotoninergique : sérotonine (5HT), acide 5-hydroxyindolacétique (5HIAA). n=20 pour TE (témoins) et UA (uranium appauvri). Valeurs : moyenne \pm erreur standard.



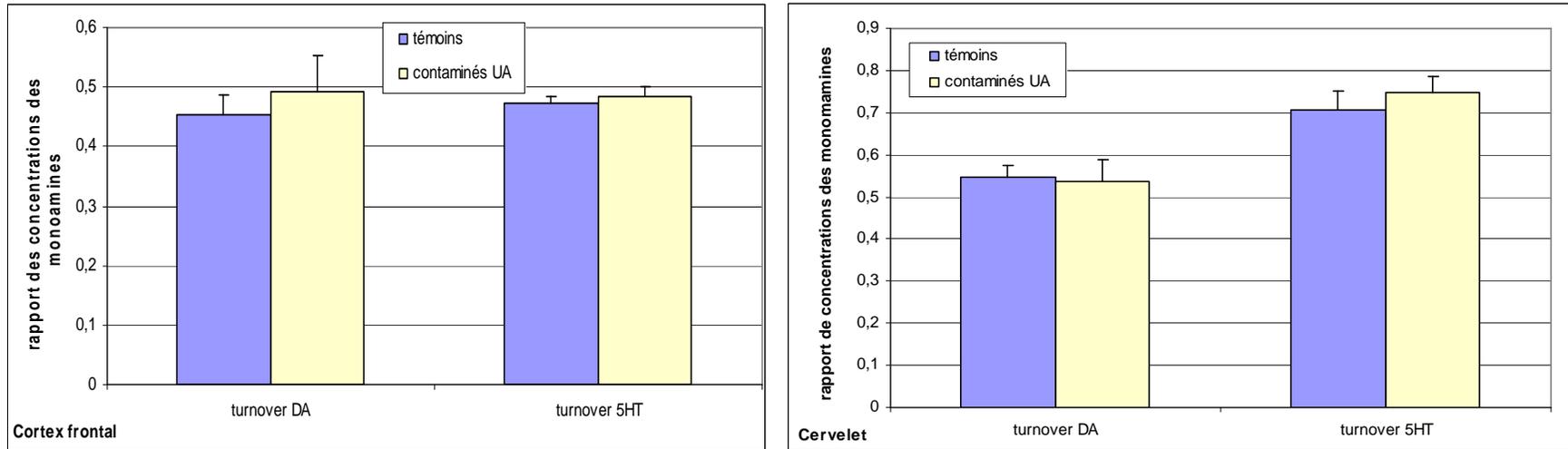


Figure n°19. Turnover des monoamines dans différentes structures cérébrales, après une injection i.p. d'UA, 70µg.kg⁻¹.

Rapport des concentrations de métabolites sur la concentration de neurotransmetteurs, dopamine (DA) et sérotonine (5HT) : (DOPAC+HVA)/DA [ou DOPAC/DA lorsque HVA non détectable par le système électrochimique] et 5HIAA/5HT. # différence indicative par rapport aux témoins $p < 0,1$; * différence significative $p < 0,05$; ** différence très significative $p < 0,01$; $n=20$ pour TE (témoins) et UA (uranium appauvri). Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

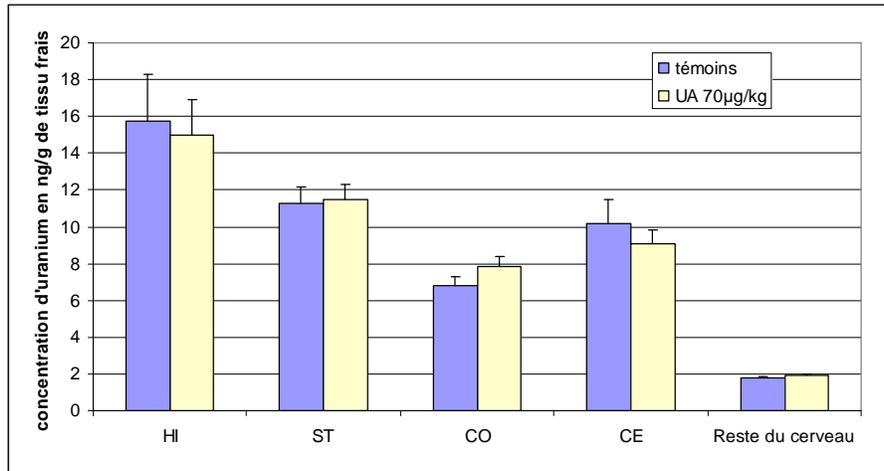
L'analyse statistique des mesures de taux de protéines totales indique qu'il n'y pas de différence significative entre les séries uranium et témoin hormis pour le striatum, où il y a une baisse significative du taux de protéines (-11%, $p=0,02$) (cf. tableau A-1, annexe 1). Ce résultat est à rapprocher d'une baisse indicative du poids du striatum observée sur l'hémisphère gauche de ces mêmes rats (cf. tableau B-1, annexe 1). En opposition aux effets fonctionnels sur la neurochimie, il semble difficile d'imputer cette baisse de poids (effet structural) au traitement à l'uranium après un laps de temps, 6 heures entre l'injection et la dissection, aussi court. En absence de preuve expérimentale directe, la baisse du poids du striatum pourrait être expliquée par l'hétérogénéité des deux lots d'animaux et les variations physiologiques naturelles entre individus avant l'expérimentation. Enfin, cette différence de poids n'a pas d'incidence sur les taux de monoamines ou sur leurs turnover dans le striatum.

L'ensemble des résultats montre que même si les taux de monoamines ou de leurs métabolites ne sont pas significativement affectés par une contamination aiguë à l'uranium ($70\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), les turnover métaboliques peuvent être modifiés, démontrant un effet localisé et modéré de l'uranium sur les métabolismes biochimiques de catabolisme (hypothalamus et hippocampe) et d'anabolisme (hippocampe) des deux monoamines étudiées.

III.1.3. DOSAGE DE L'URANIUM (HEMISPHERE GAUCHE + RESTE DU CERVEAU) :

Les résultats de dosage d'uranium par ICPMS dans l'hippocampe (HI), le striatum (ST), le cortex frontal (CO), le cervelet (CE) et le reste du cerveau sont présentés dans la figure n°20. Six heures après une injection intra-péritonéale de nitrate d'uranyle à la dose de $70\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ et quelle que soit la partie du cerveau considérée, l'analyse statistique des données montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les séries de rats contaminés et témoins ($p>0,05$). Parmi les structures étudiées, l'hippocampe et le striatum sont les deux structures qui concentrent naturellement le plus d'uranium, soit respectivement $15\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ et $11\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

La mesure du poids des structures cérébrales indique qu'il n'y pas de différence significative entre les deux séries (cf. tableau B-1, annexe 1). Pour le striatum gauche, une baisse indicative du poids ($p=0,07$) a été constatée. Cette baisse ne semble pas avoir d'influence sur la concentration d'uranium dans le striatum.

Figure n°20. Concentration cérébrale d'uranium en ng.g^{-1} de tissu frais, après une injection i.p. d'UA, $70\mu\text{g.kg}^{-1}$.

HI : hippocampe gauche, ST : striatum gauche, CO : cortex frontal gauche, CE : cervelet gauche. n=20 pour chaque série.

Tableau n°13. Synthèse des effets d'une injection intra péritonéale ($70\mu\text{g.g}^{-1}$) d'uranium appauvri au délai +6h.

Tableau récapitulatif	
Dopamine	Effets sur turnover dans l'hippocampe et l'hypothalamus
Sérotonine	Effets sur turnover dans l'hippocampe et l'hypothalamus
Dosage uranium cérébral	RAS

III - Partie 2. Contaminations Chroniques

Dans le contexte de nos études d'effets de contaminations chroniques à l'uranium, nous nous sommes placés dans le cas d'une quantité unique d'uranium sans effets toxiques connus et bien en dessous du seuil de toxicité pour les reins ($3\mu\text{g.g}^{-1}$, ATSDR 1999) même si le rat était amené à poursuivre la contamination tout au long de sa vie.

III.2.1. OBSERVATIONS GENERALES :

Quelle que soit la durée de la contamination, aucun vomissement, aucune nausée, anorexie ou démangeaison anormale n'ont été observés au cours du suivi régulier des animaux. De même aucune forme particulière d'agressivité, d'excitation, d'épuisement ou d'incapacité motrice des animaux n'a été constatée par nos vétérinaires (*communication personnelle, P. Houpert et N. Dudoignon*).

III.2.2. EFFETS A COURT TERME : CONTAMINATION CHRONIQUE DE 1,5 MOIS

Rappel des paramètres mesurés après 1,5 mois de contamination à l'UA ou à l'UE :

Paramètres	Témoin	UA 40mg.L ⁻¹	UE 40mg.L ⁻¹
<input type="checkbox"/> Suivi hebdomadaire au cours de l'expérimentation	n=24	22	22
<input type="checkbox"/> Dosage des monoamines par HPLC-ECD	14	12	12
<input type="checkbox"/> Mesure de l'activité ChE par spectrophométrie	14	12	12
<input type="checkbox"/> Dosage de l'uranium dans le cerveau par ICPMS	10	10	10
<input type="checkbox"/> Dosage de l'uranium dans les tissus cibles par KPA	10	10	10

III.2.2.1. Paramètres généraux :

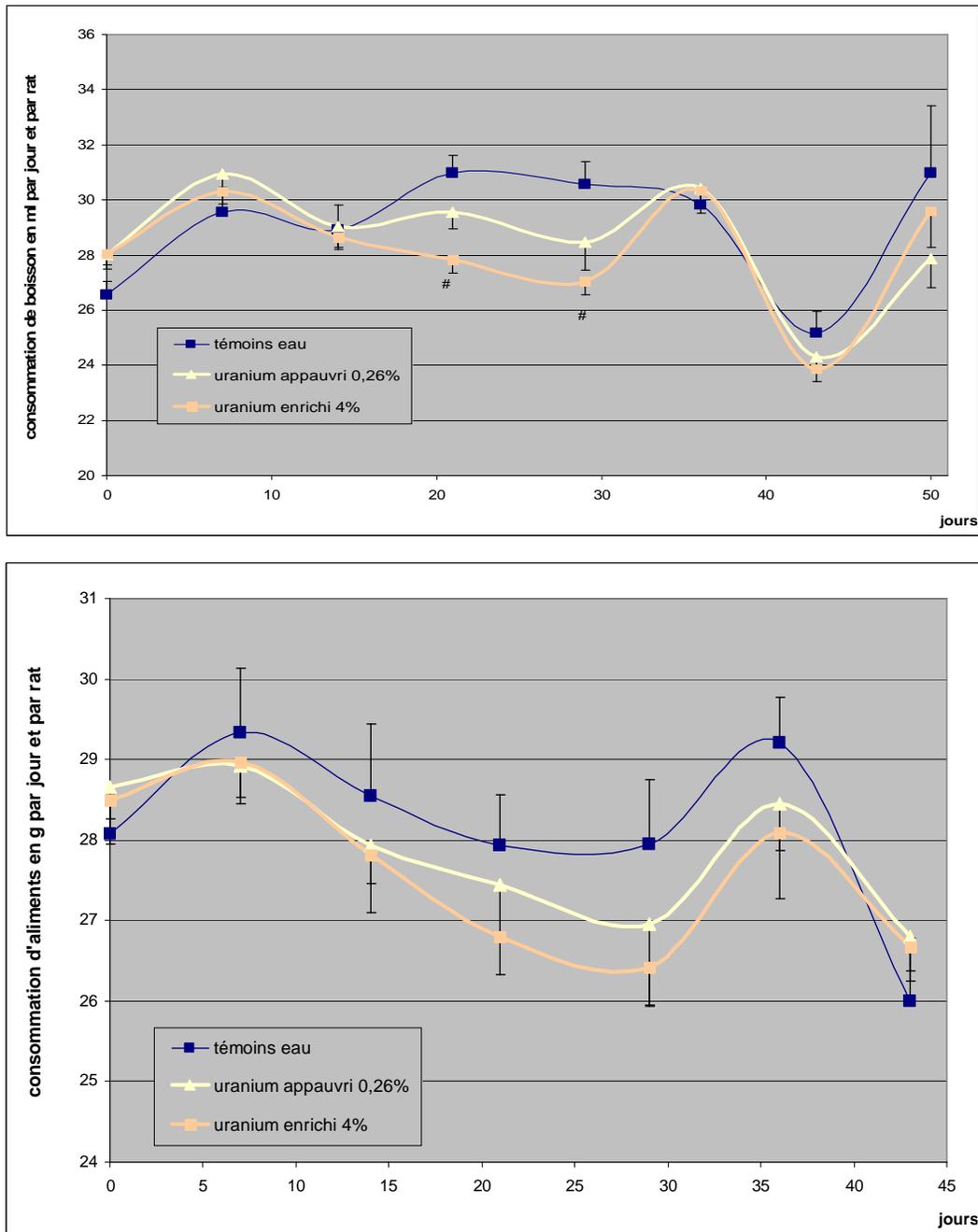
Au cours des six semaines de contamination chronique par ingestion, les animaux n'ont manifesté aucun trouble particulier lors de leur séjour à l'animalerie. Le suivi hebdomadaire des rats est représenté dans les figures n°21 et 22.

Leur poids a évolué de $254 \pm 10\text{g}$ à $478 \pm 33\text{g}$ pour les témoins (TE), de $259 \pm 8\text{g}$ à $472 \pm 34\text{g}$ pour les rats exposés à de l'uranium appauvri (UA) et $253 \pm 9\text{g}$ à $459 \pm 34\text{g}$ pour les animaux exposés à de l'uranium enrichi (UE) (cf. figure n°22). Les gains de poids quotidien ont évolué de $8,7 \pm 0,4\text{g}$ à $1,7 \pm 0,2\text{g}$ pour TE, $8,4 \pm 0,5\text{g}$ à $2,1 \pm 0,4\text{g}$ pour UA et $8,6 \pm 0,8\text{g}$ à $1,7 \pm 0,3\text{g}$ pour UE. Les consommations d'aliments ont été en moyenne de $28,2 \pm 1,8\text{g}$ pour les TE, $27,9 \pm 0,8\text{g}$ pour les UA et $27,6 \pm 1,5\text{g}$ pour les UE.

L'analyse statistique de ces résultats ne met pas en évidence de différence significative par rapport aux valeurs témoins ($p > 0,05$).

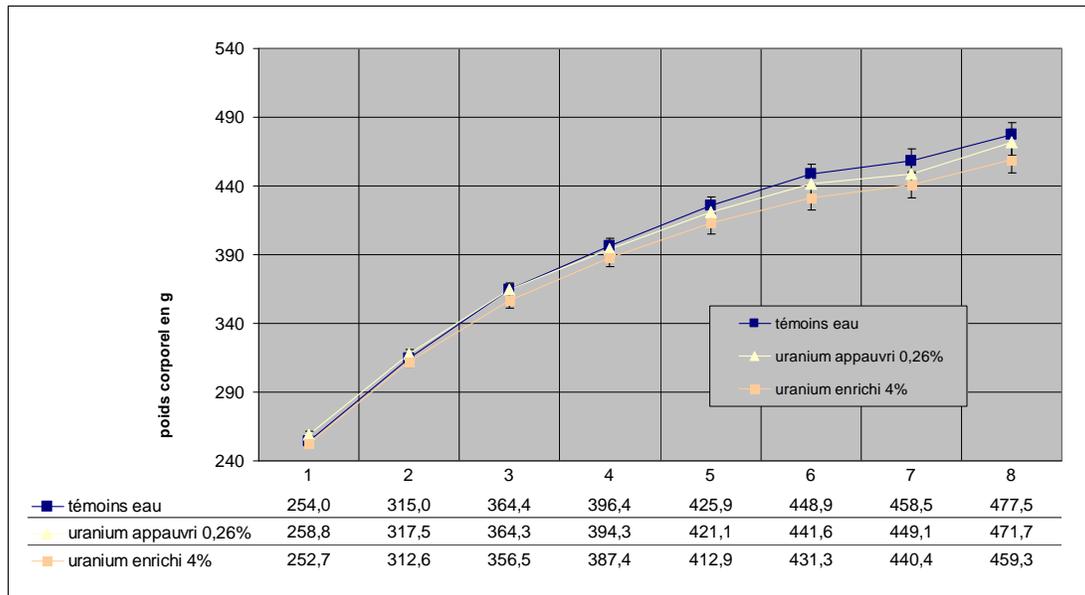
De même, la contamination n'a pas eu d'effet sur le poids des reins, organe d'accumulation immédiate de l'uranium après contamination interne : $3,6 \pm 0,3\text{g}$ pour TE, $3,8 \pm 0,4\text{g}$ pour UA et $3,8 \pm 0,6\text{g}$ pour UE.

Figure n°21. Evolution de la consommation d'aliments et de boisson au cours d'une contamination chronique de 1,5 mois à l'uranium à 40mg.L^{-1} .



variation indicative de la consommation de boisson chez les rats soumis à une contamination UE par rapport aux témoins. Valeurs : moyenne \pm erreur standard, n= 10 pour TE, UA et UE.

Figure n°22. Evolution pondérale des animaux au cours d'une contamination chronique de 1,5 mois à l'uranium à 40mg.L⁻¹.

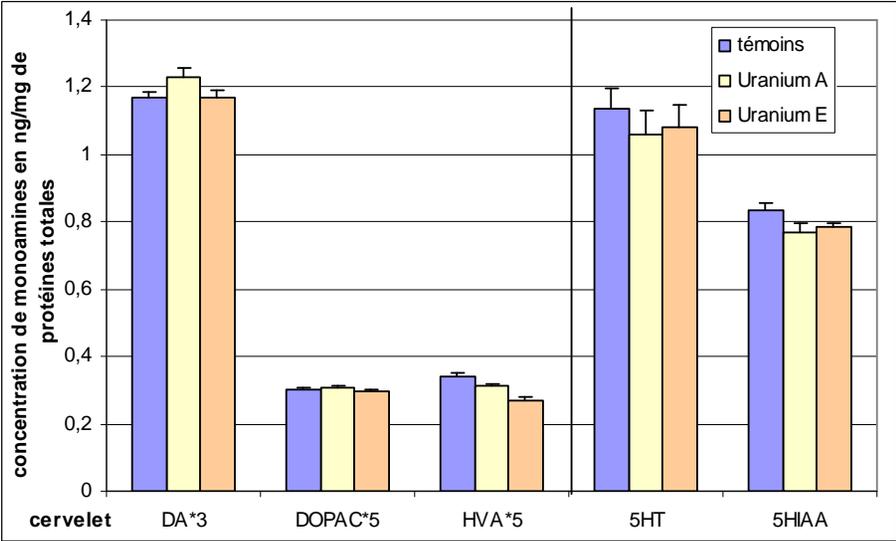
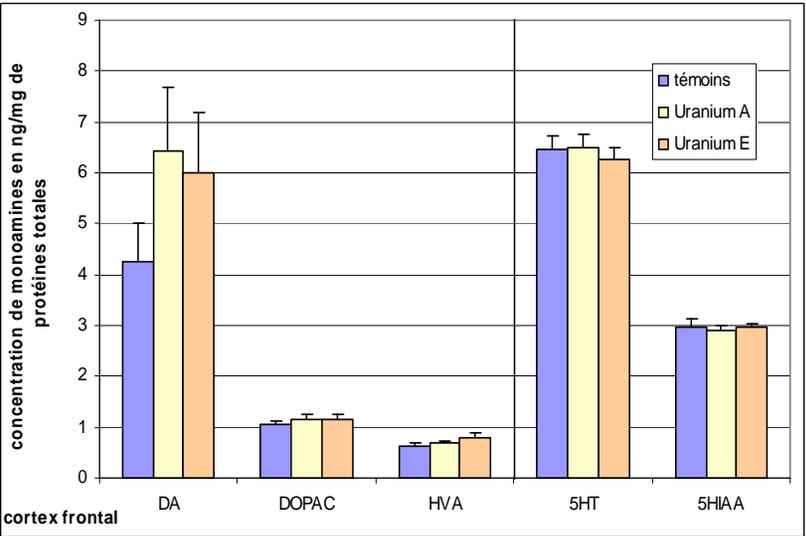
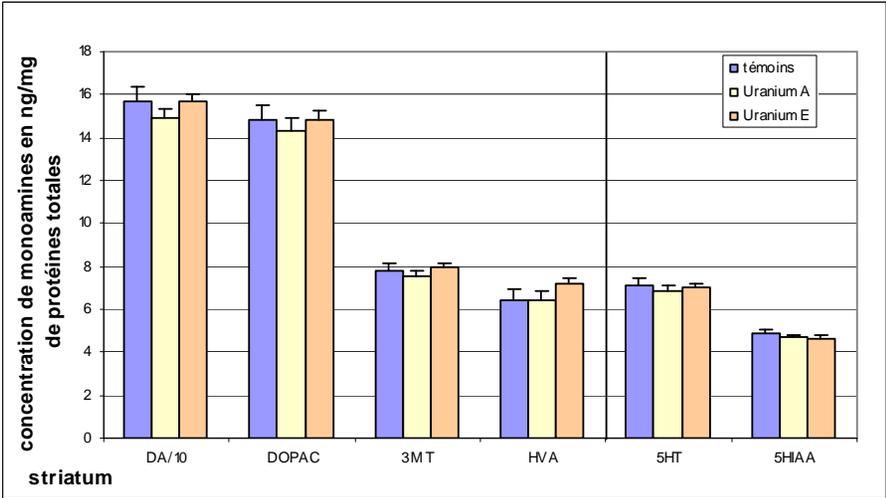
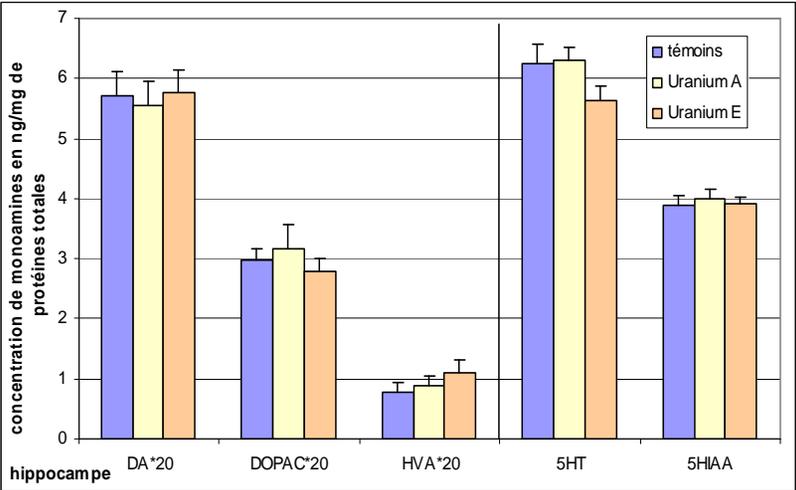


Abscisses : temps = nombre de mesures effectuées. Valeurs : moyenne \pm erreur standard. n= 10 pour TE, UA et UE.

III.2.2.2. Dosage des monoamines (hémisphère cérébral droit) :

Les résultats de dosage par HPLC-ECD des monoamines et de leurs principaux métabolites dans six structures cérébrales après une ingestion chronique d'uranium de 1,5 mois à 40mg.L⁻¹, sont présentés dans la série d'histogrammes de la figure n°23. L'analyse statistique des dosages montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les valeurs obtenues pour les rats témoins et celles pour les rats contaminés à l'uranium (appauvri ou enrichi) dans l'hippocampe, le striatum, le cortex frontal, le cervelet et le tronc cérébral ($p > 0,05$). Toutefois, dans l'hypothalamus, une hausse significative du taux de dopamine (+27%, $p = 0,04$) a été observée pour les rats soumis à une contamination à l'UA. Cette augmentation est accompagnée d'une légère hausse de son principal métabolite (DOPAC, +17%) et d'une baisse du métabolite dopaminergique final (HVA, -28%). L'augmentation de dopamine pourrait donc s'expliquer par une baisse de son catabolisme dans la dernière phase métabolique de dégradation par la COMT. Bien que non significative, les tendances observées après la contamination à l'UE vont dans un sens contraire. Les modifications du métabolisme dopaminergique indiqueraient une augmentation du catabolisme (baisse du taux de dopamine -14% et hausse du HVA +8%).

Les calculs de turnover des systèmes dopaminergique et sérotoninergique sont représentés dans la série d'histogrammes de la figure n°24. L'analyse statistique de ces rapports de concentration n'a pas mis en évidence de différence significative entre les rats témoins et les rats traités à l'uranium appauvri ou enrichi quelle que soit la structure considérée ($p > 0,05$). Dans l'hypothalamus, le turnover est abaissé de 12% après contamination UA ($p = 0,12$) et augmenté de 32% après contamination UE ($p = 0,16$) par rapport à la valeur témoin.



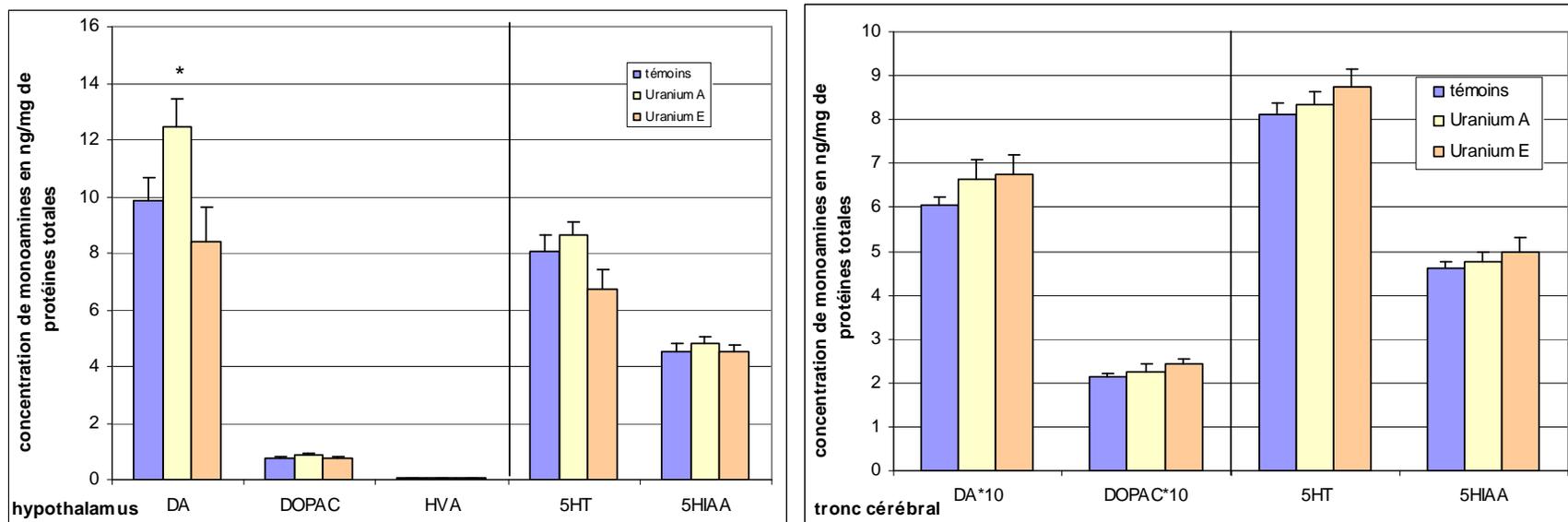
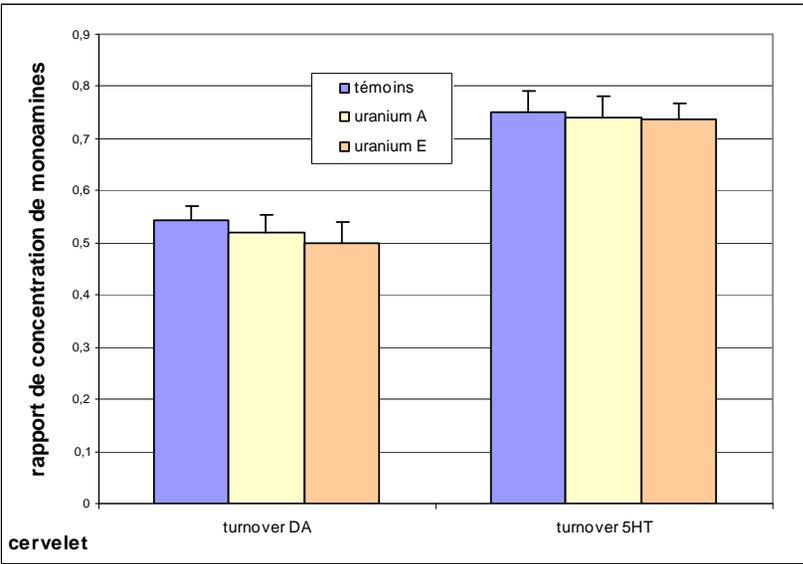
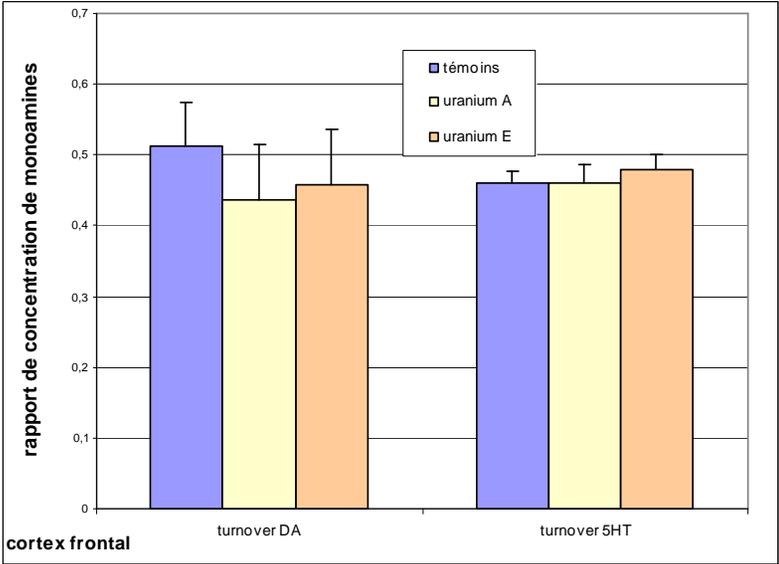
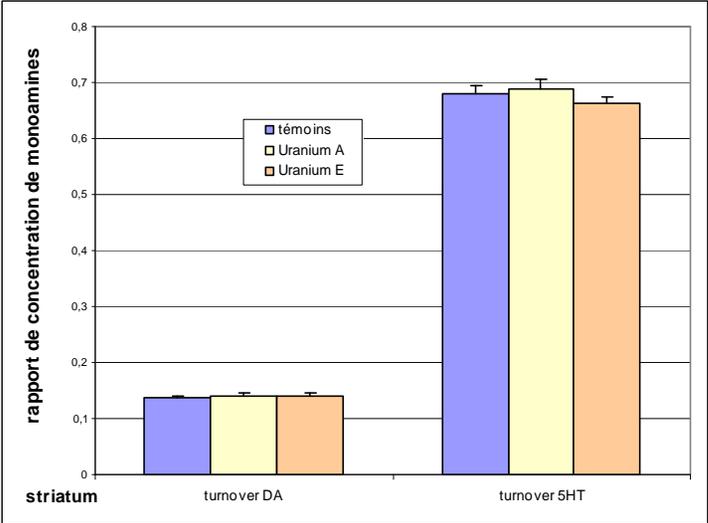
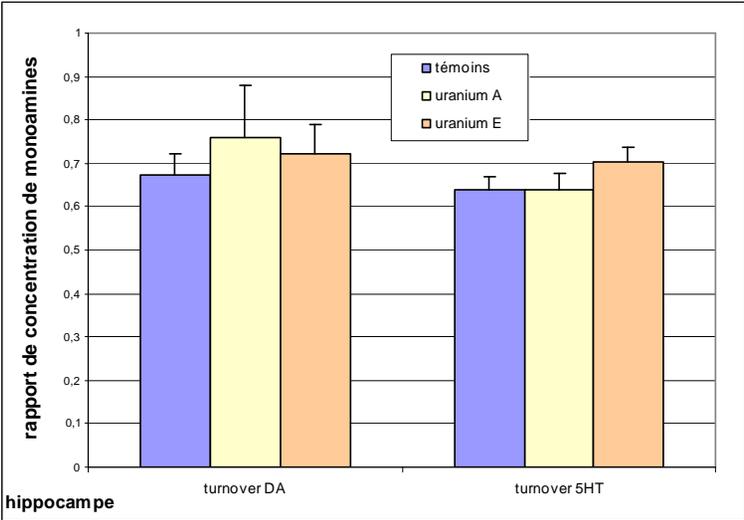


Figure n°23. Taux de monoamines en ng.mg⁻¹ dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique à l'uranium de 1,5 mois à 40mg.L⁻¹ (cf. annexe 2, taux de protéines A-2).

Métabolisme dopaminergique : dopamine (DA), acide 3,4-dihydroxyphényl acétique (DOPAC), 3-méthoxydopamine (3MT) et acide homovanillique (HVA). Métabolisme sérotoninergique : sérotonine (5HT), acide 5-hydroxyindolacétique (5HIAA). * différence significative par rapport aux témoins $p < 0,05$. $n=14$ pour TE (témoins) et $n=12$ pour UA (uranium appauvri) et UE (uranium enrichi). Valeurs : moyenne \pm erreur standard.



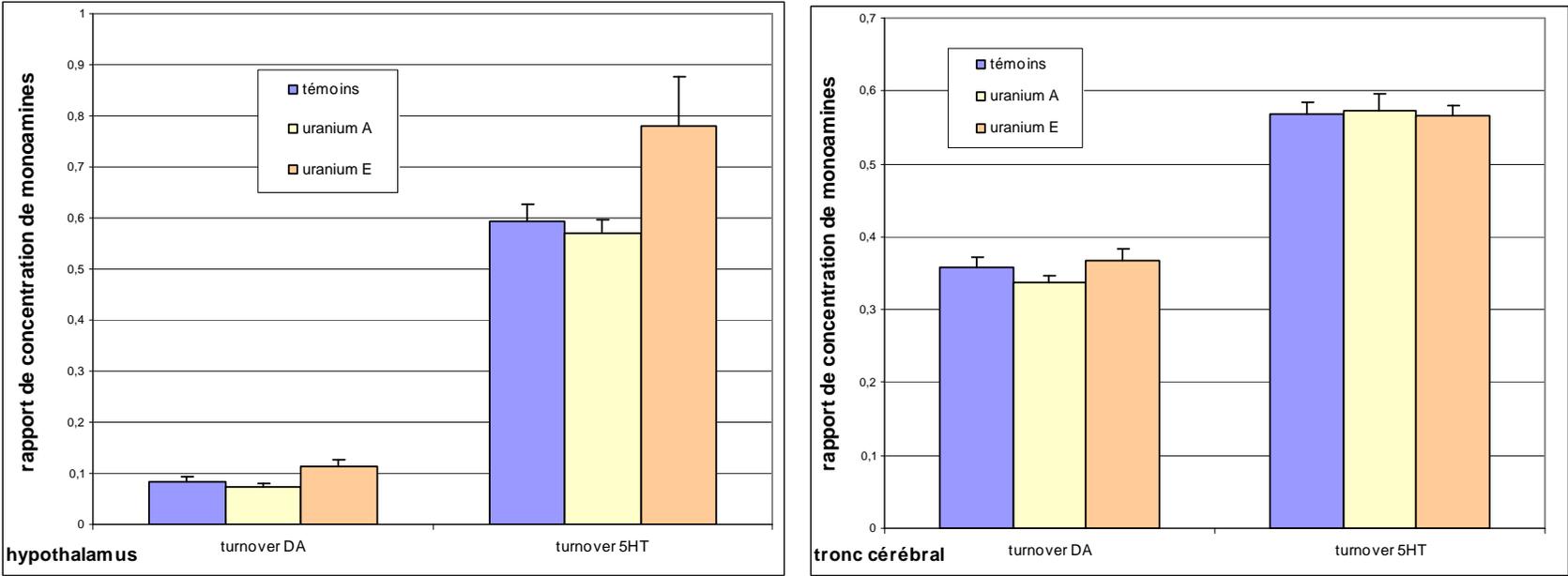


Figure n°24. Turnover des monoamines dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique à l'uranium de 1,5 mois à 40mg.L⁻¹.

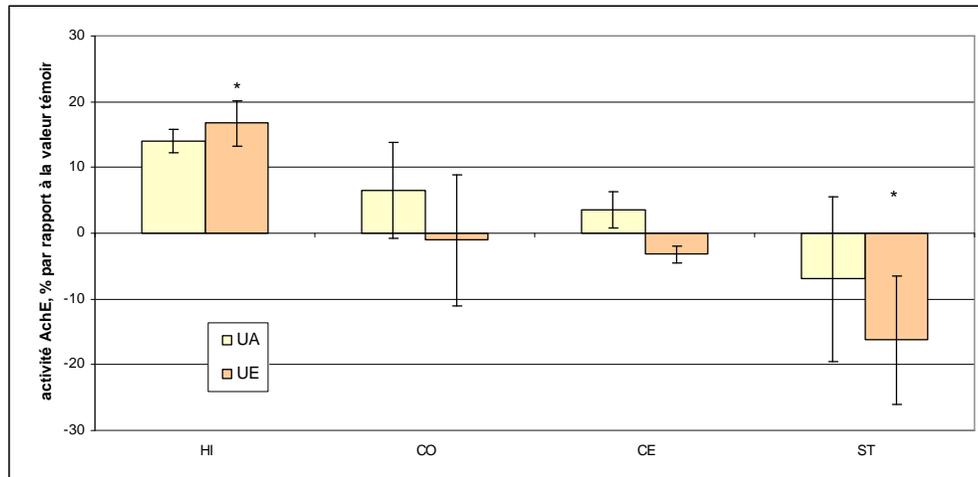
Rapport des concentrations de métabolites sur la concentration de neurotransmetteurs, dopamine (DA) et sérotonine (5HT) : (DOPAC+HVA)/DA [ou DOPAC/DA lorsque HVA non détectable par le système électrochimique] et 5HIAA/5HT. n=14 pour TE (témoins) et n=12 pour UA (uranium appauvri) et UE (uranium enrichi). Valeurs : moyenne ± erreur standard.

III.2.2.3. Mesure de l'activité acétylcholinestérase (hémisphère cérébral gauche) :

L'évaluation, dans quatre structures cérébrales, des effets d'une ingestion chronique d'uranium de 1,5 mois sur l'activité de l'acétylcholinestérase (ChE) est présentée dans la figure n°25. L'analyse statistique de ces résultats spectro-photométriques indique que l'uranium appauvri n'a pas d'effet sur l'activité ChE dans l'hippocampe, le striatum, le cervelet et le cortex frontal ($p > 0,1$). A l'inverse, la contamination chronique à l'UE induit une hausse significative de l'activité ChE dans l'hippocampe (+17%, $p = 0,04$) et une baisse significative de l'activité ChE dans le striatum (-16%, $p = 0,03$).

L'évaluation des taux de protéines des structures n'indique pas de variations significatives entre les différents lots ($p > 0,05$), hormis pour le taux de protéines du cortex frontal de la série UA où une hausse indicative a été constatée ($p = 0,06$) (cf. tableau B-2, annexe 2). Toutefois, cette observation ne modifie pas les résultats de mesure d'activité ChE dans le cortex.

Figure n°25. Activité de l'acétylcholinestérase dans différentes structures cérébrales après une contamination chronique à l'uranium de 1,5 mois à 40mg.L^{-1} (cf. annexe 2, taux de protéines B-2)



* différence significative $p < 0,05$; HI : hippocampe gauche, ST : striatum gauche, CO : cortex frontal gauche, CE : cervelet gauche. $n = 14$ pour TE (témoins), $n = 12$ pour UA (uranium appauvri) et UE (uranium enrichi). % = $((\text{moyenne traité} / \text{moyenne témoin}) - 1) \times 100$. Valeur d'activité ChE exprimée en $\mu\text{-moles de substrat hydrolysé par min par mg de protéines totales } (\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1})$. Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

III.2.2.4. Dosage de l'uranium dans le cerveau :

Les résultats de dosage par ICPMS d'uranium dans le striatum (ST), l'hippocampe (HI), le cortex frontal (CO), le cervelet (CE), l'hypothalamus (HY) et le tronc cérébral (TC) après contamination chronique de 1,5 mois à 40mg.L^{-1} sont présentés dans la figure n°26. Les résultats indiquent que l'hypothalamus est la structure cérébrale qui accumule le plus d'uranium aussi bien pour les rats témoins que les rats contaminés (100ng.g^{-1} chez les témoins). La distribution structurale chez les témoins se fait ensuite dans l'ordre suivant : hypothalamus (100ng.g^{-1}) striatum (21ng.g^{-1}),

hippocampe (16ng.g^{-1}), tronc cérébral (16ng.g^{-1}), cervelet (10ng.g^{-1}) et enfin cortex (8ng.g^{-1}). Pour les rats traités à l'UA, l'uranium se distribue dans l'ordre décroissant : HY (168ng.g^{-1}) > ST (49ng.g^{-1}) > HI (18ng.g^{-1}) > CE (13ng.g^{-1}) > TC (10ng.g^{-1}) > CO (7ng.g^{-1}). Pour les rats traités à l'UE, la distribution est : HY (183ng.g^{-1}) > ST (58ng.g^{-1}) > HI (34ng.g^{-1}) > TC (13ng.g^{-1}) > CE (12ng.g^{-1}) > CO (7ng.g^{-1}).

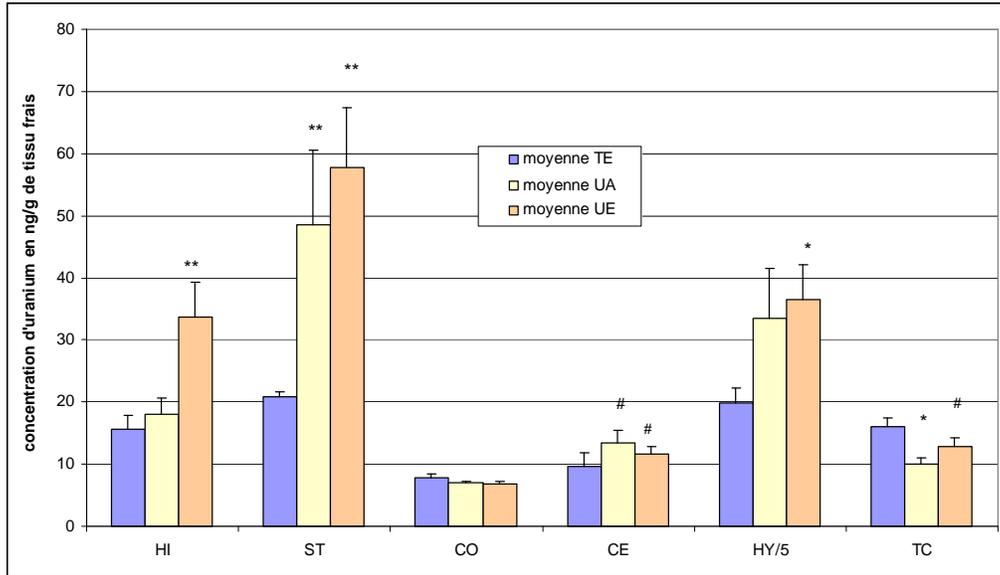
De plus, l'analyse statistique montre qu'il y a une hausse significative d'uranium (2 fois plus que chez les témoins) dans l'hippocampe des rats contaminés à l'UE ($p < 0,001$) qui n'existe pas chez les rats contaminés à l'UA (différence significative entre UA et UE, $p = 0,02$). Dans le striatum, une hausse significative d'uranium a été constatée pour les deux contaminations : presque 2,8 fois et 2,3 fois plus d'uranium, respectivement pour les UE ($p = 0,001$) et les UA ($p = 0,002$). Dans l'hypothalamus, l'augmentation de la concentration en uranium concerne également les deux types de contamination (1,8 fois plus pour UE et 1,7 fois plus pour UA) mais n'est significative que pour les rats traités à l'UE ($p = 0,03$). Dans le cervelet, l'augmentation pour les deux types de contamination n'est qu'indicative ($p < 0,1$) soit +20% pour le lot UE et +39% pour le lot UA en raison d'un écart type important. Enfin, une baisse du taux d'uranium par rapport à la valeur mesurée pour les témoins a été observée dans le tronc cérébral. Elle est significative pour le lot UA ($p = 0,03$) et indicative pour le lot UE ($p = 0,07$).

III.2.2.5. Dosage de l'uranium dans les structures cibles :

Les dosages par KPA de l'uranium des tissus cibles indiquent que tous les rats contaminés ont une concentration d'uranium dans les reins et les fémurs très supérieure à celle retrouvée chez les rats témoins (8 à 10 fois plus en moyenne) (cf. figure 27). L'analyse statistique montre des différences très significatives ($p < 0,01$) aussi bien pour les rats traités à l'uranium appauvri que ceux traités à l'uranium enrichi mais les résultats des deux contaminations ne sont pas significativement différents ($p > 0,05$). Le bruit de fond « uranium naturel » a été mesuré à $15 \pm 5\text{ng.g}^{-1}$ et $24 \pm 9\text{ng.g}^{-1}$ respectivement pour les reins et les fémurs chez les animaux témoins. L'analyse de l'isotopie par ICP-MS de l'uranium détecté a confirmé qu'il s'agissait bien d'uranium appauvri à 0,3% de ^{235}U pour les rats UA, d'uranium enrichi à 4,2% de ^{235}U pour les rats UE et d'uranium naturel 0,7% de ^{235}U pour les témoins.

