

Etude des effets multigénérationnels d'une exposition chronique à faible dose d'uranium par analyses omiques

Stephane Grison

► **To cite this version:**

Stephane Grison. Etude des effets multigénérationnels d'une exposition chronique à faible dose d'uranium par analyses omiques. Génétique humaine. Université Clermont Auvergne, 2018. Français. NNT : 2018CLFAC043 . tel-02059646

HAL Id: tel-02059646

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02059646>

Submitted on 6 Mar 2019

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

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



UNIVERSITÉ
Clermont Auvergne

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE
LA SANTE - AGRONOMIE - ENVIRONNEMENT

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Génétique, Physiologie, Pathologies, Nutrition, Microbiologie Santé, Innovation

Par **GRISON Stéphane**

TITRE DE LA THESE

**Etude des effets multigénérationnels d'une exposition
chronique à faible dose d'uranium par analyses omiques**

Soutenue publiquement le 13 décembre 2018, devant la commission d'examen.

Président du Jury : Pr Anne-Marie Lefrancois-Martinez (Université Clermont Auvergne)

Rapporteurs : Pr Francelyne Marano (Université PARIS-DIDEROT)
Pr Zdenko Herzeg (International Agency for Research on Cancer)

Examineur : Dr Isabelle Dublineau (Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire)

Membres invités : Dr Jean Charles Martin (Aix-Marseille Université)
Dr Eric Bonnet (Centre National de Recherche en Génomique Humaine)

Directeurs de thèse : Dr Maâmar Souidi (Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire)
Pr Jean-Marc Lobaccaro (Université Clermont Auvergne)



Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire (**IRSN**), Pôle Santé Environnement (**PSE**), service de recherche sur les effets biologiques et sanitaires des rayonnements ionisants (**SESANE**), dans le laboratoire de radiotoxicologie expérimentale (**LRTOX**) ;

31, avenue de la division Leclerc,

92260 Fontenay-aux Roses

RESUMES :

ETUDE DES EFFETS MULTIGENERATIONNELS D'UNE EXPOSITION CHRONIQUE A FAIBLE DOSE D'URANIUM PAR ANALYSES OMIQUES

Mots-clés : uranium, métabolomique, transcriptomique, épigénomique, multigénérationnel

Pour enrichir les connaissances scientifiques sur les effets biologiques des radionucléides et risques des contaminations chroniques sur la descendance, une étude multigénérationnelle *in vivo* d'exposition a été réalisée à doses non toxiques d'uranium. Ce modèle, a permis de suivre les effets biologiques de l'uranium sur trois générations de rats (F0, F1 et F2) par des analyses cliniques et le suivi de marqueurs biologiques. Dans cette étude, des analyses métabolomiques, transcriptomiques et épigénomiques ont été réalisées à partir d'échantillons de sang, d'urine et de rein.

Pour la première génération des rats contaminés (F0), des différences dépendant du sexe des animaux sont observables par l'analyse des niveaux d'expression géniques (ARNm et micro-ARN) dans les reins, des profils métabolomiques et biochimiques dans les reins, l'urine et le sang. Aucune modification épigénétique des profils de méthylation de l'ADN rénal n'est à noter. Pour les deux générations suivantes (F1 et F2), un effet multigénérationnel dépendant aussi du sexe des rats est observable au niveau des profils métabolomiques urinaires et rénaux ainsi qu'au niveau des profils épigénétiques de méthylation de l'ADN des reins. Une baisse de poids corporel et des reins a aussi été observée pour la troisième génération de rats chez les mâles (F2).

En conclusion, les travaux de cette thèse montrent qu'une contamination chronique à faible dose d'uranium entraîne des effets biologiques sur plusieurs générations de rats. Ils sont observables à différents niveaux moléculaires des systèmes de régulation cellulaires et dépendent du sexe des rats. Ces effets, étroitement liés à des systèmes biologiques intégrés, sont utiles à la compréhension des mécanismes biologiques des expositions à l'uranium et à l'évaluation des risques de nocivités à long termes. Dans le domaine de la radioprotection, ces résultats justifient la nécessité de considérer les dimorphismes sexuels des individus et les conséquences des expositions sur les générations à venir.

STUDY OF MULTIGENERATIONAL EFFECTS OF CHRONIC LOW-DOSE URANIUM EXPOSURE BY OMIC ANALYSIS

Keywords: uranium, metabolomics, transcriptomics, epigenomics, multigenerational

In order to deepen scientific knowledge regarding biological effects of radionuclides and associated risk to offspring, an *in vivo* multigenerational study of chronic exposure to a non-toxic dose of uranium was performed by monitoring three generation of rats (F0, F1 and F2). Clinical parameters and biological markers, including metabolomics, transcriptomics and epigenomics high throughput analysis were conducted in blood, urine and kidney samples.

For the first generation of contaminated rats (F0) sex-differences to uranium effects were observed in kidney for gene expression (mRNA, miRNA) and in kidney, urine and blood for biochemical parameters and metabolomics profiles. No epigenetic modification of DNA methylation profiles was shown in kidney. For the next two generations (F1, F2), a multigenerational sex-specific effect is observed for both metabolomics and renal DNA methylation profiles of contaminated rats. Moreover, for the last generation of male rats (F2), a decrease of both total body and kidney weight was shown.

In conclusion, low-dose chronic contamination of rats to uranium leads to multigenerational effects. Including sex-differences, they can be shown at different molecular levels of the cellular system. Depending of integrated system biology, data of this thesis are useful in the understanding of biological mechanisms of uranium effect and risk of delayed harmful effect. In the field of radiation protection, these results prove the requirement of considering sexual dimorphisms and consequences of such exposures to offspring.

REMERCIEMENTS

Quelques personnes ont significativement contribué à mon parcours professionnel. Elles m'ont fait confiance et m'ont encouragé à persévérer. Pour ces raisons, je souhaite les remercier dans ce manuscrit.

Je remercie tout particulièrement mon ami Maâmar et lui dédicace cette thèse qui signe l'aboutissement d'une grande aventure scientifique que nous avons menée avec beaucoup d'enthousiasme. Tout a commencé en 2006 lorsque nous nous sommes intéressés à la métabolomique en radiotoxicologie des faibles doses. Convaincus du potentiel de cette technique, nous, avons inscrit dans l'agenda stratégique de recherche de notre institut (2012) que la radiotoxicologie des faibles doses devait à présent s'investir dans les approches « omiques » et dans l'étude des mécanismes épigénétiques (supposés être responsables d'effets sur la descendance d'individus exposés). Nos convictions ont d'autant plus de sens que nos études ont été fructueuses et force est de constater que d'une part, ces approches sont développées dans de nombreux domaines de recherche et que d'autre part, le rôle de l'épigénétique est à présent cœur des problématiques sanitaires des expositions environnementales. Ce travail nous a permis d'échafauder une dynamique collective en créant un réseau de compétences solides dont l'ensemble des contributeurs nous permet d'être plus efficaces. Je me suis fait très plaisir en réalisant cette thèse sous la direction de Maâmar à qui j'exprime par ces quelques lignes toute ma gratitude pour m'avoir accompagné dans cette aventure, merci aussi pour sa générosité et son insatiable envie de transmettre.

La seconde personne que je souhaite remercier est Jocelyne Aigueperse sans qui cette aventure n'aurait pu exister. Il y a 24 ans, Jocelyne m'a fait confiance et m'a donné la chance de rejoindre son service. Au cours des années passées sous sa direction, Jocelyne m'a soutenu et encouragé à persévérer pour progresser. C'est en suivant ses conseils qu'il m'a finalement été permis de faire mes preuves au poste de chercheur et par la suite offert la possibilité de faire cette thèse.

Une thèse est faite de travail, d'apprentissage, de partage et d'imprévu. C'est en tous cas, la recette de celle-ci dont Jean-Marc Lobaccaro est l'un des principaux soutiens. Je souhaite le remercier tout particulièrement pour avoir pris le temps de considérer mon parcours atypique et d'avoir accepté d'être mon second directeur de thèse. Je souhaite aussi le remercier pour son accompagnement dans ce projet professionnel que j'espère pouvoir mettre à profit et faire perdurer.

Je ne pouvais pas manquer de remercier Isabelle Dublineau qui fait partie des personnes qui m'ont soutenu et fait confiance dans mon parcours. Si je songe à ces quelques années professionnelles passées ensemble, je pense à une grande aventure marquée par quelques étapes qui m'ont énormément appris tant elles étaient riches en enseignements scientifiques, techniques et sociaux. Ces différentes étapes sont passées par les sites de Valduc, Jouy-en-Josas, Pierrelatte et même Petawawa. Ces lieux sont riches de souvenirs mais aussi d'apprentissage. Ils m'ont appris à anticiper, à m'organiser, à travailler dans un esprit collectif, et à surmonter la promiscuité (ce qui n'était pas toujours chose facile après une très longue journée de travail). Cependant, les campagnes expérimentales sont certainement une des meilleures formations car elles nous font grandir. C'est aussi au cours de ces périples que j'ai commencé à me questionner, à avoir envie d'innover et de participer au projet collectif en qualité de « jeune chercheur ». Isabelle est la première à m'avoir permis d'aller au-delà de ma fonction en me permettant d'élaborer mes premiers projets et protocoles expérimentaux, pour tester mes premières et modestes hypothèses scientifiques. Chaque aventure possède ses personnages principaux et parmi ceux qui font partie de la mienne était un trio qui avait imaginé un soir, dans une voiture roulant vers Paris, réaliser certains projets en radiotoxicologie des faibles doses. Depuis, beaucoup de résultats scientifiques ont été publiés sur cette thématique et se dire que nous avons pu y contribuer, est une belle récompense.