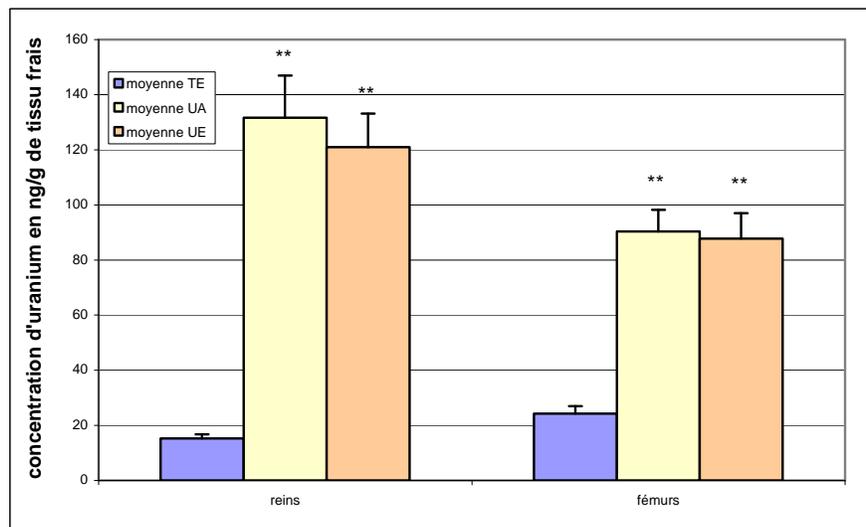
Ces observations confirment les résultats attendus pour les deux organes d'accumulation de l'uranium (reins et os) après contamination chronique à 40mg.L^{-1} : 1) accumulation d'uranium dans les tissus cibles et 2) seuil de néphrotoxicité non atteint (facteur 10 entre nos valeurs et ce seuil de $1,2\mu\text{g.g}^{-1}$ chez le rat).

Figure n°26. Concentration cérébrale d'uranium en ng.g^{-1} , après une contamination à l'uranium chronique de 1,5 mois à 40mg.L^{-1} (cf. annexe 2, poids frais C-2)



* différence significative $p < 0,05$; ** différence très significative $p < 0,01$; # différence indicative par rapport aux témoins $p < 0,1$; HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex total, CE : cervelet, HY : hypothalamus, TC : tronc cérébral. $n=10$ pour TE (témoins), UA (uranium appauvri) et UE (uranium enrichi). structures symétriques droite et gauche + hypothalamus + tronc cérébral. Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

Figure n°27. Concentration d'uranium en ng.g^{-1} dans les reins et les os, après une contamination chronique de 1,5 mois à l'uranium à 40mg.L^{-1} .



** différence très significative $p < 0,01$; $n=10$ pour TE (témoins), UA (uranium appauvri) et UE (uranium enrichi). Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

III.2.3. EFFETS A LONG TERME :

III.2.3.A. Contamination chronique de 6 mois.

Rappel des paramètres mesurés après 6 mois de contamination à l'UA ou à l'UE :

Paramètres	Témoin lot UA	UA 40mg.L ⁻¹	Témoin lot UE	UE 40mg.L ⁻¹
<input type="checkbox"/> Suivi hebdomadaire au cours de l'expérimentation	n=8	8	10	10
<input type="checkbox"/> Dosage des monoamines par HPLC-ECD	8	8	-	-
<input type="checkbox"/> Mesure de l'activité ChE par spectrophométrie	8	7	-	-
<input type="checkbox"/> Dosage de l'uranium dans le cerveau par ICPMS	-	-	10	10
<input type="checkbox"/> Dosage de l'uranium dans les tissus cibles par KPA	8	8	-	-

III.2.3.A-1. Paramètres généraux :

Aucun changement particulier du comportement général des animaux contaminés ou témoins n'a été observé. La contamination chronique de 6 mois a été décomposée en deux séries d'expérimentation : une première série (de Sept 2002 à Fév 2003) qui concernait la contamination d'animaux à l'uranium enrichi 4,95% et la seconde (Janv à Juin 2003) qui concernait la contamination d'animaux à l'uranium appauvri. Le suivi hebdomadaire des rats de ces deux séries d'expérimentation est représenté dans les figures n°28 à 31.

Pour la contamination chronique à l'UE, l'analyse statistique des données n'indique pas de variations significatives aussi bien pour le poids, la prise alimentaire que la prise de boisson, hormis pour quelques mesures (cf. figure 29). Ces variations ne sont pas constantes sur l'ensemble de la période de suivi des animaux et semblent concerner avant tout les témoins, au moins pour celles observées sur la consommation de boisson.

Pour la contamination chronique de 6 mois à l'UA, l'analyse statistique des résultats met en évidence des différences significatives de poids par rapport aux valeurs témoins ($p < 0,05$) au début de la contamination (12 premières mesures) et le jour de l'euthanasie des animaux (presque 80g de différence à cette date) (cf. figure 30). Il faut souligner que dans le cas présent, le lot de rats contaminés avait en moyenne dès le départ 20g de moins que leurs équivalents témoins (= différence significative). La différence initiale de poids semble ensuite s'accroître en raison d'un gain de poids chez les animaux contaminés légèrement inférieur à celui des animaux témoins (10,4g en moyenne pour les UA sur l'ensemble de la période considérée contre 12,0g pour les témoins). La baisse de poids ne peut être expliquée par une baisse de la consommation de boisson ou d'aliments (cf. figure 31). Pour ces deux paramètres, quelques variations significatives ont été constatées mais elles ne sont ni constantes, ni durables. Enfin, l'observation d'une baisse de poids n'a jamais été renouvelée pour d'autres lots de rats placés dans les mêmes conditions de traitement au sein de la même animalerie (Paquet *et al.*, 2005; Souidi *et al.*, 2005). La différence de poids aurait donc pour origine une mauvaise homogénéité des lots, présente dès le départ et due à la variation inter-individuelle.

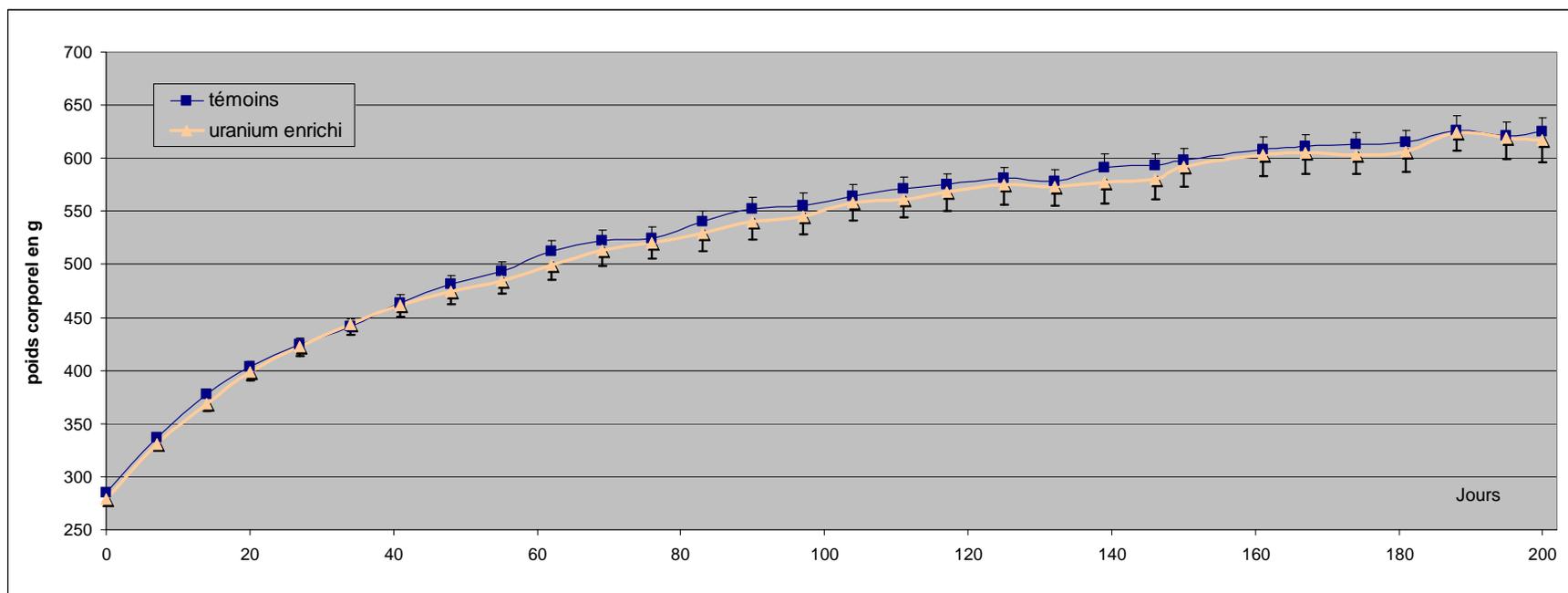


Figure n°28. Evolution pondérale des animaux au cours d'une contamination chronique à l'uranium enrichi de 6 mois à 40mg.L-1.

Valeurs : moyenne \pm erreur standard. * différence significative par rapport aux témoins $p < 0,05$.

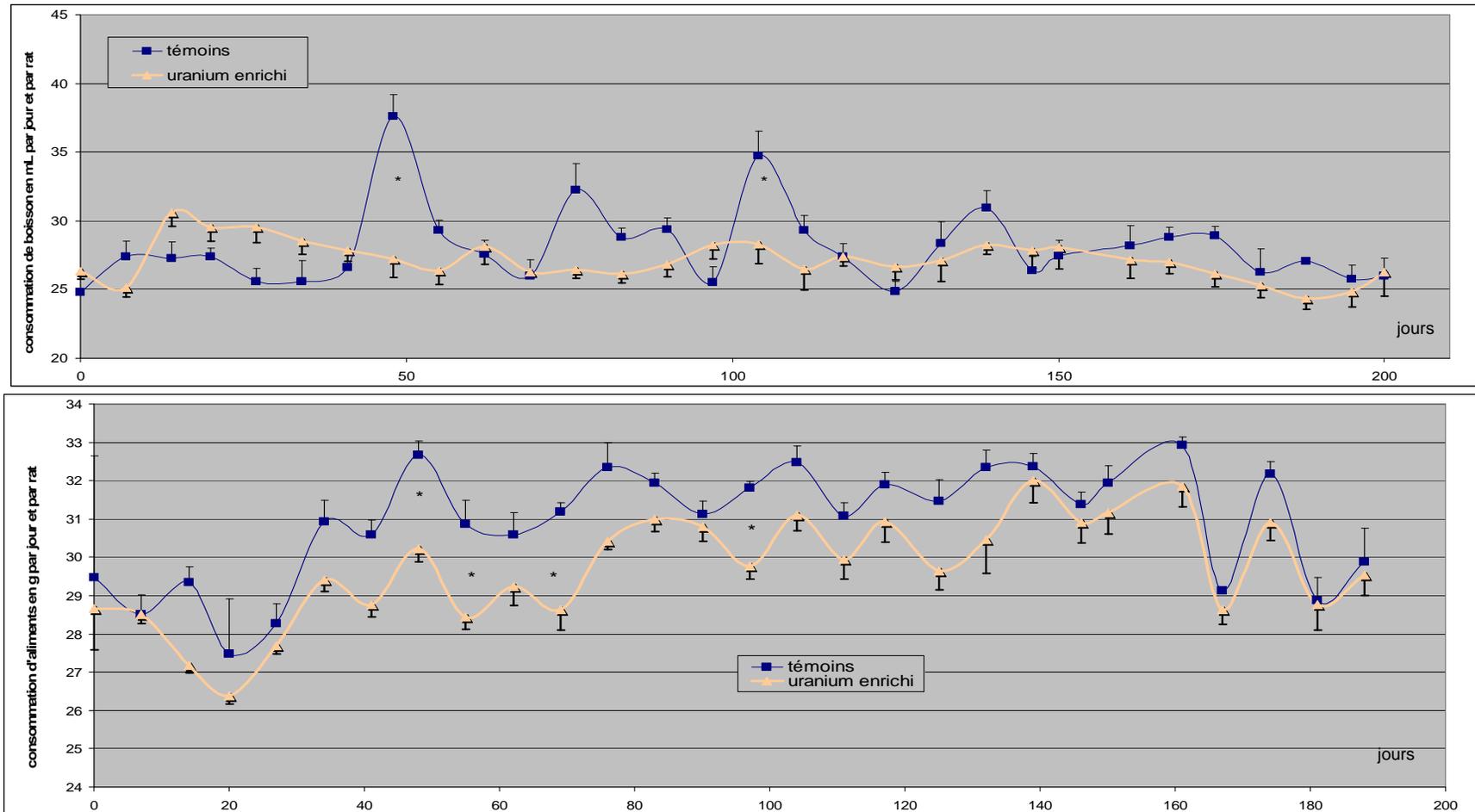


Figure n°29. Evolution de la prise quotidienne de boisson et d'aliments au cours d'une contamination chronique à l'uranium enrichi de 6 mois à 40mg.L-1.

Valeurs : moyenne ± erreur standard. * différence significative par rapport aux témoins p < 0,05.

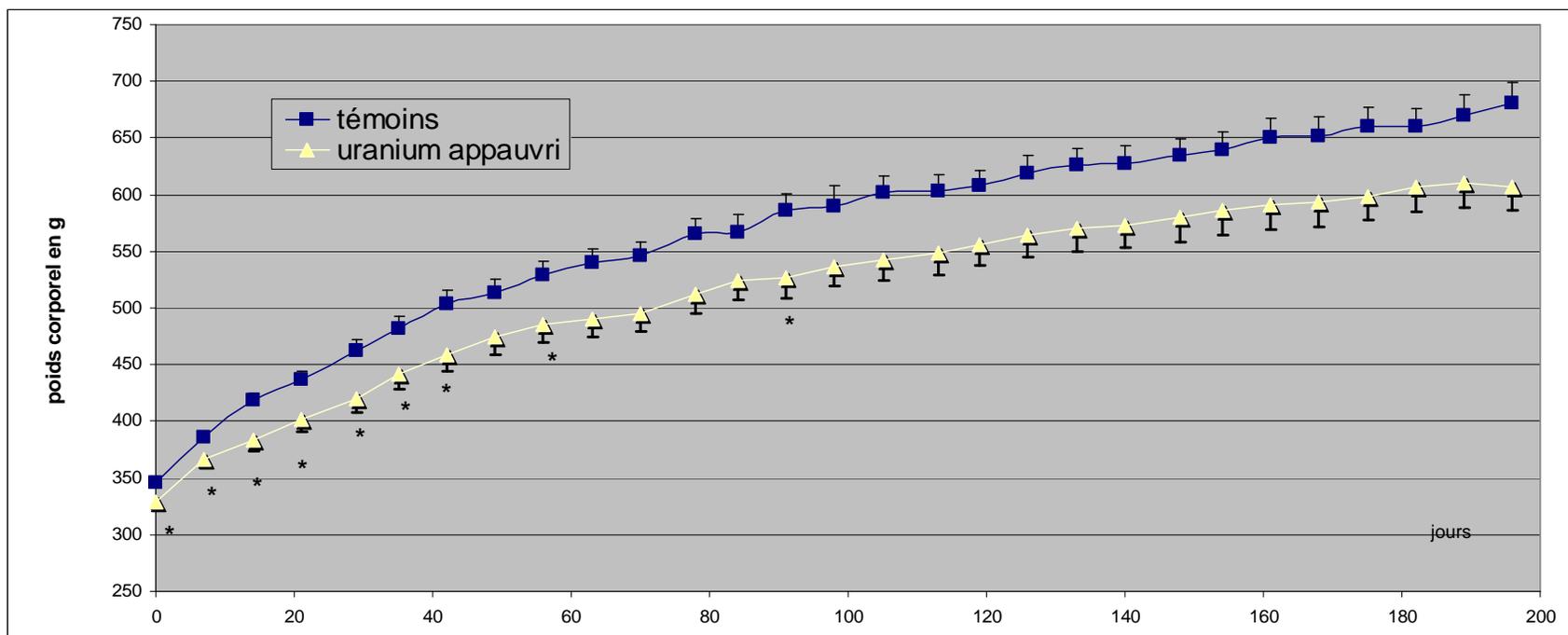


Figure n°30. Evolution pondérale des animaux au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri de 6 mois à 40mg.L⁻¹.

Valeurs : moyenne ± erreur standard. * différence significative par rapport aux témoins p < 0,05.

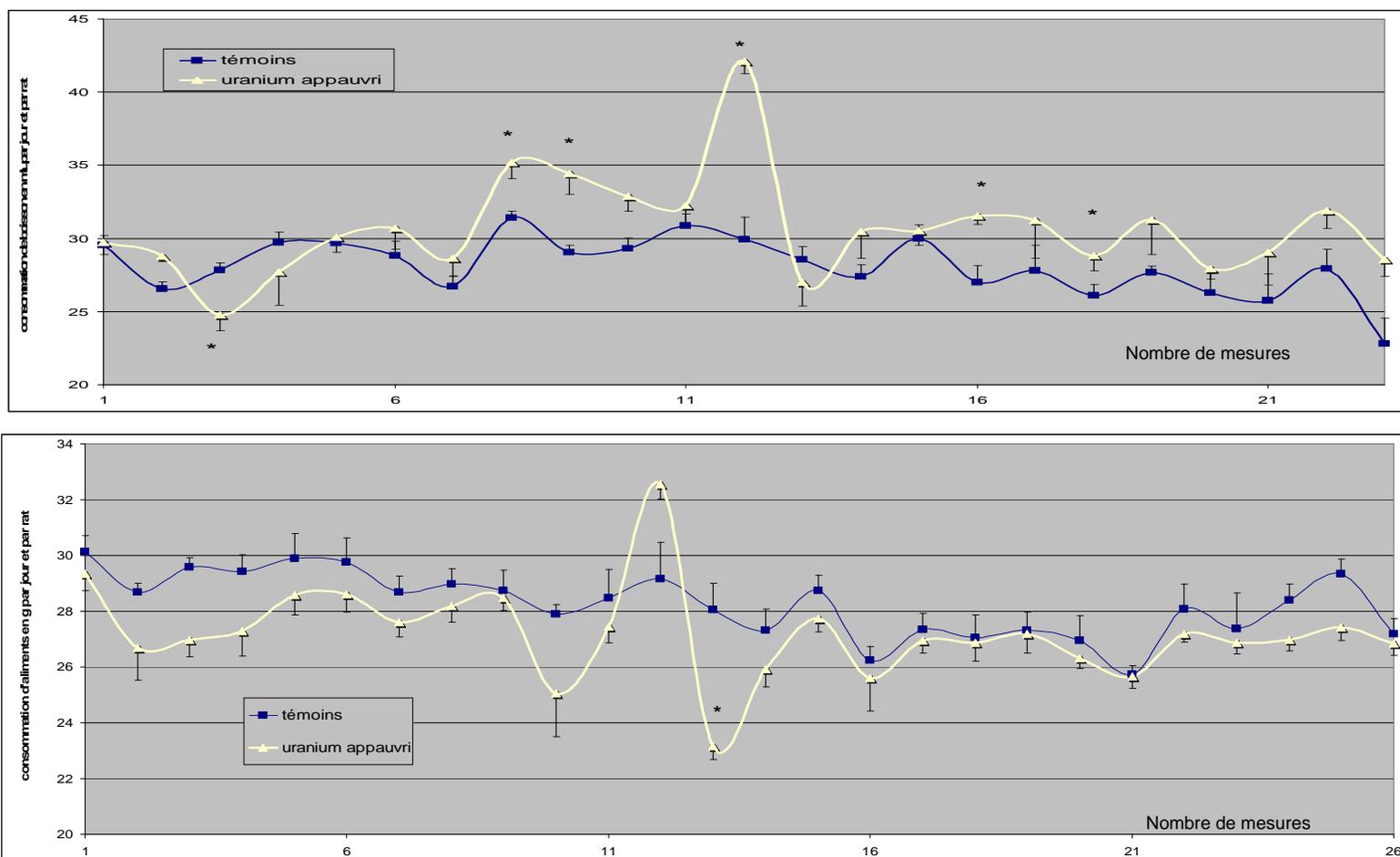


Figure n°31. Evolution de la prise quotidienne de boisson et d'aliments au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri de 6 mois à 40mg.L-1.

Valeurs : moyenne ± erreur standard. * différence significative par rapport aux témoins $p < 0,05$.

III.2.3.A-2. Dosage des monoamines (hémisphère droit) après contamination UA :

Les résultats de dosage par HPLC-ECD des monoamines et de leurs métabolites dans cinq structures cérébrales (HI, ST, CO, CE et HY), après une ingestion chronique de 6 mois d'uranium appauvri à 40mg.L^{-1} sont présentés dans la figure n°32. L'analyse statistique des dosages indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les rats soumis à une contamination à l'uranium et les rats témoins ($p > 0,05$). Toutefois dans le cortex frontal, une hausse indicative de dopamine (+71%, $p=0,07$) a été constatée chez les rats contaminés par rapport aux témoins. Cette augmentation est accompagnée d'une hausse de ses métabolites DOPAC (+25%, $p=0,09$) et HVA (+34%, $p=0,07$).

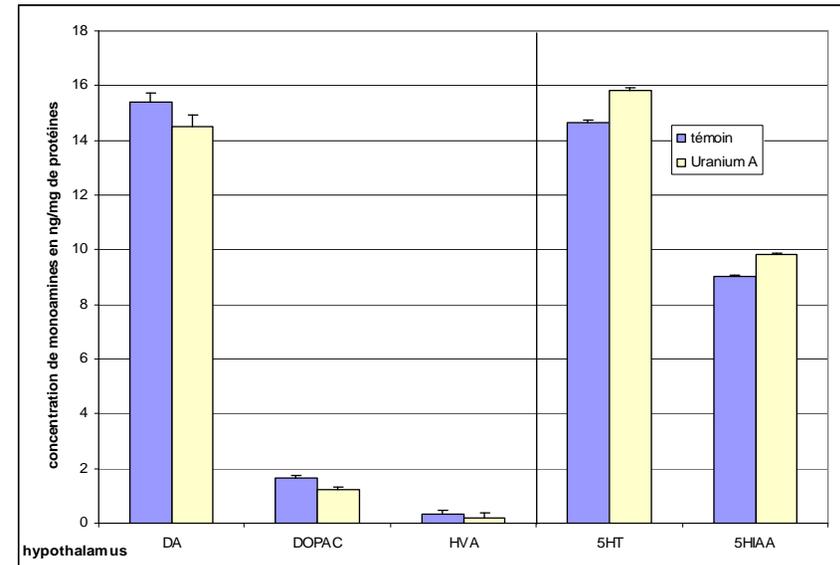
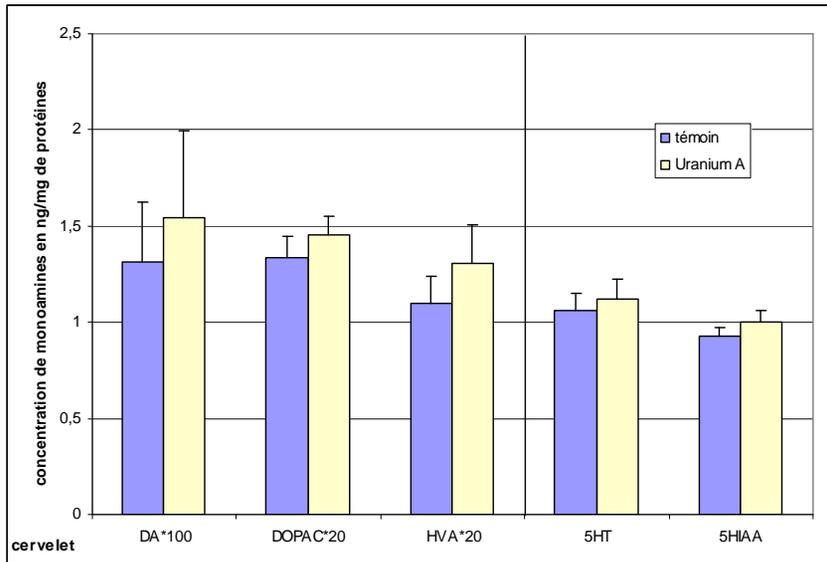
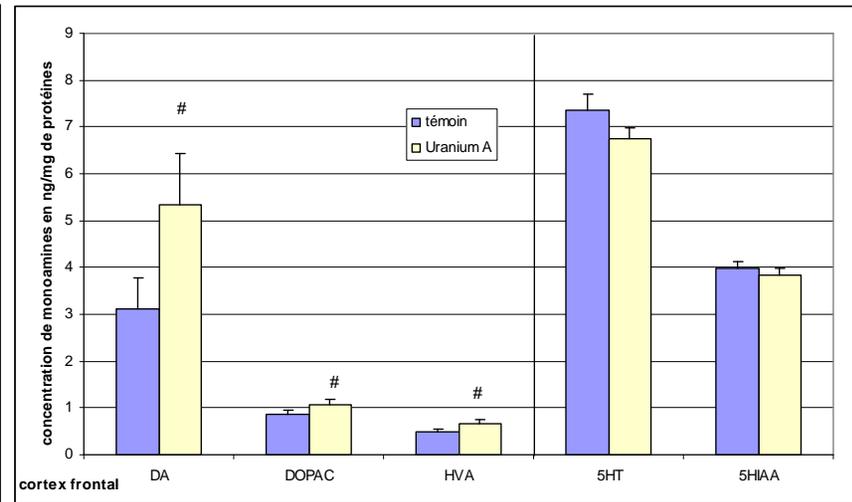
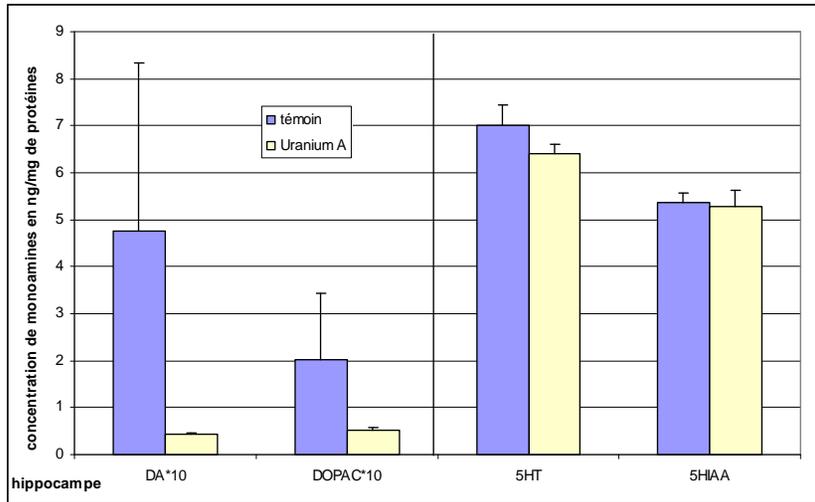
Les calculs de turnover des deux systèmes monoaminergiques sont présentés dans la figure n°33. L'analyse statistique montre une baisse significative du turnover DAergique dans le cortex frontal chez les rats contaminés (-25%, $p=0,04$). Cette baisse est la conséquence des perturbations observées pour les taux de DA, DOPAC, et HVA dans cette même structure cérébrale. Considérant l'augmentation globale des composés DAergique dans le cortex frontal, l'ensemble de ces modifications pourrait trouver son origine dans l'augmentation de l'anabolisme de la dopamine.

L'hippocampe et le cervelet ne sont pas des structures cérébrales à forte composante dopaminergique contrairement au striatum ou au cortex frontal, très innervés notamment par les noyaux A9 et A10. Pour cette raison, les variations observées sur les turnover DAergique de l'hippocampe et du cervelet peuvent être expliquées par des difficultés de détection électrochimique des composés monoaminergiques, notamment la dopamine, pour ce temps de contamination. De plus, il faut noter que dès 6 mois et en comparaison avec les résultats obtenus à 1,5 mois de contamination, les taux de métabolites DOPAC et HVA sont très peu différents du taux de dopamine dans ces deux structures cérébrales. Avec l'âge, les taux de dopamine dans ces deux structures semblent diminuer.

Pour les autres structures, les variations infimes des taux des divers composés ne permettent pas de dégager de réelles tendances.

III.2.3.A-3. Mesure de l'activité acétylcholinestérase après contamination UA :

Les mesures par spectrophotométrie de l'activité de l'ChE de quatre structures cérébrales après une ingestion chronique d'uranium appauvri pendant 6 mois sont présentées dans la figure n°34. L'analyse statistique des résultats indique que le traitement provoque une baisse significative de l'activité ChE dans le cervelet des animaux contaminés (-21%, $p=0,03$).



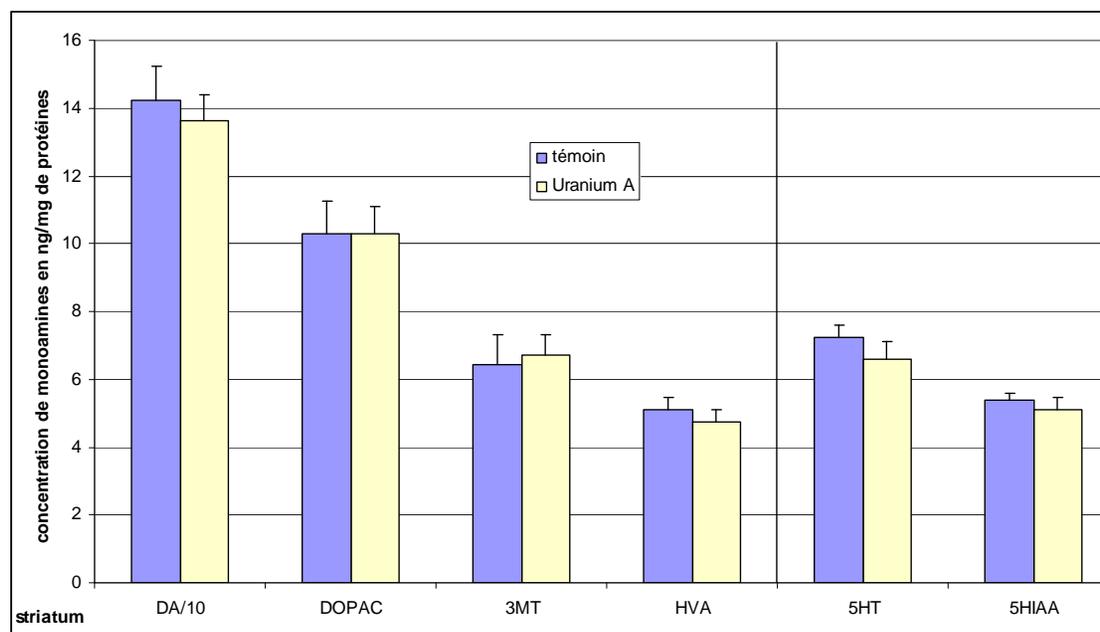
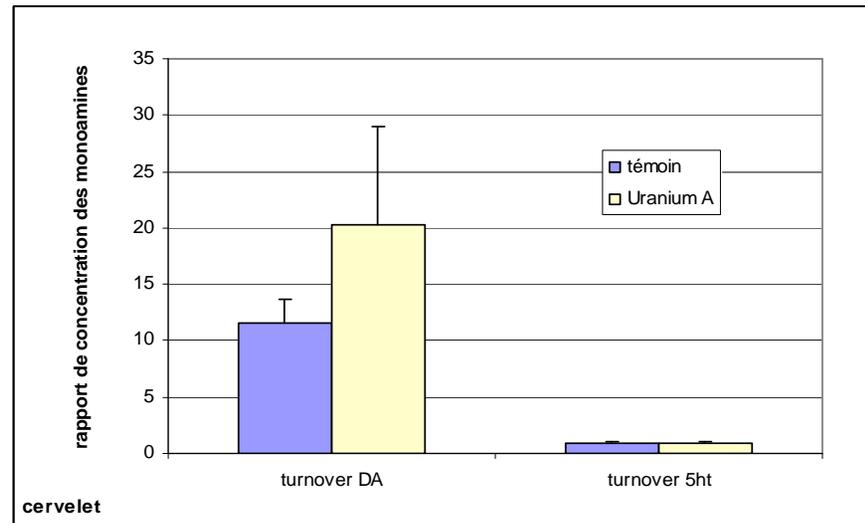
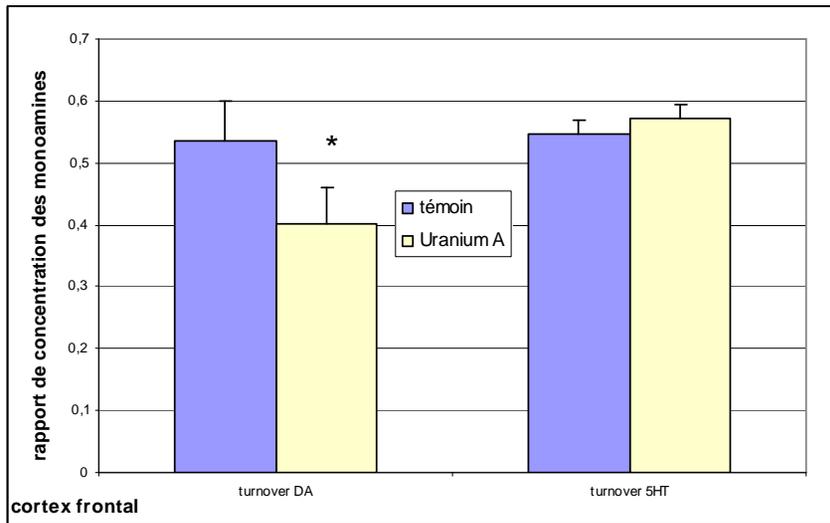
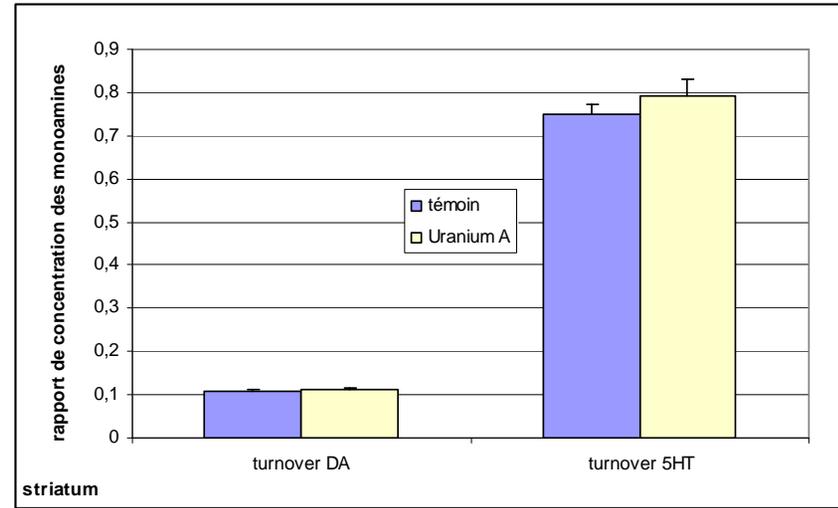
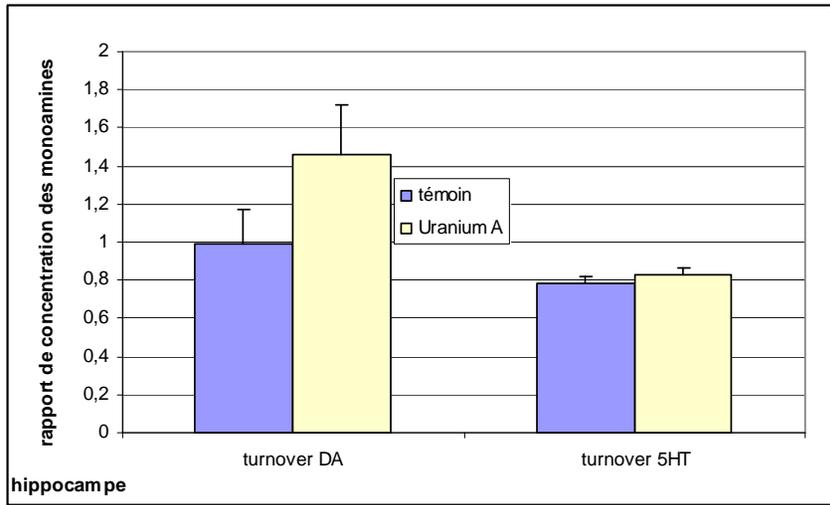


Figure n°32. Taux de monoamines en $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique de 6 mois à l'uranium appauvri à $40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (cf. annexe 3, taux de protéines A-3).

Métabolisme dopaminergique : dopamine (DA), acide 3,4-dihydroxyphényl acétique (DOPAC), 3-méthoxydopamine (3MT) et acide homovanillique (HVA). Métabolisme sérotoninergique : sérotonine (5HT), acide 5-hydroxyindolacétique (5HIAA). # différence indicative par rapport aux témoins $p < 0,01$; * différence significative $p < 0,05$. $n=8$ pour TE (témoins) et UA (uranium appauvri). Valeurs : moyenne \pm erreur standard.



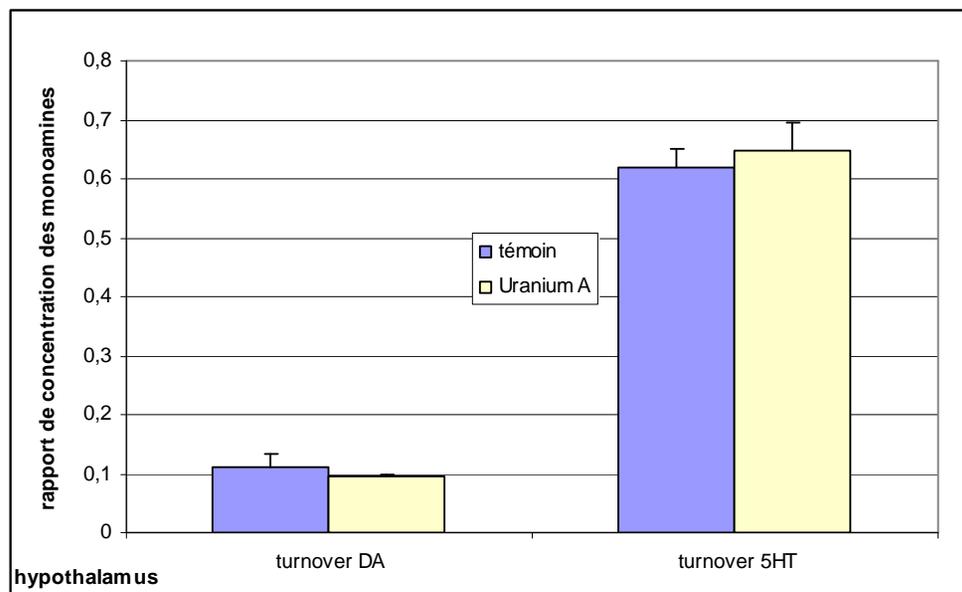
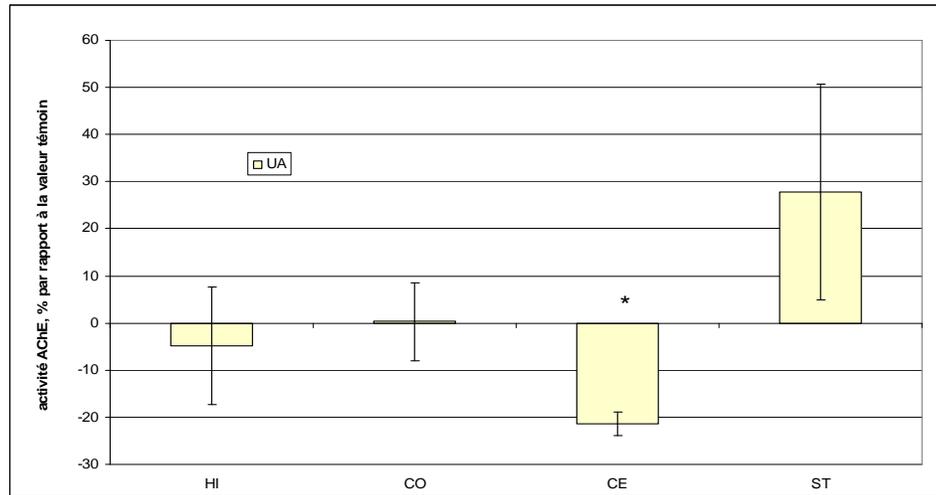


Figure n°33. Turnover des monoamines dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique de 6 mois à l'uranium appauvri à 40mg.L⁻¹.

Rapport des concentrations de métabolites sur la concentration de neurotransmetteurs, dopamine (DA) et sérotonine (5HT) : (DOPAC+HVA)/DA [ou DOPAC/DA lorsque HVA non détectable par le système électrochimique] et 5HIAA/5HT. # différence indicative par rapport aux témoins $p < 0,01$; * différence significative $p < 0,05$. $n=8$ pour TE (témoins) et UA (uranium appauvri). Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

Les taux de protéines totales de ces mêmes structures ne sont pas significativement modifiés après le traitement ($p > 0,05$) (cf. tableau B-3, annexe 3). Une hausse indicative a cependant été constatée dans l'hippocampe ($p = 0,07$) mais ne semble pas avoir d'incidence sur la mesure d'activité ChE.

Figure n°34. Activité de l'acétylcholinestérase dans différentes structures cérébrales après une contamination chronique à l'uranium appauvri de 6 mois à 40mg.L⁻¹ (cf. annexe 3, taux de protéines B-3)



* différence significative $p < 0,05$; HI : hippocampe gauche, ST : striatum gauche, CO : cortex frontal gauche, CE : cervelet gauche. n=8 pour TE (témoins), n=7 pour UA (uranium appauvri). % = ((moyenne traité/ moyenne témoin)-1) x 100. Valeur d'activité ChE exprimée en μ -moles de substrat hydrolysé par min par mg de protéines totales ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

III.2.3.A-4. Dosage de l'uranium dans le cerveau après contamination UE :

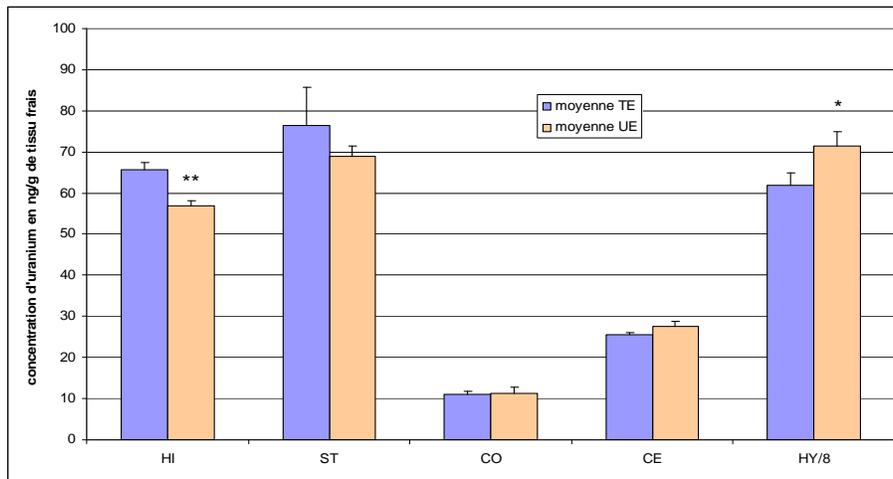
Les résultats de dosage d'uranium par ICPMS après contamination UE dans le striatum, l'hippocampe, le cortex frontal, le cervelet et l'hypothalamus sont présentés dans la figure n°35. Les résultats montrent que l'hypothalamus reste la structure cérébrale qui accumule le plus d'uranium, au regard des résultats obtenus pour des temps de contamination plus précoces (cf. paragraphe III.2.2.4.). La distribution structurale respecte toujours l'ordre suivant : HY > ST > HI > CE > CO mais les taux d'uranium retrouvés, mêmes chez les témoins, sont bien supérieurs aux taux observés pour l'expérimentation « 1,5 mois de contamination » (pour exemple : dans le striatum $70\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ à 6 mois contre $20\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ à 1,5 mois).

L'analyse statistique montre une hausse significative d'uranium (+15%, $p = 0,04$) dans l'hypothalamus des rats contaminés à l'UE par rapport aux témoins. De façon surprenante, alors qu'à 1,5 mois une accumulation significative d'uranium avait été relevée dans l'hippocampe, à 6 mois, une baisse significative du taux d'uranium a été constatée dans cette même structure chez les animaux contaminés par rapport aux témoins (-13%, $p = 0,003$).

III.2.3.A-5. Dosage de l'uranium dans les structures cibles après contamination UA :

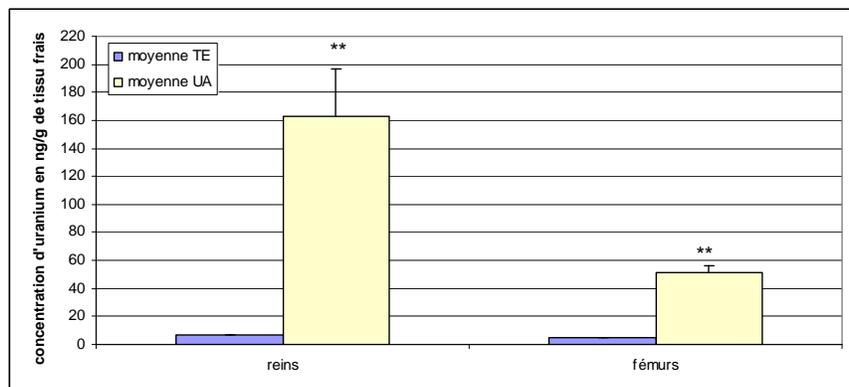
Les résultats de dosages d'uranium par KPA chez des rats contaminés pendant 6 mois à l'UA dans les reins et fémurs sont présentés dans la figure 36. L'analyse statistique montre une différence significative par rapport aux valeurs témoins ($p < 0,01$) aussi bien pour les reins que les fémurs chez les animaux contaminés. Le bruit de fond « uranium naturel » a été mesuré à $6,4 \pm 1,4 \text{ ng.g}^{-1}$ pour les reins et $4,4 \pm 0,4 \text{ ng.g}^{-1}$ pour les fémurs chez les animaux témoins. Ces valeurs sont plus basses que celles relevées après 1,5 mois de contamination (cf. paragraphe III.2.2.5.). De même, les taux d'uranium dans les fémurs chez les animaux contaminés sont plus faibles après 6 mois (52 ng.g^{-1}) qu'après 1,5 mois (90 ng.g^{-1}). A l'inverse, le taux d'uranium dans les reins augmente entre ces deux temps (132 ng.g^{-1} à 1,5 mois contre 163 ng.g^{-1} à 6 mois)

Figure n°35. Concentration cérébrale d'uranium en ng.g^{-1} , après une contamination chronique à l'uranium enrichi de 6 mois à 40 mg.L^{-1} .



* différence significative par rapport aux témoins $p < 0,05$; ** différence très significative $p < 0,01$; HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex frontal, CE : cervelet, HY : hypothalamus. $n=10$ pour TE (témoins) et UE (uranium enrichi). structures symétriques droite et gauche + hypothalamus. Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

Figure n°36. Concentration d'uranium en ng.g^{-1} dans les reins et les os, après une contamination chronique à l'uranium appauvri de 6 mois à 40 mg.L^{-1} .



** différence très significative $p < 0,01$; $n=8$ pour TE (témoins) et UA (uranium appauvri). Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

III.2.3.B. Contamination chronique de 9 mois.

Rappel des paramètres mesurés après 9 mois de contamination à l'UA ou à l'UE :

Paramètres	Témoin	UA 40mg.L ⁻¹	UE 40mg.L ⁻¹
<input type="checkbox"/> Suivi hebdomadaire au cours de l'expérimentation	n=20 (+10)	12 (+10)	12 (+10)
<input type="checkbox"/> Dosage des monoamines par HPLC-ECD	18	12	10
<input type="checkbox"/> Mesure de l'activité ChE par spectrophométrie	16	10	6
<input type="checkbox"/> Dosage de l'uranium dans le cerveau par ICPMS (9,5 m)	6	-	8
<input type="checkbox"/> Dosage de l'uranium dans le cerveau par ICPMS	10	10	-
<input type="checkbox"/> Dosage de l'uranium dans les tissus cibles par KPA	8	8	8

III.2.3.B-1. Paramètres généraux :

La contamination chronique de 9 mois, c-à-d. témoin comparé à uranium appauvri et uranium enrichi, a été réalisée deux fois : une première série de Janv. 2003 à Oct. 2003 (20 rats TE, 12 UA et 12 UE) et une seconde série de Janv. 2004 à Oct. 2004 (10 rats pour TE, UA et UE). La première série avait pour but de réaliser le dosage des paramètres neuro-biochimiques (monoamines et ChE) et le dosage d'uranium dans les structures cérébrales. La seconde avait pour but de réaliser une évaluation des perturbations histologiques (expérimentation en cours de réalisation et non rapportée dans ce mémoire). Le suivi hebdomadaire des animaux de ces deux séries d'expérimentation est rapporté ici à titre de comparaison et présenté dans les figures n°37 à 42.

Pour la série 2003, les résultats indiquent que tout au long du suivi, l'évolution pondérale des animaux du lot UA est inférieure à l'évolution pondérale du lot TE (cf. figure 37). Comme à 6 mois, la différence de poids semble croître en raison d'un gain de poids légèrement inférieur chez les animaux contaminés UA par rapport aux témoins (11,0g en moyenne chez les UA, entre chaque mesure, contre 12,2g pour les témoins et 12,4g pour les UE). Là encore ces variations pondérales ne trouvent pas de justification dans l'évolution de la prise alimentaire ou de boisson (cf. figures 38 et 39). De plus, ces observations n'ont pas été relevées pour d'autres lots de rats placés dans les mêmes conditions de traitement pendant 9 mois, au sein de l'animalerie (Paquet *et al.*, 2005; Souidi *et al.*, 2005). Les variations pondérales restent à ce jour non justifiées.

Par ailleurs, l'analyse statistique montre, pour certains animaux du lot contaminé à l'UE (2 couples sur 6), une consommation supérieure de boisson par rapport à la population témoin (cf. figure 39). La recherche des causes de cette surconsommation de boisson, nous a conduit à réaliser une série de tests en cage à métabolisme afin de mesurer l'élimination urinaire et fécale de ces animaux. Les animaux les plus consommateurs de boisson en cages traditionnelles n'ont pas consommé plus d'eau en cages à métabolisme. L'évaluation du taux d'humidité des fèces n'a pas apporté de réponse plus concluante. Il a été conclu que la surconsommation de boisson pouvait être la conséquence d'une défaillance technique des biberons, conduisant à un écoulement du contenu dans la cage. De

plus, ces variations de la prise de boisson n'ont pas eu d'incidence sur la prise de poids des animaux UE (cf. figure 37).

Pour la série 2004, l'analyse statistique ne met pas en évidence de différence concernant l'évolution pondérale des animaux entre les trois lots (TE, UA et UE) (cf. figure 40). Ces données sont contraires à la série 2003 pour le lot UA mais en accord avec les autres séries d'animaux en contamination chronique de 9 mois au sein de l'animalerie (Souidi *et al.*, 2005). Pour la consommation d'aliments, très peu de variations significatives ont été relevées (cf. figure 42). A l'inverse, pour la prise de boisson, les résultats montrent que le lot d'animaux UA a eu une consommation d'eau significativement supérieure à celle du lot TE (cf. figure 41). Là encore aucune explication concluante n'a pu être apportée pour expliquer ces variations qui n'ont pas d'incidence sur le poids ou le comportement général des animaux.

Les variations observées sur la série 2003 concernant la prise de boisson des animaux UE, n'ont pas été retrouvées pour la série 2004. Toutefois, l'uranium enrichi utilisé dans les deux cas ne présentait pas la même composition isotopique (5,45% en 2003 et seulement 4,25% en 2004).

III.2.3.B-2. Dosage des monoamines :

Les résultats de dosage par HPLC-ECD des monoamines et de leurs métabolites dans cinq structures cérébrales (HI, ST, CO, CE et HY), après une ingestion chronique pendant 9 mois d'uranium appauvri ou d'uranium enrichi à $40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sont présentés dans la figure n°43. Les résultats des calculs de turnover sont présentés figure n°44.

Après contamination à l'UA, l'analyse statistique des données montre une baisse significative du taux de DOPAC dans le striatum (-17%, $p=0,04$) qui s'accompagne d'une baisse non significative de DA (-5%) et de HVA (-12%) alors que le taux de 3MT ne varie pas. L'origine de ces perturbations pourrait être une baisse de l'anabolisme de la dopamine. Dans tous les cas, ces perturbations n'affectent pas la dégradation intra-synaptique de la dopamine puisque le taux de métabolite 3MT reste inchangé. Enfin, ces variations n'existent pas dans le cas de la contamination à l'UE.

Dans le cortex frontal, l'analyse des résultats montre une baisse significative du taux de 5HIAA après contamination chronique à l'UA (-14% , $p=0,02$). Dans le même temps, le turnover de la sérotonine est abaissé de 13% ($p=0,02$) pour cette même contamination. Ces variations pourraient être la conséquence d'une augmentation du catabolisme sérotoninergique. Après contamination à l'UE, une baisse indicative du turnover de la sérotonine a également été relevée dans le cortex frontal (-10%, $p=0,09$). Cette diminution du turnover prend son origine dans l'augmentation du taux de sérotonine (+8%). Les données montrent également une baisse indicative du turnover de la dopamine (-23%, $p=0,09$) pour la contamination à l'UA. Cette dernière baisse s'explique par une hausse du taux de dopamine +40% sans modification du taux des métabolites.

Les résultats obtenus pour l'hypothalamus, bien que non significatifs, semblent indiquer une baisse de l'anabolisme dopaminergique et sérotoninergique aussi bien après une contamination à l'UA qu'une contamination à l'UE. Une baisse indicative du taux de dopamine ($p=0,09$) a été constatée après contamination UE.

Pour l'hippocampe et le cervelet, les résultats semblent aussi indiquer certaines tendances. Dans l'hippocampe, comme pour l'hypothalamus, les résultats semblent montrer une baisse de l'anabolisme dopaminergique qui est plus marquée pour les UE que les UA. Pour le cervelet, les deux contaminations semblent augmenter le taux de HVA. Cependant l'ensemble de ces résultats est non significatif.

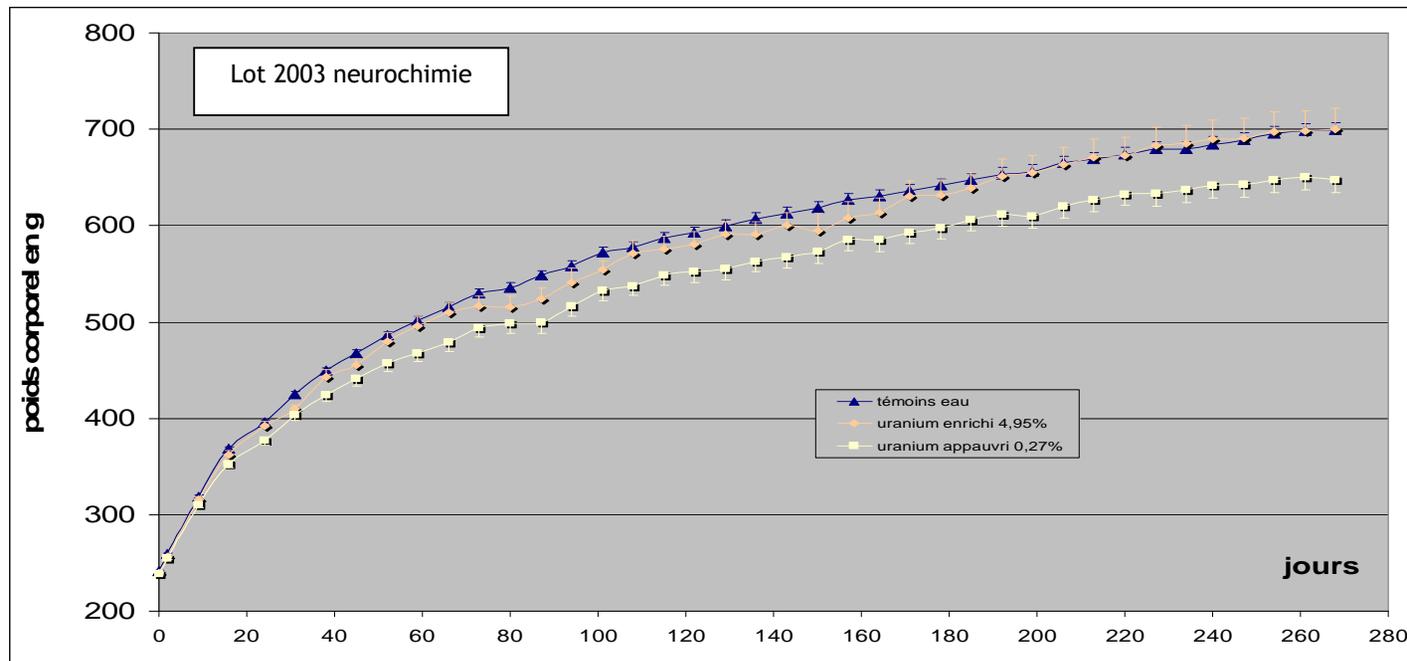


Figure n°37. Evolution pondérale des animaux au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri ou enrichi de 9 mois à 40mg.L^{-1} .

Valeurs : moyenne \pm erreur standard. Les valeurs UA sont significativement différentes par rapport aux témoins du 16 au 150^{ème} jours $p < 0,05$, la différence est à nouveau significative le jour de l'euthanasie.

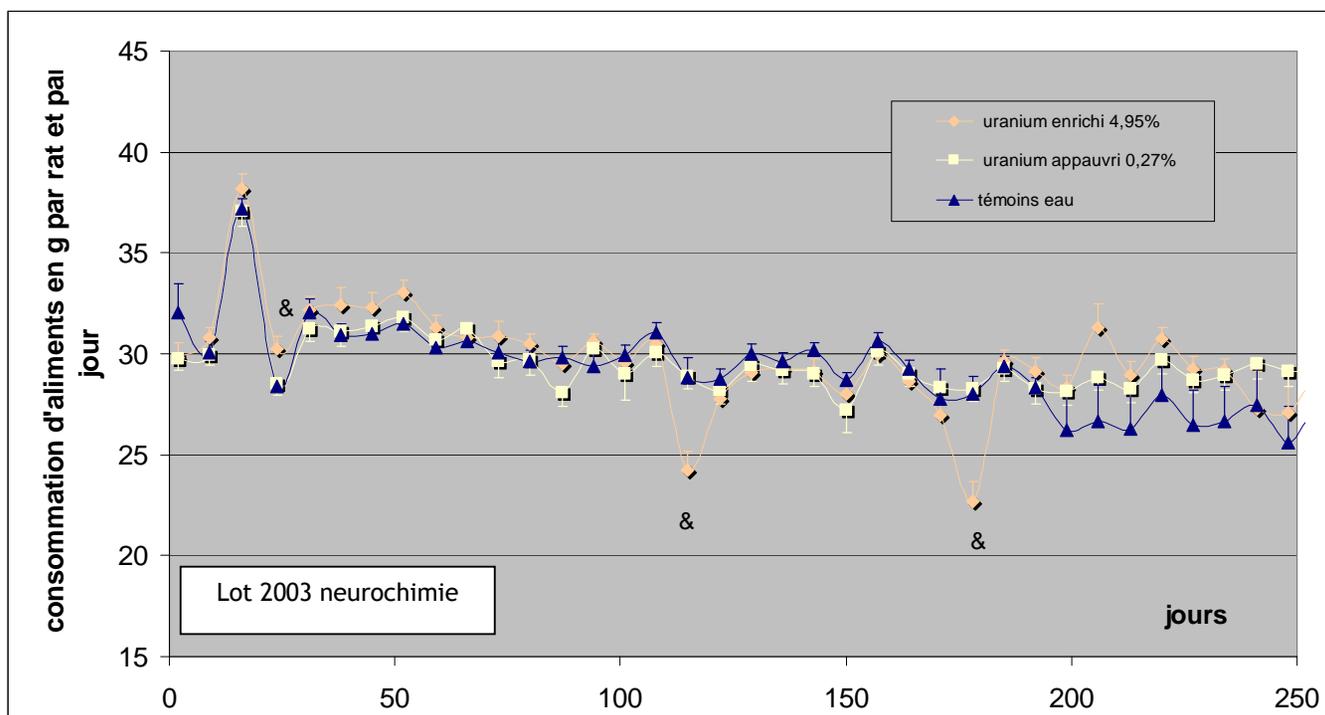


Figure n°38. Evolution de la consommation quotidienne d'aliments au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri et enrichi de 9 mois à 40mg.L^{-1} .

Valeurs : moyenne \pm erreur standard. & différence significative du lot UE par rapport aux témoins, # différence significative du lot UA par rapport aux témoins $p < 0,05$.

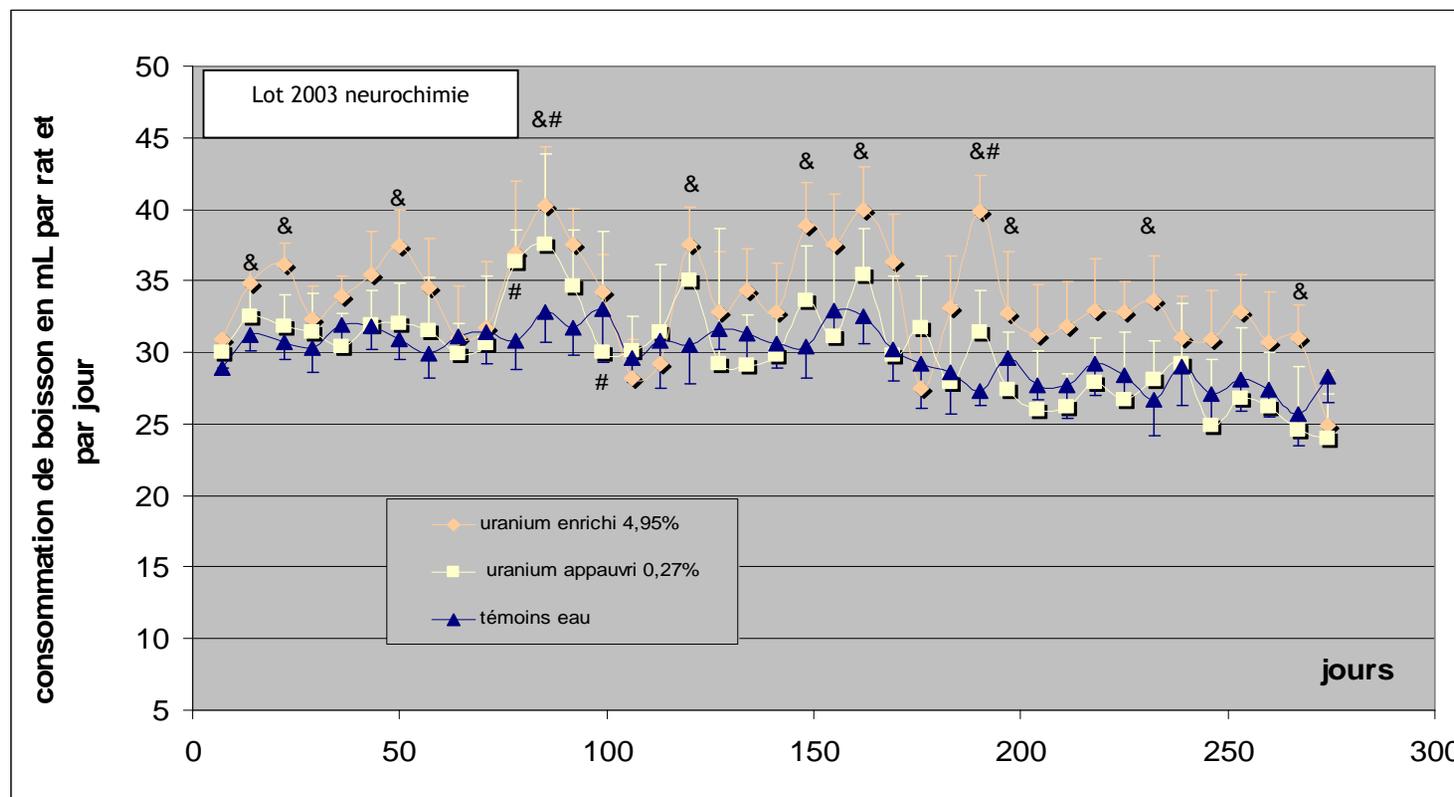


Figure n°39. Evolution de la consommation quotidienne de boisson au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri et enrichi de 9 mois à 40mg.L^{-1} .

Valeurs : moyenne \pm erreur standard. & différence significative du lot UE par rapport aux témoins, # différence significative du lot UA par rapport aux témoins $p < 0,05$.

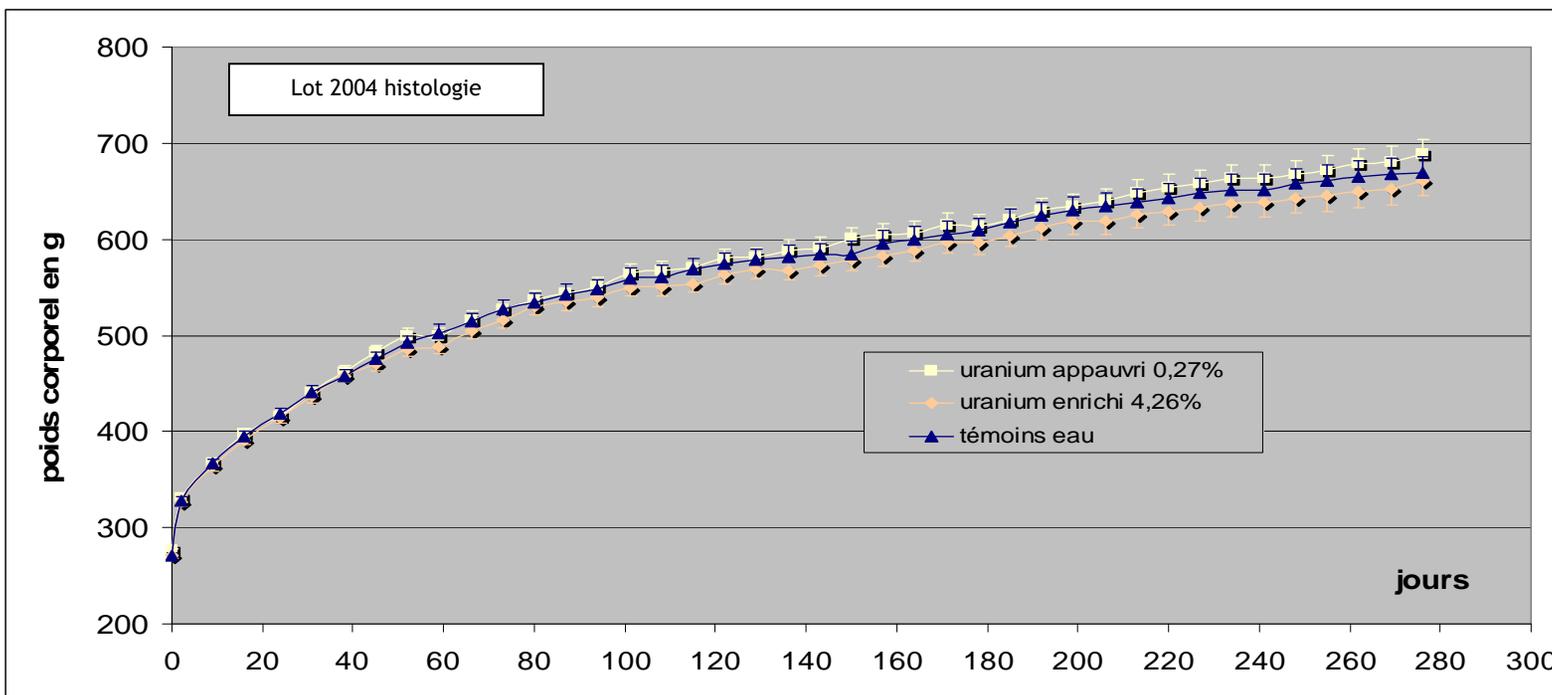


Figure n°40. Evolution pondérale des animaux au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri ou enrichi de 9 mois à 40mg.L^{-1} .

Valeurs : moyenne \pm erreur standard. * différence significative par rapport aux témoins $p < 0,05$.

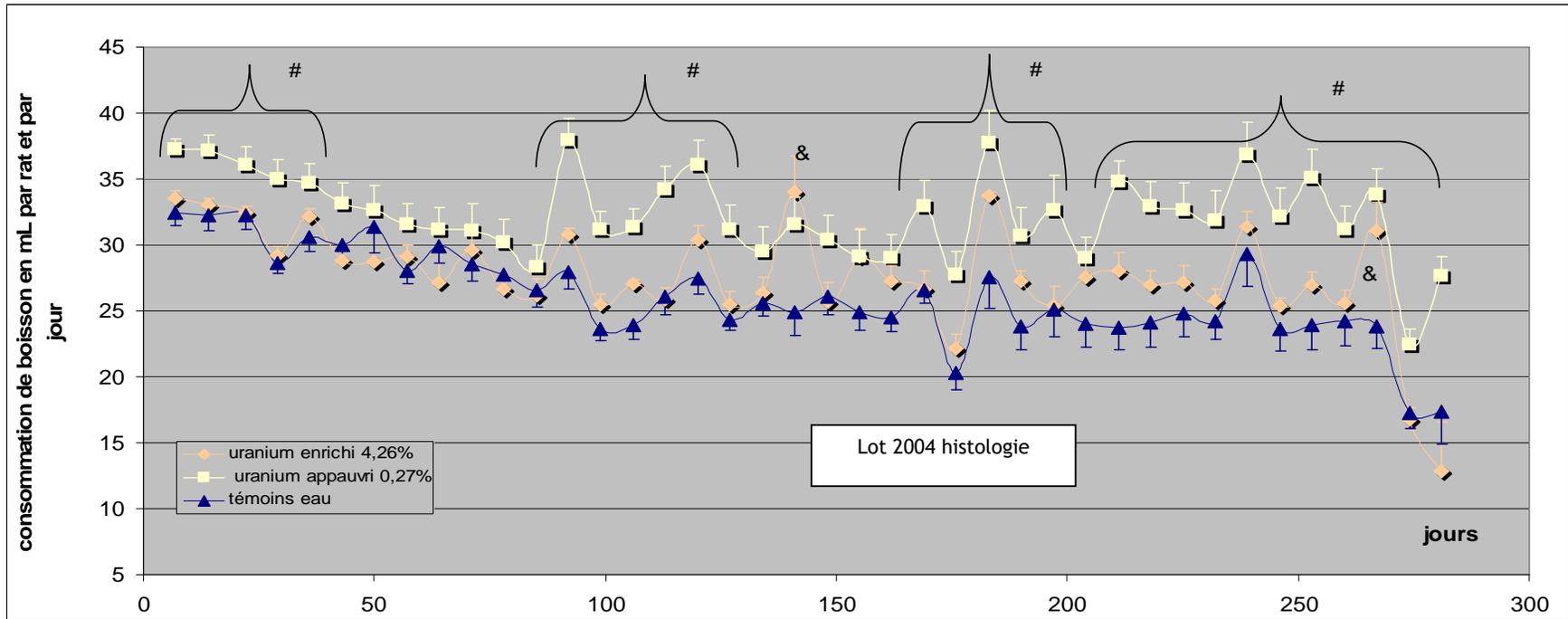


Figure n°41. Evolution de la consommation quotidienne de boisson au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri et enrichi de 9 mois à 40mg.L⁻¹.

Valeurs : moyenne ± erreur standard. & différence significative du lot UE par rapport aux témoins p < 0,05, # différence significative du lot UA par rapport aux témoins p < 0,05.

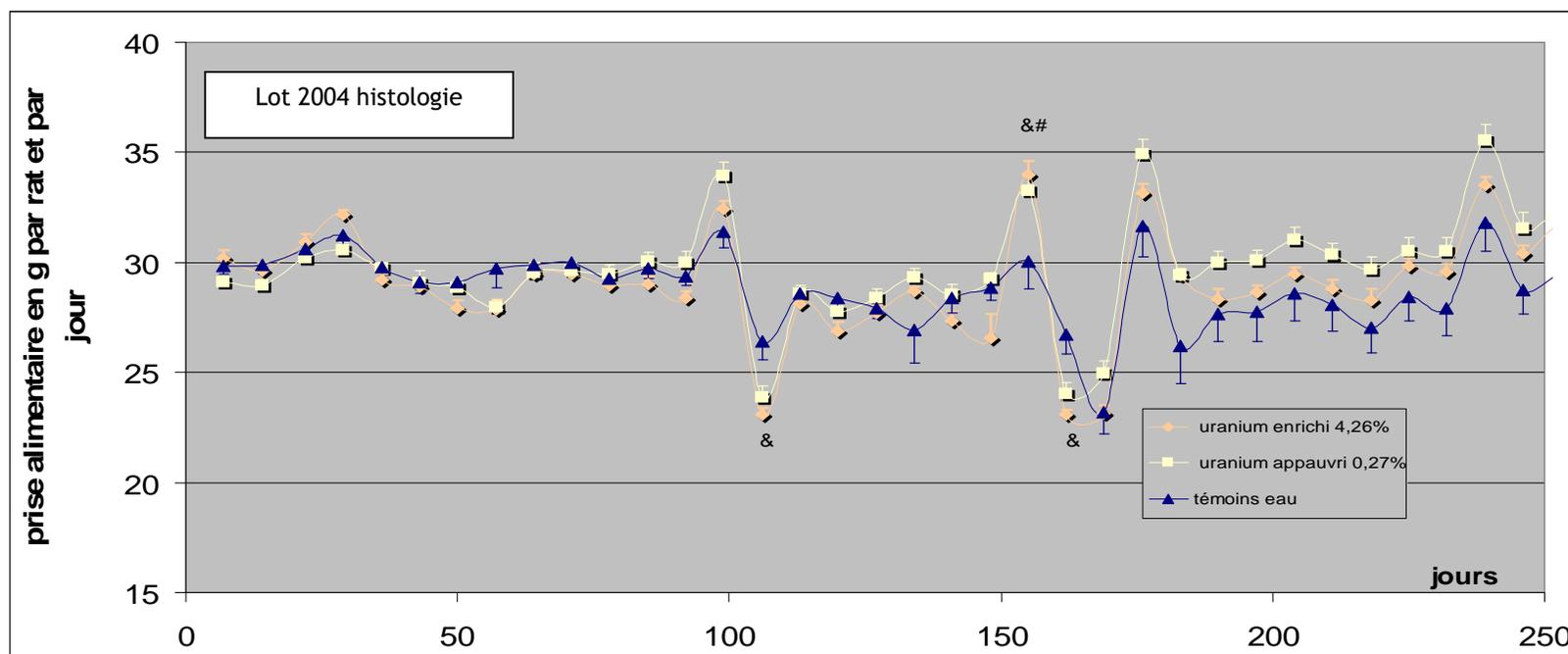
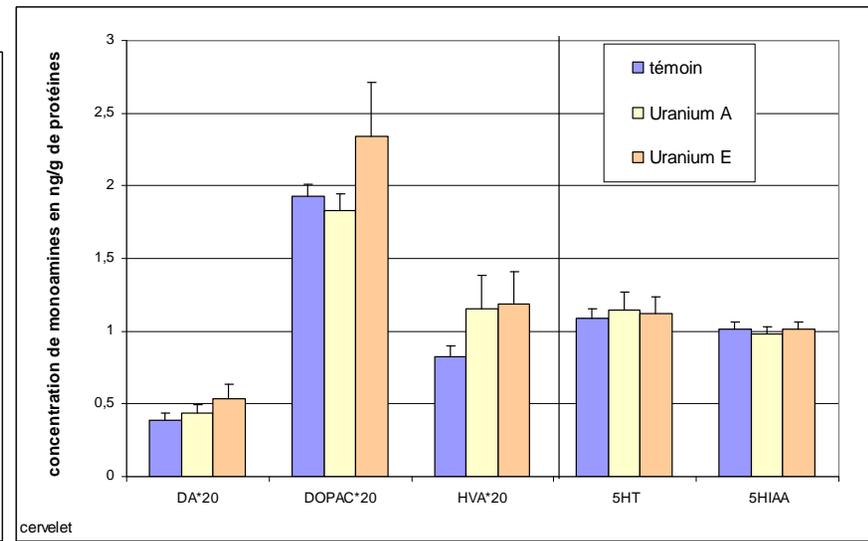
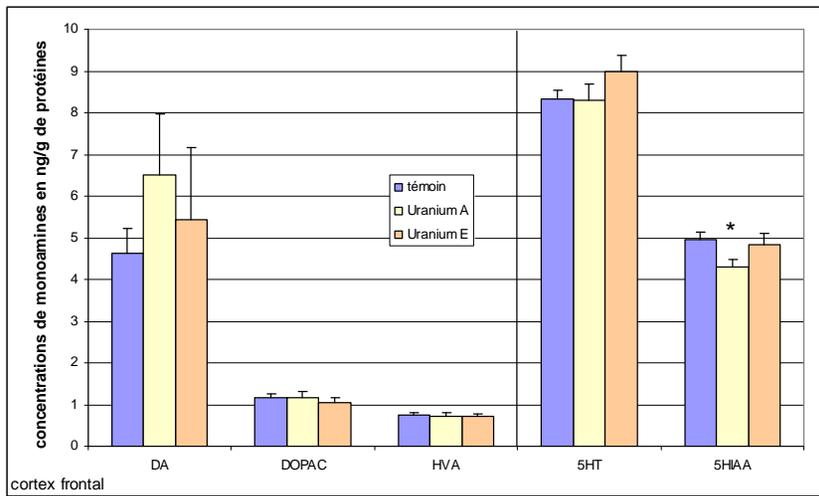
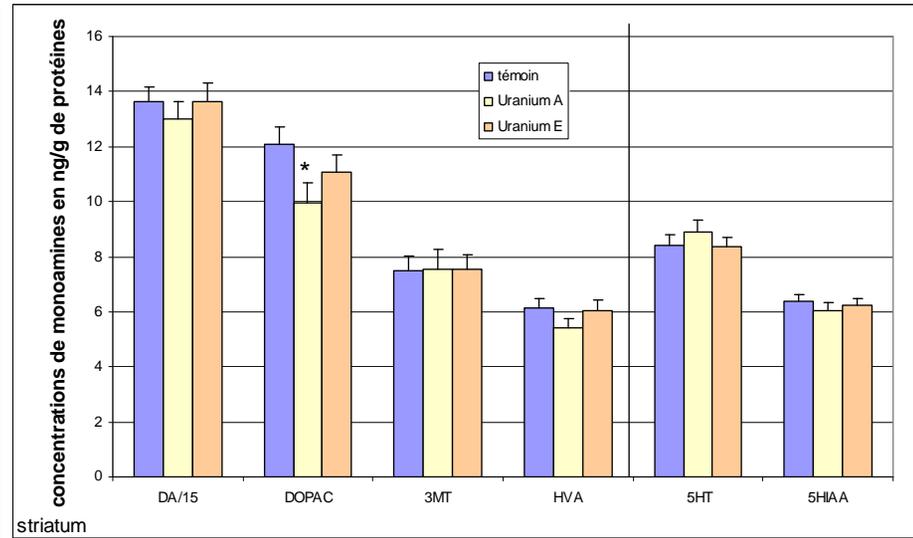
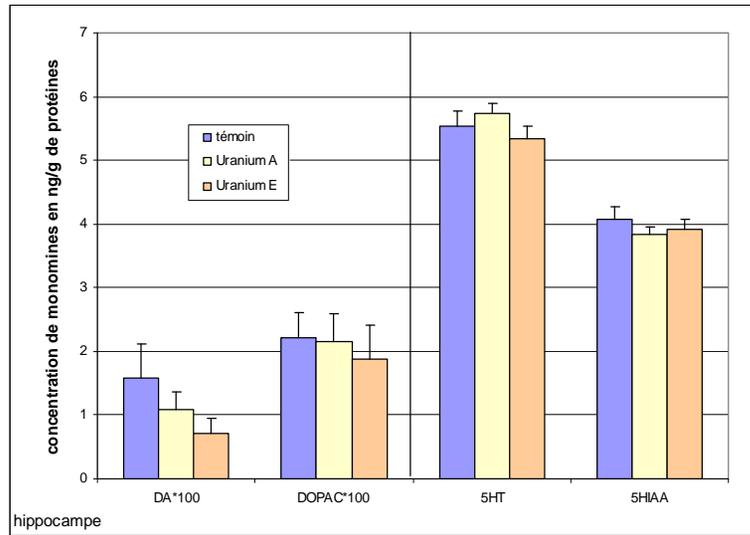


Figure n°42. Evolution de la consommation quotidienne d'aliments au cours d'une contamination chronique à l'uranium appauvri et enrichi de 9 mois à 40mg.L^{-1} .

Valeurs : moyenne \pm erreur standard. * différence significative par rapport aux témoins $p < 0,05$. & différence significative du lot UE par rapport aux témoins, # différence significative du lot UA par rapport aux témoins $p < 0,05$.



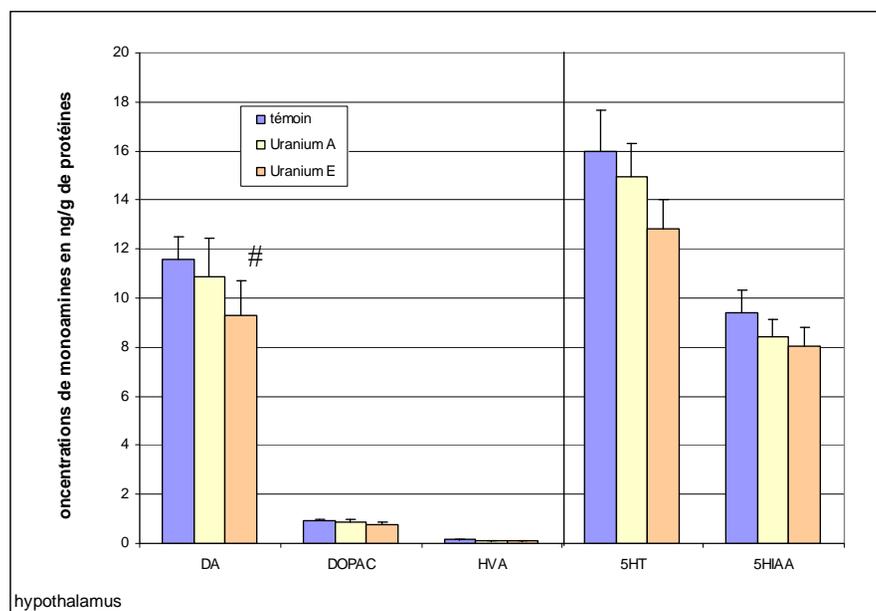
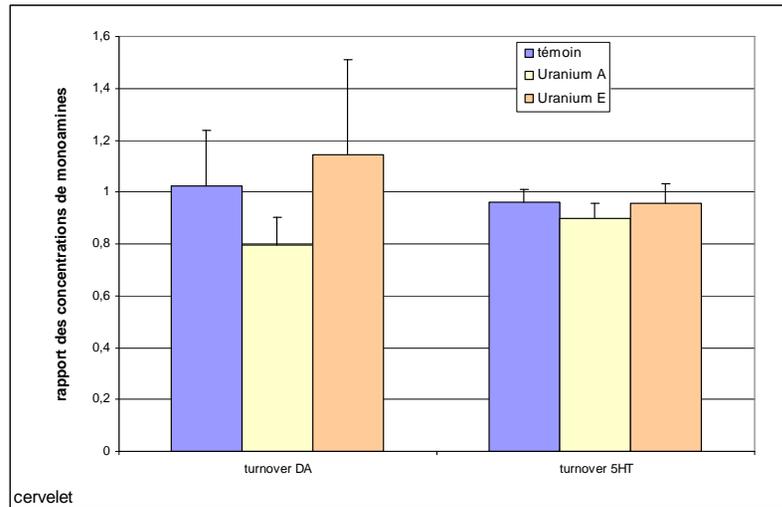
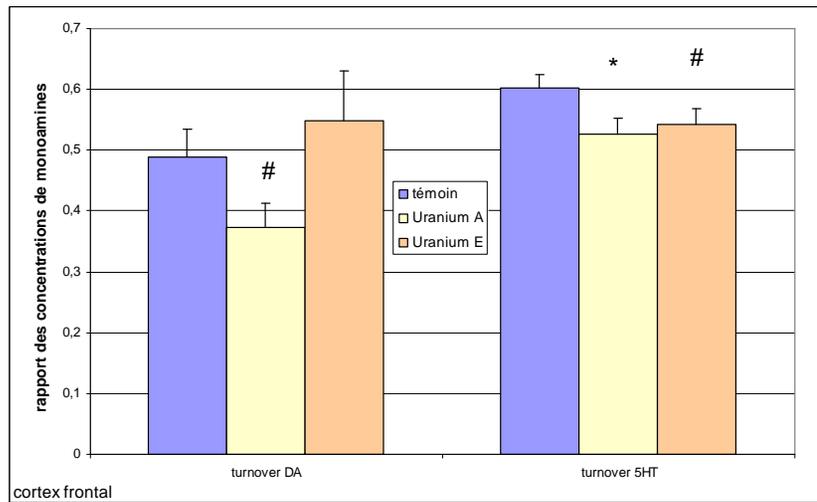
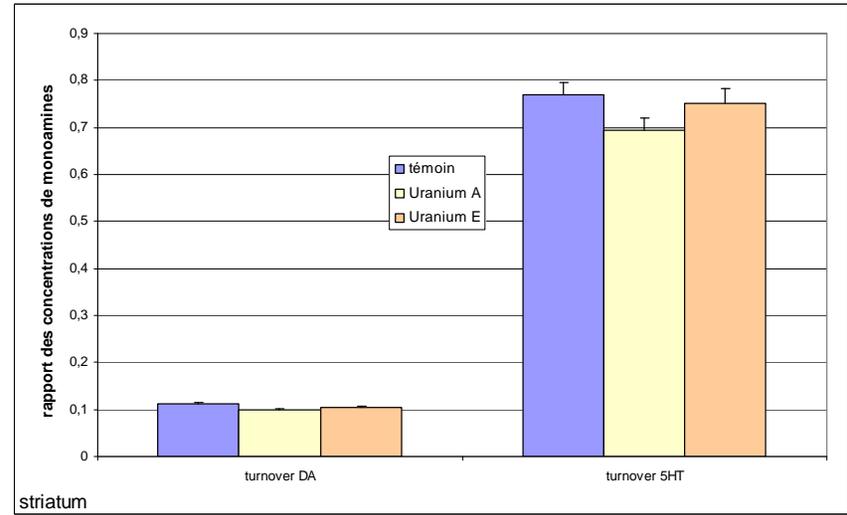
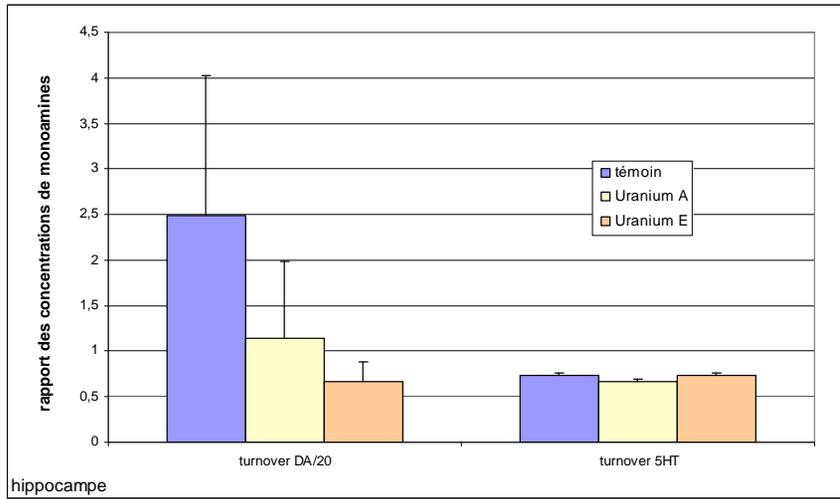


Figure n°43. Taux de monoamines en $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique de 9 mois à l'uranium à $40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (cf. annexe 4, taux de protéines A-4).

Métabolisme dopaminergique : dopamine (DA), acide 3,4-dihydroxyphényl acétique (DOPAC), 3-méthoxydopamine (3MT) et acide homovanillique (HVA). Métabolisme sérotoninergique : sérotonine (5HT), acide 5-hydroxyindolacétique (5HIAA). * différence significative par rapport aux témoins $p < 0,05$, # différence indicative par rapport aux témoins $p < 0,1$. $n=18$ pour TE (témoins), $n=12$ pour UA (uranium appauvri) et $n=10$ pour UE (uranium enrichi). Valeurs : moyenne \pm erreur standard.



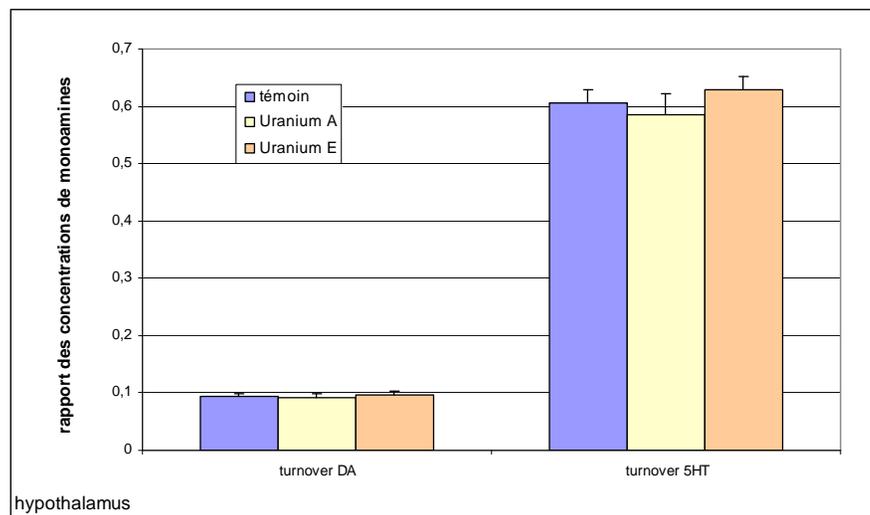


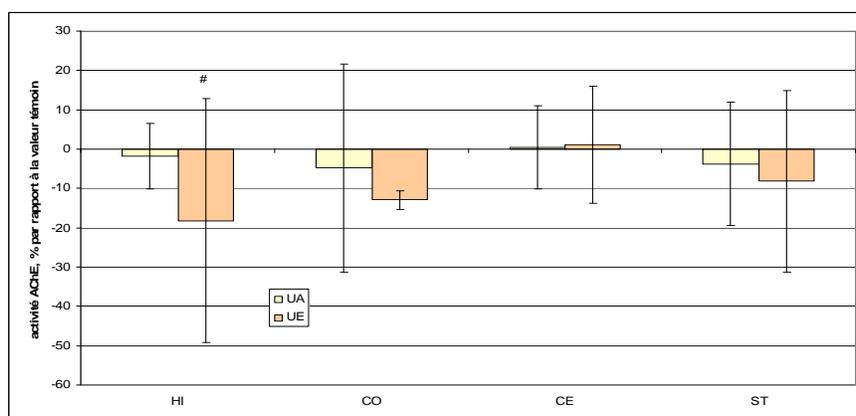
Figure n°44. Turnover des monoamines dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique de 9 mois à l'uranium à 40mg.L⁻¹.

Rapport des concentrations de métabolites sur la concentration de neurotransmetteurs, dopamine (DA) et sérotonine (5HT) : (DOPAC+HVA)/DA [ou DOPAC/DA lorsque HVA non détectable par le système électrochimique] et 5HIAA/5HT. n=18 pour TE (témoins), n=12 pour UA (uranium appauvri) et n=10 pour UE (uranium enrichi). Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

III.2.3.B-3. Mesure de l'activité acétylcholinestérase :

Les mesures spectrophotométriques d'activité ChE dans 4 structures cérébrales après contamination chronique de 9 mois à l'uranium à la concentration de 40mg.L^{-1} sont présentées dans la figure n°45. Après ingestion chronique d'UA, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs relevées pour les rats témoins et les rats contaminés. Après contamination à l'UE, l'analyse statistique montre qu'il existe une baisse indicative (-18% , $p=0,08$) de l'activité ChE dans l'hippocampe des rats contaminés pendant 9 mois.