Ce travail serait tout autre sans le soutien technique et scientifique de Jean-Charles Martin. Jean-Charles nous a ouvert en 2006 les portes de son laboratoire pour tester cette nouvelle technique du curieux nom de métabolomique. Aujourd'hui, une grande partie des travaux menés ensemble ont permis d'aboutir à la réalisation de cette thèse sur les effets à long terme des expositions chroniques à faible dose d'uranium. Nous sommes rentrés chez Jean-Charles dans un domaine novateur qui est celui des sciences « omiques ». Un monde où le flux des données produites suscite de nombreux questionnements et nous ouvre de larges horizons. Un monde complexe qu'on essaye méthodologiquement de simplifier. Enfin, un monde très enrichissant où l'on côtoie de nombreuses sciences. C'est pourquoi je souhaite dire à Jean-Charles un grand MERCI pour son soutien, son aide, sa collaboration et aussi pour m'avoir encouragé à m'inscrire dans ce travail de thèse.

Dans cette série de remerciements je pense à Marc Benderitter qui, lorsque je lui ai fait part de l'opportunité de m'inscrire dans une formation doctorale, m'a en sa qualité de chef de service et sans aucune retenue, encouragé à m'inscrire dans ce travail. Alors simplement, merci Marc.

Je remercie l'ensemble des membres de mon jury de thèse qui ont accepté de participer à ma soutenance. Je remercie aussi l'IRSN qui m'a autorisé à réaliser ce travail et la société ORANO qui m'a fait confiance et a soutenu une partie de ce travail.

Je remercie aussi tous ceux qui par leur qualité professionnelle, leur bienveillance, leurs mots d'encouragement et leur collaboration ont apporté leur contribution à mon parcours professionnel et j'espère que ceux que j'aurais pu oublier ne m'en voudront pas. Je commencerais par remercier Audrey Legendre, Béninia Habchi, Céline Gloaguen, Christelle Elie, David Cohen, Dimitri Kéréséldzé, Eric Blanchardon, Fabien Milliat, Frédéric Voyer, Gaëlle Favé, Georges Tarlet, Ghada Elmhiri, Line Manens, Matthieu Maillot, Mohamed Amine Benadjaoud, Olivia Delissen, Philippe Lestaevel, Sandra Bohand, Thierry Loiseau qui sont soit co-auteurs de mes articles soit étroitement liés à mes travaux de thèse,

mais aussi, Agnès François, Amandine Saché, Bernadette Dhieux, Bruno L'Homme, Carine Strup, Catherine Lecomte, Cécile Martin, Cédric Baudelin, Céline Dinocourt, Christelle Adam-Guillermin, Christelle Demarquay, Christelle Durand, Christelle Ibanez, Christine Linard, Christophe Joubert, Christophe Maubert, Chrysostome Yiannakis, Claire Squiban, Dalila Lebsir, David Barbacci, David Suhard, David Volle, Delphine Denais-Lalieve, Dominique Laurier, Elisa Laveille, Eric Grégoire, Eric Jouve, Eric Vial, Fabienne Lebrun, Fabrice Petitot, Franck Tourniaire, François Paquet, François Rebiere, Gaïtan Gruel, Géraldine Gonon, Guillaume Phan, Jaime Angulo-Mora, Jean & Béatrice Carrel, Jean Guiguet, Jean-françois Bottellier Depois, Jean-françois Landrier Jean-Marc Bertho, Jean-Pierre Forato, Johanna Stéfani, Karine Tack, Keltoum Mediana, Laurence Roy, Laurent Caput, Lilian Dolci, Ljubica Svilar, Nicolas Dudoignon, Nina Griffiths, Olivier Guipaud, Pascale Monti, Pascale Scanff, Patrick Laloï, Philippe Voisin, Romain Granger, Sandrine Quernée, Teni Ebrahimian, Valérie Holler, Véronique Joffre, Yann Ascoli, Yann Gueguen qui ont accompagné une partie de mon parcours professionnel.

Au terme de ce projet, je remercie ma femme Danièle qui m'a soutenue, qui a eu le courage de lire ce manuscrit et qui a surtout su faire preuve de patience ces cinq derniers mois de fin de thèse. Merci à mes enfants, William et Léa qui m'ont motivé pour les accompagner dans leur vie d'étudiant. Je souhaite aussi remercier ma famille et mes amis qui me sont chers, pour leurs encouragements et leur implication dans cette aventure. Je souhaite marquer la fin de ces remerciements par une pensée affective pour ceux qui ne sont plus mais avec qui j'aurais souhaité pouvoir partager ce moment.

Merci à tous.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	9
LISTE DES ABREVIATIONS	15
LISTE DES FIGURES	18
PREAMBULE	1
INTRODUCTION	7
1. EFFETS BIOLOGIQUES	9
1.1. <i>Les expositions aux rayonnements ionisants</i>	9
1.2. <i>Les expositions chimiques</i>	14
1.3. <i>Le monde complexe des faibles doses</i>	16
2. EFFETS EPIGENETIQUES	21
2.1. <i>Aspect moléculaire</i>	21
2.1.1. Accessibilité et lecture des gènes	22
2.1.2. Inhibition des ARN codants par des ARN non codants	24
2.2. <i>Fonctions et propriétés biologiques</i>	27
2.2.1. Différenciation cellulaire	28
2.2.2. Phénomène d’empreinte	28
2.2.3. Adaptation pré et post-natale de l’organisme à son environnement	28
2.2.4. Pathologies tardives et cancers	29
2.2.5. Vieillesse	29
2.2.6. Stress oxydatif	29
2.2.7. Relation dose-effet.....	30
2.2.8. Transmission de marques épigénétiques	30
2.3. <i>Bioindicateur de diagnostic et de pronostic</i> :	31
2.3.1. La méthylation de l’ADN	31
2.3.2. Les micro-ARNs.....	32
3. IMPLICATION DU DIMORPHISME SEXUEL	33
3.1. <i>Différences épigénétiques</i>	33
3.2. <i>Différences génétiques</i>	34
3.3. <i>Différences métaboliques</i>	34
3.4. <i>Différences phénotypiques</i>	34
3.5. <i>Différences toxicologiques et pharmacologiques</i>	34
3.6. <i>Différences générationnelles</i>	34
4. HERITABILITE D’UNE EXPOSITION A FAIBLE DOSE	37
4.1. <i>Effet multi et transgénérationnel</i>	37
4.1.1. Effet multigénérationnel	37
4.1.2. Effet transgénérationnel.....	37
4.2. <i>Périodes de sensibilité épigénétique et développementale</i>	38
4.2.1. Le développement germinale	38
4.2.2. Le développement embryonnaire	40
4.2.3. La période néonatale	41
5. «OMIQUES» : TECHNIQUES SENSIBLES A HAUTS DEBITS.	43
5.1. <i>Métabolomique</i>	44
5.2. <i>Transcriptomique</i>	47
5.3. <i>Epigénomique</i>	49
5.4. <i>Analyse « multiomique »</i>	50
6. L’URANIUM.....	51
6.1. <i>Toxicité de l’uranium</i>	52
6.1.1. L’uranium est radioactif	52
6.1.2. L’uranium est un métal lourd.....	53
6.2. <i>Faibles doses d’uranium</i>	57
OBJECTIFS	59
1. STRATEGIE D’ETUDE EXPERIMENTALE	63
2. MODELES EXPERIMENTAUX	67
2.1. <i>Modèle I : effet-dose / effet-temps</i>	67
2.2. <i>Modèle II : effets d’une exposition multigénérationnelle</i>	69
RESULTATS	73

1.	ARTICLE I :	75
2.	ARTICLE II :	79
3.	ARTICLE III :	83
ANNEXES		87
1.	RESULTATS : DIMORPHISME SEXUEL D'UNE EXPOSITION A L'URANIUM.....	89
1.1.	<i>Profils épigénétiques post-transcriptionnels des micro-ARNs dans le tissu rénal des mâles et femelles.....</i>	89
1.2.	<i>Dimorphisme épigénétique d'une contamination à l'uranium</i>	90
1.3.	<i>Conclusion.....</i>	91
2.	RESULTATS : APPROCHE MULTIGENERATIONNELLE : IMPACT DE L'URANIUM SUR LE METABOLOME DE LA GENERATION F1 : « LES ENFANTS »	93
2.1.	<i>Profils urinaires</i>	93
2.1.1.	Matériel et méthodes	93
2.1.2.	Résultats	95
2.2.	<i>Profils rénaux</i>	98
2.2.1.	Matériel et méthodes	98
2.2.2.	Résultats	98
2.3.	<i>Conclusions</i>	102
3.	RESULTATS : APPROCHE MULTIGENERATIONNELLE : IMPACT DE L'URANIUM SUR LE METABOLOME DE LA GENERATION F2 : « LES PETITS ENFANTS »	103
3.1.	<i>Profils urinaires</i>	103
3.1.1.	Résultats	103
3.2.	<i>Profils rénaux</i>	105
3.2.1.	Résultats	105
3.3.	<i>Conclusions</i>	107
DISCUSSION		109
CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES		125
ARTICLES ANNEXES		129
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		133

LISTE DES ABREVIATIONS

¹³⁷Cs : Césium-137

²³⁸, ²³⁵, ²³⁴U : Isotopes 238, 235, 234 de l'uranium

⁹⁰Sr : Strontium-90

ACN: Acétonitrile

ACP : Analyse en Composantes Principales (analyse non-supervisée)

AOP: Adverse Outcome Pathways (mécanismes biologiques pouvant conduire à des effets néfastes)

CIPR : La Commission Internationale de Protection Radiologique (ICRP en anglais)

DNMTs: DNA methyltransferases

DOHaD : Developmental Origins of Health and Disease (origines développementales de la santé et des maladies)

ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

Ilot CpG : Suite nucléotidique Guanine-phosphate-Cytosine sur la molécule d'ADN

IXRPC : X-ray and Radium Protection Committee jusqu'en 1950 pour devenir ICRP

MATE : Multidrug And Toxic Compound Extrusion

mGy : milligray (unité de dose absorbée, le Gray)

miARNs : micro-ARNs

mSv : millisievert (unité utilisée pour donner une évaluation de l'impact des rayonnements ionisants sur l'homme. Unité de la dose absorbée par unité de masse qui tient compte des effets sur l'être humain, le Sv).

OCT : Organic Cation Transporters

OMS : Organisation Mondiale de la Santé (WHO en anglais)

OPLS-DA : Analyse orthogonale discriminante des moindres carrés partiels (analyse supervisée qui concentre toute la différence des groupes sur la première composante)

PLS : Régression des moindres carrés partiels ou Partial Least Square en anglais (analyse statistique supervisée)

PLS-DA : Analyse discriminante des moindres carrés partiels (analyse supervisée)

RPM : Revolution Per Minute (anglais) ; tour par minute

RT : Retention Time (anglais) temps de rétention (chromatographie)

SAM : S-Adénosylméthionine

VTR : Valeurs Toxicologiques de Référence (indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine).

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : chronologie des principales sources de pollution des eaux continentales dans les pays industrialisés, d'après C. Lévêque, <i>Écosystèmes aquatiques</i> (Hachette, 1996).	3
Figure 2 : gamme de réponse biologique aux faibles doses d'exposition.....	4
Figure 3 : principales sources de dispersions environnementales d'éléments radioactifs depuis les années 50.....	10
Figure 4 : la réponse biologique aux faibles doses est fortement influencée par l'ensemble des facteurs endogènes et exogènes.....	17
Figure 5 : trois systèmes épigénétiques de régulation (méthylation de l'ADN, code histone et micro-ARNs).....	22
Figure 6 : inhibition transcriptionnelle par méthylation des zones promotrices des gènes..	23
Figure 7 : réaction de méthylation des cytosines en 5-méthylcytosines (5-mC) au niveau des îlots CpG.....	23
Figure 8 : réactions de déméthylation des cytosines en 5-méthylcytosines (5-mC) au niveau des îlots CpG.....	24
Figure 9 : schéma de synthèse nucléaire d'un micro-ARNs.....	25
Figure 10 : contrôle post-transcriptionnel par les micro-ARNs.....	26
Figure 11 : rôles biologiques des longs ARNs non codants.....	27
Figure 12 : modes de transmission des marques épigénétiques portées par l'ADN.....	30
Figure 13 : mécanisme semi conservatif de méthylation de l'ADN.....	31
Figure 14 : périodes de sensibilité développementale liées aux phases de reprogrammations épigénétiques de l'ADN.....	38
Figure 15 : stratégie analytique de découverte scientifique par les approches "omiques"....	43
Figure 16 : mesure de la réponse dynamique à un stress environnemental par l'analyse des mécanismes et réseaux moléculaires d'un système complexe à régulations multiples par analyses intégratives de données « omiques ».....	44
Figure 17 : limites techniques des deux approches métabolomiques.....	45
Figure 18 : principe méthodologique général d'une analyse métabolomique.....	46
Figure 19 : principe général d'analyse transcriptomique par microarray.....	48
Figure 20 : découverte fortuite de la radioactivité en 1896 par Henri Becquerel à partir d'uranium.....	51
Figure 21 : chaîne de filiation de l'uranium 238 (source IRSN).....	53
Figure 22 : biodistribution de l'uranium.....	54
Figure 23 : rétention de l'uranium au niveau des cellules épithéliales du segment S3 du tube contourné proximal du néphron.....	55
Figure 24 : proposition de stratégie expérimentale d'une étude basée sur les effets biologiques des faibles doses.....	64
Figure 25 : stratégie analytique d'étude d'une exposition multigénérationnelle à l'uranium	65
Figure 26 : protocole de contamination effet-dose / effet- temps (i.e. échelle de temps, groupe d'animaux contrôles et groupes d'animaux contaminés, périodes de contamination par l'uranium naturel).....	68
Figure 27 : principe d'une exposition multigénérationnelle à l'uranium sur trois générations successives.....	70
Figure 28 : protocole de contamination multigénérationnelle (i.e. échelle de temps, périodes de contamination par l'uranium naturel).....	71
Figure 29 : signaux analytiques discriminants chez les animaux contaminés à l'uranium .	76
Figure 30 : représentation multiéchelle d'une analyse systémique des effets biologiques d'une exposition chronique faible dose à l'uranium dans le rein.....	80
Figure 31 : cycle de méthylation de l'ADN au niveau des cytosines des îlots CpG.....	84
Figure 32 : effet épigénétique d'une exposition multigénérationnelle à l'uranium.....	85
Figure 33 : Dimorphisme sexuel des profils épigénétiques post-transcriptionnels (micro-ARNs) par analyse en composante principale (ACP). FT : femelles témoins, FU : femelles contaminées, MT : mâles témoins, MU : mâles contaminés.....	89

Figure 34 : profils de micro-ARNs rénaux discriminants chez les mâles contaminés à l'uranium par analyse PLS-DA	90
Figure 35 : profils de micro-ARNs rénaux discriminants chez les femelles contaminées à l'uranium par analyse PLS-DA	91
Figure 36 : Dimorphisme sexuel de la réponse épigénétique post-transcriptionnelle du rein	91
Figure 37 : identités putatives des métabolites discriminants identifiés dans les urines de rats mâles contaminés	96
Figure 38 : identités putatives des métabolites discriminants identifiés dans les urines de rats femelles contaminées	97
Figure 39 : dimorphisme sexuel d'une exposition chronique à l'uranium dans les urines de la seconde génération (F1).....	98
Figure 40 : analyse en composante principale réalisée à partir des signaux enregistrés par LC-MS sur l'ensemble des échantillons de rein des animaux de génération F1 (mâles, femelles, témoins et traités confondus)	99
Figure 41 : OPLS-DA réalisée à partir des signaux enregistrés par LC-MS avec l'ensemble des échantillons de rein des animaux de génération F1 (mâles, femelles, témoins et traités confondus)	100
Figure 42 : analyse PLS-DA des signaux d'échantillons des reins mâles après sélection des variables (NPP sur VIP).....	100
Figure 43 : analyse PLS-DA des signaux d'échantillons des reins femelles après sélection des variables (NPP sur VIP).....	101
Figure 44 : dimorphisme sexuel d'une exposition chronique à l'uranium dans les reins de la seconde génération (F1).....	102
Figure 45 : analyse en composante principale des urines de mâles et femelles confondus..	103
Figure 46 : dimorphisme sexuel d'une exposition chronique à l'uranium dans les urines de la troisième génération (F2)	105
Figure 47 : ACP réalisée à partir des 2934 signaux analytiques des reins mâles et femelles F2	106
Figure 48 : analyse OPLS-DA réalisée sur l'ensemble des échantillons des reins F2 (mâles et femelles)	107
Figure 49 : fréquence des publications produites sur la thématique de la toxicité de l'uranium entre 1895 et 2018.....	111
Figure 50 : principaux questionnements scientifiques abordés dans cette thèse	113
Figure 51 : schéma mécanistique hypothétique des effets multigénérationnels d'une exposition chronique à faible dose d'uranium naturel.	123
Figure 52 : facteurs influents sur l'observation des effets biologiques des faibles doses	128

PREAMBULE

La seconde moitié du vingtième siècle est marquée dans l'hémisphère nord par un développement exponentiel de l'activité industrielle. Parmi les activités fleurissantes du moment, les industries chimiques, pétrochimiques et électronucléaires ont dès la fin de la seconde guerre mondiale été en plein essor, contribuant à la modernisation et à l'amélioration des conditions de vie des populations. Paradoxalement, cette quête de développement fut aussi source de pollutions environnementales (en fonctionnement normal ou accidentelles) affectant à faibles niveaux, l'ensemble des écosystèmes et les populations humaines.

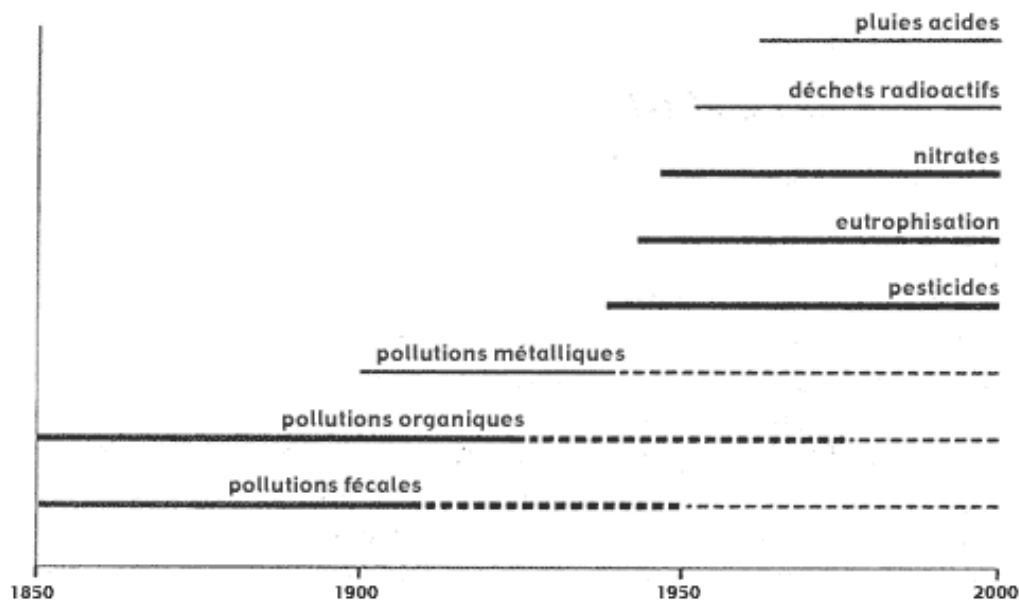


Figure 1 : chronologie des principales sources de pollution des eaux continentales dans les pays industrialisés, d'après C. Lévêque, *Écosystèmes aquatiques* (Hachette, 1996).