Figure n°45. Activité de l'acétylcholinestérase dans différentes structures cérébrales après une contamination chronique de 9 mois à l'uranium à 40mg.L^{-1} (cf. annexe 4, taux de protéines B-4).



différence indicative par rapport à la moyenne des témoins $p < 0,1$; HI : hippocampe gauche, ST : striatum gauche, CO : cortex frontal gauche, CE : cervelet gauche. $n=16$ pour TE (témoins), $n=10$ pour UA (uranium appauvri) et $n=6$ pour UE (uranium enrichi). % = $((\text{moyenne traité}/\text{moyenne témoin})-1) \times 100$. Valeur d'activité ChE exprimée en $\mu\text{moles de substrat hydrolysé par min par mg de protéines totales } (\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1})$. Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

III.2.3.B-4. Dosage de l'uranium dans le cerveau :

III.2.3.B-4.a. Dosage d'uranium cérébral après contamination chronique à l'UE :

Les résultats de dosage d'uranium par ICPMS dans l'hippocampe, le striatum, le cortex frontal, le cervelet, l'hypothalamus et le reste du cerveau après contamination chronique UE pendant 9 mois et demi sont présentés dans la figure n°46. Les résultats confirment la distribution structurale déjà observée (cf. paragraphe III.2.2.4. et III.2.3.A-4.) à savoir hypothalamus > striatum > hippocampe > cervelet > cortex.

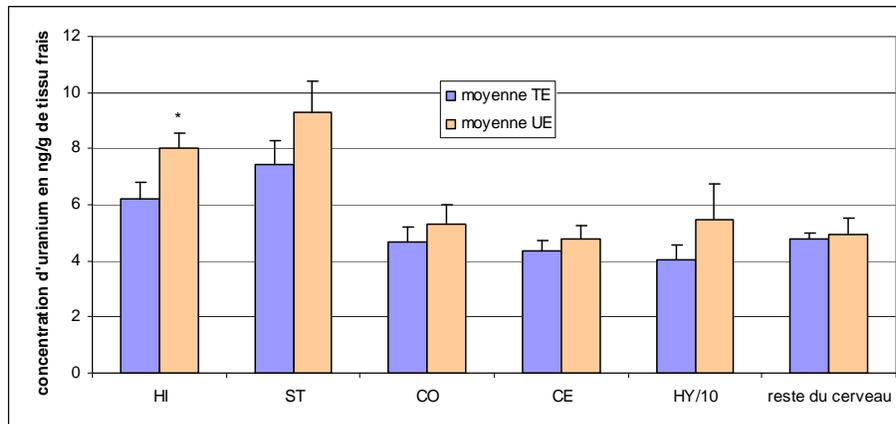
L'analyse statistique montre qu'il existe une hausse significative du taux d'uranium dans l'hippocampe ($+29\%$, $p=0,04$) des rats contaminés à l'UE par rapport aux témoins. Le taux d'uranium est également augmenté par rapport aux témoins dans toutes les autres structures étudiées, entre autres striatum et hypothalamus, mais ces augmentations restent non significatives ($p > 0,05$) en raison d'un écart-type important. Les taux de base d'uranium chez les témoins sont en baisse par rapport à

6mois (pour exemple : dans le striatum des témoins $7,5\text{ng.g}^{-1}$ à 9mois, contre 70 ng.g^{-1} à 6mois et 20 ng.g^{-1} à 1,5 mois).

Le poids des structures cérébrales est présenté dans le tableau C-4, annexe4. Il n'y a pas de différence significative entre les séries d'animaux hormis pour le poids du striatum qui est légèrement plus faible chez les animaux contaminés (-15% , $p=0,05$).

De la même manière qu'à 1,5 mois, l'uranium s'accumule préférentiellement dans l'hippocampe après 9 mois de contamination chronique à l'UE (8 ng.g^{-1} à 9mois contre 34 ng.g^{-1} à 1,5mois). Toujours en comparaison du temps 1,5 mois, les résultats montrent également une accumulation non significative dans le striatum et l'hypothalamus (dans le striatum 9 ng.g^{-1} à 9 m au lieu de 58ng.g^{-1} à 1,5m ; dans l'hypothalamus 55ng.g^{-1} à 9m au lieu de 183ng.g^{-1} à 1,5m). Les baisses de concentration d'uranium par rapport à la valeur témoin, observées dans le striatum et l'hippocampe à 6 mois, ne sont pas retrouvées à 9mois. La distribution cérébrale d'uranium après contamination chronique à l'UE évolue donc avec la durée de la période de contamination.

Figure n°46. Concentration d'uranium en ng.g^{-1} dans les structures cérébrales, après une contamination chronique de 9,5 mois à l'uranium enrichi à 40mg.L^{-1} (cf. annexe 4, poids frais C-4).



* différence significative par rapport aux témoins $p < 0,05$; HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex frontal, CE : cervelet, HY : hypothalamus. $n=06$ pour TE (témoins) et $n=08$ pour UE (uranium enrichi). structures symétriques droite et gauche + hypothalamus. Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

III.2.3.B-4.b. Dosage d'uranium cérébral après contamination chronique à l'UA :

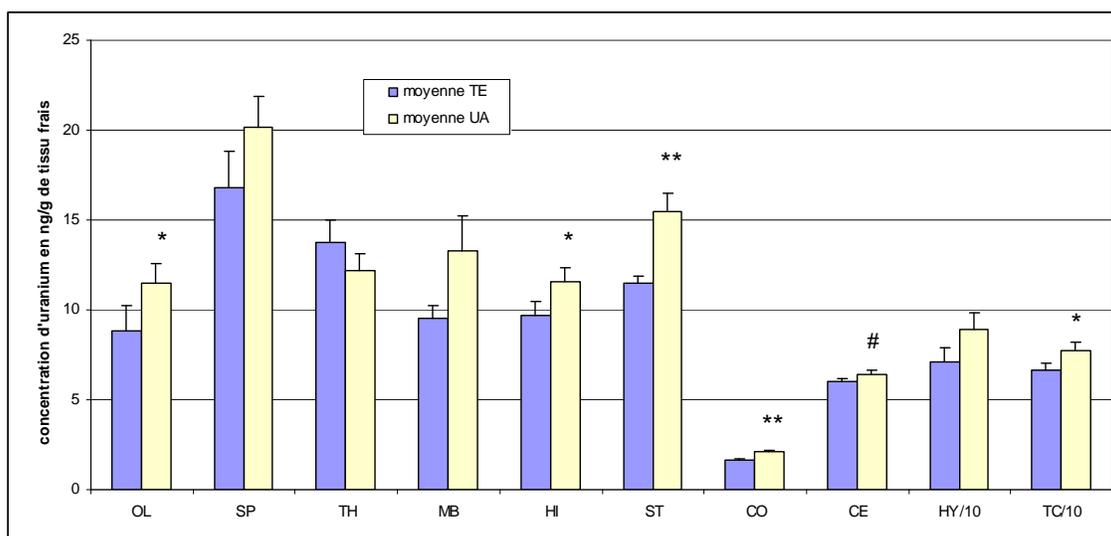
Les valeurs de dosages d'uranium par ICPMS dans 10 structures cérébrales après contamination chronique de 9 mois à l'UA sont présentées dans la figure n°47.

Cette analyse plus complète de la distribution cérébrale de l'uranium montre que le septum et la région du thalamus concentrent plus d'uranium que le striatum et l'hippocampe mais moins que l'hypothalamus qui est la structure cérébrale avec la concentration naturelle la plus élevée. Le cortex est la structure qui concentre le moins l'uranium naturel. En quantité d'uranium (ng), le tronc cérébral se place au premier rang ; il est suivi par le cortex et le cervelet.

L'analyse statistique montre qu'il existe une hausse significative d'uranium dans le système olfactif (bulbe + tubercule) (+30%, $p=0,02$), l'hippocampe (+20%, $p=0,03$), le tronc cérébral (+17%, $p=0,03$), le striatum (+34%, $p<0,001$) et le cortex (+29%, $p<0,001$) des rats contaminés par rapport aux témoins. Le taux d'uranium est également augmenté dans le cervelet (+6%, $p=0,06$) et les autres structures étudiées après contamination chronique à l'uranium, mais ces augmentations restent non significatives ($p>0,05$) en raison d'un écart-type important.

Après 9 mois de contamination chronique à l'UA, l'uranium s'accumule préférentiellement dans le striatum, l'hippocampe, le bulbe olfactif, le tronc cérébral et le cortex. En comparaison des résultats obtenus pour 1,5mois (cf. paragraphe III.2.2.4), le striatum est la structure qui caractérise l'accumulation d'uranium après contamination chronique à l'UA.

Figure n°47. Concentration d'uranium en ng.g^{-1} dans les structures cérébrales, après une contamination chronique de 9 mois à l'uranium appauvri à 40mg.L^{-1} (cf. annexe 4, poids frais D-4).



différence indicative par rapport aux témoins $p < 0,1$; * différence significative $p < 0,05$, ** différence très significative $p < 0,01$; OL : bulbe+tubercule olfactif, SP : septum, TH : thalamus, MB : midbrain, HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex total, CE : cervelet, HY : hypothalamus, TC : tronc cérébral. $n=10$ pour TE (témoins) et $n=10$ pour UA (uranium appauvri). structures symétriques droite et gauche + structure asymétrique complète. Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

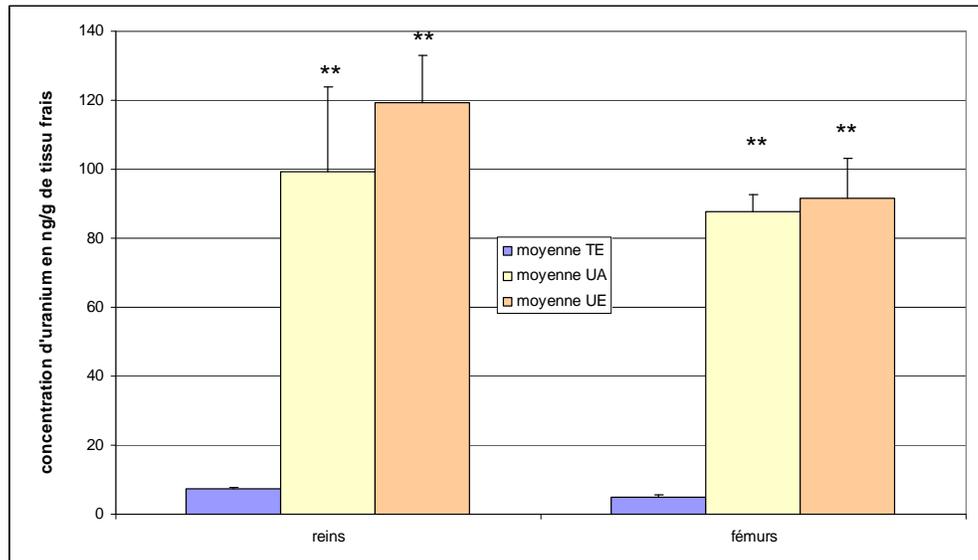
III.2.3.B-5. Dosage de l'uranium dans les structures cibles :

Les dosages d'uranium par KPA dans les reins et fémurs de rats contaminés pendant 9 mois à l'UA et à l'UE sont présentés dans la figure n°48. L'analyse statistique montre une différence significative par rapport aux valeurs témoins ($p<0,01$) aussi bien pour les reins que les fémurs chez les animaux contaminés. Le bruit de fond a été mesuré à $7,2 \pm 1,5\text{ng.g}^{-1}$ pour les reins et $5,0 \pm 1,4\text{ng.g}^{-1}$ pour les fémurs chez les animaux témoins, ce qui correspond sensiblement aux concentrations d'uranium retrouvées pour l'expérimentation 6 mois (cf. paragraphe III.2.3.A-5.).

Après 9 mois de contamination à l'UA, le taux d'uranium dans les fémurs est de 88ng.g^{-1} alors qu'il était de 52ng.g^{-1} après 6 mois et de 90ng.g^{-1} après 1,5 mois de contamination. Le taux d'uranium dans les reins est lui de 99ng.g^{-1} alors qu'il était à 132ng.g^{-1} à 1,5 mois et 163ng.g^{-1} à 6 mois. Ce dernier taux semble donc relativement constant tout au long de la contamination.

Après 9 mois de contamination à l'UE, le taux d'uranium dans les fémurs est identique à celui obtenu à 1,5 mois (92ng.g^{-1} à 9 mois contre 88ng.g^{-1} à 1,5 mois). Le taux d'uranium dans les reins reste stable à 120ng.g^{-1} alors qu'il était à 121ng.g^{-1} à 1,5 mois.

Figure n°48. Concentration d'uranium en ng.g^{-1} dans les reins et les os, après une contamination chronique de 9 mois à l'uranium à 40mg.L^{-1} .



** différence très significative $p < 0,01$; $n=8$ pour TE (témoins), UA (uranium appauvri) et UE (uranium enrichi). Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

III.2.4. EFFETS A TRES LONG TERME : 18 MOIS DE CONTAMINATION

Rappel des paramètres mesurés après 18 mois de contamination à l'UE :

Paramètres	Témoin	UE 40mg.L ⁻¹
<input type="checkbox"/> Suivi hebdomadaire au cours de l'expérimentation	12	12
<input type="checkbox"/> Dosage des monoamines par HPLC-ECD	8	10
<input type="checkbox"/> Mesure de l'activité ChE par spectrophométrie	7	8

III.2.4.1. Paramètres généraux :

Au cours des 18 mois de suivi hebdomadaire, 4 rats du lot témoin, et 1 rat du lot UE sont décédés au cours de la contamination ou ont été euthanasiés en raison d'une dégradation de leur état général de santé (cf. tableau n°14). Ces chiffres correspondent à une seule mort naturelle sur 24 rats, soit 4% de l'effectif ce qui est la donnée de référence pour des rats Sprague Dawley du même âge (≈ 20 mois) (données biologiques du fournisseur IFFA-CREDO, Charles River Laboratories).

Par ailleurs, les dissections ont mis en évidence un certain nombre de lésions apparentes des organes chez les animaux. Ces observations sont rapportées dans le tableau n°15. Les altérations constatées ne sont pas anormales pour des rats âgés de 20 mois. Le poids des reins chez les animaux contaminés était de $5,0 \pm 0,6g$ contre $5,7 \pm 1,6g$ chez les témoins.

Tableau n°14. Observations des rats morts prématurément ou euthanasiés par anticipation.

Observations qualitatives	
1 rat témoin	Moribond, tuméfaction sous-cutanée avec perte de sang, perte de poids et fatigue générale.
autopsie	Rien à signaler hormis la tumeur sous-cutanée.
1 rat témoin	Moribond, perte de poids très importante et fatigue générale.
autopsie	Foie de couleur anormale (alternance de tChEs sombres et claires).
1 rat témoin	Moribond, perte de poids très importante et fatigue générale.
autopsie	Absence totale de graisse dans la cavité abdominale, reins et foie nécrosés, reins volumineux, coloration inégale des poumons, estomac atrophié.
1 rat témoin	Décès constaté.
autopsie	Non pratiquée
1 rat UE	Moribond, perte de poids et fatigue générale apparente. Absence de réflexe aux stimuli externes.
autopsie	TChEs blanches sur le poumon droit, rein d'aspect granuleux et avec tChEs blanches.

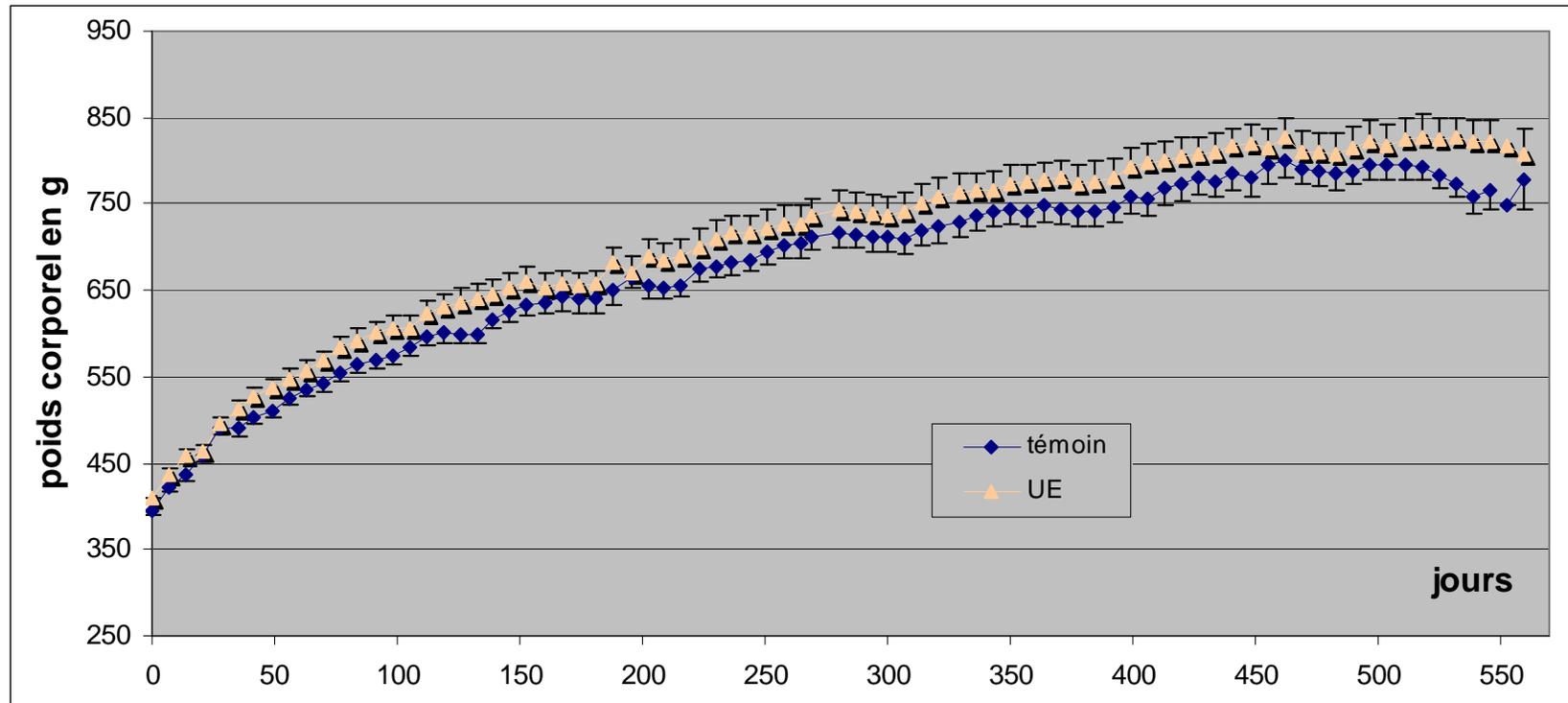


Figure n°49. Evolution pondérale des animaux au cours d'une contamination chronique à l'uranium enrichi de 18 mois à 40mg.L⁻¹.

Valeurs : moyenne ± erreur standard. * différence significative par rapport aux témoins p < 0,05.

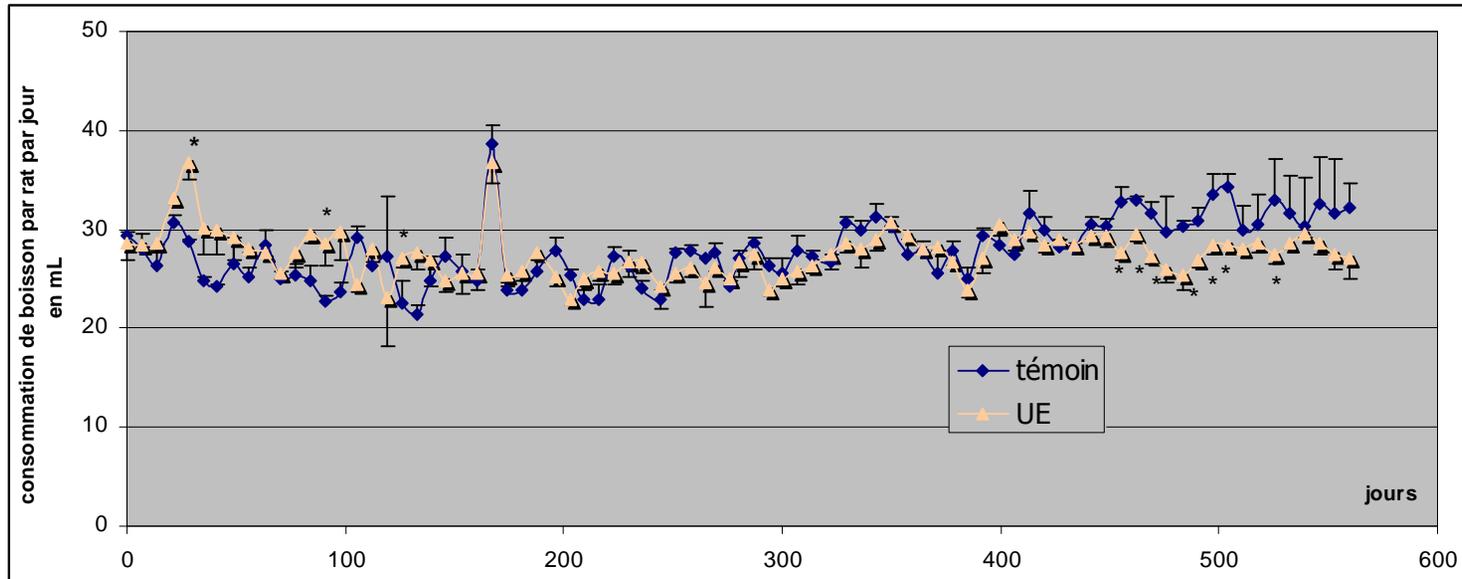


Figure n°50. Evolution de la consommation de boisson des animaux au cours d'une contamination chronique à l'uranium enrichi de 18 mois à 40mg.L⁻¹.

Valeurs : moyenne ± erreur standard. * différence significative par rapport aux témoins p < 0,05.

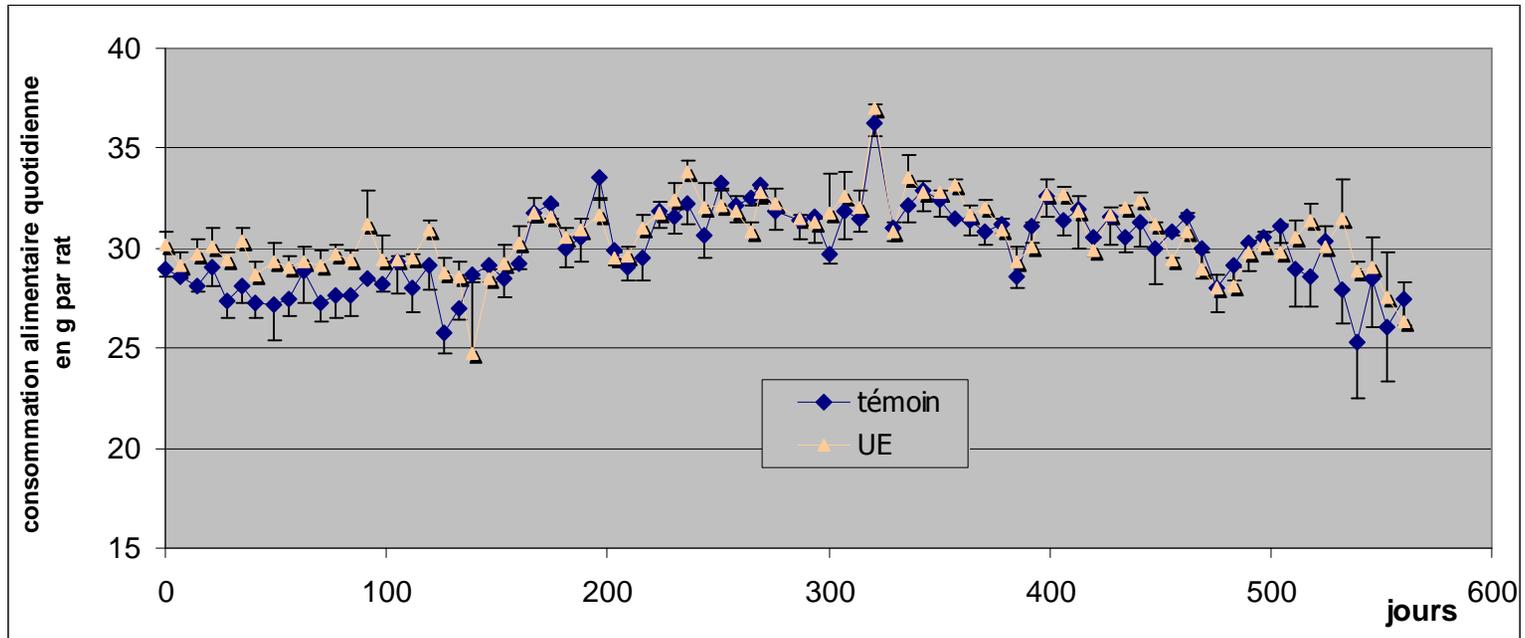


Figure n°51. Evolution de la consommation quotidienne alimentaire des animaux au cours d'une contamination chronique à l'uranium enrichi de 18 mois à 40mg.L⁻¹.

Valeurs : moyenne ± erreur standard.

Tableau n°15. Observations des rats euthanasiés le jour de l'expérimentation.

	Observations qualitatives
Ensemble des rats	L'aspect des reins n'était pas significativement différent entre les animaux témoins et les animaux contaminés
1 rat témoin	Foie nécrosé par endroit
1 rat témoin	1 rein très volumineux
1 rat UE	Cœur très volumineux
1 rat UE	Poumons très volumineux + reins, foie, rate d'aspect anormal
2 rats UE	Coloration inégale des poumons
2 rats UE	Cœur d'aspect granuleux
4 rats UE	Coloration inégale du foie

Les résultats du suivi hebdomadaire des animaux sont présentés dans la figure n°49 à 51. L'analyse statistique montre une différence indicative de poids entre les animaux TE et les animaux UE en fin d'expérimentation. Les animaux UE conservent une consommation d'aliments et de boisson conforme aux données de références pour des animaux du même âge et leur poids se maintient. A l'inverse, les animaux témoins montrent une perte de poids qui s'accompagne d'une augmentation de la consommation d'eau et une baisse de la prise alimentaire. Les animaux témoins s'écartent des données de constantes biologiques pour une population de référence du même âge.

De façon surprenante, l'ensemble des observations semble indiquer une perte des constantes physiologiques plus importantes chez les animaux témoins que les animaux contaminés.

III.2.4.3. Dosage des monoamines :

Les résultats de dosage par HPLC-ECD des monoamines et de leurs métabolites dans cinq structures cérébrales (HI, ST, CO, CE et HY), après une ingestion chronique pendant 18 mois d'uranium enrichi à 40mg.L⁻¹ sont présentés dans la figure n°52. Les turnover des deux monoamines sont présentés figure n°53.

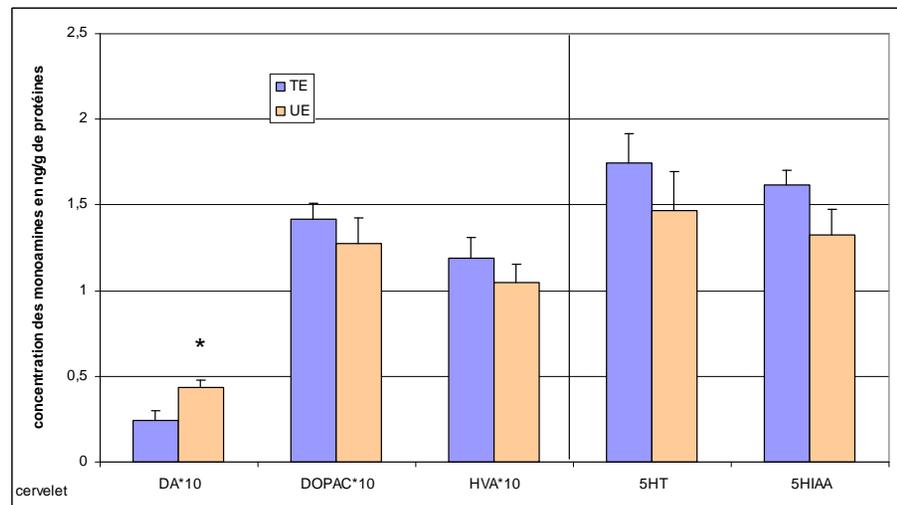
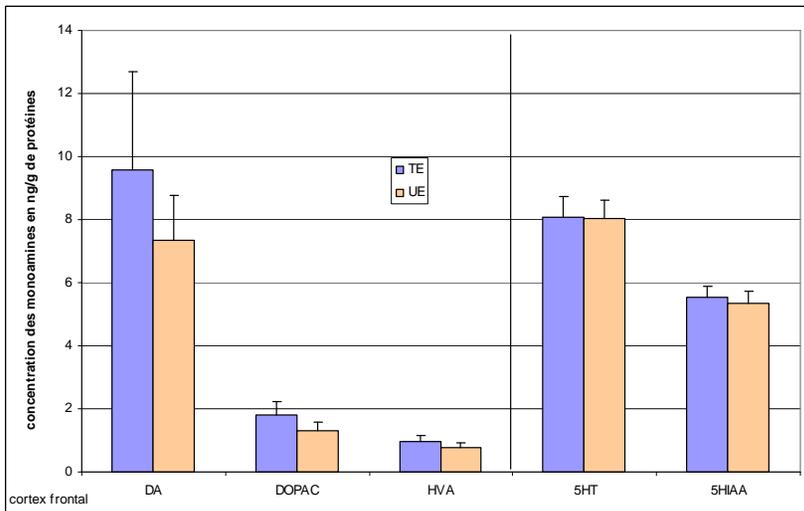
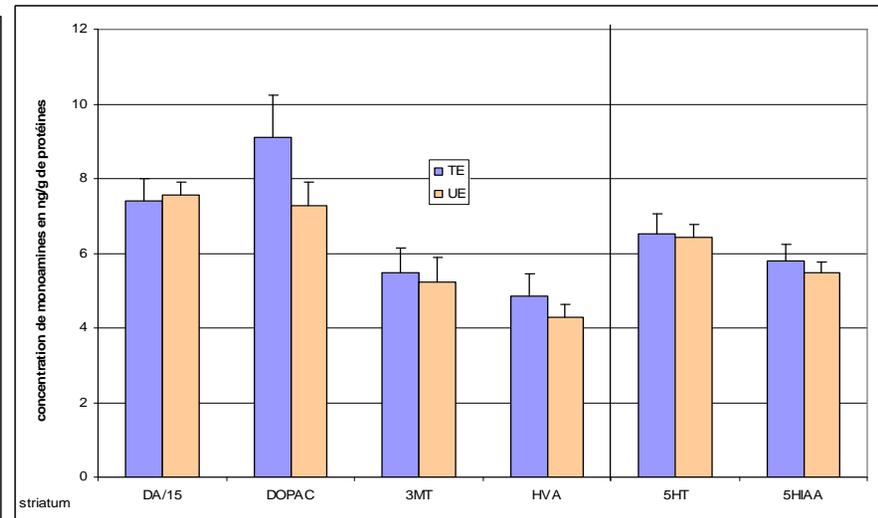
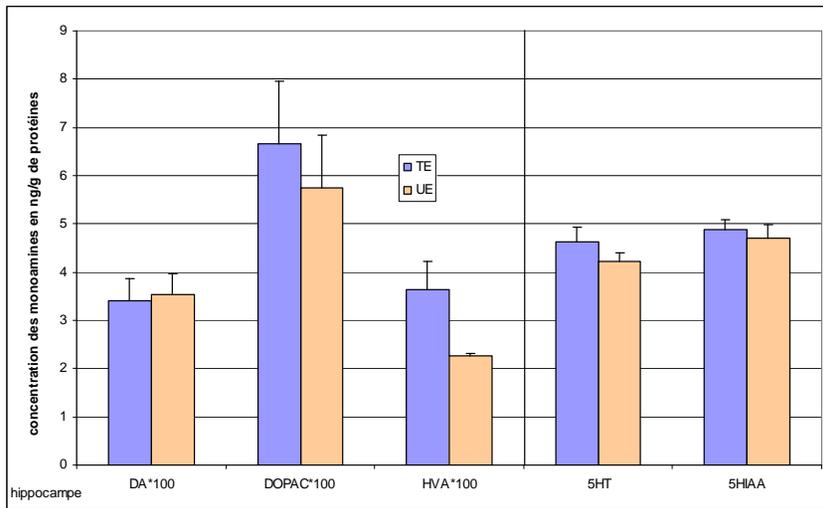
Dans le cervelet, l'analyse statistique des données montre une hausse significative de dopamine chez les animaux contaminés (+81%, $p=0,01$) accompagnée d'une baisse de DOPAC (-10%) et de HVA (-11%). Ces variations se traduisent par une baisse significative du turnover DAergique (-61%, $p=0,006$) et pourraient être la conséquence d'une baisse du catabolisme DAergique. Pour le système sérotoninergique, les résultats indiquent à la fois une baisse non significative de 5HT (-16%) et de 5HIAA (-18%), ce qui pourrait être la manifestation d'une baisse de l'anabolisme de la sérotonine. Des résultats comparables sont observables dans l'hippocampe (augmentation de la dopamine, baisse du DOPAC, HVA et du turnover DA + baisse de 5HT et

5HIAA), mais ces variations sont non significatives ($p>0,05$). Par ailleurs, dans ces deux structures, les résultats montrent que les taux de métabolites DAergiques deviennent supérieurs au taux de dopamine.

Dans l'hypothalamus, une baisse indicative de la dopamine (-28%, $p=0,05$) accompagnée d'une baisse significative de DOPAC (-40%, $p=0,02$) et de HVA (-34%, $p=0,03$) a été observée. Ces variations pourraient être la manifestation d'une baisse de l'anabolisme de la dopamine après contamination à l'UE. Dans cette même structure, les résultats montrent aussi une hausse de 5HT (+5%) et une baisse de 5HIAA (-14%) qui se traduisent par une baisse du turnover (-18%). Toutefois, là encore, ces modifications ne sont pas statistiquement significatives ($p>0,05$).

Pour les autres structures, bien que non significatives, des tendances peuvent être signalées : une hausse du catabolisme DAergique dans le striatum et une baisse de l'anabolisme DAergique dans le cortex frontal.

Les taux de protéines des structures cérébrales dans lesquelles les monoamines ont été mesurées sont présentés dans le tableau A-5 de l'annexe 5. L'augmentation indicative du poids de l'hypothalamus pourrait avoir une incidence sur les résultats de dosages des monoamines dans cette structure.



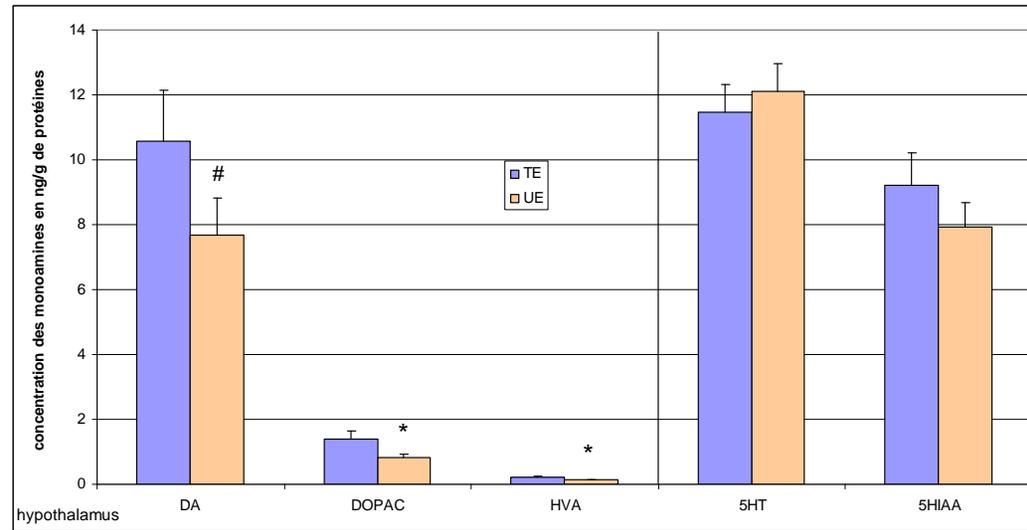
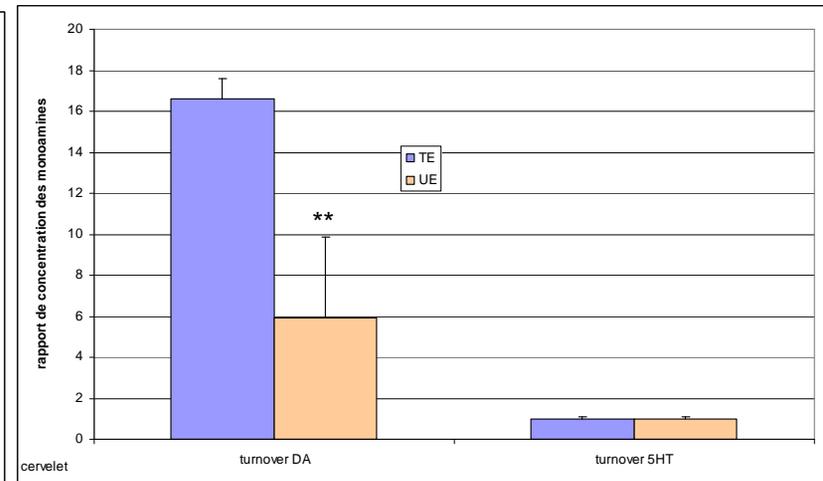
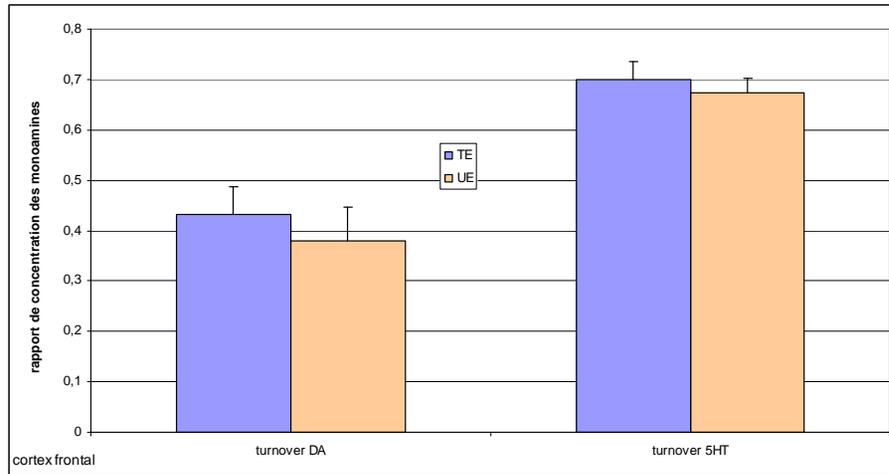
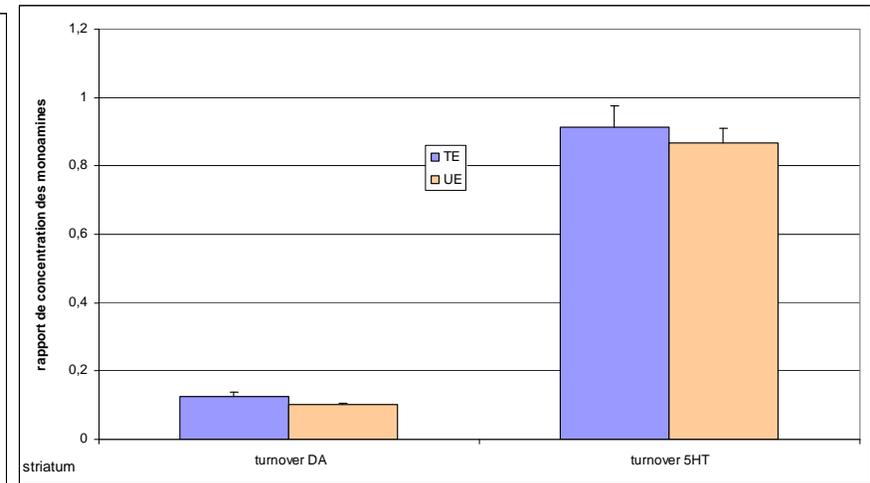
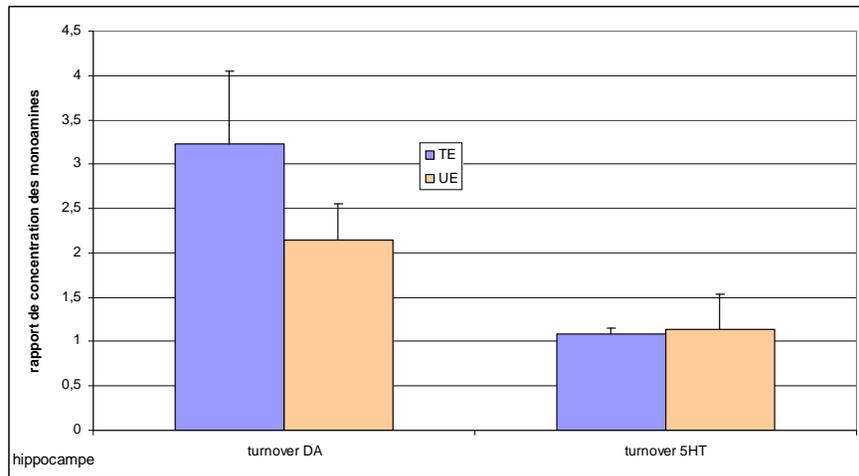


Figure n°52. Taux de monoamines en ng.mg⁻¹ dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique de 18 mois à l'uranium enrichi à 40mg.L⁻¹ (cf. annexe 5, taux de protéines A-5).

Métabolisme dopaminergique : dopamine (DA), acide 3,4-dihydroxyphényl acétique (DOPAC), 3-méthoxydopamine (3MT) et acide homovanillique (HVA). Métabolisme sérotoninergique : sérotonine (5HT), acide 5-hydroxyindolacétique (5HIAA). # différence indicative par rapport aux témoins $p < 0,1$; * différence significative par rapport aux témoins $p < 0,05$. $n=8$ pour TE (témoins) et $n=10$ UE (uranium enrichi). Valeurs : moyenne \pm erreur standard.



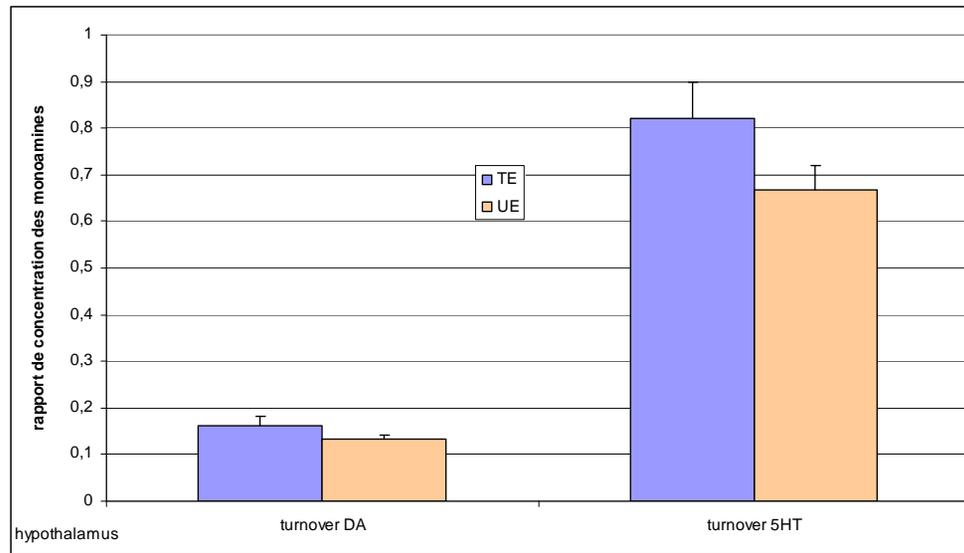


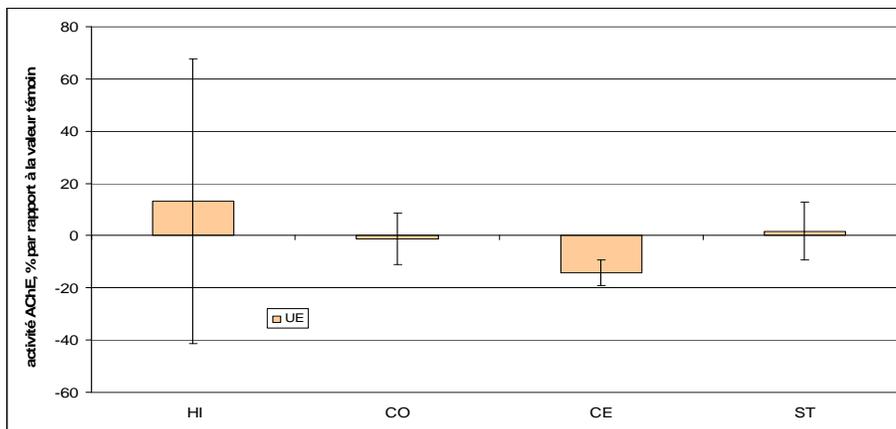
Figure n°53. Turnover des monoamines dans différentes structures cérébrales, après une contamination chronique de 18 mois à l'uranium enrichi à 40mg.L⁻¹.

Rapport des concentrations de métabolites sur la concentration de neurotransmetteurs, dopamine (DA) et sérotonine (5HT) : (DOPAC+HVA)/DA [ou DOPAC/DA lorsque HVA non détectable par le système électrochimique] et 5HIAA /5HT. ** différence très significative par rapport aux témoins $p < 0,01$. $n=8$ pour TE (témoins) et $n=10$ UE (uranium enrichi). Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

III.2.4.4. Mesure de l'activité acétylcholinestérase :

Les effets d'une contamination chronique de 18 mois à l'uranium enrichi sur l'activité de l'ChE, mesurée par spectrophotométrie selon la méthode d'Ellman, sont présentés dans la figure n°54. Il n'existe pas de différence significative entre les rats témoins et les rats contaminés ($p > 0.05$).

Figure n°54. Activité de l'acétylcholinestérase dans différentes structures cérébrales après une contamination chronique de 18 mois à l'uranium enrichi à 40mg.L^{-1} (cf. annexe 5, taux de protéines B-5)



HI : hippocampe gauche, ST : striatum gauche, CO : cortex frontal gauche, CE : cervelet gauche. $n=7$ pour TE (témoins), $n=08$ pour UE (uranium enrichi). % = $((\text{moyenne traité} / \text{moyenne témoin}) - 1) \times 100$. Valeur d'activité ChE exprimée en $\mu\text{-moles de substrat hydrolysé par min par mg de protéines totales } (\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1})$. Valeurs : moyenne \pm erreur standard.

III.2.5. RESUME EN TABLEAU :

Tableau n°16. Synthèse des effets sur le système dop aminergique

Temps de contamination	Uranium Appauvri	Uranium Enrichi
1,5 mois	↑ DA dans l'hypothalamus	RAS
6 mois	↑ DA, DOPAC et HVA (non significatif) avec ↓ du turnover dans le cortex frontal	
9 mois	↓ DOPAC dans le striatum et ↓ turnover (non significatif) dans le cortex frontal	↓ DA dans l'hypothalamus (non significatif)
18 mois		↑ DA et ↓ du turnover dans le cervelet et ↓ DA (ns), DOPAC et HVA dans hypothalamus

Tableau n°17. Synthèse des effets sur le système sér otoninergique

Temps de contamination	Uranium Appauvri	Uranium Enrichi
1,5 mois	RAS	RAS
6 mois	RAS	
9 mois	↓ 5HIAA et turnover dans le cortex frontal	↓ turnover dans le cortex frontal (non significatif)
18 mois		RAS

Tableau n°18. Synthèse des effets sur le système cho linergique

Temps de contamination	Uranium Appauvri	Uranium Enrichi
1,5 mois	RAS	↑ de l'act. ChE dans l'hippocampe et ↓ de l'act. ChE dans le striatum
6 mois	↓ de l'act. ChE dans le cervelet	
9 mois	RAS	↓ de l'act. ChE dans l'hippocampe (non significatif)
18 mois		RAS

Tableau n°19. Localisation de l'accumulation cérébrale d'uranium

Temps de contamination	Uranium Appauvri	Uranium Enrichi
1,5 mois	striatum (hypothalamus et cervelet)	hippocampe, hypothalamus, striatum et (cervelet)
6 mois		hypothalamus
9 mois	striatum, hippocampe, cortex, tronc cérébral, processus olfactif, (hypothalamus et cervelet)	hippocampe, (hypothalamus)

III – Partie 3. Synthèse des Résultats

Une injection intra-péritonéale d'uranium appauvri à $70\mu\text{g.kg}^{-1}$ a un impact limité sur les turnovers des systèmes dopaminergique et sérotoninergique de l'hippocampe et de l'hypothalamus. Dans le même temps, il n'y a pas d'accumulation d'uranium dans l'hippocampe, le striatum, le cortex frontal et le cervelet des animaux contaminés.

L'ingestion chronique d'uranium (appauvri ou enrichi) à 40mg.L^{-1} pendant 1,5 à 18 mois n'a qu'un effet biologique modéré sur le taux de monoamines et l'activité acétylcholinestérase de différentes structures cérébrales. Après contamination chronique à l'uranium enrichi, l'hippocampe et l'hypothalamus sont les structures cérébrales qui accumulent préférentiellement l'uranium alors que le striatum et l'hypothalamus sont les structures caractéristiques de l'accumulation d'uranium après contamination chronique à l'uranium appauvri. La subtilité de l'effet de l'uranium sur le fonctionnement du cerveau de rat se caractérise par :

- un faible niveau de perturbation du niveau basal des paramètres physiologiques étudiés,
- des effets sur différents systèmes de neurotransmission : dopaminergique, sérotoninergique, cholinergique,
- des effets sur différentes structures cérébrales : l'ensemble des structures cérébrales (hypothalamus, striatum, hippocampe, cortex frontal, cervelet) a été affecté à une période donnée,
- des effets différents selon la structure : évolution dans le temps et dans son expression,
- des effets différents selon la composition isotopique de l'uranium utilisé,
- une accentuation de l'effet global avec le temps : plus de zones ou de paramètres concernés,
- des effets non constants : déplacement et évolution des effets avec la durée de contamination,
- une accumulation cérébrale à l'état de trace : se mesure en $\text{ppb} = \text{ng.g}^{-1}$,
- et une accumulation cérébrale hétérogène : évolution dans le temps et dans sa distribution spatiale.

Le bilan de ces résultats suggère que l'uranium après contamination chronique à 40mg.L^{-1} a un effet multiforme et discret sur les différents paramètres étudiés. Ces effets hétérogènes suggèrent aussi une action multiple de l'uranium sur le cerveau par différentes voies qui restent à découvrir.

Chapitre IV

- DISCUSSION -

« Il ne suffit pas de dire : je me suis trompé ; il faut dire comment on s'est trompé »
Claude Bernard, *physiologiste français*.

Chapitre IV - DISCUSSION :

Dans la littérature, bien que l'ingestion chronique de faibles quantités constituent le principal mode d'exposition du grand public aux radionucléides et en particulier à l'uranium, peu d'études font état des effets sanitaires de cette exposition naturelle à l'uranium de l'environnement (Limson Zamora *et al.*, 1998). En outre, il a démontré que l'uranium peut pénétrer dans le cerveau après des expositions chroniques (Gilman *et al.*, 1998; Pellmar *et al.*, 1998) et y induire des troubles neurobiologiques (Pellmar *et al.*, 1999 a; Abou-Donia *et al.*, 2002). Dans notre travail, les effets sur le cerveau d'une ingestion chronique d'uranium ont donc été étudiés afin d'évaluer la neurotoxicité de l'uranium dans des conditions les plus proches possibles de l'exposition environnementale.

La nature physico-chimique de l'uranium ainsi que l'intensité (quantité d'uranium) et la durée de l'exposition déterminent les effets ainsi que leur intensité et leurs conséquences à long terme (ATSDR, 1999). Les expositions chroniques ont donc été envisagées sur la totalité de la vie du Rat avec une concentration unique de 40mg d'uranium par litre (40ppm). La teneur en uranium utilisée a été calculée pour rester en dessous du seuil de néphrotoxicité de l'uranium pour ce modèle animal même si le rat était contaminé pendant deux ans (seuil chez le Rat :1,2 µg d'uranium/g de rein, (Diamond *et al.*, 1989).

Par ailleurs, l'uranium étant à la fois un toxique chimique et radiologique (Limson Zamora *et al.*, 1998; ATSDR, 1999), nous avons réalisé en parallèle des contaminations avec de l'uranium appauvri et de l'uranium enrichi afin d'évaluer la part de chacune de ces toxicités dans l'éventuelle neurotoxicité globale de l'uranium lors d'exposition chronique.

IV.1. Caractérisation de l'effet de l'uranium sur le cerveau :

Les métaux représentent une catégorie particulière de molécule chimique. Certains sont des xénobiotiques toxiques pour les organismes vivants alors que d'autres sont essentiels pour les fonctions biologiques et ne deviennent toxiques qu'après dépassement d'un seuil ou biotransformation. De plus, certains métaux reconnus comme neurotoxiques (plomb, mercure,

manganèse, cuivre, aluminium) sont aujourd'hui mis en cause dans l'émergence de maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer, sclérose en plaques) (Carpenter, 2001).

Les effets sur la neurotransmission d'une ingestion chronique d'uranium seront donc rapprochés de ceux constatés après exposition à ces métaux afin de mieux évaluer les effets de l'uranium. Les caractéristiques de trois de ces métaux, manganèse, plomb et mercure sont synthétisées dans les tableaux n°20-22.

IV.1.1. Contamination aiguë

Six heures après une contamination aiguë à l'uranium appauvri à la concentration de $70\mu\text{g.kg}^{-1}$ en i.p., les résultats indiquent une absence de variations des taux de monoamines cérébrales dans l'hippocampe, le striatum, l'hypothalamus, le cortex frontal et le cervelet. Les seules différences constatées entre le lot contaminé et le lot témoin concernent le turnover des systèmes dopaminergique et sérotoninergique de l'hippocampe et de l'hypothalamus ; ce qui démontre le faible niveau de perturbation de l'uranium appauvri sur ces paramètres après une contamination aiguë relativement faible ($70\mu\text{g.kg}^{-1}$ en i.p.). Ce résultat suggère également qu'une contamination chronique, même à faible niveau d'exposition, pourrait aussi avoir une incidence sur ces mêmes paramètres.

En outre, la comparaison des études de toxicité aiguë et chronique des métaux a depuis longtemps démontré que les deux types d'exposition ne mettaient pas en jeu les mêmes mécanismes biologiques et que les effets constatés après des expositions aiguës ne rendent pas compte des phénomènes observables après une exposition prolongée, notamment à long terme (*p. ex.* cadmium (Hrdina *et al.*, 1976; Singhal *et al.*, 1976). Des études de biocinétiques d'accumulation d'uranium ont démontré que les expositions chroniques ne pouvaient être extrapolés à partir d'expositions aiguës (Paquet *et al.*, 2005).

Huit heures après une contamination aiguë à l'uranium appauvri $1000\mu\text{g.kg}^{-1}$, en i.p. chez des rats Sprague-Dawley, Barber *et al.* ont montré que l'uranium avait une distribution hétérogène dans le striatum, l'hippocampe, le cervelet et le cortex et que les concentrations retrouvées chez les animaux contaminés étaient significativement différentes de celles des témoins (Barber *et al.*, 2005). Dans notre cas, six heures après une contamination aiguë à l'uranium appauvri $70\mu\text{g.kg}^{-1}$, en i.p. chez des rats Sprague-Dawley, les résultats ne montrent pas de différence entre la série d'animaux contaminés et la série témoin. Ceci peut s'expliquer par la faible quantité d'uranium que nous avons utilisée.

Les études menées par Durbin *et al.* montrent que l'uranium se distribue dans l'ensemble de l'organisme dans l'heure qui suit l'injection, l'effet temps (6h au lieu de 8h) devrait donc peu influencer la différence de résultat (Durbin and Wrenn, 1976). Mais, l'ordre de grandeur entre les deux niveaux de contamination ($1000\mu\text{g.kg}^{-1}$ versus $70\mu\text{g.kg}^{-1}$ soit un facteur de 14) explique probablement la différence de résultats. En effet, si l'on considère que quelle que soit la quantité d'uranium injectée, les proportions par rapport à la valeur injectée retrouvées dans le cerveau restent les mêmes, la concentration d'uranium retrouvée dans le cerveau après une exposition à $70\mu\text{g.kg}^{-1}$ devrait être 14 fois inférieure à celle de Barber *et al.* (Barber *et al.*, 2005). En partant des résultats obtenus dans

l'étude de Barber *et al.* à 8h pour l'hippocampe des animaux contaminés ($10,7 \text{ ng.g}^{-1}$), les concentrations retrouvées dans notre étude devraient donc être inférieures à 1 ng.g^{-1} ($10,7 / 14 = 0,76 \text{ ng.g}^{-1}$), c-à-d. approchées la concentration d'uranium naturel endogène qui a été retrouvée dans l'hippocampe des animaux témoins de l'étude de Barber *et al.* (2 ng.g^{-1}). Le même calcul appliqué au striatum des rats contaminés de l'étude de Barber *et al.* donne un résultat équivalent ($18,7 / 14 = 1,34 \text{ ng.g}^{-1}$ soit quasiment la valeur des témoins de cette étude : $1,4 \text{ ng.g}^{-1}$). Une simple relation linéaire sans seuil pourrait donc expliquer l'absence de différence entre les concentrations obtenues chez les contaminés par rapport aux témoins, après injection de $70 \mu\text{g.kg}^{-1}$ d'uranium appauvri. Toutefois, dans l'hypothèse développée ci-dessus, les propriétés protectrices de la barrière hématoencéphalique sont négligées.

IV.1.2. Contaminations Chroniques

IV.1.2.1. Caractères spécifiques des effets de l'uranium

IV.1.2.1.1. Effets de la contamination chronique sur le poids des animaux :

Après 6 et 9 mois de contamination à l'UA, les résultats de suivi des animaux indiquent un poids corporel moyen plus faible chez les animaux contaminés que chez les témoins. Nous avons déjà rapporté dans la partie consacrée aux résultats que les variations constatées par rapport aux animaux témoins n'étaient présentes que pour le pool d'animaux choisis de façon aléatoire (randomisation) dans un groupe important d'animaux. Ces variations n'ont pas été observées pour d'autres groupes d'animaux, pourtant contaminés dans les mêmes conditions (même animalerie, même pièce, même situation spatiale, même niveau sonore) (Paquet *et al.*, 2005).

En terme statistique et pour rendre compte de l'effet réel de l'uranium appauvri sur le poids corporel, il conviendrait donc soit de ne pas prendre en compte les résultats correspondants aux seuls animaux utilisés pour nos expérimentations (n), soit de faire référence à l'ensemble des animaux placés dans les mêmes conditions (n plus important) qui est par définition plus représentatif de l'effet de l'uranium sur la population globale (N). Néanmoins, les métaux sont connus pour agir sur le poids corporel des animaux, même lorsque les niveaux d'intoxication restent faibles (*p. ex.* manganèse (Hong *et al.*, 1984) et plomb (Shailesh Kumar and Desiraju, 1990)).

Par ailleurs, quelle que soit la durée de la contamination, l'UE n'a pas d'effets majeurs sur les paramètres généraux de santé des animaux (poids, prise alimentaire et de boisson).

IV.1.2.1.2. Effets chronique et progressif de l'UA sur les monoamines :

Les résultats de dosages des monoamines démontrent qu'après une contamination chronique par ingestion d'uranium appauvri, la modification des taux de monoamines est chronique (présente à 1,5 - 6 et 9 mois) et progressive. En effet, avec l'allongement de la période de contamination, un plus grand nombre de structures et un plus grand nombre de composés par structure sont concernés par ces modifications (à 1,5 mois : taux de dopamine dans l'hypothalamus ; à 6 mois : taux de composés

dopaminergiques et turnover dans le cortex frontal ; et à 9 mois : taux de métabolites dopaminergiques dans le striatum + métabolite sérotoninergique et turnover dans le cortex frontal). De plus, les deux systèmes monoaminergiques ne sont atteints qu'après 9 mois. Cette progression discrète d'effets biologiques a déjà été observée pour d'autres effets de l'uranium sur le SNC (comportement locomoteur et peroxydation lipidique (Briner, 2002; Briner and Murray, 2005)) ou avec d'autres métaux lourds (Gwiazda *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2004).

Lors d'études d'intoxication chronique à l'uranium, plusieurs auteurs ont suggéré que l'accentuation discrète des effets au cours du temps (plusieurs mois) était liée à la chronicité de l'intoxication (Pellmar *et al.*, 1999 b; Miller *et al.*, 2002; Briner and Murray, 2005). La sollicitation permanente de l'organisme par l'uranium conduirait à son affaiblissement par une baisse progressive de ses moyens de lutte contre la toxicité.

Une hypothèse alternative serait que l'âge soit responsable de l'apparition des effets biologiques. Avec l'âge, de nombreux changements biochimiques, structuraux, métaboliques et fonctionnels surviennent, notamment une baisse du taux des neurotransmetteurs (Gottfried, 1990). Nos résultats ont montré, entre autres dans le cervelet et l'hippocampe (augmentation des taux de métabolites dopaminergiques et baisse du taux de dopamine, cf. paragraphe III.2.3.A-2 et B-2), que cet effet naturel de l'âge était présent et perceptible chez les témoins. La physiologie du rat s'affaiblissant, elle pourrait jouer un rôle de révélateur des effets de l'uranium. En effet, le processus physiologique de vieillissement entraîne avec lui l'ensemble des systèmes de défense et peut-être ceux de défense contre l'uranium.

Cette hypothèse irait à l'encontre de celle évoquée par Pellmar *et al.* qui suggéraient au contraire que l'âge agirait comme un « masque » pour l'observation des effets à long terme (Pellmar *et al.*, 1999 a). Dans cette étude, les effets de l'uranium appauvri sur l'électrophysiologie de l'hippocampe avaient tendance à disparaître au bout de 18 mois d'exposition (= implantation de fragments). Cet effet « masque » peut s'expliquer par les limites de sensibilité des techniques (perte de la possibilité de discrimination entre témoins et contaminés) ou par l'augmentation de la variabilité interindividuelle avec l'âge (cf. perte d'homogénéité des lots, que nous avons constatée sur le lot « témoin » à 18 mois, cf. paragraphe III.2.4.1.).

Afin de tester les deux hypothèses évoquées ci-dessus, il conviendrait de réaliser une série d'expérimentations en uranium appauvri reprenant différents temps d'exposition avec des rats plus âgés (1 ou 2 mois de plus au début de la contamination). Si les effets s'aggravaient avec le temps de façon similaire (lente progression), la chronicité serait l'hypothèse validée. Dans le cas où les effets surviendraient précocement et progresseraient encore après 9 mois, c'est l'âge qui serait le facteur clef.

IV.1.2.1.3. Effets à long terme de l'UE sur les monoamines : comparaison avec l'UA

De façon surprenante au regard des résultats obtenus après contamination à l'UA, les résultats UE ne montrent un effet significatif sur les monoamines qu'après 18 mois de contamination chronique. En effet, à 1,5 mois, ils sont totalement absents et à 9 mois, ils ne concernent que le turnover sérotoninergique du cortex frontal et les taux de dopamine et de sérotonine de

l'hypothalamus (variation non significative $p>0,05$). Les effets de l'UE sur les monoamines seraient donc également progressifs mais avec un déclenchement plus tardif que les effets de l'UA.

Or, les deux compositions isotopiques d'uranium ont des propriétés physiques et chimiques (pH de l'eau et espèces ioniques aqueuses) identiques. A notre connaissance, il n'y a qu'une différence d'activité radiologique qui différencie les deux solutions de contamination. Pour tenter d'expliquer au niveau biologique cette différence d'effet entre les deux types de contaminations, une hypothèse serait qu'un mécanisme de compensation soit mis en place après contamination à l'UE et ne le soit pas après contamination à l'UA.

A priori, la contamination à l'UE est supposée plus agressive car elle représente une toxicité radiologique potentielle plus importante (chimique et radiologique). Il est possible que ces propriétés permettent à l'organisme de reconnaître l'UE comme un composé exogène alors que l'organisme ne réagit pas avec l'UA dont les propriétés radiologiques sont très proches de celles de l'uranium naturel constitutif de tout organisme. Dans cette hypothèse, au niveau cérébral, l'UA exogène (apporté par l'eau de boisson) serait considéré de la même manière que l'uranium naturel endogène et pourrait donc agir sans contrainte sur la neurotransmission.

Les modifications relevées après 18 mois de contamination à l'UE seraient la manifestation d'une perte ou d'une altération de ce mécanisme de compensation. Comme dans le cas de contamination à l'UA, cette perte pourrait être due à la chronicité de la contamination ou à l'âge des animaux. Néanmoins, cette comparaison d'effets UA/UE reste à ce jour trop peu étudiée pour pouvoir comparer avec précision les résultats et tenter d'expliquer les phénomènes qui en sont la cause.

IV.1.2.1.4. Effets précoces de l'uranium sur l'activité ChE :

Aussi bien après contamination à l'UA qu'à l'UE, les résultats ne montrent aucune variation significative de l'activité enzymatique ChE au delà de 6 mois de contamination chronique (*c-à-d.* 9 et 18 mois). Les baisses de l'activité enzymatique de l'ChE, observé dans le striatum après 1,5mois de contamination à l'UE et dans le cervelet après 6mois de contamination chronique à l'UA, suggèrent un effet précoce de l'uranium sur l'activité ChE. Ces résultats sont conformes aux études antérieures réalisées sur l'activité de cette enzyme au niveau de la fraction plasmatique ou de la jonction neuromusculaire. En effet, après exposition à l'uranium, Bastide *et al.* ont rapporté des baisses d'activité pour des enzymes clefs du métabolisme des neurotransmetteurs monoaminergiques (5HTdécarboxylase et monoamine oxydase) mais aussi de la neurotransmission cholinergique (cholinestérase), mesurées dans les reins après des contaminations au nitrate d'uranyle à 2g/L/100g de poids (Bastide *et al.*, 1967; Bastide and Bastide, 1968). Pourtant, lors d'une étude de contamination chronique à l'uranium pendant 7mois (1mg.kg^{-1} *per os*), il a été démontré que le nitrate d'uranyle n'avait pas d'effet sur l'activité ChE de la jonction neuromusculaire du muscle diaphragmatique chez le rat, ni sur l'activité ChE de la corne antérieure de la moelle épinière (Angelova and Manolov, 1966; Galabov *et al.*, 1966). Mais à l'inverse, ces mêmes études ont rapporté une baisse de l'activité ChE dans les mêmes structures à la concentration de 6mg.kg^{-1} *per os* (Angelova and Manolov, 1966; Galabov *et*

al., 1966). De plus, après contamination avec du plomb et du cadmium, il a également été rapporté une baisse de l'activité de l'ChE (Antonio *et al.*, 2003).

L'augmentation de l'activité ChE, observée dans l'hippocampe après 1,5mois de contamination UE, trouve également un équivalent dans la littérature. En effet, Abou-Donia *et al.* ont rapporté une augmentation de l'activité ChE dans le cortex d'animaux contaminés en i.p. à l'uranium naturel pendant 7 jours à la concentration de 1mg.kg^{-1} (Abou-Donia *et al.*, 2002).

IV.1.2.1.5. Distribution d'uranium dans le cerveau :

La distribution cérébrale des métaux divalents essentiels (p.ex. zinc, manganèse, fer, cuivre, ...) est un paramètre spécifique à chaque région cérébrale qui évolue avec l'âge (Tarohda *et al.*, 2004). En particulier, les taux de manganèse, fer et zinc augmentent dans la substance noire (lieu d'origine du faisceau dopaminergique A9) (Tarohda *et al.*, 2004). De même, les métaux exogènes ont une distribution hétérogène lorsqu'ils pénètrent le cerveau (Subhash and Padmashree, 1990; Moller-Madsen, 1994) et peuvent interférer avec les ions métalliques fondamentaux (p.ex. fer)(Aschner, 2000; Roth and Garrick, 2003).

Dans notre cas, les résultats montrent que l'uranium a également une distribution cérébrale hétérogène qui évolue au cours de la contamination. L'hypothalamus, le striatum et l'hippocampe sont les structures qui concentrent le plus l'uranium alors que le cortex est la structure qui concentre le moins l'uranium. Cette distribution est assez similaire à celle des autres métaux neurotoxiques. L'hypothalamus, le cortex et le striatum sont les structures qui accumulent le manganèse après contamination chronique (Moller-Madsen, 1994). L'hypothalamus est également la structure d'accumulation préférentielle du plomb après contamination aiguë (Lever and Scheffel, 1998). Toujours après contamination aiguë, la concentration la plus élevée de thallium se trouve dans l'hypothalamus et la concentration la plus faible est dans le cortex (Rios *et al.*, 1989). Pour le mercure, la distribution est la suivante : cortex>striatum>hippocampe>tronc cérébral>cervelet (Subhash and Padmashree, 1990).

IV.1.2.1.6. Accumulation et élimination de l'uranium : un cycle dynamique

Pendant la période de contamination, l'animal exposé accumule l'uranium mais élimine également cet élément au fur et à mesure que la contamination se poursuit (Paquet *et al.*, 2005). D'après les études aiguës de Karpas *et al.*, il semble que l'uranium excrété par voie urinaire, au moins juste après le début de l'intoxication, ne soit pas exclusivement de l'uranium issu de la contamination mais provienne aussi de l'uranium naturel présent dans l'organisme (Karpas *et al.*, 1998). Les auteurs évoquent un phénomène de vase communicant entre les compartiments de stockage de l'uranium et le compartiment libre, c-à-d. l'uranium circulant. En fait, l'uranium exogène de contamination prendrait la place de l'uranium naturel endogène. De même, lorsque la contamination cesse, il a aussi été constaté que l'uranium naturel reprenait place dans l'organisme au détriment de l'uranium de contamination qui s'élimine peu à peu dans les urines (Karpas *et al.*, 1998). Il y aurait

donc un processus dynamique de renouvellement du « stock » ou de cycle de l'uranium au sein de l'organisme, perceptible dans ce type d'études grâce au changement de l'isotopie de l'uranium apporté en excédent à l'organisme. Les auteurs évoquent l'hypothèse d'un rôle physiologique de l'uranium comme oligo-élément métallique (Karpas *et al.*, 1998).

Le processus dynamique de la biocinétique de l'uranium est probablement un processus évolutif influencé par la durée de la contamination et l'âge de l'animal. Il pourrait expliquer les évolutions de la distribution de l'uranium constatées au niveau du cerveau au cours des différentes périodes de contamination : par exemple, l'absence d'accumulation significative d'uranium dans l'hippocampe après 6 mois de contamination à l'UE, alors que cette accumulation est présente dans l'hippocampe après 1,5 mois et 9 mois de contamination à l'UE ; ou encore, la différence entre les niveaux d'accumulation de l'uranium entre les temps 1,5 mois (34ng.g^{-1}) et 9 mois (8ng.g^{-1}) dans l'hippocampe après contamination à l'UE. Ce processus expliquerait également les variations du taux d'accumulation d'uranium dans les tissus cibles (reins et os) que nous avons relevées entre les différents temps (1,5m, 6m et 9m pour l'UA ; 1,5m et 9m pour l'UE) et qui ont été rapportées dans une étude connexe de biocinétique d'accumulation (Paquet *et al.*, 2005).

IV.1.2.1.7. Dosage d'uranium dans le cerveau : problème de discrimination entre les lots

Pour certaines structures, les résultats de dosages d'uranium cérébral ont montré une baisse significative du taux d'uranium chez les animaux contaminés par rapport aux animaux témoins (pour rappel, dans le tronc cérébral après 1,5 mois (UA et UE) ou dans l'hippocampe après 6 mois (UE)). Au plan technique, les limites de détection de l'uranium par ICPMS dans les structures cérébrales ne sont pas atteintes, même pour les niveaux très faibles qui ont été mesurés.

Afin d'expliquer ce phénomène, deux hypothèses s'opposent : la première est que la contamination (UA ou UE) influencerait le stockage endogène d'uranium (bruit de fond naturel) conduisant à une élimination préférentielle de l'uranium naturel sans accumulation d'uranium exogène, mais cette hypothèse est peu convaincante au regard de la littérature en radiotoxicologie des contaminations internes (Karpas *et al.*, 1998).

La seconde, plus probable, est que les différences constatées sont à la limite de discrimination entre les populations contaminée et témoin. En effet, les valeurs de dosages montrent combien les taux d'uranium cérébral retrouvés sont infimes en comparaison de l'uranium ingéré et du bruit de fond naturel (maximum de 40 à 50ng d'uranium dans le cerveau complet après 6 mois de contamination à 40mg.L^{-1} soit $4\mu\text{g}/\text{rat}/\text{jour}$ d'uranium absorbé avec un transfert intestinal à 0,4%). La différence entre les lots ne représente par exemple que 38ng.g^{-1} à 1,5 mois pour le striatum (UA) et plus que 4ng.g^{-1} à 9 mois pour le striatum (UA). A l'inverse, dans le cas des dosages d'uranium dans les reins et les fémurs, avant même l'analyse statistique, les résultats sont suffisamment différents pour permettre de distinguer les animaux témoins des animaux contaminés.

Une baisse d'uranium dans le cerveau des animaux contaminés n'a d'ailleurs jamais été rapportée dans aucune des études de distribution régionale de l'uranium cérébral (Pellmar *et al.*, 1999

a; Barber *et al.*, 2005). Cependant, la quantité d'uranium retrouvé dans les reins lors de ces études nous indique que les contaminations étaient largement supérieures aux nôtres et qu'il n'y avait aucun problème de discrimination entre les deux populations au niveau cérébral.

La synthèse des résultats nous amène à conclure que les valeurs de dosages d'uranium des populations « contaminés » et « témoins » ne sont pas toujours suffisamment différentes pour être correctement distinguées les unes des autres, probablement en raison du niveau modéré d'exposition utilisé ici. Si tel est le cas, certaines des augmentations d'uranium peu différentes des témoins (peu significatives) peuvent également être considérées comme des résultats contestables.

IV.1.2.2. Interactions entre les paramètres étudiés

En microscopie électronique, l'uranium est utilisé comme contrastant histologique afin de distinguer les différents éléments subcellulaires. Dans la synapse, l'ion uranyle semble avoir une affinité particulière pour les vésicules présynaptiques contenant les neurotransmetteurs et pas pour les autres éléments membranaires présynaptiques (Ovtscharoff, 1975). Cette observation nous amène à envisager les relations qu'il pourrait exister entre l'accumulation d'uranium cérébral (peut être dans les vésicules présynaptiques) et les effets sur la neurotransmission.

IV.1.2.2.1. Effets de l'accumulation d'U sur la neurotransmission monoaminergique :

D'après nos résultats, après contamination chronique à l'UA (1,5 et 9mois), il n'existe pas de relation directe entre la répartition de l'uranium et les effets mesurés sur la neurotransmission monoaminergique. En effet, après ingestion chronique d'UA pendant 1,5mois, l'uranium ne s'accumule significativement que dans le striatum (accumulation non significative dans l'hypothalamus et le cervelet). Or, pour le même temps, les taux de monoamines ne varient que dans l'hypothalamus. A 9mois, les dosages d'uranium indiquent que le métal se concentre dans le striatum, le cortex, l'hippocampe et le cervelet (accumulation non significative dans l'hypothalamus). Or les résultats de monoamines indiquent uniquement une variation des taux de monoamines dans le striatum et dans le cortex frontal.

De même, d'après les résultats obtenus à 1,5 et 9mois après contamination à l'UE, il n'y aurait pas de relation directe entre la répartition de l'uranium et les effets mesurés sur la neurotransmission monoaminergique. En effet, après une contamination de 1,5mois à l'UE, l'uranium se concentre dans l'hippocampe, l'hypothalamus, le striatum et dans le cervelet. Or, les dosages de monoamines n'indiquent à 1,5mois qu'une légère variation du turnover de la sérotonine dans l'hippocampe ($p=0,11$) et l'hypothalamus ($p=0,11$). A 9mois, l'uranium se concentre toujours dans les mêmes structures mais la différence par rapport aux témoins n'est significative que pour l'hippocampe. Pour ce même temps d'exposition, les résultats de monoamines montrent une légère variation des taux de dopamine ($p=0,09$) et de sérotonine ($p=0,09$) dans l'hypothalamus.

Pour les métaux neurotoxiques, des résultats similaires ont été rapportés après exposition à de faibles quantités de manganèse (Kontur and Fechter, 1985). Dans cette étude, le gavage quotidien de rats nouveaux-nés avec 25 ou 50 $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ pendant 21 jours, n'a pas eu d'influence sur les taux de monoamines ou de leurs métabolites dans le striatum, l'hippocampe et l'hypothalamus malgré l'augmentation de la concentration cérébrale de manganèse (Kontur and Fechter, 1985).

L'origine des perturbations monoaminergiques ne serait donc pas liée à la présence *in situ* d'uranium mais la cause pourrait être indirecte ou la conséquence d'effet collatéral de la présence d'uranium dans des structures cérébrales adjacentes.

IV.1.2.2.2. Effets de l'accumulation d'U sur l'activité ChE :

Après contamination à l'UA, malgré une concentration supérieure d'uranium à 1,5 mois dans le striatum (48 ng.g^{-1}) et à 9 mois dans le striatum (15 ng.g^{-1}), dans l'hippocampe (12 ng.g^{-1}) et le cortex (2 ng.g^{-1}), aucun effet significatif sur l'activité ChE dans ces régions cérébrales et pour ces deux temps de contamination n'a été observé. La présence d'uranium dans les structures cérébrales après contamination chronique à l'UA n'agirait pas comme un facteur favorisant l'apparition d'effets biologiques sur l'activité ChE.

A l'inverse, les effets constatés sur l'activité ChE après contamination à l'UE semblent dépendre de la présence d'uranium dans les structures où se manifestent ces perturbations. A 1,5 mois, la présence significative d'uranium dans le striatum et l'hippocampe est concomitante à une modification de l'activité ChE dans ces deux structures. De même, à 9 mois, il existe une modification non significative de l'activité de l'ChE dans l'hippocampe qui est accompagnée d'une augmentation significative de la concentration d'uranium par rapport à la valeur des témoins. De plus, la teneur à 9 mois (8 ng.g^{-1}) dans l'hippocampe est inférieure à la teneur à 1,5 mois (34 ng.g^{-1}) ; cette différence pourrait expliquer l'absence de signification des résultats à 9 mois pour l'activité ChE. Pour les contaminations à l'UE, ceci nous amène à envisager l'existence d'une relation « exposition-réponse » pour les effets sur l'activité ChE. Toutefois, la présence d'uranium dans le cervelet à 1,5mois n'a pas eu d'incidence sur l'activité ChE dans cette structure, ce qui suggère qu'il existe une quantité d'uranium à atteindre pour observer une réponse ou bien que les structures cérébrales n'ont pas toutes la même sensibilité à l'uranium.

IV.1.2.2.3. Effets de l'activité radiologique de l'uranium accumulé sur l'activité ChE :

Pour le striatum, après 1,5 mois de contamination, des concentrations comparables d'uranium accumulé ont été mesurées pour les deux compositions isotopiques d'uranium (48 ng.g^{-1} pour UA et 58 ng.g^{-1} pour UE au lieu de 21 ng.g^{-1} pour les témoins). Or, l'activité ChE n'est affectée que dans le cas d'une exposition chronique à l'UE. La seule différence caractérisant les deux contaminations étant l'activité radiologique supérieure de la solution d'UE, ces résultats suggèrent que la réponse mesurée

sur l'activité ChE dépend non seulement de la présence d'uranium mais de surcroît de l'activité radiologique de l'uranium utilisé lors de la contamination.

Jusqu'à présent, les rares découvertes relatives aux effets de l'uranium enrichi ou de la radioactivité de l'uranium ne concernaient que la recherche d'effets cancérigènes (Batchelor *et al.*, 1980; Gu *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2003; Miller, 2004). En général, la littérature dans ce domaine ne tient compte que des effets chimiques de l'uranium et néglige sa radiotoxicité pour expliquer la toxicité globale de l'uranium. Les effets biologiques décrits ici suggèreraient que la faible contamination interne utilisée (4µg d'uranium absorbé/rat/jour) et donc l'irradiation de très faible intensité et très localisée qui en résulte (Cothorn and Lappenbusch, 1983a), suffiraient à provoquer des modifications du niveau basal de mécanismes physiologiques pourtant très régulés. Les mécanismes d'action de cette radioactivité à très faible dose et en contamination interne restent à ce jour inconnus et inexpliqués.

Toutefois, la littérature nous indique que le SNC est sensible aux irradiations externes : des changements fonctionnels ont été décrits au niveau neurochimique après irradiation. Il a été démontré, par exemple, que les principales voies de neurotransmission (voies dopaminergique, sérotoninergique, cholinergique, ...) subissent des modifications et que ces changements pourraient participer aux troubles comportementaux observés après irradiation (Egana, 1962). Même si la littérature est très contradictoire dans ce domaine, les radiations ionisantes peuvent affecter le système dopaminergique (Catravas and McHale, 1974; Martin *et al.*, 1993; Foulon *et al.*, 1999), le système sérotoninergique (Alaoui *et al.*, 1995; Foulon *et al.*, 1999) et le système cholinergique (Pausescu *et al.*, 1972). Dans ce dernier cas, les irradiations (gamma 4Gy) peuvent aussi bien activer l'ChE (effet précoce) que l'inhiber (effet tardif)(Pausescu *et al.*, 1972). Ceci est à rapprocher de nos résultats où dans l'hippocampe, après contamination interne par l'UE, une hausse de l'activité ChE à 1,5 mois puis une baisse non significative de l'activité ChE à 9 mois sont observées.

Les résultats d'irradiation externe confirment que l'origine des perturbations de l'activité cholinergique après contamination chronique à l'UE pourrait être liée à l'activité radiologique de l'uranium utilisé. Dans le cas de nos contaminations internes à l'uranium, il est néanmoins très difficile d'évaluer le niveau de radioactivité présent au sein des structures cérébrales. Celui-ci est sûrement très éloigné (plusieurs ordres de grandeur) des doses d'irradiation externe utilisées expérimentalement pour obtenir les effets rapportés ci-dessus.

IV.1.2.3. Caractères généraux des effets de l'uranium

IV.1.2.3.1. Effets de l'U comparables aux métaux neurotoxiques : cf. tableau 20-22

En comparaison avec la littérature relative aux effets des métaux neurotoxiques sur la neurotransmission, l'uranium présente un impact similaire mais nettement plus modéré, à quantité égale d'exposition, sur les différents systèmes neurochimiques étudiés.

Nos résultats montrent que l'uranium (UA et UE) agit préférentiellement sur le système dopaminergique (à 1,5mois, 6 mois, 9 mois et 18 mois). Comme le manganèse, le plomb ou le mercure, l'uranium affecte le système dopaminergique du striatum (UA, 9mois) (Autissier *et al.*, 1982; Subhash and Padmashree, 1991; Lasley, 1992; Faro *et al.*, 2000).

D'après nos résultats, l'uranium agit également sur le système sérotoninergique du cortex frontal (UA, 9 mois). Des résultats équivalents ont été rapportés pour les trois métaux neurotoxiques de comparaison (Seth and Chandra, 1984; Shailesh Kumar and Desiraju, 1990; O'Kusky, 1998).

De même, l'uranium agit, comme le plomb et le mercure, sur le système cholinergique de l'hippocampe (UE, 1,5 mois) et du cervelet (UA, 6 mois)(Coccini *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 2003).

Tableau n°20. Effets du manganèse

Manganese	
Baisse du poids corporel	(Hong <i>et al.</i> , 1984)
S'accumule préférentiellement dans le cerveau	(Ranasinghe <i>et al.</i> , 2000)
Se distribue dans HY > CO > ST après contamination chronique, absent de l'hippocampe	(Subhash and Padmashree, 1990)
S'accumule de préférence dans les astrocytes	(Aschner <i>et al.</i> , 1999)
Augmentation du taux de manganèse sans modifications des monoamines ou des métabolites	(Kontur and Fechter, 1985)
Baisse le taux de dopamine et le turnover dans le striatum. Pas d'action sur la MAO.	(Autissier <i>et al.</i> , 1982)
Pas d'effet sur les récepteurs dopaminergiques et cholinergiques du striatum après contamination chronique	(Bhargava, 1987)
Baisse du taux de dopamine dans striatum et dans hippocampe, hausse du taux de sérotonine dans cortex + perturbation régionale des enzymes du métabolisme dopaminergique.	(Subhash and Padmashree, 1990)
Baisse de la sérotonine dans le cortex frontal	(Seth and Chandra, 1984)
Pas d'effets sur taux de sérotonine, dopamine et leurs métabolites après injection aiguë	(Hong <i>et al.</i> , 1984)
Pas d'effet sur le taux de prolactine, testostérone et corticostérone	(Hong <i>et al.</i> , 1984)

Tableau n°21. Effets du plomb

Plomb	
Accumulation préférentielle du plomb dans l'hypothalamus après contamination aiguë	Lever 1998
Baisse du poids corporel et du poids cérébral après contamination chronique (100 ou 400 µg/g/jour)	Shailesh 1990
Abaisse le taux de métabolites dopaminergiques (DOPAC et HVA) dans système nigrostrié et mésolimbique	Moresco 1988, Tang 1995, Cory Schleta 1995
Action multiple sur les neurones dopaminergiques (taux de dopamine et libération de dopamine) du striatum mais pas d'action sur les autorécepteurs qui régulent la Tyrosine hydroxylase.	Lasley 1992
Inactive la tyrosine hydroxylase dans le noyau accumbens et le cortex frontal (50ppm 90jours)	Ramesh 1998
Active l'enzyme monoamine oxydase	Shi 1995, Sablonska 1994
Augmente le taux de dopamine dans hypothalamus et de sérotonine dans l'hippocampe et le cortex frontal	Shailesh 1990
Baisse l'activité ChE dans le cervelet et l'hippocampe	Reddy 2003
Perturbe la neurotransmission cholinergique	Cory Schleta 1995
Inhibe la sécrétion d'acétylcholine, dopamine et acides aminés en perturbant le flux calcique (entrée ions Ca ²⁺ dans bouton synaptique)	Lasley 1999
Abaisse la conduction au niveau périphérique	Lille 1994
Bloque récepteur NMDA, la transmission GABAerique et glutamatergique, inhibe le flux calcique	Braga 1999
Effets sur axe hypothalamohypophysaire : hausse du taux de prolactine	Govoni 1987

Tableau n°22. Effets du mercure

Mercure	
Se distribue dans CO > ST > HI > TC > CE après contamination chronique	Moller-madsen 1994
Distribution après contamination aiguë : CE, medulla oblongata, tronc cérébral	Butterworth 1978
Accumulation cérébrale sans effet toxique général (poids, poids cerveau), pas effet histologique, pas de réaction GFAP, hausse du taux de noradrénaline dans le cervelet	Lindstrom 1991
Mercure est liposoluble	Felton 1972
Augmente la libération synaptique de dopamine et de DOPAC+HVA dans le striatum	Faro 2000, 1997
Neurones de la motricité (striatum) accumulent le mercure + altération de la fonction motrice.	Moller-madsen 1994
Augmente le taux de dopamine par perturbation de l'homéostasie calcique	McKay et al. 1986, Minnema et al. 1989
Augmente la sécrétion de sérotonine et de son métabolite 5HIAA dans le cortex cérébral (dév. néonatal)	O'Kusky et al., 1998
Bloque l'entrée d'ions Ca ²⁺ / empêche la sécrétion de sérotonine	atchinson et Hare 1994, atchinson 1986
Augmente le nombre de récepteurs muscariniques dans l'hippocampe et le cervelet	Coccini 2000
Empêche la sécrétion d'ACh en perturbant le métabolisme du calcium	limke 2004, candura 1997
Perturbe l'activité des enzymes du métabolisme cholinergique	dinner and brenner 1998
Impliqué dans la perturbation de fonctions cognitives (mémoire et apprentissage) glutamate dépendantes	Cagiano et al 1990
Inhibe la recapture extracellulaire du glutamate	O'Carroll et al 1995

IV.1.2.3.2. Effet multiforme et spécifique à chaque région cérébrale :

La plupart des neurones monoaminergiques et cholinergiques naissent dans la même région cérébrale : le tronc cérébral. L'uranium pourrait donc avoir un effet restreint à ces noyaux, effet qui serait ensuite transmis le long de l'innervation jusqu'à la zone de libération des neurotransmetteurs (régions cérébrales étudiées). Toutefois, les différences observées ici dans les différentes structures (effets différents selon la structure cérébrale et qui touchent différents neurotransmetteurs) soutiennent l'idée que la sensibilité des neurones à l'uranium dépend plutôt de facteurs régionaux. L'uranium n'aurait pas un effet localisé sur le tronc cérébral mais plutôt un effet sur chaque structure et propre à chacune de ces structures.

Afin d'altérer la neurotransmission, les neurotoxiques (métaux, solvants, pesticides, ...) peuvent agir directement sur les enzymes responsables de l'anabolisme des neurotransmetteurs, les processus de libération ou de recapture, les enzymes du catabolisme, les récepteurs, le processus post-synaptique (Costa, 1988). Ou bien l'action peut être indirecte et interférer avec le métabolisme énergétique, les canaux ioniques, le contenu hydrique et l'homéostasie électrolytique par compétition avec les autres ions présents dans le milieu interstitiel (Costa, 1988; Strange, 1992).

Dans le cas de l'exposition chronique au plomb ou au manganèse, l'hypothèse d'un effet multiforme/pléiotrope a d'ailleurs été émise afin d'expliquer leurs actions sur divers neurotransmetteurs (amines biogènes, glutamate, GABA, ...) et dans différentes structures (Shailesh Kumar and Desiraju, 1990; Subhash and Padmashree, 1990).

IV.1.2.3.3. Effets non constants sur les différentes périodes de contamination :

L'un des principaux constats des résultats rapportés ici est l'absence de constance dans les modifications. Hormis, **1**) l'accumulation d'uranium dans le striatum après contamination à l'UA (présent à 1,5 et 9 mois) et **2**) la baisse du turnover dopaminergique dans le cortex frontal après contamination à l'UA (présent à 6 et 9 mois), les résultats obtenus après 1,5 mois (dosage des monoamines, mesure de l'activité ChE et accumulation cérébrale) n'ont pas été retrouvés à plus long terme, à savoir 6, 9 ou 18 mois. Par exemple, l'accumulation d'uranium dans l'hippocampe après contamination à l'UE est présente à 1,5 mois et 9 mois mais absente à 6 mois. De même, la modification de l'activité ChE dans l'hippocampe après contamination à l'UE est présente à 1,5 et 9 mois mais cette modification est absente à 18 mois et de plus, ne présente pas le même caractère à ces deux temps (hausse à 1,5 mois et baisse à 9 mois).

Ces effets transitoires peuvent trouver leur origine dans l'évolution de la physiologie des animaux au cours de la contamination. Une fois de plus, le facteur âge et l'évolution de la sensibilité régionale à l'uranium seraient en cause.

IV.1.2.3.4. Effets caractéristiques de la biologie des éléments traces :

La synthèse des résultats démontre aussi que les effets biologiques constatés se caractérisent par une grande subtilité, souvent à la limite de la signification. Cette absence d'effets très marqués trouve probablement son origine d'abord dans le niveau d'exposition utilisé et ensuite dans l'évolution de la variabilité interindividuelle qui augmente avec l'âge des rats. De plus, la chronicité et la durée de l'exposition permettent aux mécanismes de régulation de s'adapter.