Parallèlement à ce développement d'activité industrielle, une augmentation de la fréquence d'apparition de certains cancers (leucémies, cancer du pancréas, cancer des testicules...) et maladies métaboliques (hypertension, diabète, obésité) affectant principalement les nouvelles générations est observée.

Fort de ce constat, l'existence d'un potentiel risque sanitaire lié aux expositions environnementales des populations est devenue un sujet majeur de préoccupation qui depuis quelques dizaines d'années, anime les politiques de santé publique et interroge le monde scientifique.

☞ À ce sujet, le concept d'exposome [1] est récemment entré dans l'article 1er de la loi de santé publique (adoptée en avril 2015) par l'Assemblée nationale (loi santé Marisol Touraine) et en 2017, un projet a été fondé autour d'un consortium européen pour développer une nouvelle approche d'évaluation de l'exposition à des polluants environnementaux qualifiés de hautement prioritaires [2].

Cette subite prise de conscience collective peut s'expliquer par l'alourdissement des dépenses de santé mais aussi et surtout par une pression sociétale grandissante qui, au regard de ses propres inquiétudes amplifiées par quelques récents scandales sanitaires, s'interroge de plus en plus sur l'impact sanitaire des expositions environnementales.

Ces expositions environnementales sont majoritairement de faibles niveaux de doses et susceptibles d'exposer les populations chroniquement. Selon le National Institute of Environmental Health Sciences américain, une faible dose est estimée comme une dose d'exposition dont le niveau se situe dans la gamme des doses d'exposition humaines et à des niveaux inférieures aux seuils utilisés dans les études toxicologiques traditionnelles, pour lesquels des effets biologiques forts peuvent être observés.

Bien que relativement précise, cette définition est incomplète car elle ne tient pas compte des différents paramètres physico-chimiques et biologiques susceptibles de moduler le niveau d'impact ou la toxicité d'une exposition donnée (durée, débit, nature de la source, la voie d'exposition, période développementale de la vie, le sexe de l'individu, expositions multiples, état de santé...). Qu'il s'agisse d'effets biologiques des rayonnements ionisants ou des substances chimiques, cette composante multiparamétrique accroît le niveau d'incertitude dans la définition même des seuils de toxicité des expositions lorsque l'on s'intéresse aux effets des faibles doses.

☞ *Ce dernier point présentant en grande partie la complexité de cette problématique [3].*

Selon Philippe Hubert [4], parler de faibles doses serait incorrect car il serait plus juste de parler de «doses pour lesquelles on observe des effets biologiques faibles».

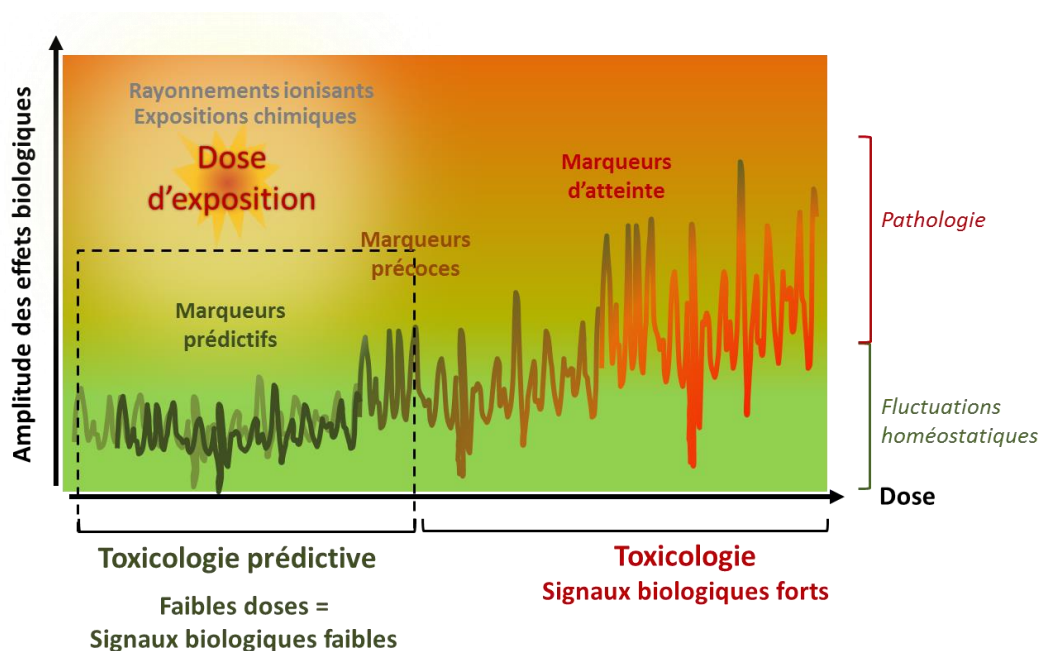


Figure 2 : gamme de réponse biologique aux faibles doses d'exposition

Dans cette gamme, les effets observables sont généralement difficilement mesurables voire même non décelables par les méthodologies analytiques usuellement utilisées en toxicologie cliniques ou en épidémiologie.

Ce domaine d'exposition concerne essentiellement celui des expositions environnementales. La prise de conscience que des faibles doses pouvaient présenter un risque pour la santé, trouve ses origines dès les années 50 avec la problématique des expositions aux rayonnements ionisants. En effet, à cause du développement des exploitations industrielles et des armements nucléaires qui ont été sources d'accidents, cette problématique des expositions aux rayonnements ionisants s'est rapidement posée.

☞ Dès lors, la CIPR a mis en place sa première norme de radioprotection (1959) pour réduire le risque d'apparition d'effets néfastes radio-induits.

Souvent liée à l'actualité, cette problématique anxiogène des expositions environnementales resurgissait de manière épisodique et était peu suivie dans la durée. Dans un autre domaine d'exposition environnementale, celle des expositions aux agents chimiques utilisés en agriculture (pesticides) ou dans le bâtiment (amiante) n'a quant à elle inquiété l'opinion publique que vers les années 70.

Il faudra attendre la catastrophe nucléaire de Tchernobyl (1986) et le constat d'une exposition des populations de grande ampleur, pour que la considération des risques sanitaires engagés par l'industrie électronucléaire soit cette fois-ci mondialement relancée. Viendront ensuite s'ajouter au débat général dès les années 90, des questionnements liés à l'observation d'une augmentation de fréquence d'apparition des leucémies, des cancers, des maladies métaboliques et développementales, de la baisse de fertilité des populations et de l'impact des maladies neurodégénératives sur les politiques de santé publiques [5].

☞ De plus en plus de spécialistes associent ces observations à l'utilisation et l'exposition environnementale à divers agents dont la chronicité des expositions est susceptible de pouvoir avoir des conséquences sanitaires sur les populations à plus longs termes. Parmi les sources d'expositions incriminées et sujets de préoccupations : l'amiante, les dioxines, les rayonnements ionisants et radionucléides (autour des sites nucléaires), les émissions de rayonnements non-ionisants (télécommunication), les pesticides (largement utilisés dans l'agriculture), les perturbateurs endocriniens (utilisés dans l'industrie plasturgique), les nanoparticules (retrouvées dans les cosmétiques et les aliments), le benzène et autres pollutions liées à l'exploitation des hydrocarbures mais aussi l'hygiène de vie et les habitudes alimentaires, qui peuvent aussi être responsables d'effets sanitaires à plus ou moins longs termes.

Comme mentionné, la problématique des effets biologiques et sanitaires susceptibles d'être engagés par des faibles doses d'exposition n'est pas simple à aborder. Outre les faibles amplitudes des fluctuations moléculaires observables qui présentent des décalages de cinétiques temporelles [6], la composante multiparamétrique des effets des faibles doses ajoute de la complexité aux études épidémiologiques qui manquent souvent de puissance statistique dans cette gamme de dose, pour pouvoir mettre en évidence un effet sanitaire fortement suspecté.

Face à cette difficulté, l'observation et compréhension des mécanismes moléculaires complexes qui peuvent, à des niveaux de détection proches du bruit de fond biologique, conduire à des effets indésirables ou maladies doivent passer par la mise en œuvre de stratégies expérimentales et analytiques innovantes, robustes et extrêmement sensibles qui, sur la base de leurs résultats, fourniront de la puissance statistiques aux approches épidémiologiques (domaine de l'épidémiologie moléculaire). Ces données scientifiques contribueront à fournir l'information nécessaire et utile à l'expertise ; préalables à l'évolution des normes et politiques de santé.

L'estimation d'un risque, nécessite de pouvoir identifier un effet indésirable tel qu'une nocivité, une toxicité, une maladie qui peuvent être la conséquence d'un désordre métabolique ou physiologique (pathologie). Or, faute de marqueurs prédictifs d'effets, le risque est difficilement estimable dans le domaine des expositions environnementales où les doses délivrées n'entraînent généralement pas de manifestation clinique immédiate ou d'effets suffisamment nets et spécifiques pour être associés à l'apparition d'une pathologie (marqueurs précoces).

☞ A ce titre, l'utilisation de techniques analytiques récentes et de très grandes sensibilités pourrait fournir des informations scientifiques extrêmement fines et être un atout majeur pour appréhender plus efficacement cette problématique complexe [7].

Dans ce contexte, de plus en plus d'études scientifiques mettent en évidence à différents niveaux de l'échelle des systèmes moléculaires de régulation des systèmes biologiques, des effets associables à de telles expositions par la mise en œuvre de nouvelles approches d'analytiques, permettant à haut débit d'analyse, de couvrir de nombreux champs d'études tels que la génomique, la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique et d'en comprendre les rouages et interactions. Ces techniques qui consistent à analyser un système dans son ensemble sont toutes définies par la suffixe « omique » [8].