Le niveau d'exposition (40mg.L^{-1}) a été calculé pour rester en dessous du seuil de néphrotoxicité même si le rat devait subir une contamination pendant 2 ans. Les valeurs relevées après contamination chronique varient entre $0,10$ et $0,16\mu\text{g.g}^{-1}$ de rein, soit un facteur inférieur de 7,5 à 12 fois au seuil de néphrotoxicité chez le rat : $1,2\mu\text{g.g}^{-1}$ de rein (Diamond *et al.*, 1989). Si l'on considère que seul 0,4% de l'uranium ingéré est absorbé au niveau de l'intestin grêle, la valeur quotidienne de l'uranium absorbé atteint $4\mu\text{g}$ par animal. La proportion quotidienne d'uranium qui atteint le cerveau est inconnue. Mais elle ne doit constituer qu'une proportion infime de la quantité absorbée quotidiennement, puisque la quantité d'uranium à 1,5 mois n'atteint que $0,03\mu\text{g}$ sur la totalité du cerveau. Pour le cerveau, le niveau d'exposition de l'animal est donc caractéristique de la biologie des « éléments-traces ».

Par ailleurs, l'hétérogénéité des populations augmente avec l'âge des animaux. En conséquence, plus le temps d'exposition augmente, plus la distribution des individus dans les différents lots est dispersée : l'écart type sur la valeur moyenne augmente avec l'âge. Dans nos résultats, le plus souvent, seule l'analyse statistique a permis d'établir définitivement une différence entre les lots. Mais dans tous les cas, les effets perçus restent modérés et très variables d'un individu à l'autre. En effet, avec des niveaux faibles de contamination, il semble que chaque individu d'une population puisse réagir différemment selon sa propre physiologie. De telles différences ont également été rapportées par JL Lewis, suite à des inhalations répétées d'uranium, où seulement 2 rats sur 6 exposés ont présenté de l'uranium en quantité identifiable dans leur cerveau (Evans, December 12, 2004).

IV. 2. Causes potentielles des modifications biochimiques :

Les modifications biochimiques constatées peuvent être la conséquence soit d'un effet direct de l'uranium sur le cerveau (action in situ de l'uranium accumulé) soit d'un effet indirect (effet secondaire en réponse à un effet sur un autre organe ou un autre système physiologique). Dans les paragraphes suivants, les causes les plus probables à l'origine des modifications biochimiques constatées sont discutées.

IV.2.1. Causes directs :

IV.2.1.1. La quantité d'uranium dans le cerveau

Plus un toxique est présent en quantité faible, c-à-d. en traces infimes, plus l'organisme a du mal à le reconnaître comme un corps étranger toxique et donc à mettre en place un mécanisme de défense ou de réaction adéquat (Kostecki and Calabrese, 2003). Ainsi, une concentration donnée d'un xénobiotique qui s'avère non délétère pour un organisme (mécanisme de compensation) pourra devenir toxique si elle s'abaisse (absence de compensation).

En effet, les résultats de certaines études chroniques par ingestion d'uranium montrent qu'il n'y a pas de relation « exposition-réponse » entre la concentration d'uranium utilisée et les paramètres mesurés (p.ex. concentration d'uranium cérébral ou effets biologiques sur la reproduction masculine et le comportement locomoteur, Bellés *et al.*, 2005; Linares *et al.*, 2005). Dans ces études, la dose intermédiaire de 20mg/kg s'est avérée relativement plus nocive que la dose la plus basse de 10mg/kg ou celle de 40mg/kg. De façon tout aussi surprenante, les quantités d'uranium retrouvées dans les reins et dans le cerveau après une exposition à 20mg/kg étaient plus basses que celles à 10 ou 40 mg/kg, alors que celles à 40mg/kg étaient supérieures à celles à 10mg/kg, comme il était attendu. Ces phénomènes sont encore largement peu compris ou expliqués. Une hypothèse serait que la présence d'uranium exogène induit un mécanisme de réponse (défense/détoxication) qui se mettrait en place à la dose de 20mg/kg, ne serait pas activé à 10mg/kg (quantité trop faible) et se trouverait dépassé à 40mg/kg (quantité trop forte).

Dans le cas de nos expositions, puisque la concentration d'uranium cérébral fluctue au cours des mois de contamination, il est possible d'envisager qu'un mécanisme de réponse du même type puisse exister et ne serait actif qu'à certains moments de l'exposition, en fonction du taux cérébral d'uranium. Les variations des modifications biochimiques au cours des différents temps de mesure pourraient être la conséquence des variations de l'accumulation cérébrale.

IV.2.1.2. La radioactivité de l'uranium

Dans le cas de contamination interne, l'uranium est avant tout considéré comme un toxique chimique et sa radiotoxicité est le plus souvent négligée (ATSDR, 1999). Afin de répondre à la

question de la double toxicité de l'uranium, les deux postulats de nos expérimentations comparatives (UA vs UE après 1,5 mois et 9 mois de contamination) étaient que la radiotoxicité de l'uranium ne devait être importante qu'après exposition à l'UE et que la toxicité globale de l'UE était la somme d'une toxicité chimique et d'une toxicité radiologique. En faisant la différence « réponse UE - réponse UA », le résultat devait représenter la radiotoxicité de l'uranium.

Or, les résultats obtenus avec l'UE n'ont jamais eu le même profil d'expression que l'UA. Pour les résultats de dosage des monoamines, alors que l'UA semblait indiquer les effets de la chimiotoxicité de l'uranium, l'UE restait sans effet. Les effets biologiques de l'UE sur les monoamines seraient donc mieux compensés que ceux de l'UA. A l'inverse, les modifications de l'activité ChE, notamment à 1,5 mois, semblent liées non seulement à la présence d'uranium *in situ* mais aussi à l'activité radiologique de l'uranium utilisé pour la contamination. L'activité de l'uranium enrichi pourrait donc avoir un effet synergique avec la chimiotoxicité de l'uranium.

Nos résultats ne nous permettent pas de conclure totalement sur l'origine chimique ou radiologique des modifications biochimiques modérées que nous constatons. Afin de pouvoir discriminer plus précisément les deux toxicités ou de conclure à une synergie, il faudrait réaliser une série d'exposition de court terme avec des activités radiologiques croissantes.

IV.2.1.3. La barrière hémato-encéphalique.

Le cerveau est un organe supérieur protégé par la barrière hémato-encéphalique (BHE) de tous les composés et substances exogènes apportés par la circulation sanguine (Copin and Gasche, 2003). Contrairement au restant de l'organisme qui n'est séparé de la lumière des vaisseaux sanguins que par la membrane cellulaire des cellules endothéliales, le cerveau est protégé par une double couche de membranes cellulaires. Un endothélium capillaire à jonctions serrées couplé à un revêtement constitué de péricytes et des prolongements des astrocytes forment la BHE (Huber *et al.*, 2001). Pour franchir la barrière, les composés doivent avoir soit une forte lipo-solubilité qui leur permet de traverser toutes les membranes cellulaires, soit une forte affinité pour des systèmes de transport spécialisés (p.ex. divalent metal transporter, Huang *et al.*, 2004). Toutefois, la BHE présente deux caractéristiques : elle est absente dans certaines zones très localisées du cerveau (organes péri-ventriculaires dont les noyaux supra-optique et para-ventriculaire de l'hypothalamus, (Paxinos and Watson, 1998) (Copin and Gasche, 2003)) et possède une perméabilité régionale naturelle (Belova and Jonsson, 1982; Abdel-Rahman *et al.*, 2002). En effet, lors d'exposition à des substances neurochimiques, certains auteurs ont rapportés une variation de la sensibilité loco-régionale de la BHE (Abdel-Rahman *et al.*, 2002).

Compte tenu des propriétés de la BHE et afin de s'introduire dans le cerveau, l'uranium en provenance du sang circulant pourrait donc soit profiter des régions plus fragiles (absence de BHE ou BHE plus perméable), soit agir directement sur la BHE. Dans le premier cas, l'uranium aurait d'abord une pénétration très localisée qui s'étendrait par la suite grâce à une diffusion dans le milieu cellulaire interstitiel. Dans l'hypothèse alternative, l'uranium agirait par augmentation de la perméabilité de la

BHE ; il pourrait donc s'introduire dans l'ensemble des structures cérébrales et y avoir une action plus ou moins importante, dépendante de sa concentration finale mais aussi de la sensibilité propre de la structure cérébrale à cet élément.

L'uranium circulant pourrait également atteindre le parenchyme cérébral par les plexus choroïdes, après transfert dans le liquide céphalo-rachidien et passage de l'épithélium épendymocytaire (barrière hémato-cérébrospinale).

Les résultats que nous avons rapportés démontrent que l'uranium est naturellement présent dans l'ensemble des structures cérébrales mais que sa concentration peut augmenter localement après un apport supplémentaire par l'eau de boisson. L'hétérogénéité de l'accumulation d'uranium pourrait être liée à l'évolution de la perméabilité de la BHE : les régions où s'accumule l'uranium après contamination (*c-à-d* hippocampe, hypothalamus, striatum) pourraient être des zones privilégiées de fragilisation de la BHE par l'uranium. Et cette augmentation de la perméabilité serait la cause des effets biochimiques relevés dans ces structures d'accumulation. Toutefois, ces hypothèses n'expliquent pas la présence d'effets biochimiques en absence d'accumulation significative d'uranium pour d'autres structures cérébrales sauf si ces modifications persistent alors que l'uranium a déjà diffusé vers une autre structure.

IV.2.1.4. Les électrolytes : des éléments essentiels pour le fonctionnement du SNC.

Les métaux neurotoxiques (plomb, mercure, manganèse, ...) sont connus pour interférer avec les électrolytes et en particulier avec les ions métalliques divalents (zinc, cuivre, fer et calcium) qui sont primordiaux pour un fonctionnement optimal des neurones (Gomez and Robles, 2003; Takeda, 2004). Par exemple, le plomb agit sur le bouton terminal des neurones en entrant par le canal calcique. Une fois internalisé, il joue le rôle d'un agoniste des flux calciques et déclenche ainsi l'exocytose de neurotransmetteurs (Wang and Quastel, 1991).

Or, dans le système nerveux central, les taux de calcium intra-cellulaire et extra-cellulaire sont essentiels. Non seulement, ils permettent la sécrétion des neurotransmetteurs dans la fente synaptique, mais ils contrôlent aussi l'expression génique (Sutton *et al.*, 1999). Une perte de l'homéostasie calcique au niveau central peut avoir des répercussions non seulement sur la libération synaptique des neurotransmetteurs mais aussi sur les processus régulant leurs métabolismes.

Pour l'uranium, les études sont relativement contradictoires. Une étude réalisée sur la jonction neuromusculaire, en présence ou en absence d'inhibiteur des canaux calciques, n'a pas mis en évidence d'influence de l'inhibiteur sur les effets induits par la présence d'uranium dans le milieu (Lin *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent l'absence d'effet de l'uranium sur la pompe calcique. Pourtant, l'uranium, probablement sous la forme d'ions UO_2^{2+} , semble pouvoir prendre la place des ions Ca^{2+} dans la jonction neuromusculaire (Lin-Shiau *et al.*, 1979). Dans une autre étude, l'uranium a été directement mis en cause dans le blocage de l'entrée du calcium nécessaire à la contraction cardiaque (Mill *et al.*, 1978). Dans cette étude, les contractions cardiaques de coeur de lapin étaient

inhibées par la présence d'ion uranyle et les effets du toxique semblaient relayés *via* une sécrétion de catécholamines (Mill *et al.*, 1978). D'autres études ont montré que l'ion uranyle était la cause d'une libération accrue d'acétylcholine dans la fente synaptique (Sokoll and Thesleff, 1968; Fu and Lin-Shiau, 1985). Pellmar *et al.* ont aussi décrit sur des coupes d'hippocampe provenant de rats implantés avec des fragments d'uranium appauvri pendant plusieurs mois, des perturbations de l'électrophysiologie (Pellmar *et al.*, 1998). Ces perturbations peuvent être la conséquence d'une altération de la conduction du signal nerveux par modification des mouvements ioniques responsables du potentiel d'action ($\text{Na}^+ / \text{K}^+ / \text{Ca}^{2+}$).

Concernant nos résultats, certaines variations du métabolisme dopaminergique et sérotoninergique ont été attribuées hypothétiquement à des effets de l'uranium sur l'anabolisme ou le catabolisme des neurotransmetteurs, suggérant un effet de l'uranium sur les enzymes du métabolisme. Mais à ce jour, aucune connaissance ne permet d'écarter l'hypothèse d'une altération des processus calcium dépendants. Considérant la complexité des résultats obtenus (très grande variabilité du profil d'expression des effets), il est probable que l'uranium, comme de nombreux autres métaux neurotoxiques (p.ex. manganèse, plomb, mercure) emprunte plusieurs voies pour agir sur la neurotransmission (Marchetti, 2003; Takeda, 2004; Crespo-Lopez *et al.*, 2005). Des études plus approfondies sur les taux de calcium ou le contenu hydrique sont nécessaires pour savoir si l'uranium agit directement sur le neurone et les neurotransmetteurs ou sur la distribution ionique et le contenu hydrique des cellules.

IV.2.2. Causes indirectes :

IV.2.2.1. Effet secondaire d'origine rénale.

De nombreuses études pharmacologiques et pharmacocinétiques ont mis en évidence que la fonction rénale était l'une des plus fragiles et des plus dégradées lors du vieillissement (pour revue, Lamb *et al.*, 2003). En effet, il a été rapporté qu'avec l'âge, le taux de filtration glomérulaire, le taux de production de créatinine, le poids des reins, le flux sanguin et la fonction sécrétrice tubulaire diminuaient. Dans le cas de nos contaminations qui font appel à un néphrotoxique reconnu (et utilisé comme tel pour modéliser l'insuffisance rénale, Hodge 1973), il est possible d'envisager que les rats les plus âgés aient manifesté des troubles légers mais non perceptibles de la fonction rénale. Ce paramètre n'a pas été suivi au cours de nos études, mais des expérimentations menées au laboratoire indiquent en effet, que cet organe est très modérément altéré tout au long des contaminations chroniques, même à $40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, et notamment à long terme (*communication personnelle M. Claraz*).

Bien qu'un lien entre altération de la fonction rénale et neuropathologie ait été mis en évidence, comme effet secondaire, chez des personnes dialysées (Strange, 1992; Brouns and De Deyn, 2004), il semble peu probable qu'un effet secondaire d'un dysfonctionnement des reins soit à l'origine des effets constatés au niveau cérébral. La plupart des auteurs travaillant sur les effets de l'uranium (hors fonction rénale) ont d'ailleurs écarté cette éventualité même avec des niveaux

d'expositions bien supérieures aux nôtres (Pellmar *et al.*, 1999 a; Bellés *et al.*; Briner and Murray, 2005).

IV.2.2.2. Hypothèse du nerf vague.

Le nerf vague, nerf crânien X, qui naît à la base du cervelet, en arrière du nerf IX, en position latérale de la *medulla oblongata* chez l'Homme, est le nerf qui est responsable de la régulation de l'information en provenance et en direction des viscères abdominaux.

Dans le cas des contaminations par ingestion, ce nerf est donc un lien entre le cerveau (lieu de mesure des effets neurochimiques) et la sphère digestive (porte d'entrée de l'uranium). Le nerf vague pourrait donc relayer une information nerveuse en provenance de la région digestive qui est souvent assimilée à un second « cerveau » en raison de sa richesse en neurotransmetteurs et en innervations (système nerveux entérique) et où s'expriment les premiers effets de l'ingestion d'uranium.

Dans le cas des névro-pathologies fonctionnelles de la sphère digestive, de la maladie de Crohn ou de l'ulcère peptique, il a été établi qu'il existait un lien entre les perturbations des conditions physiologiques de la sphère digestive et les modifications de l'homéostasie du système nerveux (et *vice versa*) (Bhatia and Tandon, 2005). De plus, lors d'irradiation gamma périphérique (tête protégée à 15Gy), il a été démontré que le nerf vague était le relais d'une afférence nerveuse qui informait le cerveau de l'irradiation périphérique et déclenchait une réaction inflammatoire cérébrale (Marquette *et al.*, 2003).

Dans le cadre de nos contaminations, il conviendrait d'approfondir cette hypothèse afin de pouvoir statuer sur l'éventuel lien entre la porte d'entrée de l'uranium et l'une des zones d'expression de sa toxicité située à distance.

IV.2.2.3. Un ensemble de réponses biologiques : une toxicité systémique avant tout.

L'étude des effets sur le système nerveux central n'était qu'une voie d'approche de la toxicité globale de l'uranium après contamination chronique par ingestion d'uranium appauvri. A 40mg.L⁻¹, les résultats obtenus au laboratoire de radiotoxicologie expérimentale démontrent en effet que de nombreuses réponses biologiques existent dans l'ensemble de l'organisme (cf. paragraphe I.1.6.3.) notamment après 9 mois de contamination qui a été identifiée comme la durée critique pour la manifestation de la toxicité systémique de l'uranium appauvri.

Bien que les résultats UA rapportés ici ne fassent état que d'effets subtils et modérés sur le fonctionnement biochimique du cerveau, le dosage d'uranium dans les tissus cibles (reins et os) rappelle que les animaux sont soumis à une contamination d'un toxique chimique connu qui diffuse dans l'ensemble de l'organisme. Les effets sur le SNC sont donc à considérer non seulement en association avec ceux décrits pour la sphère digestive (reins, foie, intestin ...), première barrière après une ingestion d'uranium et premier filtre avant redistribution dans tout l'organisme, mais aussi avec ceux du système reproducteur (cf. paragraphe I.1.6.3.). Même si en apparence les paramètres généraux de nos animaux ne sont pas profondément perturbés, la manifestation de réponses

biologiques dans plusieurs organes en même temps souligne la globalité de la toxicité et la possibilité d'interaction entre ces différentes réponses.

En résumé, la contamination chronique par ingestion d'uranium appauvri à 40mg.L^{-1} est à l'origine d'un syndrome multiorgane, comme l'irradiation externe (Gourmelon *et al.*, 2005) et les effets constatés sur le SNC pourraient avoir une origine multifactorielle.

IV. 3. Conséquences des modifications biochimiques :

La perturbation des neurotransmetteurs est souvent évoquée dans l'étiologie des grandes pathologies du SNC qui présentent une manifestation comportementale (Winblad 1985). Par exemple, la dépression est souvent associée à une baisse du taux de sérotonine (Celada *et al.*, 1990; Sarrias *et al.*, 1991). La maladie de Parkinson est la conséquence d'une déficience du taux de dopamine dans le striatum (Corti *et al.*, 2005). La maladie d'Alzheimer aurait pour origine une dérégulation du système cholinergique et en particulier de l'activité de l'acétylcholinestérase (Geula and Mesulam, 1995; Geula and Darvesh, 2004). La maladie de Huntington se manifeste par une atteinte précoce des récepteurs dopaminergiques au niveau du striatum mais aussi du cortex (Pavese *et al.*, 2003). Les effets sur les grandes fonctions cognitives supérieures (locomotion, mémoire, sommeil, ...) doivent donc être recherchés en cas de perturbations neurochimiques.

IV.3.1. Les conséquences physiologiques des modifications biochimiques observées ?

L'une des premières questions que soulèvent les résultats neurochimiques observés est de savoir si les variations du métabolisme des monoamines et de l'activité de la principale enzyme du système cholinergique, malgré leurs faibles ampleurs, peuvent avoir des conséquences fonctionnelles sur la physiologie du rat.

Considérant le faible niveau de perturbation, aussi bien après contamination chronique à l'UA qu'à l'UE, il est difficile d'envisager qu'une pathologie nerveuse aussi symptomatique que les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson puisse survenir. Cet avis est renforcé par l'absence de tout trouble majeur et par un état de santé tout à fait satisfaisant chez les animaux soumis à ce type de contamination (constatations vétérinaires, *communication personnelle* de P. Houpert, cf. résultats, Paquet *et al.*, 2005, Souidi *et al.*, 2005). Toutefois, les modifications monoaminergiques et cholinergiques constatées sont la manifestation d'une perturbation, certes modérée mais réelle, du niveau de base de la biochimie cérébrale des animaux contaminés à l'UA ou à l'UE. Dans l'éventualité où des facteurs secondaires et aggravants surviendraient (stress, co-contamination métallique, affections microbiennes, traitement médicamenteux, ...), ces variations neurochimiques pourraient être à l'origine de troubles des grandes fonctions physiologiques régulées par le SNC ou de troubles neurologiques.

L'ensemble des résultats démontre que le système dopaminergique, à l'avantage des systèmes cholinergique et sérotoninergique, est le plus affecté par une contamination chronique à l'uranium (UA ou UE). Or, les structures concernées par ces variations dopaminergiques sont des structures clefs dans la régulation des fonctions qui dépendent de la dopamine. Le striatum (affecté à 9 mois), le cortex frontal (affecté à 6m et 9 mois) et dans une moindre mesure le cervelet (affecté à 18 mois) régulent notamment les fonctions motrices de l'organisme par l'intermédiaire de la dopamine (Corti *et al.*, 2005 ; Nieoullon A., 2002). Et l'hypothalamus (affecté à 1,5m, 9m et 18 mois) est en charge de la régulation de l'anxiété et des hormones neuroendocrines (Freeman *et al.*, 2000 ; Nieoullon A., 2002). En perturbant le métabolisme des monoamines dans ces structures, l'uranium

pourrait être à l'origine d'un trouble de la conduction du signal nerveux et en conséquence à la source d'une pathologie qui resterait asymptomatique jusqu'à l'apparition d'un facteur aggravant. Les atteintes monoaminergiques du striatum, du cortex et du cervelet pourraient expliquer les troubles modérés de la fonction locomotrice qui ont été observés après des expositions chroniques à de fortes concentrations d'uranium naturel ($10 \text{ à } 40 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$) (Bélles *et al.*, 2005). De même, les atteintes de l'hypothalamus pourraient être une explication des modifications, là aussi modérées, que provoque le stress sur la distribution d'uranium dans le cerveau (Barber *et al.*, 2005) ou sur le comportement après exposition à l'uranium (Bélles *et al.*, 2005).

Afin de mieux mesurer l'ampleur de l'atteinte de la neurotransmission, notamment dopaminergique, et de mieux en prévoir les conséquences, des études complémentaires des récepteurs dopaminergiques, de l'activité des enzymes clefs de ce système (monoamine oxydase MAO et tyrosine hydroxylase TyrH) ou encore des tests de comportement spécifiques des fonctions dépendantes de la dopamine pourraient être des perspectives intéressantes.

IV.3.2. Action de l'uranium sur le taux de prolactine et la locomotion

En 2005, une équipe américaine a mis en évidence après une exposition chronique par ingestion d'uranium appauvri (150 mg.L^{-1}) des effets sur la locomotion des mâles et une résistance des femelles (Briner, 2002; Briner and Murray, 2005). Cette résistance a été attribuée à une différence de régulation hormonale. Considérant que la dopamine régule à la fois la fonction locomotrice et la sécrétion de l'hormone de la lactation, la prolactine, les auteurs ont émis l'hypothèse que l'uranium en affectant le système dopaminergique pourrait altérer en cascade la locomotion et la régulation hormonale (prolactine) (Briner and Murray, 2005).

Par ailleurs, une étude sur l'Homme a rapporté une augmentation du taux de prolactine chez les vétérans (masculins) de la guerre du Golfe porteurs de fragments d'uranium appauvri et aussi une baisse des performances cognitives à une batterie de tests psychologiques informatisés (McDiarmid *et al.*, 2001). Chez les vétérans, aucun lien direct entre l'uranium et le taux de prolactine n'a pu être établi. Les variations du taux de prolactine ont été attribuées au stress qui est un facteur connu d'augmentation de la prolactine (Gala, 1990; Torner and Neumann, 2002; Torner *et al.*, 2002).

La prolactine a pour rôle de stimuler la croissance des glandes mammaires, de déclencher la sécrétion du lait ou encore d'activer la sécrétion de la progestérone chez la femme. Cette hormone intervient également dans la régulation du sommeil et des rythmes circadiens. Physiologiquement, la dopamine active la synthèse du « *prolactin inhibiting factor* » au niveau de l'hypothalamus qui inhibe la synthèse de prolactine par l'antéhypophyse (Freeman *et al.*, 2000). Au sein du système dopaminergique, la voie tubéroinfundibulaire qui se projette vers l'hypophyse, agit sur la sécrétion endocrinienne de prolactine. De plus, la voie nigrostriée qui se projette vers le striatum, contrôle les mouvements. Elle est notamment impliquée lors du développement de la maladie de Parkinson. Pour affecter ces deux voies dopaminergiques différentes, l'uranium devrait donc toucher les deux régions d'origine de ces faisceaux de neurones : la substance noire (A9) (localisées dans le tronc cérébral) et l'hypothalamus (A12) ou les régions innervées (striatum et hypothalamus) ou les deux.

Bien que nous ayons observé des perturbations du métabolisme dopaminergique après contamination UA dans le striatum (après 9mois de contamination à l'UA) et dans l'hypothalamus (après 1,5mois de contamination à l'UA), aucun trouble de la locomotion n'a été constaté chez ces mêmes animaux (mesures de locomotion spontanée réalisées dans un actimètre avant les dosages biochimiques cérébraux) (*communication personnelle*, P. Houpert). Dans l'état actuel des connaissances, il est impossible de confirmer l'hypothèse de Briner *et al.* selon laquelle les modifications de la locomotion auraient pour origine une atteinte du métabolisme dopaminergique, probablement en raison de la différence des niveaux d'exposition entre les deux études.

IV.3.3. Effets cognitifs de l'uranium : travaux ENVIRHOM.

Les études qui ont été menées au sein du LRTOX en parallèle à ce travail, dans les mêmes conditions d'exposition (UA et UE vs témoins), nous permettent d'apporter quelques éléments de réponse à l'interrogation des effets possibles de l'uranium sur les fonctions cognitives supérieures.

En effet, les travaux menés par Houpert *et al.* ont montré qu'une contamination chronique à l'UE pendant 1,5 mois pouvait altérer le sommeil alors que la contamination UA n'avait pas d'effet significatif (Houpert *et al.*, 2005). La quantité de sommeil paradoxal pendant la phase diurne est augmentée après contamination à l'UE et dans une quantité moindre et non significative après contamination à l'UA (Lestaevel *et al.*, 2005 b).

Par ailleurs, les études de Houpert *et al.* ont démontré qu'une contamination chronique à l'UE affectait le comportement des animaux alors qu'une contamination à l'UA restait sans effets (Houpert *et al.*, 2005). Après 1,5 mois d'ingestion chronique d'UE, une hausse de l'anxiété ainsi qu'une baisse de la mémoire à court terme (mémoire spatiale de travail) ont été observées. Les effets sur la mémoire spatiale étaient présents et avec la même intensité, aussi bien à court terme (1,5 mois, Houpert *et al.* 2005) qu'à long terme (9 mois), mais absents à moyen terme (6 mois, communication personnelle de P. Houpert).

Considérant les effets constatés sur le sommeil après contamination UE à 1,5 mois, les résultats attendus au niveau biochimique étaient une variation du taux de sérotonine, eu égard au rôle prépondérant de ce neurotransmetteur dans la régulation de cette fonction (Jouvet, 1972; Asikainen *et al.*, 1997). Une baisse du métabolisme sérotoninergique a été mise en évidence dans le cortex frontal qui aurait un rôle dans la régulation du sommeil paradoxal (Dugovic, 1992; Asikainen *et al.*, 1997; Portas *et al.*, 1998), mais uniquement après 9 mois de contamination à l'UA. De même, les variations du métabolisme monoaminergique semblent apporter peu d'explications quant aux phénomènes comportementaux (mémoire et anxiété) observés après contamination à l'UE. En effet, ces variations biochimiques affectent plus les animaux contaminés à l'UA que ceux contaminés à l'UE.

A l'inverse, la modification de l'activité ChE dans l'hippocampe aussi bien à 1,5 mois (hausse significative) qu'à 9 mois (baisse non significative) après contamination à l'UE peut être rapprochée des effets comportementaux sur la mémoire de travail (fonction cognitive assurée par l'hippocampe) après contamination à l'UE (Houpert *et al.*, 2005). En effet, l'altération de cette fonction enzymatique a

été mise en cause dans certains troubles de la mémoire ou de l'apprentissage, par exemple la maladie d'Alzheimer (Geula and Mesulam, 1995; Birkhimer *et al.*, 2003; Geula and Darvesh, 2004; Ballard *et al.*, 2005; Inestrosa *et al.*, 2005).

De plus, considérant les rôles de l'hippocampe dans la régulation de la mémoire de travail et de l'hypothalamus dans la régulation de l'anxiété et du cycle de veille/sommeil, l'accumulation d'uranium dans l'hippocampe et dans l'hypothalamus après contamination UE peut être directement rapprochée des effets comportementaux et électrophysiologiques. En effet, à 1,5 mois, alors que des effets sur la mémoire de travail, l'anxiété et le sommeil ont été relevés (Houpert *et al.*, 2005), les résultats montrent que l'uranium s'accumule significativement dans l'hippocampe et l'hypothalamus. A 6 mois, les effets sur la mémoire n'ont pas été constatés (anxiété et sommeil non réalisés) et pour le même temps, l'uranium ne s'accumule pas dans l'hippocampe (baisse par rapport aux témoins). Enfin, à 9 mois, des effets sur la mémoire spatiale hippocampique ont à nouveau été relevés. Or, nos résultats démontrent que l'uranium s'accumule significativement dans l'hippocampe pour ce temps de contamination.

Pour les deux temps 1,5 et 9 mois, l'altération de la mémoire à court terme présente la même intensité, voire une légère progression, par rapport aux témoins. Or, nos résultats montrent que la modification de l'activité ChE est moins intense à 9 mois qu'à 1,5 mois et évolue au cours de la contamination (hausse précoce et baisse tardive). De même, les résultats indiquent une évolution de l'accumulation d'uranium dans l'hippocampe entre ces deux temps, l'accumulation étant moins importante à 9 mois.

En résumé, les modifications monoaminergiques semblent être de mauvais indicateurs des effets comportementaux de l'uranium enrichi à 40mg.L^{-1} . Mais l'évolution des effets cognitifs de l'UE semble directement liée à l'évolution de la distribution cérébrale de l'uranium et aux effets biochimiques de l'uranium sur le système cholinergique. Toutefois, dans l'état actuel des connaissances, une autre cause ou une cause complémentaire ne peuvent pas être écartées, notamment pour expliquer les effets cognitifs à 9 mois. Par ailleurs, les observations comportementales suggèrent que la contamination à l'uranium enrichi pourrait provoquer chez les animaux contaminés un comportement semblable à celui induit par un stress physique externe démontrant ainsi la neurotoxicité potentielle de l'uranium enrichi à 40mg.L^{-1} .

Au contraire, d'après ces résultats de comportements, après exposition chronique à l'UA, la présence d'uranium en quantité supérieure par rapport aux témoins et la modification modérée des monoamines et du système cholinergique dans certaines structures cérébrales n'auraient pas les mêmes effets cognitifs que l'exposition à l'UE.

IV.4. Synthèse de la Discussion

L'uranium partage de nombreuses similitudes avec des métaux neurotoxiques connus. La distribution cérébrale hétérogène de l'uranium après contamination chronique correspond à celle décrite pour d'autres voies de contamination (*c-à-d* implants musculaires, injection i.p., inhalation) et se rapproche de celle du manganèse, du plomb et du thallium. Les effets biologiques induits par l'uranium sur la neurotransmission dopaminergique, sérotoninergique et cholinergique peuvent aussi être rapprochés de ceux du mercure, du manganèse ou du plomb. Mais à quantité égale, l'uranium possède une action plus modérée que ces métaux. L'action de l'uranium sur la neurotransmission, comme pour d'autres métaux neurotoxiques, emprunterait plusieurs voies (enzyme, canaux ioniques, contenu hydrique, compétition ionique ...).

L'effet multiforme et modéré de l'uranium sur la neurotransmission semble directement lié au niveau d'exposition utilisé dans nos expérimentations : 40ppm. Une altération loco-régionale de la barrière hématoencéphalique pourrait aussi en être la cause. L'évolution des constantes physiologiques des animaux (âge, variabilité et sensibilité individuelle, ...) au cours des contaminations chroniques serait également un facteur non négligeable de pondération et d'évolution des effets biologiques observés à ce niveau de contamination. L'uranium étant responsable d'un syndrome multi-organe, les effets constatés sur le cerveau pourraient être d'origine multifactorielle.

Par ailleurs, l'uranium enrichi est la cause d'effets biologiques semblables à ceux que les irradiations externes même modérées peuvent induire, notamment sur l'activité de l'acétylcholinestérase. Les différences constatées entre les effets de l'UE et ceux de l'UA auraient pour origine la radioactivité supérieure de l'UE et la mise en place d'un mécanisme de compensation inexistant lors de la contamination UA. Néanmoins, nous n'avons pas pu déterminer avec certitude l'origine radiologique ou chimique des effets observés tant après contamination à l'uranium enrichi qu'après contamination à l'uranium appauvri.

Enfin, les paramètres biochimiques mesurés sont de mauvais indicateurs (faible corrélation) des effets d'une ingestion chronique d'uranium à 40ppm sur les fonctions cognitives supérieures (sommeil, mémoire, apprentissage, locomotion, ...). A l'inverse, l'évolution de l'accumulation cérébrale d'uranium après contamination à l'UE suit exactement l'évolution des perturbations des fonctions cognitives qui sont induites par cette contamination. De plus, l'altération de l'activité ChE, en présence d'uranium, pourrait être l'une des causes de ces effets cognitifs.

Chapitre V

- Conclusion Générale et Perspectives -

« L'art c'est moi, la science c'est nous. »

Claude Bernard, *physiologiste français*.

Chapitre V – Conclusion Générale et Perspectives :

V.1. Conclusion Générale

Ce travail de toxicologie descriptive a mis en évidence que l'ingestion chronique d'uranium, à la teneur de 40ppm, pouvait induire des perturbations subtiles, localisées et de faibles intensités de la neurotransmission monoaminergique et cholinergique. Par ailleurs, cette étude a démontré que l'uranium se concentrait préférentiellement dans l'hypothalamus après contamination chronique.

A court terme (1,5 mois de contamination) et en comparaison avec les effets induits par l'uranium appauvri, l'uranium enrichi s'avère être le toxique le plus néfaste pour les paramètres mesurés. A long terme (6 - 9 mois de contamination), l'uranium appauvri semble être le toxique le plus délétère pour la neurotransmission, probablement parce qu'il n'induit pas de compensation, contrairement à l'uranium enrichi pour lequel aucune perturbation n'a pu être mise en évidence. A très long terme (18 mois de contamination), les effets naturels de l'âge sur les paramètres mesurés pourraient avoir tendance à révéler les effets de l'uranium enrichi.

Après une contamination chronique à l'uranium appauvri et en considérant les résultats d'études comportementales menées au laboratoire, les résultats indiquent que l'uranium peut s'accumuler de façon hétérogène dans différentes structures cérébrales et induire une réponse de l'organisme sans que ces altérations soient reliées à une pathologie *ad hoc*. L'ensemble de ces résultats suggère que l'uranium appauvri n'a pas d'effet majeur sur le fonctionnement du cerveau de rat à 40ppm. Toutefois, en situation de stress, ces modifications du niveau basal de la neurotransmission pourraient être accentuées comme le suggère les récentes études relatives aux effets conjoints, sur le cerveau, d'une exposition à l'uranium et à un stress (Barber *et al.*, 2005; Bellés *et al.*, 2005; Linares *et al.*, 2005).

Après contamination à l'uranium enrichi et en complément des résultats comportementaux, nos résultats montrent que l'évolution de l'accumulation locale d'uranium, pourrait être la cause de l'évolution des perturbations des fonctions cognitives au cours de la contamination. Par ailleurs, les modifications du système cholinergique qui ont été mises en évidence, notamment dans l'hippocampe, pourraient expliquer, en partie, comment l'accumulation d'uranium dans l'hippocampe induit des effets sur la mémoire spatiale de travail.

V.2. Evaluation du risque pour l'uranium naturel

L'uranium de l'environnement (uranium naturel) possède les mêmes caractéristiques chimiques que l'uranium appauvri mais a une activité radiologique 1,7 plus élevée. De plus, il n'est présent qu'à la concentration moyenne de 1 à 10µg.L⁻¹ dans les eaux de boisson, hors cas exceptionnel.

Pour l'exposition à l'uranium naturel de la population, les effets relevés sur le rat avec l'uranium appauvri (40mg.L⁻¹) peuvent donc être considérés comme envisageables mais peu probables, en raison d'une très nette différence de concentration (facteur 4000 entre les deux niveaux d'exposition). De même, il est difficile, à partir des données descriptives obtenues avec l'uranium enrichi sur un modèle animal, d'évaluer les effets de la radiotoxicité de l'uranium naturel (activité radiologique 2,7 fois moins élevée que l'uranium enrichi à 4,25%) et donc d'évaluer le risque pour la population. Ce risque radiologique ne doit cependant pas être négligé même pour les concentrations les plus faibles, au regard des différences constatées entre les contaminations à l'uranium appauvri et à l'uranium enrichi pour la bioaccumulation d'uranium, la neurotransmission cholinergique et les effets cognitifs.

V.3. Perspectives

De nombreuses perspectives peuvent être envisagées afin d'approfondir et de compléter les données relatives à l'impact d'une ingestion chronique d'uranium sur le cerveau et de connaître les mécanismes mis en jeu. L'une des principales questions qui reste à ce jour sans réponse définitive est l'explication du lien entre l'accumulation d'uranium dans l'hippocampe après contamination à l'uranium enrichi et le développement de troubles cognitifs qui sont associés à cette structure cérébrale.

Du fonctionnel au lésionnel

L'ensemble des résultats obtenus au laboratoire ne concerne que des études fonctionnelles (neurotransmetteurs, comportement, sommeil, ...). Une évaluation de l'impact lésionnel de l'uranium a donc été entreprise au travers d'études histologiques du cerveau. Deux temps de contamination ont été retenus : 1,5 et 9 mois. Dans l'état actuel des connaissances, pour la contamination UE, les recherches se concentrent sur l'hippocampe et l'hypothalamus. Pour l'UA, bien que le temps 1,5 mois puisse indiquer des lésions précoces, les principaux résultats sont attendus pour le temps 9 mois. A ce jour, aucune structure n'est privilégiée, hormis l'hippocampe et l'hypothalamus, à titre de comparaison avec l'UE.

Plusieurs niveaux d'exposition

La mise en place d'une expérimentation chronique à long terme, avec une quantité unique, mais en utilisant un radionucléide est une étude coûteuse et qui demande une gestion importante

(problème des déchets radioactifs, réduction du nombre de ces déchets). Néanmoins, il paraît aujourd'hui nécessaire de mettre en place plusieurs niveaux d'exposition dans le but d'approfondir l'origine des différences constatées entre les deux compositions isotopiques. Pour cela, deux types d'expérimentation peuvent être envisagés : des concentrations croissantes d'une seule composition isotopique ou des activités radiologiques croissantes. La première consisterait à augmenter le niveau d'exposition en uranium appauvri de façon à rejoindre, en terme d'activité absorbée quotidiennement, l'exposition à l'uranium enrichi (par exemple : U appauvri 40ppm > U appauvri 80ppm > U appauvri 120ppm > U appauvri 160ppm). La seconde consisterait, avec une quantité donnée d'uranium (40ppm) à augmenter le niveau d'activité radiologique de l'uranium utilisé (par exemple : U appauvri > U naturel > U enrichi à 2% > 3% > 5% > 10%). Des études pour un délai court (par exemple, 1,5 mois) menées à la fois sur le comportement, le dosage d'uranium et la mesure de l'activité acétylcholinestérase pourraient être une première approche.

Maladies neurodégénératives

Les systèmes de neurotransmission ont une place prépondérante dans l'évolution et l'aggravation des maladies neurodégénératives : le système cholinergique est impliqué dans la maladie d'Alzheimer et les monoamines, en particulier le système dopaminergique, sont des molécules de premier plan dans la maladie de Parkinson. D'après les résultats obtenus à long terme pour les monoamines et à court terme pour l'acétylcholinestérase, une étude de l'impact de l'uranium sur les maladies neurodégénératives, à l'aide de modèles animaux transgéniques, semble une voie intéressante de perspectives. En plus d'une information descriptive de l'effet de l'uranium sur de tels modèles cérébraux fragilisés, ces études pourraient apporter des renseignements sur les mécanismes d'action empruntés par l'uranium. Une étude sur un modèle murin d'Alzheimer a été engagée en 2004 et devrait apporter des réponses complémentaires aux résultats de l'étude présentée dans ce manuscrit.

Homéostasie des ions

D'un point de vue plus fondamental et dans la perspective d'expliquer les modifications observées sur les monoamines, il conviendrait de mener des études sur les éventuelles modifications de l'homéostasie des ions métalliques et des ions divalents au sein du cerveau après contamination chronique à l'uranium. En effet, ces ions divalents (calcium, fer, cuivre, zinc, magnésium) sont fondamentaux pour le fonctionnement du SNC et leur perturbation semble à l'origine de troubles cognitifs, notamment par le biais d'une altération de la neurotransmission (Takeda, 2004; Takeda, 2004). Au regard des résultats d'études menées sur la jonction neuromusculaire, l'ion uranylle, s'il parvient jusqu'au cerveau sous la forme d'ions divalents, pourrait entrer en compétition avec ces ions dans les processus physiologiques cérébraux et à terme, en perturber le fonctionnement.

Communications

Communications :

Ce travail a fait l'objet des communications suivantes :

Congrès :

Contamination de courte durée à l'uranium : Effet sur les métabolismes sérotoninergique et dopaminergique du système nerveux central chez le rat. C. Bussy, P. Lestaevel, D. Dhieux, C. Amourette, F. Paquet, P. Gourmelon and P. Houpert. Journées de l'école doctorale ABIES, INAPG, 8-9 Décembre 2003, Paris. (*poster*)

Chronic exposure to uranium affects the central nervous system of rats. C. Bussy, P. Lestaevel, S. Frelon, C. Amourette, F. Paquet, P. Gourmelon and P. Houpert. HEIR 2004, Health Effect of Incorporated Radionuclides, Nov. 29 – Dec. 2004, Neuherberg, Germany. (*poster + short presentation*)

Long term chronic ingestion of uranium in drinking water: effect on the neurochemistry in the rat brain. C. Bussy, P. Lestaevel, D. Dhieux, C. Amourette, F. Paquet, P. Gourmelon and P. Houpert. SETAC Europe, 15th annual meeting, May 22-26 2005, Lille, France. (*poster*)

Perturbation de l'activité de l'acétylcholinestérase après ingestion chronique d'uranium appauvri ou enrichi chez le rat. C. Bussy, P. Lestaevel, S. Frelon, D. Dhieux, C. Amourette, F. Paquet, P. Gourmelon and P. Houpert. 7^{ème} colloque internationale de radiobiologie fondamentale et appliquée (CIRFA), 19-23 septembre 2005, Orford, Québec, Canada. (*poster primé*)

Publication en premier auteur:

Chronic ingestion of uranium alters acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in rat brains. C. Bussy, P. Lestaevel, B. Dhieux, C. Amourette, F. Paquet, P. Gourmelon and P. Houpert ; *soumis pour publication dans la revue Neurotoxicology en Juin 2005.*

Short term exposure to depleted uranium: regional brain accumulation and alteration of monoaminergic neurotransmission. C. Bussy, P. Lestaevel, P. Houpert, S. Frelon, B. Dhieux, C. Maubert, F. Paquet, P. Gourmelon and C. Amourette; *soumis pour publication dans la revue Toxicology Letters en Sept. 2005.*

Chronic ingestion of uranium: effects of enriched uranium on cholinergic system and monoamine metabolism in discrete rat brain areas. C. Bussy, P. Lestaevel, S. Frelon, B. Dhieux, C. Amourette, F. Paquet, P. Gourmelon and P. Houpert ; *soumis pour publication dans la revue Toxicology Sciences en Sept. 2005.*

Publication en co-auteur:

Effect of U and ¹³⁷Cs chronic contamination on dopamine and serotonin metabolism in the central nervous system of the rat. P. Houpert P. Lestaevel, C. Amourette, B. Dhieux, C. Bussy, and F. Paquet, *presented as part of the 6e Colloque International de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée, Batz-sur-Mer, Loire Atlantique, France, 30 June – 4 July 2003 and in Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 82: 161-166, 2004.

Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations. M. Monleau, C. Bussy, P. Lestaevel, P. Houpert, F. Paquet and V. Chazel. *Neurotoxicology Letters*, 390 : 31-36, 2005.

The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. P. Lestaevel, P. Houpert, C. Bussy, B. Dhieux, P. Gourmelon and F. Paquet, *Toxicology*, 212 (2-3): 219-226, 2005.

Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat. P. Houpert, P. Lestaevel, C. Bussy, F. Paquet and P. Gourmelon. *Neurotoxicology*, *in press*, 2005.

Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to enriched uranium in rats. P. Lestaevel, C. Bussy, F. Paquet, B. Dhieux, D. Clarençon, P. Houpert and P. Gourmelon. ; *Neurotoxicology and Teratology*, *in press*, 2005.

Annexes

Annexes :

Annexe 1. Données relatives à la contamination aigue de $70\mu\text{g.g}^{-1}$.

Tableau n°A-1. Taux de protéines totales en mg sur le culot d'extrait tissulaire (structures droites) de monoamines, après une injection i.p. d'UA, $70\mu\text{g.kg}^{-1}$.

	ST	HI	CO	CE	HY
moyenne témoins	8,70	6,59	15,26	12,42	1,95
Ecart type	1,46	0,70	2,10	1,24	0,80
Erreur standard	0,33	0,16	0,47	0,28	0,18
n	20	20	20	20	20
moyenne UA $70\mu\text{g.kg}^{-1}$	7,7 *	6,52	14,59	12,53	1,82
Ecart type	1,13	0,65	1,43	1,73	0,84
Erreur standard	0,25	0,14	0,32	0,39	0,19
n	20	20	20	20	20

*différence significative entre les deux lots $p < 0,05$, Mann Whitney; HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex frontal, CE : cervelet, HY : hypothalamus.

Tableau n°B-1. Poids frais des structures cérébrales (gauches) en mg (dosage d'uranium), après une injection i.p. d'UA, $70\mu\text{g.kg}^{-1}$.

	ST	HI	CO	CE	Reste du cerveau
moyenne témoins	66,9	59,4	187,3	138,9	1078,1
Ecart type	9,8	7,1	20,3	18,4	119,1
Erreur standard	0,5	0,4	1,0	0,9	6,0
n	20	20	20	20	20
moyenne UA $70\mu\text{g.kg}^{-1}$	61,0 #	60,5	179,8	132,4	1125,1
Ecart type	8,0	5,7	16,6	19,4	203,8
Erreur standard	0,4	0,3	0,8	1,0	10,2
n	20	20	20	20	20

différence indicative $p < 0,10$ par rapport aux témoins, Mann Whitney, ST : striatum, HI : hippocampe, CO : cortex, CE : cervelet.

Annexe 2. Données relatives à la contamination chronique de 1,5 mois

Tableau n°A-2. Taux de protéines totales en mg sur le culot d'extrait tissulaire de monoamines (partie droite des structures cérébrales), après une contamination chronique à l'uranium de 1,5 mois à 40mg.L⁻¹.

	HI	ST	Cortex frontal	CE	HY	TC
moyenne témoins	5,98	4,25	12,82	12,92	1,20	13,47
Ecart type	0,59	0,50	1,45	1,08	0,29	1,64
Erreur standard	0,16	0,13	0,39	0,29	0,08	0,44
n	14	14	14	14	14	14
moyenne UA	5,91	4,24	12,92	13,33	1,00	13,31
Ecart type	0,44	0,94	1,36	0,71	0,26	2,16
Erreur standard	0,13	0,27	0,39	0,20	0,08	0,62
n	12	12	12	12	12	12
moyenne UE	5,46	4,38	12,53	12,51	0,95	13,07
Ecart type	0,73	0,88	0,92	1,46	0,29	1,71
Erreur standard	0,21	0,25	0,27	0,42	0,08	0,49
n	12	12	12	12	12	12

HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex frontal, CE : cervelet, HY : hypothalamus, TC : tronc cérébral.

Tableau n°B-2. Taux de protéines en mg sur le surnageant d'extrait tissulaire pour la mesure d'activité ChE (partie gauche des structures cérébrales), après une contamination chronique à l'uranium de 1,5 mois à 40mg.L⁻¹.

	HI	CO	CE	ST
moyenne témoins	2,14	6,33	7,03	1,23
Ecart type	0,47	1,17	1,10	0,25
Erreur standard	0,12	0,34	0,32	0,07
n	14	14	14	14
moyenne UA	2,04	7,47 #	6,91	1,30
Ecart type	0,45	1,59	0,79	0,36
Erreur standard	0,13	0,46	0,23	0,10
n	12	12	12	12
moyenne UE	1,89	6,59	7,56	1,40
Ecart type	0,34	1,21	1,14	0,19
Erreur standard	0,10	0,35	0,33	0,05
n	12	12	12	12

différence indicative par rapport aux témoins $p < 0,1$ Mann Whitney. HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex frontal, CE : cervelet.

Tableau n°C-2. Poids frais des structures cérébrales en mg (dosage d'uranium), après une contamination chronique de 1,5 mois à l'uranium à 40mg.L⁻¹.

	HI	ST	CO	CE	HY	TC
moyenne témoins	130	79,32	976,12	328,88	22,74	557,58
Ecart type	19,57	14,03	45,95	37,12	8,31	68,77
Erreur standard	6,19	4,44	14,53	11,74	2,63	21,75
n	10	10	10	10	10	10
moyenne UA	120,90	72,25	1006,20 #	343,80	16,28 #	598,90
Ecart type	9,26	9,32	36,72	20,44	4,75	22,44
Erreur standard	2,93	2,95	11,61	6,46	1,50	7,10
n	10	10	10	10	10	10
moyenne UE	123,75	78,01	1000,08	344,97	22,27	575,71
Ecart type	9,82	19,67	105,99	21,18	8,01	46,49
Erreur standard	3,11	6,22	33,52	6,70	2,53	14,70
n	10	10	10	10	10	10

différence indicative par rapport aux témoins p< 0,1 Mann Whitney. HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex frontal, CE : cervelet, HY : hypothalamus, TC : tronc cérébral.

Annexe 3. Données relatives à la contamination chronique de 6 mois

Tableau n°A-3. Taux de protéines totales en mg sur le culot d'extrait tissulaire de monoamines (partie droite des structures cérébrales), après une contamination chronique à l'uranium de 6 mois à 40mg.L⁻¹.

	HI	ST	CO	CE	HY
moyenne témoins	5,71	7,16	11,99	15,97	1,27
Ecart type	0,73	1,69	1,15	1,60	0,80
Erreur standard	0,26	0,60	0,41	0,57	0,28
n	8	8	8	8	8
moyenne UA	6,01	7,31	12,88	14,98	1,08
Ecart type	0,83	1,93	2,62	3,26	0,60
Erreur standard	0,29	0,68	0,93	1,15	0,21
n	8	8	8	8	8

HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex frontal, CE : cervelet, HY : hypothalamus.

Tableau n°B-3. Taux de protéines en mg sur le surnageant d'extrait tissulaire pour la mesure d'activité ChE (partie gauche des structures cérébrales), après une contamination chronique à l'uranium de 6 mois à 40mg.L⁻¹.

	HI	CO	CE	ST
moyenne témoins	1,62	4,88	6,09	1,65
Ecart type	0,24	1,09	1,30	0,55
Erreur standard	0,08	0,38	0,46	0,20
n	8	8	8	8
moyenne UA	1,73 #	5,03	6,71	1,43
Ecart type	0,36	1,72	1,51	0,45
Erreur standard	0,13	0,61	0,53	0,16
n	7	7	7	7

différence indicative par rapport aux témoins p<0,1 Mann Whitney. HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex frontal, CE : cervelet.

Annexe 4. Données relatives à la contamination chronique de 9 mois

Tableau n°A-4. Taux de protéines totales en mg sur le culot d'extrait tissulaire de monoamines (partie droite des structures cérébrales), après une contamination chronique à l'uranium de 9 mois à 40mg.L⁻¹.

	HI	ST	CO	CE	HY
moyenne témoins	6,43	6,97	11,60	17,43	1,39
Ecart type	0,75	1,59	2,60	2,06	0,42
Erreur standard	0,18	0,38	0,61	0,49	0,10
n	18	18	18	18	18
moyenne UA	6,55	7,83	11,93	19,28	1,46
Ecart type	1,06	1,54	2,26	1,87	0,51
Erreur standard	0,31	0,44	0,65	0,54	0,15
n	10	10	10	10	10
moyenne UE	6,57	7,39	9,96	17,52	1,59
Ecart type	0,87	1,47	1,94	2,40	0,52
Erreur standard	0,28	0,46	0,61	0,76	0,16
n	12	12	12	12	12

HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex frontal, CE : cervelet, HY : hypothalamus.

Tableau n°B-4. Taux de protéines en mg sur le surnageant d'extrait tissulaire pour la mesure d'activité ChE (partie gauche des structures cérébrales), après une contamination chronique à l'uranium de 9 mois à 40mg.L⁻¹.

	HI	CO	CE	ST
moyenne témoins	2,23	3,99	5,93	1,92
Ecart type	0,48	1,19	1,13	0,56
Erreur standard	0,12	0,30	0,28	0,14
n	16	16	16	16
moyenne UA	2,40	4,40	5,55	1,79
Ecart type	0,51	1,63	0,77	0,36
Erreur standard	0,16	0,52	0,24	0,11
n	10	10	10	10
moyenne UE	2,54	4,16	5,34	1,94
Ecart type	0,46	0,93	0,61	0,33
Erreur standard	0,19	0,38	0,25	0,13
n	6	6	6	6

HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex frontal, CE : cervelet.

Tableau n°C-4. Poids frais des structures cérébrales en mg (dosage d'uranium), après une contamination chronique de 9 mois à l'uranium enrichi à 40mg.L⁻¹.

	HI	ST	CO	CE	HY	Reste du cerveau
moyenne témoins	107,12	85,72	274,92	340,37	10,02	1478,33
Ecart type	9,36	10,52	46,17	29,22	2,16	83,30
Erreur standard	3,82	4,29	18,85	11,93	0,88	34,01
n	6	6	6	6	6	6
moyenne UE	105,45	72,78 #	273,93	327,58	10,05	1388,28
Ecart type	9,80	10,03	40,24	21,61	1,85	66,31
Erreur standard	4,00	4,09	16,43	8,82	0,75	27,07
n	8	8	8	8	8	8

différence indicative par rapport aux témoins $p < 0,1$ Mann Whitney. HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex frontal, CE : cervelet, HY : hypothalamus.

Tableau n°D-4. Poids frais des structures cérébrales en mg (dosage d'uranium), après une contamination chronique de 9 mois à l'uranium enrichi à 40mg.L⁻¹.

	OL	SP	TH	MB	HI	ST	CO	CE	HY	TC
moyenne témoins	146,06	79,69	159,90	147,73	123,06	102,05	798,92	328,50	13,10	220,56
Ecart type	30,64	30,64	33,80	28,25	11,30	10,29	60,31	20,27	3,82	20,64
Erreur standard	9,69	9,69	10,69	8,93	3,57	3,26	19,07	6,41	1,21	6,53
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
moyenne UA	160,63	64,69	164,10	136,13	126,15	100,49	781,95	317,32	12,06	238,57
Ecart type	19,60	13,83	21,05	32,68	10,66	10,59	37,76	31,09	3,42	56,04
Erreur standard	6,20	4,37	6,66	10,33	3,37	3,35	11,94	9,83	1,08	17,72
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

OL : bulbe+tubercule olfactif, SP : septum, TH : ≈thalamus, MB : midbrain, HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex total, CE : cervelet, HY : hypothalamus, TC : tronc cérébral. structures symétriques droite et gauche + structure asymétrique complète.

Annexe 5. Données relatives à la contamination chronique de 18 mois

Tableau n°A-5. Taux de protéines totales en mg sur le culot d'extrait tissulaire de monoamines (partie droite des structures cérébrales), après une contamination chronique à l'uranium de 18 mois à 40mg.L⁻¹.

	HI	ST	CO	CE	HY
moyenne témoins	6,15	7,97	10,94	13,35	0,99
Ecart type	0,82	2,05	1,61	3,78	0,43
Erreur standard	0,27	0,68	0,54	1,19	0,14
n	8	8	8	8	8
moyenne UE	6,62	9,08	11,23	13,92	1,81 #
Ecart type	1,14	2,89	2,72	3,25	1,02
Erreur standard	0,34	0,87	0,82	1,03	0,31
n	11	11	11	11	11

différence indicative par rapport aux témoins $p < 0,1$ Mann Whitney. HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex frontal, CE : cervelet, HY : hypothalamus.

Tableau n°B-5. Taux de protéines en mg sur le surnageant d'extrait tissulaire pour la mesure d'activité ChE (partie gauche des structures cérébrales), après une contamination chronique à l'uranium de 18 mois à 40mg.L⁻¹.

	HI	CO	CE	ST
moyenne témoins	2,46	5,01	4,32	1,96
Ecart type	0,53	0,94	1,29	0,62
Erreur standard	0,19	0,42	0,58	0,28
n	7	7	7	7
moyenne UE	2,45	4,24	4,91	1,90
Ecart type	0,95	0,83	1,04	0,49
Erreur standard	0,39	0,34	0,43	0,20
n	8	8	8	8

HI : hippocampe, ST : striatum, CO : cortex frontal, CE : cervelet.

Annexe 6. Poids des reins et fémurs aux différents temps

Poids des reins et fémurs en g pour les différents temps de contamination chronique.

		1,5 mois	6 mois	9 mois
REINS	moyenne témoins	3,64	4,34	4,16
	Ecart type	0,27	0,56	0,56
	Erreur standard	0,09	0,23	0,23
	n	10	6	6
	moyenne UA	3,78	3,86	4,24
	Ecart type	0,37	0,13	0,33
	Erreur standard	0,12	0,05	0,14
	n	10	6	6
	moyenne UE	3,78		3,44
	Ecart type	0,57		1,49
	Erreur standard	0,18		0,61
	n	10		6
FEMURS	moyenne témoins	3,23	4,62	4,52
	Ecart type	0,60	0,44	0,33
	Erreur standard	0,19	0,18	0,13
	n	10	6	6
	moyenne UA	3,61	4,54	4,85
	Ecart type	0,53	0,50	0,56
	Erreur standard	0,17	0,21	0,23
	n	10	6	6
	moyenne UE	3,98		4,78
	Ecart type	0,77		0,32
	Erreur standard	0,24		0,13
	n	10		6

Annexe 7. Paramètres de mesures pour les différentes techniques analytiques (critères-conditions d'acceptabilité des résultats).

A-7. Paramètres de dosages des monoamines par HPLC-ECD.

Exemple d'un dosage de monoamines dans un échantillon de striatum d'un rat contaminé pendant 1,5 mois à l'uranium appauvri (cf. annexe 8, exemple de données brutes).

- Paramètres instrumentaux :
 - Débit : 1,1mL.min⁻¹.
 - Pression : 270 Bar.
 - Température : 30°C.
 - Volume d'injection : 30µL.
 - Voltage appliqué aux électrodes : E1=+100mV et E2=+400mV, chromatogramme intégré sur E2.
- Paramètres de calibration :
 - La gamme de calibration est composée d'un mélange complexe de 7 composés standards, p.ex. dopamine de chez Sigma Aldrich, et de 8 points de concentrations différentes de ce mélange. Les deux points les plus haut de la gamme sont pour chaque composé au delà de la concentration maximal du composé dans les échantillons à doser (évaluer au cours d'une phase de test).
 - Le temps de rétention (TR) pour un composé standard donné doit être identique (**+/- 0,02min**) sur chaque point de la gamme.
 - La gamme est validée si tous les coefficients de corrélation R² de chacune des droites de calibration (1 droite de calibration par composé, c-à-d 8 droites de calibration) sont compris entre **0,985 et 1**.
- Paramètres d'un chromatogramme (p.ex. le chromatogramme représenté figure n°16) :
 - Le pic correspondant à un composé est intégré manuellement sous le logiciel Borwin si et seulement si le TR du pic est sensiblement identique (**+/-0,02min**) à celui de la gamme correspondante à ce composé.

Critère de séparation des pics	3,4 DHBA	DA	DOPAC	5HIAA	3MT	5HT	HVA
Temps de rétention (min)	6,25	9,25	10,42	18,27	23,01	24,87	27,86
Volume de rétention (mL)	6,875	10,175	11,642	20,097	25,311	27,357	30,646
Facteur de capacité	1,75	3,07	3,59	7,04	9,13	9,96	11,27
Efficacité	516	1369	2714	3418	5422	3055	5518
Sélectivité, pour deux pics voisins (correcte si $\alpha > 1,01$)		1,75	1,17	1,96	1,30	1,09	1,13
Résolution, pour 2 pics voisins, (insuffisante si $R_s < 0,8$)		2,86	1,3	7,66	3,79	1,22	1,81

B-7. Paramètres de dosages des protéines par spectrophotomètre DU7500 (également utilisé pour les mesures d'activité ChE). *Exemple d'un dosage de protéines dans un culot d'extraction de monoamines dans le striatum d'un rat contaminé pendant 1,5 mois à l'uranium appauvri (cf. annexe 9, exemple de données brutes).*

- Paramètres instrumentaux d'émission :
 - Domaine spectrale d'application : 190 à 800 nm.
 - Sensibilité (précision) de la mesure de longueur d'onde : +/- 1,25 nm
 - Résolution : inférieur à 2 nm
 - Reproductibilité -répétitivité de la mesure : différence entre les mesures < 0,05 nm.
- Paramètres instrumentaux d'absorbance :
 - Bruit de fond de l'absorbance à 340 nm : en moyenne < 0,0002 A rms
 - Stabilité du signal : variation d'absorbance entre deux mesures prises à 60 mins d'intervalle : < 0,002 A
- Paramètres de l'échantillon mesuré :
 - Moyenne des mesures de D.O. (sur 4 mesures) : 0,2579 +/- 0,013
 - Equation de la droite de calibration (gamme BSA) : $Y=3,286 X + 0,0309$
 - R^2 , coefficient de corrélation de la droite de calibration BSA : 0,9976 (**doit être entre 0,980 et 0,999**).
 - Concentration en protéines de l'échantillon : 0,878605 +/- 0,073854 mg.mL⁻¹

C-7. Paramètres de dosage de l'uranium par KPA-11.

Exemple d'un dosage d'uranium dans un rein de rat contaminé pendant 1,5 mois à l'uranium enrichi

- Paramètres instrumentaux d'émission :
 - Pulse du LASER : 1000
 - Temps de comptage de la décroissance de phosphorescence (Time gate) : 52µs
- Paramètres de l'échantillon mesuré :
 - Rapport de l'intensité du signal sur l'intensité de la calibration (Reference ratio) : 0,99 (**doit être proche de 1 ou au moins > 0,8**)
 - Durée de vie de la phosphorescence de l'uranium (Lifetime) : 264 +/- 0,621µs (**très bon entre 250 et 300 et bon entre 150 et 250**)
 - R^2 , coefficient de corrélation de la droite de régression de la décroissance de la phosphorescence : 0,9998 (**doit être entre 0,97 et 1**)
 - Equation de la droite de calibration $Y=1,46.10^{+4} X + 48,527$
 - Intensité du signal : 40281
 - Concentration en uranium de l'échantillon : 3,45026 +/- 0,1414 µg.L⁻¹

D-7. Paramètres de dosage de l'uranium par ICPMS-VGPQ Excell.

Exemple d'un dosage d'uranium dans le cervelet de rat contaminé en intra péritonéale ($70\mu\text{g.kg}^{-1}$) (cf. annexe 10, exemple de données brutes).

- Paramètres de calibration :
 - Droite de calibration ^{238}U : sensibilité = 207 897,013315 et $R^2=1,0000000$
 - Droite de calibration ^{235}U : sensibilité = 218 108,930644 et $R^2=1,0000000$
 - Moyenne du nombre de coups sur la solution étalon à 1ppb de bismuth (sur 10 mesures) : 211 462,660 +/- 1412,575 (**doit être > 110 000 coups, très bon lorsque compris entre 160 000 et 250 000 coups**)
 - % RSD, répétitivité de la mesure avec 1ppb de bismuth (sur 10 mesures) : 0,668 (**doit être < 3%**)
 - Moyenne du nombre de coups sur la solution étalon à 1ppb de ^{238}U (sur 10 mesures) : 236987,370 +/- 1657,277 (**doit être identique au résultat obtenu pour le bismuth**)
 - % RSD avec 1ppb de ^{238}U (sur 10 mesures) : 0,699 (**doit être < 3%**)
- Paramètres de l'échantillon mesuré (nombres de coups détectés) :
 - Moyenne sur 5 mesures (blanc, acide) : 232,847 +/- 6,880 avec %RSD 2,955 en bismuth
 - Moyenne sur 5 mesures (blanc, acide) : 389,962 +/- 6,915 avec %RSD 1,773 en ^{238}U
 - Moyenne sur 5 mesures (échantillon 1) : 168 993,980 +/- 1160,311 avec %RSD 0,687 Bi
 - Moyenne sur 5 mesures (échantillon 1) : 13 818,487 +/- 233,836 avec %RSD 1,692 ^{238}U
 - Moyenne sur 5 mesures (échantillon 2) : 173 193,760 +/- 1936,936 avec %RSD 1,118 Bi
 - Moyenne sur 5 mesures (échantillon 2) : 545 343,740 +/- 10301,540 avec %RSD 1,884 ^{238}U

Annexe 8. Exemple de données brutes de dosage électrochimique.

Données brutes de concentration des composés monoaminergiques (ng.mL⁻¹) obtenues après intégration des chromatogrammes sur le logiciel Borwin®, pour le striatum, après 1,5 mois de contamination chronique, avant correction par le rendement d'extraction (taux de 3-4DHBA dosé / taux de 3-4DHBA utilisé (= 200 ng.mL⁻¹)) et avant rapport sur le taux de protéines, mesuré sur le culot d'extraction de chaque structure cérébrale.

numéro de fichier chromatogramme	numéro du rat	concentrations de composés en ng.mL-1						
		3-4DHBA	DA	DOPAC	3MT	HVA	5HT	5HIAA
Contamination uranium enrichi								
C01ST202.CH2	UE16	199,3235	468,7947	42,7233	22,2034	22,6613	16,1332	12,3053
C04ST202.CH2	UE22	178,4952	396,338	37,2743	20,8398	25,1015	19,6497	12,9714
C07ST202.CH2	UE13	173,9254	394,0433	37,7834	18,4911	23,1596	16,999	11,6465
C10ST202.CH2	UE19	176,4672	344,7729	40,7647	19,3199	15,3054	14,9898	10,5605
C13ST202.CH2	UE15	180,8471	402,7054	35,3167	21,2086	18,9372	20,0358	12,7275
C17ST202.CH2	UE23	182,821	375,7525	32,3905	17,2015	14,3171	14,5149	8,9329
C18ST202.CH2	UE18	182,2362	324,9176	27,9862	19,9015	15,9385	14,2352	8,8859
C22ST202.CH2	UE24	206,9735	511,4025	42,5248	26,9627	20,7749	27,8311	17,2643
C28ST202.CH2	UE21	228,1569	440,0519	42,1046	21,4912	17,4629	24,5606	15,7296
C31ST202.CH2	UE14	212,693	396,0297	34,8762	20,4608	17,5113	18,2494	11,5571
C33ST202.CH2	UE26	206,2136	481,9797	45,9757	21,1101	18,4642	20,3634	13,5314
C37ST202.CH2	UE17	186,194	335,9396	38,07	17,1537	13,2622	12,976	9,3863
Contamination uranium appauvri								
C02ST202.CH2	UA09	174,4811	415,2668	37,0305	23,9492	24,7669	22,415	15,7949
C05ST202.CH2	UA03	179,7163	419,8049	39,5741	23,7125	20,144	21,8735	13,1003
C08ST202.CH2	UA01	179,5701	368,4621	39,0569	19,2105	22,4335	14,6386	10,9165
C12ST202.CH2	UA11	181,7278	321,7997	32,1101	20,8858	12,6491	19,789	12,5869
C14ST202.CH2	UA05	178,7421	244,3097	28,3283	11,9891	10,4612	11,6965	8,2978
C16ST202.CH2	UA02	176,293	346,3259	34,7827	17,3806	13,1554	14,3054	9,517
C20ST202.CH2	UA08	184,1754	365,1829	29,9201	16,1375	14,1622	17,295	10,6145
C23ST202.CH2	UA06	196,5741	470,3871	36,3765	21,3122	14,5926	16,928	10,968
C26ST202.CH2	UA07	228,8702	531,6406	46,9789	28,194	22,1012	26,0482	18,026
C29ST202.CH2	U04	199,8998	297,8732	28,3693	14,924	9,8974	12,9317	9,5544
C32ST202.CH2	UA10	205,4195	379,5299	34,2897	15,4681	13,9447	16,6956	11,7743
C35ST202.CH2	UA12	190,6519	297,6179	34,6316	14,3055	15,8108	12,7531	10,3089
Témoïn								
C03ST202.CH2	TE35	186,3164	423,2064	39,4307	20,4839	23,7642	19,0598	13,1273
C06ST202.CH2	TE27	187,4505	421,4687	38,4583	24,1781	20,7906	21,8017	16,0561
C09ST202.CH2	TE32	182,7191	411,9097	49,4003	20,9246	17,9252	20,415	15,1798
C11ST202.CH2	TE28	183,1946	332,7194	31,7919	17,2341	12,7211	15,4394	9,7146
C15ST202.CH2	TE34	183,6414	270,8581	32,4799	15,6164	11,35	13,3499	9,2044
C19ST202.CH2	TE30	222,4463	440,3656	36,8789	20,657	13,2794	17,5735	12,3884
C21ST202.CH2	TE31	255,2708	556,0047	51,4266	25,9814	19,4509	23,9516	14,8765
C24ST202.CH2	TE25	215,3635	540,488	50,9718	25,6531	21,0199	24,971	17,4623
C25ST202.CH2	TE33	221,6678	353,174	27,4945	16,9366	12,609	12,7599	9,0286
C27ST202.CH2	TE37	218,4893	433,5858	39,7186	25,9376	19,466	23,5313	15,4751
C30ST202.CH2	TE26	181,1678	343,6653	36,0238	16,4948	16,1253	15,8585	11,0728
C34ST202.CH2	TE29	192,9914	448,6286	35,6175	19,8481	16,1918	17,2973	10,3351
C36ST202.CH2	TE36	168,5942	387,0418	37,0539	17,6729	15,8649	17,9105	12,078
C38ST202.CH2	TE38	179,8849	423,5517	36,4002	18,4569	16,4159	18,7523	12,7976

Annexe 9. Exemple de données brutes de mesure de l'activité ChE.

Données brutes de mesures de l'activité acetylcholinestérase (μmol de substrat hydrolysé par min) obtenues dans le striatum, après 1,5 mois de contamination chronique, avant de rapporter le résultat au taux de protéines mesuré dans le surnageant d'extraction de chaque structure cérébrale. Le résultat brut est obtenu par calcul à partir de la moyenne d'absorbance sur deux mesures de cinétique enzymatique de 10 min (1 échantillon cérébral = 2 fois 10 min de cinétique).

Numéro du rat	Moyenne de l'absorbance dA/min	Résultats bruts	Numéro du rat	Moyenne de l'absorbance dA/min	Résultats bruts	Numéro du rat	Moyenne de l'absorbance dA/min	Résultats bruts
Contamination uranium enrichi			Contamination uranium appauvri			Témoin		
UE16	0,1135	262,11	UA09	0,13405	309,425	TE35	0,16525	381,48
UE22	0,1504	347,19	UA03	0,1257	290,245	TE27	0,15725	362,965
UE13	0,14605	337,085	UA01	0,1357	313,225	TE32	0,1443	333,065
UE19	0,1522	351,355	UA11	0,1544	356,49	TE28	0,14135	326,305
UE15	0,14055	324,39	UA05	0,14305	330,205	TE34	0,1553	358,485
UE23	0,14835	342,455	UA02	0,1438	331,85	TE30	0,13625	314,52
UE18	0,13	300,11	UA08	0,1333	307,685	TE31	0,1479	341,345
UE24	0,1403	323,945	UA06	0,14805	341,735	TE25	0,1437	331,68
UE21	0,1475	340,51	UA07	0,15075	348,04	TE33	0,1569	362,205
UE14	0,1574	363,3	UA04	0,1579	364,4	TE37	0,14425	333,045
UE20	0,17065	393,91	UA10	0,1441	332,695	TE26	0,15035	347,135
UE17	0,16275	375,63	UA12	0,14395	332,235	TE29	0,162	373,995
						TE36	0,1474	340,305
						TE38	0,15955	368,205

Annexe 10. Exemple de données brutes de dosage de l'uranium par ICP-MS.

Données brutes de dosage de l'uranium par ICP-MS dans des échantillons de cervelet. Les résultats bruts sont présentés en nombre de coups avant traitement mathématique qui permet de convertir ce nombre de coups en ng.L^{-1} et avant d'être rapporté au poids frais de l'échantillon dosé.

Run	Label	TimeStamp	209Bi	234U	235U	238U
1	1ppb	09/08/2005 14:06:17	21000,060	2,400	501,477	236392,740
2	1ppb	09/08/2005 14:07:13	214386,820	1,867	503,610	239181,950
3	1ppb	09/08/2005 14:08:09	211093,030	2,800	500,143	238107,050
4	1ppb	09/08/2005 14:09:05	212398,010	2,667	508,077	238126,520
5	1ppb	09/08/2005 14:10:01	210602,190	2,800	518,011	235070,800
6	1ppb	09/08/2005 14:10:58	210900,460	1,067	500,210	235093,310
7	1ppb	09/08/2005 14:11:54	209860,640	2,267	501,810	238382,330
8	1ppb	09/08/2005 14:12:50	210594,840	2,000	498,943	235263,310
9	1ppb	09/08/2005 14:13:46	212661,020	2,400	504,944	238673,720
10	1ppb	09/08/2005 14:14:42	212129,570	1,867	494,943	235581,960
	Mean of 1ppb	09/08/2005 14:06:17	211462,660	2,213	503,217	236987,370
	SD of 1ppb		1412,575	0,534	6,288	1657,277
	%RSD of 1ppb		0,668	24,130	1,250	0,699
1	bic	09/08/2005 14:18:23	920,701	0,533	3,467	515,744
2	bic	09/08/2005 14:19:19	790,558	0,400	2,867	448,941
3	bic	09/08/2005 14:20:15	684,685	0,800	3,600	381,339
	Mean of bic	09/08/2005 14:18:23	798,648	0,578	3,311	448,675
	SD of bic		118,215	0,204	0,391	67,203
	%RSD of bic		14,802	35,251	11,798	14,978
1	bic	09/08/2005 14:27:16	235,336	0,667	2,467	385,073
2	bic	09/08/2005 14:28:12	238,136	0,133	3,133	386,939
3	bic	09/08/2005 14:29:09	225,069	0,533	2,400	397,873
	Mean of bic	09/08/2005 14:27:16	232,847	0,444	2,667	389,962
	SD of bic		6,880	0,278	0,406	6,915
	%RSD of bic		2,955	62,450	15,207	1,773
1	bic	09/08/2005 14:32:51	177,868	0,533	3,200	372,139
	Analyte Dilution Conc.		Mass Uncorrected ICPS	Analyte ICPS	Survey Analyte Uncorrected ICPS	Survey Analyte ICPS
1	CE 15-Aig	09/08/2005 16:04:37	174783,450	8,933	1480,554	552403,000
2	CE 15-Aig	09/08/2005 16:05:33	172762,960	8,267	1481,621	544300,580
3	CE 15-Aig	09/08/2005 16:06:30	170630,510	7,333	1444,084	531169,950
4	CE 15-Aig	09/08/2005 16:07:26	174598,120	6,933	1501,957	553501,410
	Mean of CE 15-Aig	09/08/2005 16:04:37	173193,760	7,867	1477,054	545343,740
	SD of CE 15-Aig		1936,936	0,904	24,085	10301,540
	%RSD of CE 15-Aig		1,118	11,495	1,631	1,889
1	CE 23-Aig	09/08/2005 16:11:06	173446,080	1,067	99,200	26647,092
2	CE 23-Aig	09/08/2005 16:12:02	176230,940	1,067	89,000	27061,991
3	CE 23-Aig	09/08/2005 16:12:58	174840,370	0,800	90,400	26936,118
4	CE 23-Aig	09/08/2005 16:13:55	175594,510	2,000	88,267	27140,564
	Mean of CE 23-Aig	09/08/2005 16:11:06	175027,970	1,233	91,717	26946,441
	SD of CE 23-Aig		1198,010	0,526	5,067	216,604
	%RSD of CE 23-Aig		0,684	42,676	5,524	0,804
1	CE 24-Aig	09/08/2005 16:17:35	170682,240	1,067	59,133	14155,894
2	CE 24-Aig	09/08/2005 16:18:32	168446,710	0,933	55,733	13780,539
3	CE 24-Aig	09/08/2005 16:19:28	168768,680	1,067	55,067	13713,002
4	CE 24-Aig	09/08/2005 16:20:24	168078,290	1,067	53,000	13624,511
	Mean of CE 24-Aig	09/08/2005 16:17:35	168993,980	1,033	55,733	13818,487
	SD of CE 24-Aig		1160,311	0,067	2,548	233,836
	%RSD of CE 24-Aig		0,687	6,452	4,572	1,692

Annexe 11. Procédures de microdissection de l'encéphale, adaptée de la méthode de Glowinski et Iversen 1966.

Placer le cerveau sur sa face ventrale, l'avant vers le manipulateur.

1. ôter les bulbes olfactifs.
2. écarter les hémisphères aux disséqueurs.
3. passer l'un des disséqueurs sous les corps calleux (CC).
4. couper les CC avec le second instrument.
5. bien écarter la partie avant des hémisphères cérébraux
6. introduire les disséqueurs de part et d'autre des *septa lateralis* en plongeant la pointe à mi-longueur de la structure.
7. faire réaliser un arc de cercle aux pointes en passant sous le *striatum*, longer alors la commissure antérieure. Bien appuyer jusqu'au fond.
8. couper en haut des *septa lateralis* et entraîner tout le bloc.

Pour les hippocampes

1. après avoir pris soin de détChEr, en postérieur, l'hémisphère cérébral (lieu où il est logé), des vaisseaux et débris de méninges qui le retiennent au niveau des *colliculi superior*, faire glisser doucement les structures hippocampes de leurs logements.
2. ôter le cortex enthorinal qui pourrait adhérer à l'hippocampe.

Pour les striata

1. bien écarter le cortex antérieur, réaliser l'incision entre le striatum et le thalamus.
2. maintenir le cortex décroché avec le disséqueur gauche et faire rouler le striatum avec celui de droite.

Pour l'hypothalamus et le thalamus

1. retourner l'encéphale partie antérieure-rostrale toujours dirigée vers l'expérimentateur
2. couper centralement, mais superficiellement.
3. ôter l'hypothalamus, en 2 parties (qui sont assez superficielles et ont la forme de petites poires).
4. couper au niveau des noyaux inter-pédonculaires (vers la partie postérieure du bloc restant)
5. écarter la substance noire (forme ovale apparaissant bien blanche)
6. on voit un mince filet blanc (faisceaux médian du télencéphale)
7. couper à l'avant de la substance blanche (thalamus ôté en deux blocs)
8. lorsque l'on retourne le bloc restant, on doit avoir coupé en avant des colliculi

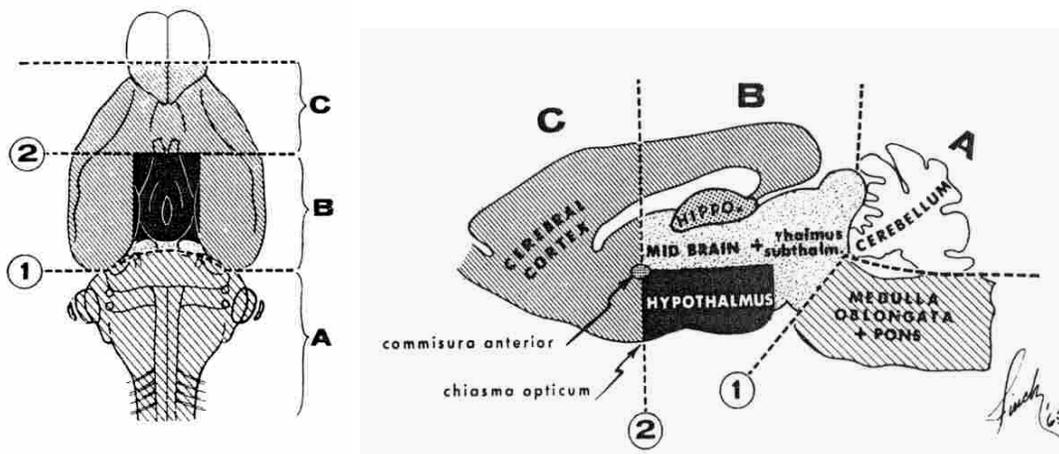
Pour le cortex frontal

Le cortex est coupé au niveau de l'artère cérébrale centrale (carotide interne).

Annexe 12. Méthode de Glowinski et Iversen 1966.

Le rat sera préalablement assommé et décapité dans l'instant. Le cerveau est extrait de sa loge crânienne et maintenu dans un état de semi-congélation dans la glace. La dissection se pratique sur une plaque de verre refroidie par contact avec de la glace.

1. les lobes olfactifs sont enlevés dès le départ
2. la partie rhombencéphale (métencéphale et myélocéphale) est séparée d'un bloc A que l'on découpe ensuite en 2 parties, à savoir le cervelet (supérieur) et la moelle associée au pont (inférieur)
3. l'encéphale est retourné : une section transverse totale est faite au niveau du chiasma optique, cela démarque la partie antérieure de l'hypothalamus. En profondeur, la section doit passer par les commissures antérieures. (= on obtient les blocs B et C)
4. l'hypothalamus est alors séparé en prenant comme repère antérieur et horizontal pour la coupe, les commissures antérieures. La limite postérieure est donnée par l'hypothalamus postérieur
5. le striatum B est isolé par découpe au niveau du bord externe du ventricule latéral (limite interne) et au niveau du corps calleux pour limite externe.
6. le striatum C est isolé de la même façon
7. l'hippocampe/ cortex B est séparé du cerveau moyen B. L'hippocampe est alors isolé du cortex B.
8. le cortex total est obtenu en combinant la partie B avec la partie C



D'après Glowinski et Iversen 1966

Annexe 13. Procédures de fixation biologique par perfusion vasculaire intracardiaque.

La perfusion vasculaire est reconnue comme la meilleure technique de fixation des tissus, notamment pour le tissu cérébral, très sensible à la manipulation et sujet aux artéfacts anoxiques. La méthode décrite ci-dessous est conforme à celle rapportée dans l'ouvrage collectif de JP Cassella, JHay et SJ Lawson (Cassella *et al.*, 1997).

1. Anesthésier le rat avec du pentobarbital sodique (130 μ L pour 100g de rat) injecté en i.p.. Vérifier le réflexe de la patte arrière (pincement), tant que le rat réagit au pincement, attendre.
2. Bien positionner l'animal sur sa face dorsale et s'assurer qu'il puisse respirer correctement. Arroser le pelage ventral avec de l'alcool 70°. *Attention : la température de l'alcool (plus froide que celle du corps) peut provoquer un réflexe d'ébrouement du rat. Si c'est le cas attendre encore un peu que l'anesthésique fasse plein effet.*
3. Dégager le pelage longitudinalement depuis la base de l'abdomen vers le haut de la cage thoracique en passant entre les couches dermique et musculaire.
4. Au centre, à la hauteur du foie, inciser l'abdomen en entrant dans la cavité péritonéale. Pratiquer deux incisions latérales pour dégager la paroi abdominale jusqu'au sternum puis la cage thoracique (en découpant les côtes jusqu'à la base du cou). Clamper le processus xiphoïde et poser le clamp à l'avant du rat. *Le cœur est visible et bat encore. Attention : l'incision de la cage thoracique et la découpe du diaphragme provoquent l'arrêt de la respiration. Les étapes suivantes doivent donc être pratiquées avec diligence.*
5. Prendre le cœur « battant » avec une pince à dissection et introduire le trocart-aiguille du cathéter dans le ventricule gauche du cœur en visant l'aorte. Retirer l'aiguille. Positionner l'extrémité du trocart dans l'aorte (par transparence). Le sang s'écoule par le cathéter que l'on peut maintenant brancher sur l'arrivée de la pompe péristaltique.
6. Mettre en marche la perfusion de la solution de préfixation (héparine) à la vitesse de 10 mL par min. Dès lors, couper l'oreillette droite du cœur et passer à la vitesse de 25mL par min. *Le sang s'écoule par l'oreillette et devient de plus en plus fluide.*
7. le cathéter est maintenu en position par les ailettes du trocart. La solution de rinçage est perfusée à la vitesse de 25mL/min en respectant l'équation : volume en mL=10% du poids en g.
8. Basculer ensuite la pompe sur la solution de fixation toujours à la vitesse de 25mL par min en respectant l'équation : volume en mL=poids en g. Une « bonne fixation » se traduit généralement par une réaction musculaire générale lors de la perfusion (le rat se met en extension).

Annexe 14. Protocole de fixation des cerveaux avant immunohistologie.

Le rat est anesthésié par injection i.p. de pentobarbital de sodium (Ceva santé animale, Libourne, France, 1,3mL/kg de poids corporel).

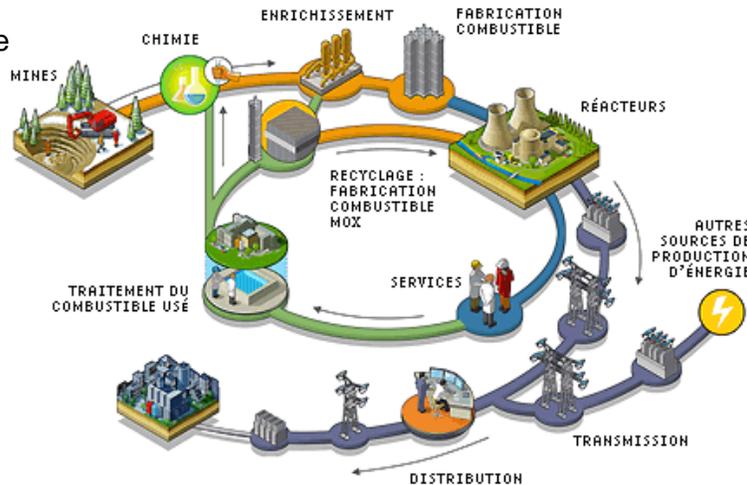
Une fois endormi, l'animal est perfusé à l'aide d'une pompe péristaltique (Easy-load Masterflex, Cole Palmer, USA, 25ml/min) au travers d'un cathéter (cathéter court pour IV, intraflon2, Vygon, France) introduit dans le ventricule gauche du cœur et émergeant dans l'aorte.

L'animal est d'abord perfusé à la vitesse de $25\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (volume en mL = 10% poids en g) avec une solution de préfixation à base de cacodylate de sodium ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{-HCl}$, 1M ; CaCl_2 , 2mM ; KCl, 2,7mM ; NaCl, 140mM ; pH 7,4) avec de l'héparine (héparine sodique Choay, Sanofi Synthélabo, France, 13 UI /g de poids corporel) afin de l'exanguiner convenablement.

Ensuite, une fixation avec une solution de paraformaldéhyde à 4% dans le tampon de cacodylate de sodium (PAF 4% dans $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{-HCl}$, 1M ; CaCl_2 , 12mM ; pH 7,4) est réalisée à la vitesse de $25\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (volume de perfusion en mL = poids en g).

Une post-fixation du cerveau conservé dans la boîte crânienne entrouverte, pendant 6 heures à température ambiante, est réalisée dans le même tampon de fixation (PAF4% dans le tampon cacodylate de sodium). Le cerveau est ensuite extrait puis immergé dans un tampon PBS-sucrose à 20% pendant 24h à 4°C. Les cerveaux sont ensuite congelés dans de l'isopentane, refroidi à -40°C par de l'azote liquide, avant d'être placés à -80°C jusqu'à dissection.

Annexe 15. Le combustible nucléaire



Source : plaquette de communication AREVA, disponible sur <http://www.aveva.fr>

Le cycle du combustible en 10 étapes :

■ Pôle amont

1. extraction de l'uranium naturel (UN) à partir de minerai plus ou moins riche en uranium
2. concentration de l'uranium par procédé chimique (premier niveau de purification)
3. étape de conversion des oxydes d'uranium en gaz UF_6
4. enrichissement en isotope 235 (atome fissile) production d'uranium enrichi (UE, + radioactif que UN) et d'uranium appauvri (UA, - radioactif que UN)
5. fabrication du combustible (pastille de céramique UO_2 + « assemblage » du combustible) et fabrication des grappes de contrôle neutronique

■ Pôle réacteur

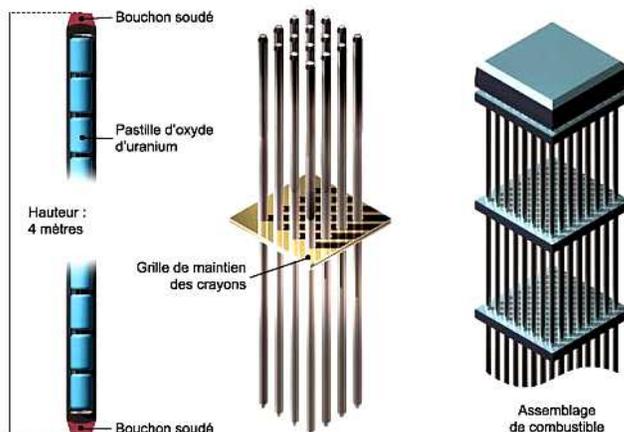
6. utilisation du combustible dans les centres nucléaires de production d'électricité (CNPE)

■ Pôle distribution

7. utilisation du combustible dans les centres nucléaires de production d'électricité (CNPE)

■ Pôle aval

8. retraitement = séparation et purification du combustible usagé
9. recyclage du combustible pouvant être revalorisé
10. conditionnement des déchets ultimes



La préparation des assemblages de combustible :

Après enrichissement, l'uranium est converti en oxyde d'uranium sous la forme d'une poudre noire. Celle-ci est comprimée puis frittée (cuite au four) pour donner des petits cylindres d'environ 1 cm de long et gros comme des petits morceaux de craie, appelés "pastilles". Chaque pastille, qui ne pèse que 7 g, peut libérer autant d'énergie qu'une tonne de charbon (1 million de grammes).

Les pastilles sont enfilées dans de longs tubes métalliques de 4 m de long en alliage de zirconium, les "gainés", dont les extrémités sont bouchées de manière étanche pour constituer les "crayons" de combustible. Pour une centrale, plus de 40 000 crayons sont préparés pour être rassemblés en "fagots" de section carrée, appelés assemblages de combustible. Chaque assemblage contient 264 crayons. Le chargement d'un réacteur nucléaire de 900 mégawatts (millions de watts) nécessite 157 assemblages contenant en tout 11 millions de pastilles.

Source : CEA 23/03/2005, <http://www.cea.fr/fr/pedagogie>

Références

Références bibliographiques :

Sources documentaires disponibles en ligne sur le réseau Internet :

- dictionnaire encyclopédique Wikipédia (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Accueil>),
- dictionnaire électronique du CNRS : TLFi « trésor de la langue française », (<http://atilf.atilf.fr/>),
- dictionnaire de terminologie « grand dictionnaire terminologique » de l'office québécois pour la langue française (http://www.granddictionnaire.com/btml/fra/r_motclef/index1024_1.asp).
- dictionnaire des synonymes du laboratoire CRESCO de l'université de Caen (<http://elsap1.unicaen.fr/cgi-bin/cherches.cgi>).