La mise en œuvre de protocoles d'études ciblées sur la problématique des effets des faibles doses d'expositions n'en demeure pas moins complexe car l'ensemble des facteurs endogènes et exogènes (sexe, âge, climat, saisons, environnement psychosocial, stress, origines ethniques, alimentation, état de santé, rythmes nycthémeraux, autres sources d'exposition), capables d'avoir une influence sur le niveau de la réponse biologique à une exposition donnée peut impacter significativement la qualité des résultats obtenus et en conséquence, la pertinence des conclusions qui seront formulées.

INTRODUCTION

1. EFFETS BIOLOGIQUES

1.1. LES EXPOSITIONS AUX RAYONNEMENTS IONISANTS

La radioactivité est un phénomène physique naturel avec lequel la vie terrestre et aquatique a dû s'adapter. Le niveau d'exposition naturel des populations aux rayonnements ionisants (d'origine cosmique et tellurique) se situe entre 2 mSv (France) et plus de 250 mSv par an (Brésil, Iran, Kerala, Chine) suivant la région du monde considérée [9]. A ces niveaux naturels d'exposition, viennent s'ajouter ceux de l'ensemble des activités humaines (industrielles, militaires et médicales) qui sont considérées comme des sources potentielles d'exposition à faibles doses de rayonnements ionisants.

☞ *35 % des expositions sont issus des expositions médicales, 32 % des émissions de radon, 12 % d'origine tellurique, 12 % de l'alimentation et 7 % provenant du rayonnement cosmique (Rapport IRSN/2015-00001).*

☞ *Un vol transatlantique correspond à 0.05 mSv, un scanner à 10-20 mSv et une mammographie à 8,4 mGy [10]. L'exposition totale moyenne en France des populations se situe aux alentours de 4.5 mSv/an.*

D'un point de vue historique, les premières interrogations concernant l'existence d'effets indésirables radio-induits et les limites de doses d'exposition à ne pas dépasser, remontent au début du 20^{ème} siècle [11].

Le premier principe de radioprotection a été adopté en 1924 après que le physicien américain Arthur Mutscheller ait observé qu'une exposition professionnelle de 5,2 Gy sur 30 jours provoquait un érythème de la peau. Il suggéra alors de limiter l'exposition des personnes en diminuant arbitrairement cette dose quotidienne admissible d'un facteur 100 (~0.002 Gy). Une dizaine d'années plus tard, un premier seuil de dose d'exposition basé sur l'observation d'effets déterministes des fortes doses sera fixé à 700 mSv/an par le Comité International de Protection contre les Rayons X et le Radium (IXRPC) [12]

☞ *Ce seuil d'exposition est 35 fois supérieur à la norme actuelle de radioprotection.*

La prise de conscience que des faibles doses d'exposition à des rayonnements ionisants pouvaient avoir des effets sur la santé, trouve son origine à la fin de la seconde guerre mondiale [13]. Cette inquiétude est apparue à la suite des nombreux essais atomiques atmosphériques réalisés par les États Unis d'Amérique dans les années 50 (16 essais en 1951) et particulièrement des suites accidentelles de l'essai de la bombe H « Castle Bravo » en 1954 dont les conséquences sanitaires furent notables (15 MT soit 1300 fois Hiroshima). Dès lors, la prise de conscience de l'existence d'un risque pour la santé des expositions à faibles doses a commencé à alerter l'opinion publique et à initier la polémique sur ce sujet.

☞ *Lors de cet accident, les 23 membres d'un bateau de pêche Japonais (Daigo Fukuryū Maru) qui naviguait à 160 Km de la zone de tir furent pris de douleurs, nausées et d'inflammations cutanées. Ce test eut un impact écologique et sanitaire considérable, exposant des personnels militaires et civils ainsi que les populations locales d'Ultirik et Rongelap situés dans l'état des îles Marshall.*

☞ *Entre 1945 et 1980, les 520 essais nucléaires atmosphériques réalisés sur cette période ont dispersés 9.10^{17} Bq dans la nature soit 20 fois plus que l'accident de Tchernobyl ou de Fukushima Daiichi.*

Deux théories seront avancées en 1957 pour décrire la relation dose-effet des effets biologiques des rayonnements ionisants. La première théorie propose une relation linéaire sans seuils entre la dose reçue et l'apparition de leucémie (Edward Lewis) alors que l'autre, fondée sur l'observation des données issues des victimes de Hiroshima et Nagasaki, montre l'existence d'un seuil à 100 mSv pour les leucémies et un autre à 200 mSv pour les autres cancers.

☞ Le modèle « dose-effet linéaire sans seuil » fut choisi en 1958 par la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR et ex. ICRP) pour fixer une norme de seuil au-dessous duquel le risque pouvait être considéré comme acceptable (50 mSv pour les travailleurs et 5 mSv pour le public).

Dans les années 1970, avec le développement de l'industrie électronucléaire civile, la polémique sur les effets des faibles doses reprend mais c'est surtout l'accident de la centrale nucléaire de Tchernobyl (1986), qui en créant un désastre écologique et sanitaire sur une grande partie de l'Europe, a en grande partie alerté l'opinion publique et entraîné une prise de conscience collective quant au risque engagé pour les populations par les expositions chroniques à faibles doses de rayonnements ionisants. Cette problématique étant devenue un sujet sociétal majeur.

☞ L'accident Tchernobyl a libéré 4.10^{16} Bq d'éléments radioactifs (iode 131, césium 134 et césium 137) sur une grande partie du territoire européen. Certaines zones de dépôts dépassant les 40 000 Bq/m² (voire jusqu'à plusieurs centaines de milliers à certains endroits) (site IRSN : 1986-2016 : Tchernobyl, 30 ans après. Impacts de l'accident de Tchernobyl en France et en Europe).

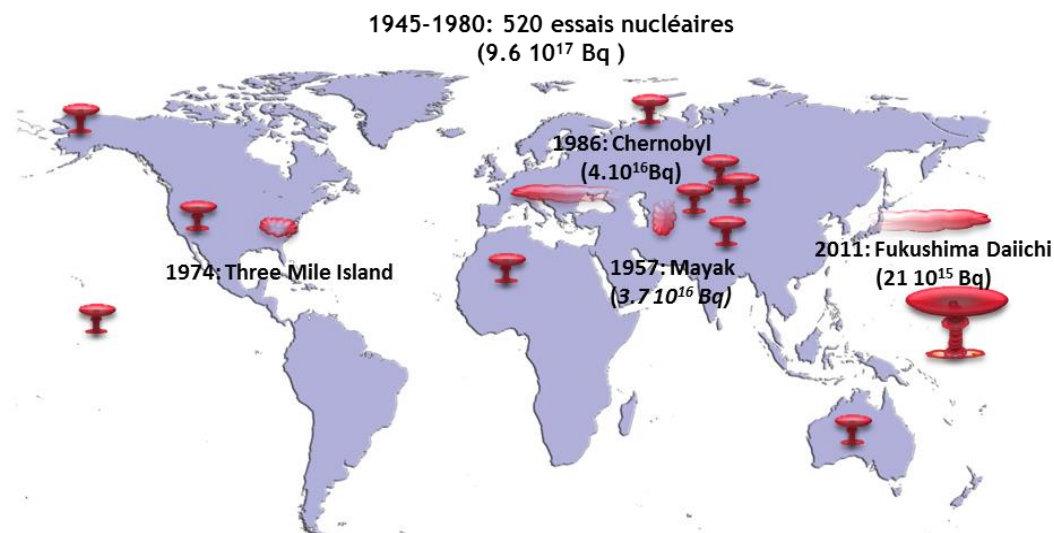


Figure 3 : principales sources de dispersions environnementales d'éléments radioactifs depuis les années 50.

Depuis, les normes de radioprotection ont encore été abaissées de 50 à 20 et de 5 à 1 mSv sur 12 mois. Seulement, en se basant sur l'apparition d'effets déterministes, toute extrapolation réalisée à partir d'une relation dose-effet linéaire sans seuil demeure inadaptée car en réalité très éloignée de la relation réelle associable aux faibles doses.

☞ Il est à noter aussi que cette valeur minimale de 1 mSv.an^{-1} pour les populations est égale à celle du bruit de fond naturel mesuré en France et 50 fois plus faible que celui mesuré dans certaines régions du monde (Brésil, Iran, Kerala). Ce point montre l'ampleur et la complexité du problème des effets des expositions à faibles doses de rayonnements ionisants pour lesquels les valeurs adoptées par principe de précaution sont incluses dans la gamme des expositions naturelles (même si elles sont considérées comme additives).

Au sujet des risques associés au développement mondial de l'industrie électronucléaire, à l'augmentation exponentielle du nombre d'examen médicaux, aux conséquences de l'accident de la centrale de Tchernobyl en 1986 et de Fukushima-Daiichi en 2011, le manque de données épidémiologiques et scientifiques ne permet toujours pas d'apporter des réponses claires sur la problématique des effets biologiques des faibles doses de rayonnements ionisants d'autant plus qu'un grand nombre de centrales nucléaires vieillissantes en activité, inquiètent particulièrement les populations.

☞ *Pour des doses inférieures à 100 mSv (gamme extrapolée des faibles doses), le risque d'apparition d'effets biologiques indésirables (nocivité) ou de signes cliniques non cancéreux (toxicité) est beaucoup plus difficile à observer qu'au-dessus de cette dose. Le risque de cancer radio-induit est quant à lui estimé comme nul (selon les données issues du suivi des survivants d'Hiroshima). Ce point montre l'ampleur de la difficulté rencontrée pour définir des seuils dans une gamme dépourvue d'effets cliniques tangibles.*

Cette valeur limite de 100 mSv a été retenue par la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR Publication 103) comme la valeur de référence pour définir la limite haute de la gamme des faibles doses de rayonnements ionisants [14]. Or, bien que difficilement observables dans cette gamme de doses, des effets biologiques stochastiques, fortement influencés par des facteurs environnementaux (endogènes ou exogènes), ont pu être détectés expérimentalement à l'échelle moléculaire, cellulaire et parfois physiologique lors d'expositions au césium-137 [15, 16].