Références de la littérature scientifique :

- Abdel-Rahman, A., Shetty, A. K., and Abou-Donia, M. B. (2002). Acute exposure to sarin increases blood brain barrier permeability and induces neuropathological changes in the rat brain: dose-response relationships. *Neuroscience* 113, 721-741.
- Abou-Donia, M. B., Dechkovskaia, A. M., Goldstein, L. B., Shah, D. U., Bullman, S. L., and Khan, W. A. (2002). Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72, 881-890.
- Alaoui, F., Pratt, J., Trocherie, S., Court, L., and Stutzmann, J. M. (1995). Acute effects of irradiation on the rat brain: protection by glutamate blockade. *Eur J Pharmacol* 276, 55-60.
- Amaral, A., Galle, P., Escaig, F., Cossonnet, C., Henge-Napoli, M. H., Ansoborlo, E., and Zhang, L. (1998). The use of SIMS for uranium localization in biological research. *Journal of Alloys and Compounds* 271-273, 19-24.
- Angelova, O., and Manolov, S. (1966). [Changes in the activity of cholinesterase at consecutive myoneural synapses after uranium poisoning]. *Dokl Bulg Acad Nauk* 19, 661-664.
- Antonio, M. T., Corredor, L., and Leret, M. L. (2003). Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. *Toxicol Lett* 143, 331-340.
- Arfsten, D. P., Still, K. R., and Ritchie, G. D. (2001). A review of the effects of uranium and depleted uranium exposure on reproduction and fetal development. *Toxicol Ind Health* 17, 180-191.
- Arruda-Neto, J. D., Guevara, M. V., Nogueira, G. P., Saiki, M., Cestari, A. C., Shtejer, K., Deppman, A., Pereira Filho, J. W., Garcia, F., Geraldo, L. P., Gouveia, A. N., Guzman, F., Mesa, J., Rodriguez, O., Semmler, R., and Vanin, V. R. (2004). Long-term accumulation of uranium in bones of Wistar rats as a function of intake dosages. *Radiat Prot Dosimetry* 112, 385-393.
- Aschner, M. (2000). Manganese: brain transport and emerging research needs. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3, 429-432.

- Aschner, M. (2003). Blood-Brain Barrier Transport of Uranium, Annual rept. 1 Sep 2002-31 Aug 2003, pp. 9. WAKE FOREST UNIV WINSTON-SALEM NC SCHOOL OF MEDICINE.
- Aschner, M., Vrana, K. E., and Zheng, W. (1999). Manganese uptake and distribution in the central nervous system (CNS). *Neurotoxicology* 20, 173-180.
- Asikainen, M., and Kahlos, H. (1980). Natural radioactivity of drinking water in Finland. *Health Phys* 39, 77-83.
- Asikainen, M., Toppila, J., Alanko, L., Ward, D. J., Stenberg, D., and Porkka-Heiskanen, T. (1997). Sleep deprivation increases brain serotonin turnover in the rat. *Neuroreport* 8, 1577-1582.
- ATSDR (1999). Toxicological profile for uranium. In *Toxicological profile*, pp. 462. US, department of health and human services. Public health service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.
- Autissier, N., Rochette, L., Dumas, P., Beley, A., Loireau, A., and Bralet, J. (1982). Dopamine and norepinephrine turnover in various regions of the rat brain after chronic manganese chloride administration. *Toxicology* 24, 175-182.
- Auvinen, A., Kurttio, P., Pekkanen, J., Pukkala, E., Ilus, T., and Salonen, L. (2002). Uranium and other natural radionuclides in drinking water and risk of leukemia: a case-cohort study in Finland. *Cancer Causes Control* 13, 825-829.
- Auvinen, A., Salonen, L., Pekkanen, J., Pukkala, E., Ilus, T., and Kurttio, P. (2005). Radon and other natural radionuclides in drinking water and risk of stomach cancer: A case-cohort study in Finland. *Int J Cancer* 114, 109-113.
- Aymard, N., Belkahla, F., Curet, O., and Boulu, R. (1983). Détermination des monoamines cérébrales et de leurs métabolites chez le rat par chromatographie liquide haute performance avec détection électrochimique (article in french). *Act. Pharm. Biol. Chem.* 2, 175-179.
- Baglan, N., Cossonnet, C., and Ritt, J. (2001). Determination of ²³²Th in urine by ICP-MS for individual monitoring purposes. *Health Phys* 81, 76-81.
- Baglan, N., Cossonnet, C., Trompier, F., Ritt, J., and Berard, P. (1999). Implementation of ICP-MS protocols for uranium urinary measurements in worker monitoring. *Health Phys* 77, 455-461.
- Ballard, C. G., Greig, N. H., Guillozet-Bongaarts, A. L., Enz, A., and Darvesh, S. (2005). Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr Alzheimer Res* 2, 307-318.
- Barber, D. S., Ehrich, M. F., and Jortner, B. S. (2005). The effect of stress on the temporal and regional distribution of uranium in rat brain after acute uranyl acetate exposure. *J Toxicol Environ Health A* 68, 99-111.
- Bastide, J., and Bastide, P. (1968). [5-hydroxytryptophan decarboxylase and monoamine oxidase activities in rat and mouse kidney after experimental uranyl nitrate poisoning]. *Ann Biol Clin (Paris)* 26, 1239-1245.
- Bastide, J., Bastide, P., Malet, P., Turchini, J. P., and Dastugue, G. (1967). [Cholinesterase activity in the rat kidney during experimental uranyl nitrate poisoning (biochemical and histochemical study)]. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 169, 320-327.

- Batchelor, A. L., Buckley, P., Gore, D. J., Jenner, T. J., Major, I. R., and Bailey, M. R. (1980). The carcinogenic effect of localized fission fragment irradiation of rat lung. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 37, 249-266.
- Bellen, H. (1999). *Neurotransmitters release*. Oxford University Press, Oxford.
- Bellés, M., Albina, M. L., Linares, V., Gómez, M., Sánchez, D. J., and Domingo, J. L. (2005). Combined action of uranium and stress in the rat: I. Behavioral effects. *Toxicology Letters* 158(3), 176-185.
- Belova, I., and Jonsson, G. (1982). Blood-brain barrier permeability and immobilization stress. *Acta Physiol Scand* 116, 21-29.
- Bhargava, H. N. (1987). Effect of repeated administration of manganese on the striatal cholinergic and dopaminergic receptors in the rat. *Toxicol Lett* 37, 135-141.
- Bhatia, V., and Tandon, R. K. (2005). Stress and the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol* 20, 332-339.
- Birtheimer, A., Lazaris, A., Schweizer, T., Jackisch, R., and Cassel, J. C. (2003). Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the cortex of aged rats with differential memory impairments. *Pharmacol Biochem Behav* 75, 147-162.
- Briner, W. (2002). Altered open-field performance in depleted uranium exposed rats. seventh international symposium on metals ions in biology and medicine, pp. 342-345.
- Briner, W., and Davis, D. (2002). Lipid oxidation and behavior are correlated in depleted uranium exposed mice. Seventh international symposium on metals ions in biology and medicine, pp. 59-63.
- Briner, W., and Murray, J. (2005). Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats. *Neurotoxicol Teratol* 27, 135-144.
- Brouns, R., and De Deyn, P. P. (2004). Neurological complications in renal failure: a review. *Clin Neurol Neurosurg* 107, 1-16.
- Cantaluppi, C., and Degetto, S. (2000). Civilian and military uses of depleted uranium: environmental and health problems. *Ann Chim* 90, 665-676.
- Carpenter, D. O. (2001). Effects of metals on the nervous system of humans and animals. *Int J Occup Med Environ Health* 14, 209-218.
- Carrière, M., Gouget, B., Gallien, J.-P., Avoscan, L., Gobin, R., Verbavatz, J.-M., and Khodja, H. (2005). Cellular distribution of uranium after acute exposure of renal epithelial cells: SEM, TEM and nuclear microscopy analysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 231, 268-273.
- Cassella, J., Hay, J., and Lawson, S. (1997). *The rat nervous system, an introduction to preparatory techniques*. Wiley Ed, Chichester.
- Catravas, G. N., and McHale, C. G. (1974). Radiation-induced changes in the activity of brain enzymes involved in neurotransmitter metabolism. *Radiat Res* 58, 462-469.
- Celada, P., Puig, M., Amargos-Bosch, M., Adell, A., and Artigas, F. (2004). The therapeutic role of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci* 29, 252-265.

- Celada, P., Sarrias, M. J., and Artigas, F. (1990). Serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in plasma. Potential use as peripheral measures of MAO-A activity. *J Neural Transm Suppl* 32, 149-154.
- Clarkson, E. D., Bahr, B. A., and Parsons, S. M. (1993). Classical noncholinergic neurotransmitters and the vesicular transport system for acetylcholine. *J Neurochem* 61, 22-28.
- Coccini, T., Randine, G., Candura, S. M., Nappi, R. E., Prockop, L. D., and Manzo, L. (2000). Low-level exposure to methylmercury modifies muscarinic cholinergic receptor binding characteristics in rat brain and lymphocytes: physiologic implications and new opportunities in biologic monitoring. *Environ Health Perspect* 108, 29-33.
- Copin, J. C., and Gasche, Y. (2003). [Morphology and physiology of the blood-brain barrier]. *Ann Fr Anesth Reanim* 22, 202-214.
- Corti, O., Hampe, C., Darios, F., Ibanez, P., Ruberg, M., and Brice, A. (2005). Parkinson's disease: from causes to mechanisms. *C R Biol* 328, 131-142.
- Costa, L. G. (1988). Interactions of neurotoxicants with neurotransmitter systems. *Toxicology* 49, 359-366.
- Cothorn, C. R., and Lappenbusch, W. L. (1983a). Occurrence of uranium in drinking water in the U.S. *Health Phys* 45, 89-99.
- Cothorn, C. R., Lappenbusch, W. L., and Cotruvo, J. A. (1983b). Health effects guidance for uranium in drinking water. *Health Phys* 44 Suppl 1, 377-384.
- Craft, E., Abu-Qare, A., Flaherty, M., Garofolo, M., Rincavage, H., and Abou-Donia, M. (2004). Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 7, 297-317.
- Crespo-Lopez, M. E., Herculano, A. M., Corvelo, T. C., and Do Nascimento, J. L. (2005). [Mercury and neurotoxicity]. *Rev Neurol* 40, 441-447.
- Darvesh, S., Grantham, D. L., and Hopkins, D. A. (1998). Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. *J Comp Neurol* 393, 374-390.
- Darvesh, S., and Hopkins, D. A. (2003). Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *J Comp Neurol* 463, 25-43.
- Denison, F. H. (2004). Uranium VI speciation: modelling, uncertainty and relevance to bioavailability models. application to uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve. Doctorat de l'Université de Provence Aix Marseille I, Marseille.
- Diamond, G., Morrow, P., and Panner, B. (1989). Reversible uranyl nephrotoxicity in the Long Evans rat. In *Issue 01. NTIS/NUREG/CR-4951*. Govt Rep Announce Ind.
- Domingo, J. L., Llobet, J. M., Tomas, J. M., and Corbella, J. (1987). Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bull Environ Contam Toxicol* 39, 168-174.
- Domingo, J. L., Ortega, A., Paternain, J. L., and Corbella, J. (1989). Evaluation of the perinatal and postnatal effects of uranium in mice upon oral administration. *Arch Environ Health* 44, 395-398.
- Domingo, J. L., Paternain, J. L., Llobet, J. M., and Corbella, J. (1989). The developmental toxicity of uranium in mice. *Toxicology* 55, 143-152.

- Dublineau, I., Grison, S., Baudelin, C., dudoignon, N., souidi, M., Marquette, C., Paquet, F., aigueperse, J., and Gourmelon, P. (2005). Absorption of uranium through different segments of the gastrointestinal tract of the rat. *int j radiat Biol, in press*.
- Dugovic, C. (1992). Functional activity of 5-HT₂ receptors in the modulation of the sleep/wakefulness states. *J Sleep Res* 1, 163-168.
- Durbin, P. W., and Wrenn, M. (1976). Metabolism and effects of uranium in animals. Conference of occupational health experience with uranium, pp. 68-129.
- Dyger, H. (1949). In *The Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds*. (C. Voegtlin, and H. C. Hodge, Eds.), pp. 603-613. Mc Graw-Hill Book Company, New York.
- Egana, E. (1962). Some effects of ionizing radiations on the metabolism of the central nervous system. *international journal of neurology* 3, 631.
- Ejnik, J. W., Hamilton, M. M., Adams, P. R., and Carmichael, A. J. (2000). Optimal sample preparation conditions for the determination of uranium in biological samples by kinetic phosphorescence analysis (KPA). *J Pharm Biomed Anal* 24, 227-235.
- Ejnik, J. W., Todorov, T. I., Mullick, F. G., Squibb, K., McDiarmid, M. A., and Centeno, J. A. (2005). Uranium analysis in urine by inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 382, 73-79.
- Ellman, G., Courtney, K., Andres-Jr, V., and Featherstone, R. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.
- Evans, B. (December 12, 2004). Special report of rodents and radiation, chapter 2: from the nose to the brain, experiments with rats find that inhaling dust from depleted uranium weapons can cause genetic mutations. In *Daily Press*, Hampton Roads, VA, USA.
- Faro, L. R., do Nascimento, J. L., San Jose, J. M., Alfonso, M., and Duran, R. (2000). Intrastratial administration of methylmercury increases in vivo dopamine release. *Neurochem Res* 25, 225-229.
- Fisene, I. M., and Perry, P. M. (1985). Isotopic U concentration in human blood from New York City donors. *Health Phys* 49, 1272-1275.
- Fisene, I. M., Perry, P. M., Decker, K. M., and Keller, H. W. (1987). The daily intake of ²³⁴U, ²³⁵U, ²³⁸U, ²²⁸Th and ²²⁶Ra by New York City residents. *Health Phys* 53, 357-363.
- Foulon, O., Lalouette, F., Lambert, F., Martin, S., Fatome, M., and Martin, C. (1999). Effect of neutron-gamma radiation on dopamine and serotonin metabolism in the rat brain: a regional analysis. *J Neurosci Res* 55, 770-775.
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., and Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80, 1523-1631.
- Frelon S., Houpert P, Lepetit D, Paquet F. (2005) The chemical speciation of uranium in water does not influence its absorption from the gastrointestinal tract of rats. *Chem Res Toxicol.* 18(7), 1150-1154.
- Friede, R. (1966). *Topographic brain chemistry*. Academic Press, New York and London.
- Fu, W. M., and Lin-Shiau, S. Y. (1985). Mechanism of rhythmic contractions induced by uranyl ion in the ileal longitudinal muscle of guinea-pig. *Eur J Pharmacol* 113, 199-204.

- Gala, R. R. (1990). The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci* 46, 1407-1420.
- Galabov, G., Angelova, O., Manolov, S., and Venkov, L. (1966). [Changes in the activity of cholinesterase of the spinal cord in rats treated with uranyl nitrate]. *Dokl Bulg Acad Nauk* 19, 673-676.
- Galle, P. (1974). Rôle des lysosomes et des mitochondries dans le sphénomènes de concentration et d'élimination d'éléments minéraux uranium et or) par les reins. *journal de microscopie* 19, 17-24.
- Galle, P., and Berry, J. (1980). the role of aci phophatase in the concentration of some mineral elements in lysosomes. *Electro Microscopy* 3, 92-93.
- Gazin, V., Kerdine, S., Grillon, G., Pallardy, M., and Raoul, H. (2004). Uranium induces TNF alpha secretion and MAPK activation in a rat alveolar macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 194, 49-59.
- Geula, C., and Darvesh, S. (2004). Butyrylcholinesterase, cholinergic neurotransmission and the pathology of Alzheimer's disease. *Drugs Today (Barc)* 40, 711-721.
- Geula, C., and Mesulam, M. M. (1995). Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 9 Suppl 2, 23-28.
- Gilman, A. P., Moss, M. A., Villeneuve, D. C., Secours, V. E., Yagminas, A. P., Tracy, B. L., Quinn, J. M., Long, G., and Valli, V. E. (1998 a). Uranyl nitrate: 91-day exposure and recovery studies in the male New Zealand white rabbit. *Toxicol Sci* 41, 138-151.
- Gilman, A. P., Villeneuve, D. C., Secours, V. E., Yagminas, A. P., Tracy, B. L., Quinn, J. M., Valli, V. E., and Moss, M. A. (1998 b). Uranyl nitrate: 91-day toxicity studies in the New Zealand white rabbit. *Toxicol Sci* 41, 129-137.
- Gilman, A. P., Villeneuve, D. C., Secours, V. E., Yagminas, A. P., Tracy, B. L., Quinn, J. M., Valli, V. E., Willes, R. J., and Moss, M. A. (1998 c). Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci* 41, 117-128.
- Glowinski, J., and Iversen, L. L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. *J Neurochem* 13, 655-669.
- Goasguen, J., Laprele, J., Ribot, C., and Rocquet, G. (1982). Intoxication par l'uranium métallique. Manifestations neurologiques chroniques. *Nouv Presse Med* 11, 119-121.
- Gomez, T. M., and Robles, E. (2003). Imaging calcium dynamics in developing neurons. *Methods Enzymol* 361, 407-422.
- Gottfries, C. G. (1990). Neurochemical aspects on aging and diseases with cognitive impairment. *J Neurosci Res* 27, 541-547.
- Gourmelon, P., Marquette, C., Agay, D., Mathieu, J., and Clarencon, D. (2005). Involvement of the central nervous system in radiation-induced multi-organ dysfunction and/or failure. *BJR Suppl* 27, 62-68.
- Gu, G., Zhu, S., Wang, L., and Yang, S. (2001). [Irradiation of 235 uranium on the growth, behavior and some biochemical changes of brain in neonatal rats]. *Wei Sheng Yan Jiu* 30, 257-259.

- Gwiazda, R. H., Lee, D., Sheridan, J., and Smith, D. R. (2002). Low cumulative manganese exposure affects striatal GABA but not dopamine. *Neurotoxicology* 23, 69-76.
- Hamilton, E. I. (1970). The concentration of uranium in air from contrasted natural environments. *Health Phys* 19, 511-520.
- Hamilton, E. I. (1971). The concentration and distribution of uranium in human skeletal tissues. *Calcif Tissue Res* 7, 150-162.
- Hamilton, E. I. (1972). The concentration of uranium in man and his diet. *Health Phys* 22, 149-153.
- Hedaya, M. A., Birkenfeld, H. P., and Kathren, R. L. (1997). A sensitive method for the determination of uranium in biological samples utilizing kinetic phosphorescence analysis (KPA). *J Pharm Biomed Anal* 15, 1157-1165.
- Hodge, H. C. (1973). Chap. 9 Effects of uranium on the nervous system. In *Uranium plutonium transplutonic elements. A history of uranium poisoning 1824-1942*. (S. Verlag, Ed.), Berlin.
- Hodge, H. C., Stannard, J., and Hursh, J. B. (1973). *Uranium, plutonium, transplutonic elements. A history of uranium poisoning 1824-1942*. Springer Verlag, Berlin.
- Hong, J. S., Hung, C. R., Seth, P. K., Mason, G., and Bondy, S. C. (1984). Effect of manganese treatment on the levels of neurotransmitters, hormones, and neuropeptides: modulation by stress. *Environ Res* 34, 242-249.
- Hornung, R. W., Deddens, J. A., and Roscoe, R. J. (1998). Modifiers of lung cancer risk in uranium miners from the Colorado Plateau. *Health Phys* 74, 12-21.
- Houpert, P., Lestaevel, P., Bussy, C., Paquet, F., and Gourmelon, P. (2005). Enriched But Not Depleted Uranium Affects Central Nervous System In Long-Term Exposed Rat. *Neurotoxicology*, in press.
- Hrdina, P. D., Peters, D. A., and Singhal, R. L. (1976). Effects of chronic exposure to cadmium, lead and mercury of brain biogenic amines in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 15, 483-493.
- Hu, Q. Y., and Zhu, S. P. (1990). Induction of chromosomal aberrations in male mouse germ cells by uranyl fluoride containing enriched uranium. *Mutat Res* 244, 209-214.
- Huang, E., Ong, W. Y., and Connor, J. R. (2004). Distribution of divalent metal transporter-1 in the monkey basal ganglia. *Neuroscience* 128, 487-496.
- Huber, J. D., Egleton, R. D., and Davis, T. P. (2001). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 24, 719-725.
- Huikuri, P., and Salonen, L. (2000). removal of uranium from finnish groundwaters in domestic use with a strong base anion resin. *J Radioanal Nucl Chem* 245, 385-393.
- Huikuri, P., Salonen, L., and hamalainen, K. (2001). occurrence of uranium in finnish bedrock wear and its removal with a strongly basic anion-exchange resin. *radiochemistry* 43, 425-428.
- Hursh, J. B., Neuman, W. R., Toribara, T., Wilson, H., and Waterhouse, C. (1969). Oral ingestion of uranium by man. *Health Phys* 17, 619-621.
- Hursh, J. B., and Spoor, J. (1973). Data on man. In *Uranium, plutonium, transplutonic elements. A history of uranium poisoning 1824-1942*. (S. Verlag, Ed.), pp. 1970-2400, Berlin.

- ICRP (Ed.) (1991). *ICRP Publication 60: 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection*. International Commission on Radiological Protection, Pergamon Press, Oxford.
- ICRP (Ed.) (1995). *ICRP Publication 69: age dependent doses to members of the public from intake of radionuclides, Part 3, ingestion dose coefficients, chap.5 Uranium*. International Commission for Radiation Protection, Pergamon Press, Oxford.
- ICRP (Ed.) (1994). *ICRP 68: dose coefficients for intakes of radionuclides by workers, chap.3 Gastrointestinal tract model*. International Commission for Radiation Protection, Pergamon Press, Oxford.
- Inestrosa, N. C., Sagal, J. P., and Colombres, M. (2005). Acetylcholinesterase interaction with Alzheimer amyloid beta. *Subcell Biochem* 38, 299-317.
- Iversen, L. L., and Snyder, S. H. (1968). Synaptosomes: different populations storing catecholamines and gamma-aminobutyric acid in homogenates of rat brain. *Nature* 220, 796-798.
- Jouvet, M. (1972). The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergeb Physiol* 64, 166-307.
- Juntunen, R. (1991). summary: uranium and radon in wells drilled into bedrock in southern finland. In *Geological survey of finland, Report of investigation 98*, pp. 20. Geological survey of finland, Gottingen.
- Karpas, Z., Lorber, A., Elish, E., Kol, R., Roiz, Y., Marko, R., Katorza, E., Halicz, L., Riondato, J., Vanhaecke, F., and Moens, L. (1998). Uptake of ingested uranium after low "acute intake". *Health Phys* 74, 337-345.
- Kocher, D. C. (1989). Relationship between kidney burden and radiation dose from chronic ingestion of U: implications for radiation standards for the public. *Health Phys* 57, 9-15.
- Kontur, P. J., and Fechter, L. D. (1985). Brain manganese, catecholamine turnover, and the development of startle in rats prenatally exposed to manganese. *Teratology* 32, 1-11.
- Kostecki, P., and Calabrese, E. (2003). Conference on non-linear dose-response relationship in biology, toxicology and medicine.
- Kurtio, P., Auvinen, A., Salonen, L., Saha, H., Pekkanen, J., Makelainen, I., Vaisanen, S. B., Penttila, I. M., and Komulainen, H. (2002). Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 110, 337-342.
- Kurtio, P., Komulainen, H., Leino, A., Salonen, L., Auvinen, A., and Saha, H. (2005). Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 113, 68-72.
- La Touche, Y. D., Willis, D. L., and Dawydiak, O. I. (1987). Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health Phys* 53, 147-162.
- Lamb, E. J., O'Riordan, S. E., and Delaney, M. P. (2003). Kidney function in older people: pathology, assessment and management. *Clin Chim Acta* 334, 25-40.
- Lasley, S. M. (1992). Regulation of dopaminergic activity, but not tyrosine hydroxylase, is diminished after chronic inorganic lead exposure. *Neurotoxicology* 13, 625-635.

- Leach, L. J., Yuile, C. L., Hodge, H. C., Sylvester, G. E., and Wilson, H. B. (1973). A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO₂) dust. II. Postexposure retention and biologic effects in the monkey, dog and rat. *Health Phys* 25, 239-258.
- Leggett, R. W. (1989). The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys* 57, 365-383.
- Leggett, R. W. (1994). Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium. *Health Phys* 67, 589-610.
- Leggett, R. W., and Harrison, J. D. (1995). Fractional absorption of ingested uranium in humans. *Health Phys* 68, 484-498.
- Lemercier, V., Millot, X., Ansoborlo, E., Menetrier, F., Flury-Herard, A., Rousselle, C., and Scherrmann, J. M. (2003). Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiat Prot Dosimetry* 105, 243-245.
- Lestaevel, P. (19-23 septembre 2005). Perturbations comportementales chez des rats nés de parents contaminés par ingestion chronique d'uranium. 7ème CIRFA, Orford, Québec, Canada (communication orale).
- Lestaevel, P., Houpert, P., Bussy, C., Dhieux, B., Gourmelon, P., and Paquet, F. (2005 a). The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 212, 219-226.
- Lestaevel, P., Bussy, C., Paquet, F., Dhieux, B., Clarencon, D., Houpert, P., and gourmelon, P. (2005 b). Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicol Teratol*, in Press.
- Lever, S. Z., and Scheffel, U. (1998). Regional distribution of ²⁰³PbCl₂ in the mouse after intravenous injection. *Neurotoxicology* 19, 197-207.
- Limson Zamora, M., Tracy, B. L., Zielinski, J. M., Meyerhof, D. P., and Moss, M. A. (1998). Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol Sci* 43, 68-77.
- Limson Zamora, M., Zielinski, J. M., Meyerhof, D., Moodie, G., Falcomer, R., and Tracy, B. (2003). Uranium gastrointestinal absorption: the f1 factor in humans. *Radiat Prot Dosimetry* 105, 55-60.
- Lin-Shiau, S. Y., and Fu, W. M. (1986). Antagonistic action of uranyl nitrate on presynaptic neurotoxins from snake venoms. *Neuropharmacology* 25, 95-101.
- Lin-Shiau, S. Y., Fu, W. M., and Lee, C. Y. (1979). Effects of uranyl ions on neuromuscular transmission of chick biventer cervicis muscle. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 241, 332-343.
- Lin, J. L., Lin-Tan, D. T., Hsu, K. H., and Yu, C. C. (2003). Environmental lead exposure and progression of chronic renal diseases in patients without diabetes. *N Engl J Med* 348, 277-286.
- Lin, R. H., Fu, W. M., and Lin-Shiau, S. Y. (1988). Presynaptic action of uranyl nitrate on the phrenic nerve-diaphragm preparation of the mouse. *Neuropharmacology* 27, 857-863.
- Lin, R. H., Wu, L. J., Lee, C. H., and Lin-Shiau, S. Y. (1993). Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 319, 197-203.

- Linares, V., Albina, M. L., Belles, M., Mayayo, E., Sanchez, D. J., and Domingo, J. L. (2005). Combined action of uranium and stress in the rat II. Effects on male reproduction. *Toxicol Lett.*
- Llobet, J. M., Sirvent, J. J., Ortega, A., and Domingo, J. L. (1991). Influence of chronic exposure to uranium on male reproduction in mice. *Fundam Appl Toxicol* 16, 821-829.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., and Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Lu, S., and Zhao, F. Y. (1990). Nephrotoxic limit and annual limit on intake for natural U. *Health Phys* 58, 619-623.
- Mambrini, J., and Benoit, P. R. (1968). [Modifications of the liberation of the mediator at the neuromuscular junction under the effect of the uranyl ion]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 266, 1145-1148.
- Mao, Y., Desmeules, M., Schaubel, D., Berube, D., Dyck, R., Brule, D., and Thomas, B. (1995). Inorganic components of drinking water and microalbuminuria. *Environ Res* 71, 135-140.
- Marchetti, C. (2003). Molecular targets of lead in brain neurotoxicity. *Neurotox Res* 5, 221-236.
- Marquette, C., Linard, C., Galonnier, M., Van Uye, A., Mathieu, J., Gourmelon, P., and Clarencon, D. (2003). IL-1beta, TNFalpha and IL-6 induction in the rat brain after partial-body irradiation: role of vagal afferents. *Int J Radiat Biol* 79, 777-785.
- Martin, C., Janodet, D., Job, A., Eschenbrenner, M., and Fatome, M. (1993). [Early effects of neutron-gamma or gamma irradiation on the group toxicity induced by (+) amphetamine in mice]. *C R Acad Sci III* 316, 508-512.
- Martin, C., Martin, S., Viret, R., Denis, J., Mirguet, F., Diserbo, M., Multon, E., and Lamproglou, I. (2001). Low dose of the gamma acute radiation syndrome (1.5 Gy) does not significantly alter either cognitive behavior or dopaminergic and serotonergic metabolism. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47, 459-465.
- Martin, F., Earl, R., and Tawn, E. J. (1991). A cytogenetic study of men occupationally exposed to uranium. *Br J Ind Med* 48, 98-102.
- Maynard, E., Downs, W., and Hodge, H. C. (1949). Oral toxicity of uranium compounds. In *The Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds, Part I & II.* (C. Voegtlin, and H. C. Hodge, Eds.), pp. 1221-1369. MacGraw-Hill book Co. Inc., New York.
- McDiarmid, M. A., Engelhardt, S., Oliver, M., Gucer, P., Wilson, P. D., Kane, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Handwerger, B., Albertini, R. J., Jacobson-Kram, D., Thorne, C. D., and Squibb, K. S. (2004). Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans: a 10-year follow-up. *J Toxicol Environ Health A* 67, 277-296.
- McDiarmid, M. A., Keogh, J. P., Hooper, F. J., McPhaul, K., Squibb, K., Kane, R., DiPino, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Hamilton, M., Jacobson-Kram, D., Burrows, B., and Walsh, M. (2000). Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans. *Environ Res* 82, 168-180.
- McDiarmid, M. A., Squibb, K., Engelhardt, S., Oliver, M., Gucer, P., Wilson, P. D., Kane, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., and Jacobson-Kram, D. (2001). Surveillance of

- depleted uranium exposed Gulf War veterans: health effects observed in an enlarged "friendly fire" cohort. *J Occup Environ Med* 43, 991-1000.
- Meltzer, C. C., Smith, G., DeKosky, S. T., Pollock, B. G., Mathis, C. A., Moore, R. Y., Kupfer, D. J., and Reynolds, C. F., 3rd (1998). Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging. *Neuropsychopharmacology* 18, 407-430.
- Mesulam, M. M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E. G., and Lockridge, O. (2002). Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110, 627-639.
- Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Wainer, B. H., and Levey, A. I. (1983). Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10, 1185-1201.
- Mill, J. G., Vassallo, D. V., and Campanha Vde, P. (1978). Effect of uranyl ions on isometric contractions in rabbit atria. *Am J Physiol* 235, H295-298.
- Miller, A. C. (2004). Internal contamination from depleted uranium: carcinogenesis and leukemogenesis *in vivo*. HEIR 2004, Health Effect of Incorporated Radionuclides, emphasis on radium, thorium, uranium and their daughter products. Nov. 29 – Dec. 2004, Neuherberg, Germany.
- Miller, A. C., Brooks, K., Stewart, M., Anderson, B., Shi, L., McClain, D., and Page, N. (2003). Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation. *J Environ Radioact* 64, 247-259.
- Miller, A. C., Fuciarelli, A. F., Jackson, W. E., Ejniak, E. J., Emond, C., Strocko, S., Hogan, J., Page, N., and Pellmar, T. (1998). Urinary and serum mutagenicity studies with rats implanted with depleted uranium or tantalum pellets. *Mutagenesis* 13, 643-648.
- Miller, A. C., Mog, S., McKinney, L., Luo, L., Allen, J., Xu, J., and Page, N. (2001a). Neoplastic transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by heavy metal-tungsten alloy particles: induction of genotoxic effects. *Carcinogenesis* 22, 115-125.
- Miller, A. C., Xu, J., Stewart, M., and McClain, D. (2001b). Suppression of depleted uranium-induced neoplastic transformation of human cells by the phenyl fatty acid, phenyl acetate: chemoprevention by targeting the p21RAS protein pathway. *Radiat Res* 155, 163-170.
- Miller, A. C., Stewart, M., Brooks, K., Shi, L., and Page, N. (2002 a). Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *J Inorg Biochem* 91, 246-252.
- Miller, A. C., Xu, J., Stewart, M., Brooks, K., Hodge, S., Shi, L., Page, N., and McClain, D. (2002 b). Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints. *Radiat Prot Dosimetry* 99, 275-278.
- Miller, A. C., Xu, J., Stewart, M., Prasanna, P. G., and Page, N. (2002 c). Potential late health effects of depleted uranium and tungsten used in armor-piercing munitions: comparison of neoplastic transformation and genotoxicity with the known carcinogen nickel. *Mil Med* 167, 120-122.

- Mis, K., Mars, T., Jevsek, M., Brank, M., Zajc-Kreft, K., and Grubic, Z. (2003). Localization of mRNAs encoding acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the rat spinal cord by nonradioactive in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 51, 1633-1644.
- Moller-Madsen, B. (1994). Localization of mercury in CNS of the rat. An autometallographic study. *Pharmacol Toxicol* 75 Suppl 1, 1-41.
- Monleau, M., Bussy, C., Lestaevel, P., Paquet, F., Houpert, P., and Chazel, V. (2005). Bioaccumulation, locomotor and memory effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations. *Neurosci Lett, in Press*.
- Moss, M., McCurdy, R., Dooley, K., Givner, M., Dymond, L., and Slayter, J. (1983). Uranium in drinking water-report on clinical studies in Nova Scotia. In *In: Chemical Toxicology and Clinical Chemistry of Metals* (S. J. Brown SS, eds, Ed.), pp. 149-152. London:Academic Press.
- Nguyen, M. L., Cox, G. D., and Parsons, S. M. (1998). Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine. *Biochemistry* 37, 13400-13410.
- Nieoullon A. (2002). Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog Neurobiol.* 67(1), 53-83.
- O'Kusky, J. R. (1998). Postnatal changes in the numerical density and total number of asymmetric and symmetric synapses in the hypoglossal nucleus of the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 108, 179-191.
- Orloff, K. G., Mistry, K., Charp, P., Metcalf, S., Marino, R., Shelly, T., Melaro, E., Donohoe, A. M., and Jones, R. L. (2004). Human exposure to uranium in groundwater. *Environ Res* 94, 319-326.
- Ortega, A., Domingo, J. L., Llobet, J. M., Tomas, J. M., and Paternain, J. L. (1989). Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 42, 935-941.
- Ovtscharoff, W. (1975). Cytochemistry and morphology of synaptic structures in the cerebral cortex of rat. *Histochemistry* 44, 185-192.
- Paquet, F., Houpert, P., Blanchardon, E., Delissen, O., Maubert, C., Dhieux, B., Moreels, A., Frelon, S., Voisin, P., and Gourmelon, P. (2005). Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys, in press*.
- Parsons, S. M., Prior, C., and Marshall, I. G. (1993). Acetylcholine transport, storage, and release. *Int Rev Neurobiol* 35, 279-390.
- Pasanen, M., Lang, S., Kojo, A., and Kosma, V. M. (1995). Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environ Res* 70, 126-133.
- Paschoa, A. S. (1998). Potential environmental and regulatory implications of naturally occurring radioactive materials (NORM). *Appl Radiat Isot* 49, 189-196.
- Paternain, J. L., Domingo, J. L., Ortega, A., and Llobet, J. M. (1989). The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicol Environ Saf* 17, 291-296.
- Pausescu, E., Paun, C., Chirvasie, R., and Teodosiu, T. (1972). Effects of total exposure to cobalt-60 gamma-radiation on cerebral energy producing and transferring systems. *Strahlentherapie* 144, 370-376.

- Pavese, N., Andrews, T. C., Brooks, D. J., Ho, A. K., Rosser, A. E., Barker, R. A., Robbins, T. W., Sahakian, B. J., Dunnett, S. B., and Piccini, P. (2003). Progressive striatal and cortical dopamine receptor dysfunction in Huntington's disease: a PET study. *Brain* 126, 1127-1135.
- Paxinos, G., and Watson, C. (1998). *The Rat Brain in stereotaxic coordinates, fourth edition*. Academic Press, San Diego and London.
- Pellmar, T. C., Hogan, J. B., Benson, K. A., and Landauer, M. R. (1998). Toxicological Evaluation of Depleted Uranium in Rats: Six-Month Evaluation Point. In *AFRRI Special Publication 98*. (n°1, Ed.), pp. 2 (16-18). Armed Forces Radiobiology Research Institute, Bethesda.
- Pellmar, T. C., Keyser, D. O., Emery, C., and Hogan, J. B. (1999 a). Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments. *Neurotoxicology* 20, 785-792.
- Pellmar, T. C., Fuciarelli, A. F., Ejniak, J. W., Hamilton, M., Hogan, J., Strocko, S., Emond, C., Mottaz, H. M., and Landauer, M. R. (1999 b). Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets 4. *Toxicol Sci* 49, 29.
- Petitot, F., Moreels, A. M., and Paquet, F. (2004). In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig. *Can J Physiol Pharmacol* 82, 133-139.
- Portas, C. M., Bjorvatn, B., Fagerland, S., Gronli, J., Mundal, V., Sorensen, E., and Ursin, R. (1998). On-line detection of extracellular levels of serotonin in dorsal raphe nucleus and frontal cortex over the sleep/wake cycle in the freely moving rat. *Neuroscience* 83, 807-814.
- Priest, N. D. (2001). Toxicity of depleted uranium. *Lancet* 357, 244-246.
- Ranasinghe, J. G., Liu, M. C., Sakakibara, Y., and Suiko, M. (2000). Manganese administration induces the increased production of dopamine sulfate and depletion of dopamine in Sprague-Dawley rats. *J Biochem (Tokyo)* 128, 477-480.
- RAND : Harley, N., Foulkes, E., Hilbourne, L., Hudson, A., and Anthony, C. (1999). Volume 7: depleted uranium. In *a review of the scientific literature as it pertains to Gulf War Illnesses*. (R. report, Ed.). national defense research institute.
- Reddy, G. R., Basha, M. R., Devi, C. B., Suresh, A., Baker, J. L., Shafeek, A., Heinz, J., and Chetty, C. S. (2003). Lead induced effects on acetylcholinesterase activity in cerebellum and hippocampus of developing rat. *Int J Dev Neurosci* 21, 347-352.
- Rios, C., Galvan-Arzate, S., and Tapia, R. (1989). Brain regional thallium distribution in rats acutely intoxicated with Tl₂SO₄. *Arch Toxicol* 63, 34-37.
- Roberts, E. (1949). In *The Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds, Part I & II*. (C. Voegtlin, and H. C. Hodge, Eds.), pp. 561-585. Mc Graw-Hill Book Company, New York.
- Roscoe, R. J. (1997). An update of mortality from all causes among white uranium miners from the Colorado Plateau Study Group. *Am J Ind Med* 31, 211-222.
- Roth, J. A., and Garrick, M. D. (2003). Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochem Pharmacol* 66, 1-13.
- Rothstein, A. (1949). In *The Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds, Part I & II*. (C. Voegtlin, and H. C. Hodge, Eds.), pp. 548-560. Mc Graw-Hill Book Company, New York.

- Sarrias, M. J., Martinez, E., Celada, P., Udina, C., Alvarez, E., and Artigas, F. (1991). Plasma free 5HT and platelet 5HT in depression: case-control studies and the effect of antidepressant therapy. *Adv Exp Med Biol* 294, 653-658.
- Seth, P. K., and Chandra, S. V. (1984). Neurotransmitters and neurotransmitter receptors in developing and adult rats during manganese poisoning. *Neurotoxicology* 5, 67-76.
- Shailesh Kumar, M. V., and Desiraju, T. (1990). Regional alterations of brain biogenic amines and GABA/glutamate levels in rats following chronic lead exposure during neonatal development. *Arch Toxicol* 64, 305-314.
- Sikov, M. R., and Mahlum, D. D. (1968). Cross-placental transfer of selected actinides in the rat. *Health Phys* 14, 205-208.
- Singhal, R. L., Merali, Z., and Hrdina, P. D. (1976). Aspects of the biochemical toxicology of cadmium. *Fed Proc* 35, 75-80.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Sokoll, M. D., and Thesleff, S. (1968). Effects of pH and uranyl ions on action potential generation and acetylcholine sensitivity of skeletal muscle. *Eur J Pharmacol* 4, 71-76.
- Souidi, M., Gueguen, Y., Linard, C., Dudoignon, N., Grison, S., Baudelin, C., Marquette, C., Gourmelon, P., Aigueperse, J., and Dublineau, I. (2005). In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology, in press*.
- Spencer, H., Osis, D., Fisenne, I. M., Perry, P. M., and Harley, N. H. (1990). Measured intake and excretion patterns of naturally occurring ²³⁴U, ²³⁸U, and calcium in humans. *Radiat Res* 124, 90-95.
- Strange, K. (1992). Regulation of solute and water balance and cell volume in the central nervous system. *J Am Soc Nephrol* 3, 12-27.
- Subhash, M. N., and Padmashree, T. S. (1990). Regional distribution of dopamine beta-hydroxylase and monoamine oxidase in the brains of rats exposed to manganese. *Food Chem Toxicol* 28, 567-570.
- Subhash, M. N., and Padmashree, T. S. (1991). Effect of manganese on biogenic amine metabolism in regions of the rat brain. *Food Chem Toxicol* 29, 579-582.
- Sullivan, M. F., and Ruemmler, P. S. (1988). Absorption of ²³³U, ²³⁷Np, ²³⁸Pu, ²⁴¹Am and ²⁴⁴Cm from the gastrointestinal tracts of rats fed an iron-deficient diet. *8. 54*, 311.
- Sutton, K. G., McRory, J. E., Guthrie, H., Murphy, T. H., and Snutch, T. P. (1999). P/Q-type calcium channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A. *Nature* 401, 800-804.
- Takeda, A. (2004 a). [Essential trace metals and brain function]. *Yakugaku Zasshi* 124, 577-585.
- Takeda, A. (2004 b). [Function and toxicity of trace metals in the central nervous system]. *Clin Calcium* 14, 45-49.
- Tarohda, T., Yamamoto, M., and Amamo, R. (2004). Regional distribution of manganese, iron, copper, and zinc in the rat brain during development. *Anal Bioanal Chem* 380, 240-246.

- Taulan, M. (2004). Etude des effets biologiques consécutifs à une accumulation chronique d'uranium naturel chez les rongeurs. Doctorat de l'Université de Médecine de Montpellier, Montpellier.
- Taulan, M., Paquet, F., Maubert, C., Delissen, O., Demaille, J., and Romey, M. C. (2004). Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environ Health Perspect* 112, 1628-1635.
- Taylor, D. M., and Taylor, S. K. (1997). Environmental uranium and human health. *Rev Environ Health* 12, 147-157.
- Tirmarche, M., Baysson, H., and Telle-Lamberton, M. (2004). [Uranium exposure and cancer risk: a review of epidemiological studies]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 52, 81-90.
- Torner, L., and Neumann, I. D. (2002). The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation. *Stress* 5, 249-257.
- Torner, L., Toschi, N., Nava, G., Clapp, C., and Neumann, I. D. (2002). Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *Eur J Neurosci* 15, 1381-1389.
- Tracy, B. L., Quinn, J. M., Lahey, J., Gilman, A. P., Mancuso, K., Yagminas, A. P., and Villeneuve, D. C. (1992). Absorption and retention of uranium from drinking water by rats and rabbits. *Health Phys* 62, 65-73.
- Tymen, H., Gerasimo, P., and Hoffschir, D. (2000). Contamination and decontamination of rat and human skin with plutonium and uranium, studied with a Franz's chamber. *Int J Radiat Biol* 76, 1417-1424.
- Ubios, A. M., Guglielmotti, M. B., Steimetz, T., and Cabrini, R. L. (1991). Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ Res* 54, 17-23.
- Ubios, A. M., Marzorati, M., and Cabrini, R. L. (1997). Skin alterations induced by long-term exposure to uranium and their effect on permeability. *Health Phys* 72, 713-715.
- US-EPA (2000). national primary drinking water regulations, radionuclides, final rule. In *federal register Part II (40 CFR, parts 9, 141 and 142)*, pp. 76708-76753. United States Environmental Protection Agency.
- Voegtlin, C., and Hodge, H. (1949). *The pharmacology and toxicology of uranium compounds*. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- Von Böhlen und Halbach, O., and Dermitzel, R. (2002). *Neurotransmitters and neuromodulators, Hanbook of receptors and biological effects*. Wiley- VCH, Weinheim.
- Wang, Y. X., and Quastel, D. M. (1991). Actions of lead on transmitter release at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch* 419, 274-280.
- White, S., and Bondietti, E. (1983). Removing uranium by current municipal water treatment processes. *J. Am. Water Works Assoc.* 75, 374-380.
- WHO (2001). Depleted Uranium: Sources, Exposure and Health Effects - Full Report. In *WHO, 2001 (WHO/SDE/PHE/01.1)*. World Health Organization, Department of Protection of the Human Environment, Geneva.

- WHO (2004). Guidelines for drinking water quality, third edition. Chap. 9: radiological quality of drinking water. In *Guidelines for drinking water quality*, pp. 197-209. World Health Organization, Geneva.
- Winblad, B., Hardy, J., Backman, L., and Nilsson, L. G. (1985). Memory function and brain biochemistry in normal aging and in senile dementia. *Ann N Y Acad Sci* 444, 255-268.
- Wingerd, B., D., (1988). *Rat dissection manual*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Wrenn, M. E., Durbin, P. W., Howard, B., Lipsztein, J., Rundo, J., Still, E. T., and Willis, D. L. (1985). Metabolism of ingested U and Ra. *Health Phys* 48, 601-633.
- Wrenn, M. E., P. W. Durbin, and D. L. Willis (1987). The Potential Toxicity of Uranium in Water. *Am Water Works Assoc J* 79, 177-184.
- Yu, C. C., Lin, J. L., and Lin-Tan, D. T. (2004). Environmental exposure to lead and progression of chronic renal diseases: a four-year prospective longitudinal study. *J Am Soc Nephrol* 15, 1016-1022.