L'utilisation exponentielle des rayonnements ionisants pour des actes de diagnostic médical est un autre sujet de préoccupation pour lesquels aussi les études épidémiologiques manquent de puissance statistique pour statuer. Parmi ces actes, l'utilisation de plus en plus courante en pédiatrie de l'imagerie scanner (10 mSv) interroge sur son rapport bénéfice-risque car le niveau de sensibilité aux rayonnements ionisants chez l'enfant de bas âge est connu pour être supérieur à l'adulte.

☞ *Par principe de précaution, des scanners de nouvelle génération destinés à la médecine pédiatrique sont à présent beaucoup moins impactants en terme de dépôt de dose [17].*

Parmi l'ensemble des émetteurs naturels ou anthropiques de rayonnements ionisants, les radionucléides (atomes instables et radioactifs) sont susceptibles de contaminer les écosystèmes et les populations humaines. Cette exposition externe ou interne peut être d'origine naturelle mais aussi accidentelle (chaîne alimentaire, contamination atmosphérique, blessures en milieu professionnel) ou de nécessité médicale (examen de diagnostic ou traitement curatif). Quelles que soient leurs origines ou justifications, la nature des sources radioactives et les modes d'exposition engagent les individus à des niveaux de risques différents (Rapport IRSN/2015-00001).

Parmi l'ensemble des radionucléides exploités, l'uranium, le césium 137 et le strontium 90 sont des sources de pollution majeures des écosystèmes qui présentent un risque potentiel d'exposition interne des populations [18].

Le césium 137 et le strontium 90 sont des radionucléides qui n'existent pas à l'état naturel, contrairement à l'uranium. Ce sont des produits de fission de l'uranium 235 qui se forment essentiellement au cœur des réacteurs nucléaires. L'origine de leur dispersion environnementale résulte essentiellement d'accident de centrales nucléaires comme ceux de Tchernobyl, Fukushima et Mayak. Jadis, une autre origine de pollution provenait des quelques 500 essais nucléaires atmosphériques qui ont été réalisés jusque dans les années 80 [13, 19].

L'uranium peut être considéré comme contaminant lorsqu'une modification d'origine anthropique impacte sa qualité ou quantité naturelle sur un territoire. Après traitement chimique lors des processus d'extraction et de raffinement (usine de production du combustible), son niveau de solubilité dans les milieux biologiques peut être accru, le rendant beaucoup plus nocif pour les écosystèmes.

Jusqu'ici, le système de radioprotection s'est principalement basé sur la probabilité d'apparition des cancers (observés pour des doses reçues supérieures à 100 mSv) [14]. En deçà, la dose absorbée par un organisme est considérée comme faible car exempte de relation dose-cancer. Pour estimer la probabilité d'apparition d'effet indésirable (effets stochastiques cancéreux ou non cancéreux), le système de radioprotection a fait le choix du principe de précaution en extrapolant les données probabilistes de risque (établi à partir des données observées à fortes doses chez les survivants d'Hiroshima) par une relation dose-effet linéaire sans seuil [20]. Or, l'étude montre que dans la gamme des faibles doses, la plupart des effets mesurables ne suivent pas des relations dose-effet linéaires. Les relations observées sont au contraire de types non linéaires et non monotones. Elles dépendent étroitement de la dose, du temps et du système biologique considéré [21]. Cet écart d'appréciation entraîne une grande part d'incertitude qui pose le problème des limites du modèle utilisé actuellement dans le système de radioprotection [22].

Pour évaluer l'impact biologique des expositions de faibles niveaux (dont l'amplitude des niveaux des effets biologiques observés ne dépasse guère celle des fluctuations homéostatiques), il faudrait tenir compte de l'ensemble des sources et situations d'exposition qu'un individu a subit et subit tout au long de sa vie.

☞ *L'ensemble de ces paramètres, capables d'avoir une influence sur le niveau d'une réponse biologique a été désigné récemment sous le terme d'exposome [1].*

La problématique des effets et risques des expositions à faibles doses est complexe car multiparamétrique. Elle concerne des populations hétérogènes subissant des expositions multiples aussi hétérogènes [23].

En ce qui concerne les rayonnements ionisants, différents modes d'expositions peuvent être considérés. Il peut s'agir d'expositions chroniques des populations vivant sur des territoires dont le bruit de fond radioactif est naturellement élevé (IRAN) ou sur des territoires contaminés (Rivière Tetcha). Il peut s'agir aussi d'expositions répétées ou aiguës (dans le cadre des expositions professionnelles ou médicales) [10]. Aux effets de ces expositions aux rayonnements ionisants, peut être associée la notion de susceptibilité individuelle qui prend tout son sens si l'on tient compte de la diversité génétique et sociale d'une population.

☞ *L'âge, le sexe, l'origine ethnique ou familiale, l'état de santé ou l'environnement psychosocial d'un individu sont des facteurs qui influent sur le niveau d'intensité et la qualité de la réponse biologique aux faibles doses de rayonnements ionisants.*

Pour maintenir l'équilibre fonctionnel des systèmes biologiques, la réponse cellulaire aux faibles doses est essentiellement d'ordre adaptatif mais des inquiétudes persistent au sujet du risque d'apparition d'effets indésirables voire de maladies tardives. Parmi ces effets, l'apparition d'effets biologiques délétères non cancéreux tels que le syndrome métabolique, la baisse de fertilité ou certains troubles psychiques et les risques de transmission d'effets à caractères héréditaires semble être plus en plus pris au sérieux par la communauté internationale [24].

Pour Morgan et Baire, la question principale qui se pose dans le cas des expositions à faibles doses est de savoir si l'énergie déposée au niveau de l'ADN, peut être suffisante pour stimuler les mécanismes de réparation et processus de réponse cellulaires associés. Cette question repose sur la capacité des systèmes de régulations biologiques à maintenir un niveau actif des processus de réparation et de régulation de telle façon que ces systèmes puissent répondre immédiatement à une éventuelle agression mineure (contexte des populations continuellement soumises à un niveau faible d'exposition). Dans ce contexte, le débit de dose est aussi une variable importante car un faible débit de dose permet à la cellule de disposer de temps pour mettre en place ses mécanismes de défense (suppression des espèces réactives et la réparation des altérations radio-induites provoquées sur l'ADN). Il permettra aussi à la cellule de mettre en place des mécanismes adaptatifs de régulation (lui permettant de réagir plus efficacement lors d'une future exposition) [10].

Une autre composante étroitement liée aux effets des faibles doses est liée aux effets non-ciblés ou indirects qui peuvent s'exercer de différentes manières. Les expositions peuvent avoir une action indirecte sur la descendance des cellules exposées (par des processus d'instabilité génomique) ou sur des cellules voisines des cellules exposées par effet bystander (par des mécanismes de signalisation et communication cellulaires) [25]. Contrairement aux fortes doses pour lesquelles des mécanismes ciblés et déterministes s'ajoutent aux effets biologiques non-ciblés, ces effets indirects sont la principale composante des effets des faibles doses.

Cependant dans cette gamme des faibles doses, l'additivité ou la synergie de multiples petits effets biologiques liés à des facteurs endogènes ou exogènes peuvent avoir, par des mécanismes complexes et indirects, des conséquences biologiques significatives qui peuvent être à l'origine et cause d'effets biologiques indésirables à plus ou moins long terme.

☞ *Cette propriété multifactorielle des effets associables aux faibles doses souligne l'ampleur et la complexité des études nécessaires pour définir et évaluer un risque qui est lui-même modulé par l'ensemble des facteurs environnementaux (hygiène de vie, environnement social), génétiques et épigénétiques qui sont propres à chaque individu (âge, sexe, origine ethnique ou familiale, état de santé).*

Comme vu précédemment, le temps est un paramètre très influent. Ce dernier influe sur la qualité de la réponse directe de la cellule à une dose donnée et sur sa capacité à mettre en place une réponse adaptative [26, 27]. Le facteur temps est aussi impliqué dans la cinétique des événements moléculaires d'apparition des effets biologiques [28] qui varient selon l'âge de l'individu et le système moléculaire de régulation biologique ou physiologique considéré [29].

La sensibilité individuelle intervient aussi sur la qualité de la réponse biologique à une exposition. Capable de faire varier le niveau de réponse biologique aux expositions elle est étroitement liée au risque d'apparition d'effets indésirables [30, 31].

☞ *À titre d'exemple, un grand nombre de facteurs tels que le stress, l'état de santé, l'alimentation, la génétique, le sexe, l'origine ethnique, l'âge ou même le stade développemental peuvent avoir une influence sur le risque oncogène [32, 33].*

☞ *Pour expliquer cette sensibilité individuelle au stress environnemental, un certain nombre d'études mettent en avant des phénomènes d'instabilités génétiques qui seraient induites par le biais de multiples expositions environnementales.*

En deçà des phénomènes de mutations génétiques, dont les mécanismes se mettent naturellement en place sur de très longues périodes (plusieurs dizaines de générations), les phénomènes biologiques observés se déroulent sur des durées beaucoup plus courtes. Dans un laps de temps qui se compte au maximum en dizaines d'années, seuls des niveaux forts d'exposition aux rayonnements ionisants ou de multiexposition seraient capables d'induire des aberrations chromosomiques.

☞ *Certains composés chimiques qui comme l'hydroquinone et le cadmium sont capables d'induire des phénomènes d'instabilité génétiques relativement similaires à celles des rayonnements ionisants ou d'en accroître la génotoxicité.*

Dans les cas des multi-expositions, l'association d'expositions non-toxiques peut en accroître le niveau de toxicité de façon additive ou synergique [34, 35]. Par ce mécanisme, des multiples expositions de faibles niveaux peuvent finir par entraîner une toxicité pouvant être à l'origine de phénomènes de mutation (susceptibles d'augmenter le risque d'apparition des cancers). A l'inverse, ces multi-expositions peuvent aussi avoir des effets antagonistes avec les rayonnements ionisants par stimulation des mécanismes de défenses cellulaires [36].

En deçà du risque lié à l'instabilité génique, de plus en plus d'études mettent en avant l'influence des mécanismes épigénétiques dans la réponse adaptative cellulaire aux expositions à faibles doses. Ces mécanismes se manifestent en partie par la mise en place de marques épigénétiques sur la séquence d'ADN (épimutations). Ces épimutations sont susceptibles d'avoir un effet direct (immédiat ou tardif) sur un système biologique par modulation de la capacité des gènes à s'exprimer. Ces mécanismes épigénétiques pourraient être à l'origine des mécanismes de réponses cellulaires aux expositions de faibles niveaux et par conséquent à l'origine de dérégulations ou d'ajustements métaboliques dont l'impact phénotypique pourrait être à l'origine d'effets cliniques tardifs tels que des troubles psychiques, le syndrome métabolique ou des cancer [37-39].

1.2. LES EXPOSITIONS CHIMIQUES

Les substances chimiques issues des industries (pétrochimique, pharmaceutique, phytosanitaire, cosmétique, ...) viennent s'ajouter à l'ensemble des molécules naturellement présentes dans l'environnement. Or, si le seuil de toxicité de certains composés s'avère relativement bien défini, il l'est beaucoup moins pour d'autres qui jusqu'alors, n'avaient suscité que peu d'intérêt car leur exposition était considérée comme très faible ou tout simplement méconnue. La prise de conscience collective du risque lié aux pollutions chimiques environnementales est bien plus récente (années 70) et moins prononcée que celle liée aux rayonnements ionisants, qui suscitent toujours plus de craintes.

Cependant, l'augmentation récente des fréquences d'apparition d'anomalies développementales, métaboliques et de cancers interroge de plus en plus sur la question des risques associés aux expositions chroniques faibles doses au sens large qui sont à présent devenues un problème sociétal majeur.

D'un point de vue clinique, des études scientifiques récentes ont montré la capacité de certaines molécules à pouvoir agir à très faibles concentrations sur le système endocrinien et plus récemment au niveau des mécanismes d'expression géniques, sur le système épigénétique [40].

Les perturbateurs endocriniens, sont des composés chimiques qui agissent sur le métabolisme en mimant l'action d'une hormone ou en perturbant l'activité biologique. Ils sont capables de se lier à certains récepteurs membranaires et nucléaires, tels que des récepteurs hormonaux (œstrogènes, androgènes, hormones thyroïdiennes).

On recense actuellement environ 800 composés susceptibles d'être des perturbateurs endocriniens [41]. Ces composés sont capables d'interférer avec les processus de biosynthèse, de stockage, de relargage, de transport et de liaison des hormones endogènes avec leurs récepteurs. De tels effets peuvent s'avérer particulièrement néfastes pour le fœtus et le jeune enfant pour lesquels l'action métabolique de certaines hormones est particulièrement importante aux différentes périodes développementales. Ces dérèglements peuvent avoir des répercussions immédiates, induisant des malformations ou plus tardives comme des pathologies du système reproducteur [42].

☞ *Parmi ces molécules, les pesticides organophosphorés utilisés comme insecticides, les phtalates utilisés comme plastifiant, le bisphénol A (BPA) principalement utilisé dans la fabrication des plastiques et résines, les polychlorobiphényles (PCB) qui sont très utilisés dans l'industrie sont susceptibles de contaminer la chaîne alimentaire.*

D'autres composés chimiques, peuvent avoir un effet sur le système nerveux central, malgré des niveaux d'expositions faibles.

☞ *Le syndrome cholinergique est un syndrome qui affecte les populations exposées à des fortes doses de composés organophosphorés. Cependant des troubles neurologiques de type neuropsychologiques et psychiatriques ont été observés chez des éleveurs de moutons qui utilisaient chroniquement, de faibles doses d'insecticides antiparasitaires sur le bétail [43]. Des suspicions d'apparition de troubles de l'activité et de déficit attentionnel ont aussi été relevés chez des enfants exposés aux pesticides organophosphorés, bien qu'aucun lien statistique n'est pu être confirmé [44]. Une étude expérimentale menée chez le rat a cependant pu établir un lien entre des modifications comportementales liées à l'attention et à l'activité de l'animal et une exposition répétée à faible dose de pesticide « chlorpyrifos » [45].*

Ainsi, l'hypothèse de l'existence d'un lien entre la chronicité des expositions environnementales et la survenue à long terme d'effets néfastes ou maladies se pose de plus en plus.

☞ *Parmi ces maladies, le syndrome métabolique est associé au surpoids, au diabète, à l'obésité, l'hypertension, et les maladies cardiovasculaires. Il devient un sérieux problème de santé publique car si l'on se reporte à une étude de 2016, l'obésité mondiale a fait un bond de 6.1% en 40 ans et toucherait plus de 642 millions de personnes [46]. Le nombre de diabétiques a augmenté de 30 à plus de 382 millions de personnes au cours des 20 dernières années.*

Si l'augmentation de la fréquence d'apparition de l'obésité ou du diabète peut en partie s'expliquer par la sédentarisation des populations, par des régimes alimentaires déséquilibrés ou des prédispositions d'origines génétiques, l'hypothèse fondée sur l'action des perturbateurs métaboliques sur l'homéostasie glucido-lipidique (par résistance à l'insuline) s'est posée dès les années 90.

Comme pour les rayonnements ionisants, le niveau de sensibilité des individus à une exposition est étroitement lié à leur âge.

☞ *Le fœtus et le jeune enfant sont plus sensibles aux effets toxiques des composés chimiques et aux perturbateurs endocriniens que les adultes, car leur système de détoxification est encore en cours de développement. Leurs cellules germinales sexuelles sont aussi des cibles biologiques de grande sensibilité qui sont susceptibles de pouvoir transmettre des effets néfastes à leur propre descendance [42].*

Le sexe des individus est un autre paramètre déterminant sur le niveau de sensibilité des individus en matière de susceptibilité et d'influence développementale des agents chimiques et perturbateurs endocriniens.

☞ *Ainsi, selon le sexe, l'une ou l'autre des populations peut être différemment affectée par une exposition donnée.*

1.3. LE MONDE COMPLEXE DES FAIBLES DOSES

Le sujet des effets des expositions chroniques à faibles doses est complexe et d'influence multiparamétrique. Par conséquent, la définition même du terme de « faible dose » est complexe et multiple car elle s'applique à différents domaines tels que la physique ou la chimie et pour lesquels le terme de « dose » représente des grandeurs différentes, définies par des unités différentes [47].

En toxicologie, la dose représente une quantité de substance administrée ou absorbée par un organisme, un organe ou un tissu. Elle est exprimée en unités de masse totale (g, mg, µg...) pour les expositions réalisées par ingestion ou injection, ou en unité relative de masse en la rapportant au poids corporel (mg/Kg). La dose peut aussi s'exprimer en quantité par volume d'air (mg/m³) dans le cadre des expositions réalisées par inhalation.

En physique, et plus particulièrement dans le domaine des rayonnements, la dose exprime une énergie ou une quantité de photons absorbés par unité de volume ou de masse d'un objet exposé pendant un temps d'exposition donné. Elle est exprimée en Joule/kilogramme (J/Kg) ou en Gray (Gy). On l'appelle la « dose absorbée ». On parle de « dose équivalente » ou « dose effective » lorsqu'on lui applique un facteur correctif qui dépend du type de rayonnement et du tissu biologique considéré. Cette dose s'exprime alors en Sievert (Sv) (CIPR, 2007).

☞ *Ce qu'il faut en retenir c'est que la dose est une grandeur très subjective qui peut s'exprimer avec différentes unités. Elle est étroitement liée à la source d'exposition, aux conditions d'exposition et à la cible biologique considérée. Pouvoir donner une définition claire des faibles doses devient encore plus complexe car les limites à donner à ce domaine évoluent en fonction des avancées scientifiques. Dans ce contexte, la définition même des valeurs limites des effets biologiques, précliniques et cliniques, fait toujours débat.*

Une définition simple des faibles doses consiste à dire que : « la limite des faibles doses est une dose en dessous de laquelle plus aucun effet biologique n'est observable ».

Cette définition est néanmoins incomplète et trop réductrice pour être satisfaisante car elle ne tient pas compte de l'influence des paramètres biologiques et environnementaux qui sont capables de moduler la qualité de la réponse biologique d'un organisme à une exposition. Elle ne tient pas non plus compte des limites de sensibilité des outils analytiques dont les seuils sont continuellement repoussés et qui permettent d'observer toujours plus d'effets. Aussi, contrairement aux relations dose-effet observables en toxicologie à fortes doses d'exposition, celles observées dans la gamme des faibles doses sont souvent très différentes.

☞ *Si certains composés toxiques ne présentent pas de seuil d'apparition de toxicité [48], d'autres composés peuvent en présenter un ou plusieurs suivant des relations dose-effet beaucoup plus complexes.*

Dans cette gamme de dose, de nombreuses études décrivent des relations dose-effet de type non monotone, en forme de « U », de « cloche » ou même de « vagues », rendant toutes extrapolations entre la dose et l'effet biologique attendu, transpositions d'effets entre espèces animales ou prévisions par analogie chimique quasiment impossible.

Cette difficulté est d'autant plus importante que ces relations dose-effet sont évolutives et étroitement dépendantes des facteurs individuels et environnementaux qui sont capables à ces niveaux de dose, d'influencer les seuils de toxicité des expositions par effet synergique ou antagoniste.

☞ *En matière d'expertise des risques (nécessaire à la mise en place des normes de protection des populations), la complexité de ces relations ne permet pas non plus de définir des valeurs toxiques de référence (VTR) [49].*

L'extrapolation n'étant pas réalisables dans le domaine des faibles doses, la caractérisation d'un risque biologique (ou sanitaire) ne peut se faire que par l'observation directe de phénomènes biologiques. Ces études nécessitent de pouvoir identifier de la manière la plus exhaustive possible, des biomarqueurs d'exposition, d'effet et de sensibilité spécifiques à la source d'exposition.

Cette étude peut être réalisée à différents niveaux de l'échelle des systèmes d'organisation biologiques, dont le spectre va de l'analyse des mécanismes épigénétiques, géniques, protéiques, métaboliques, morphologiques et fonctionnels jusqu'à l'expression d'un phénotype individuel (sain ou pathologique).

Par ailleurs, si la réponse biologique est intrinsèquement dépendante de la source d'exposition (de niveau d'énergie ou de toxicité donnée), d'autres facteurs tels que le mode d'exposition (externe, interne), la cible biologique, le temps d'exposition, la fenêtre développementale d'exposition, l'origine génétique de l'individu (ethnie, famille, sexe), son état de santé, ou ses conditions de vie sont autant de variables à prendre en compte à cause de leur influence modulatrice sur la qualité de la réponse biologique.

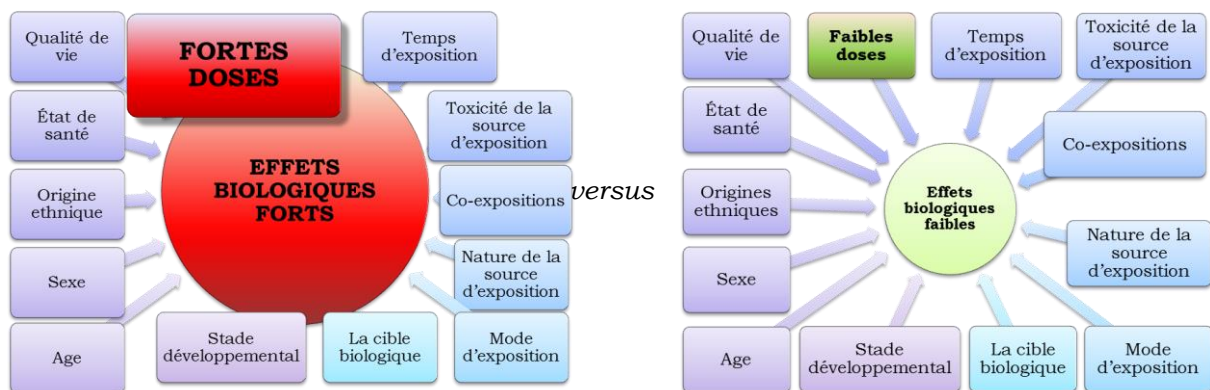


Figure 4 : la réponse biologique aux faibles doses est fortement influencée par l'ensemble des facteurs endogènes et exogènes.

D'un point de vue sociétal, le lien potentiel qui existerait entre des effets biologiques de faibles amplitudes et d'éventuels risques pour la santé inquiète et interroge. Or, à cause de la composante multiparamétrique (d'origine endogène et exogène) de la réponse biologique aux faibles doses associée à l'absence de déterminisme clinique clair, cette problématique sanitaire se heurte à la complexité des études qui doivent être mise en œuvre pour fournir des données pertinentes.

Dans la gamme des effets des faibles doses, les effets sont majoritairement observables au niveau moléculaire et ne peuvent en l'état, être considérés comme la marque précoce d'un futur effet clinique. En conséquence, les conclusions d'expertise qui pourraient être rendues à partir des résultats d'études dépendent étroitement des moyens et conditions de réalisation des projets expérimentaux et épidémiologiques.

☞ Une telle expertise nécessite aussi de pouvoir s'appuyer sur les résultats de plusieurs études pour pouvoir étayer et rendre un avis tangible par confrontation des résultats concordants.

Ce travail implique nécessairement d'importants moyens humains et scientifiques mais aussi du temps. A défaut d'observation d'effets cliniques précoces, les effets cliniques attendus dans le domaine des faibles doses, le sont vraisemblablement à moyens et longs termes. Ce dernier point montre une autre part de la difficulté rencontrée pour réaliser des études épidémiologiques dont les éventuelles conséquences d'une situation d'exposition ne peuvent être observables qu'après quelques dizaines d'années.

☞ *Qu'elles soient épidémiologiques ou expérimentales, outre la durée des études à réaliser, ce décalage temporel ajoute intrinsèquement de l'incertitude dans l'estimation des relations de causalité. Ceci expliquant aussi la confusion qui existe autour de certains débats d'actualité qui mêlent des sujets sanitaires à des problématiques économiques (glyphosate, hydrocarbure, additifs alimentaires, nanoparticules...).*

Pour mieux comprendre les origines des effets observés et établir des relations de causalité fondées sur des suspicions de nocivité de certaines expositions, la mise en œuvre d'études cliniques et expérimentales basées sur la réalisation d'un suivi cinétique d'évolution des paramètres mesurés, s'avère nécessaire dans cette situation. La réalisation de telles études nécessite de mettre en place des protocoles de suivi sur quelques jours pour des expérimentations *in vitro* ou quelques années pour des études *in vivo* voire dizaines d'années pour des études épidémiologiques sur cohortes humaines.

Le choix des outils analytiques aura aussi une très grande influence sur la qualité des études et des conclusions qui en découleront. Jadis, s'il était concevable de parler d'absence d'effet pour définir la limite inférieure des fortes doses, c'est essentiellement pour des raisons de limites de sensibilité instrumentale. Depuis quelques décennies, la capacité et les niveaux de sensibilité métrologiques ont décuplé, permettant d'atteindre des niveaux de précision inférieurs au bruit de fond naturel (regroupant l'ensemble des fluctuations biologiques d'un système).

☞ *Cette montée en puissance a considérablement augmenté le champ d'observation des études car ces outils permettent de réaliser des analyses comparatives sur la quasi-totalité des systèmes (environnemental, social, clinique, moléculaires) et depuis peu, permettent d'en intégrer les résultats.*

Le domaine des faibles doses évoluent en permanence à cause de l'évolution des niveaux de détection des réponses biologiques qui sont continuellement repoussés. Allant de découvertes en découvertes scientifiques, il n'est cependant pas encore possible de pouvoir statuer catégoriquement sur le sujet des effets sanitaires de certaines expositions ou sur l'origine environnementale de certaines maladies.

Si un certain nombre d'études récentes permet d'avoir une idée plus précise au sujet des effets biologiques des faibles doses et des risques engagés, le choix des conditions de réalisation des études a une influence considérable sur la qualité et l'interprétation des résultats qui seront obtenus.

Ainsi, pour aborder et donner un sens à la complexité d'effets biologiques observables très en amont de tous signes cliniques, il est nécessaire de pouvoir identifier et comprendre le fonctionnement des mécanismes moléculaires de défense et d'adaptation responsables au niveau cellulaire et systémique, des fluctuations homéostatiques observables. Cette approche méthodologique est essentielle pour espérer pouvoir rendre un avis objectif et prédire avec pertinence des risques d'évolution indésirables. Cette approche méthodologique s'inscrit dans le domaine de la toxicologie prédictive [50] qui s'appuie sur l'analyse exhaustive des systèmes biologiques, pour étudier un organisme dans la globalité.

Dans cette optique, l'analyse des systèmes de régulation géniques tel que l'épigénétique qui joue un rôle prépondérant, dans la régulation des systèmes biologiques avals et la métabolomique qui se situe au plus près du déterminisme phénotypique d'un organisme, d'un organe ou d'une cellule, fournit une information capable d'être le reflet de son état fonctionnel à un instant donné.

☞ *Régulateur moléculaire des flux d'expression géniques, l'épigénétique peut être considérée comme la clé d'ajustement et d'adaptation des organismes aux agressions environnementales. L'analyse de ce système est très certainement un des outils de diagnostic et de pronostic d'évènements biologiques et cliniques les plus pertinents dans l'avenir.*

2. EFFETS EPIGENETIQUES

L'épigénétique est un mécanisme réversible de régulation de l'expression des gènes sans entraîner de modification dans la séquence nucléotidique de l'ADN [51].

Son rôle est multiple. Il intervient aux stades précoces du développement dans l'inactivation du second chromosome X porté par les femelles, dans la différenciation cellulaire embryonnaire et la transmission mitotique des caractéristiques cellulaires propres à la fonction physiologique de chaque organe. Il est impliqué dans l'ensemble des mécanismes cellulaires que sont la transcription, la réparation, la réplication, la condensation de la chromatine, l'empreinte parentale et le vieillissement. Il est aussi et surtout directement impliqué dans les mécanismes cellulaires d'adaptation environnementale, dans l'évolution des espèces mais peut aussi être dans certains cas, à l'origine d'effets indésirables.

☞ *D'un point de vue historique (Source Edith Heard), c'est Aristote qui a le premier évoqué l'existence d'un mécanisme impliqué dans le développement embryonnaire. Il l'appela «épigénèse». Ce terme fut ensuite publié en 1942 par le généticien anglais C. Waddington qui, à partir du génotype, s'intéressait au développement phénotypique. En 1965 F. Jacob, J. Monod et L. Wolff obtiennent le prix Nobel pour leurs travaux sur l'importance du lactose dans le contrôle de l'expression des gènes et la détermination d'un caractère adaptatif associé à l'utilisation du lactose comme source d'énergie par Escherichia. coli. Finalement en 2007, A. Bird pose le concept de transmission de marques épigénétiques acquises.*

☞ *Grâce aux mécanismes épigénétiques de régulation de l'expression des gènes, deux génomes strictement identiques peuvent produire des phénotypes différents (voir cas des jumeaux séparés, différenciation reine/ouvrières chez l'abeille).*

2.1. ASPECT MOLECULAIRE

Étroitement liée aux différentes influences environnementales (exogènes et endogènes), l'épigénétique est une modification réversible de la capacité d'expression des gènes (sans modification de la séquence nucléotidique du brin d'ADN).

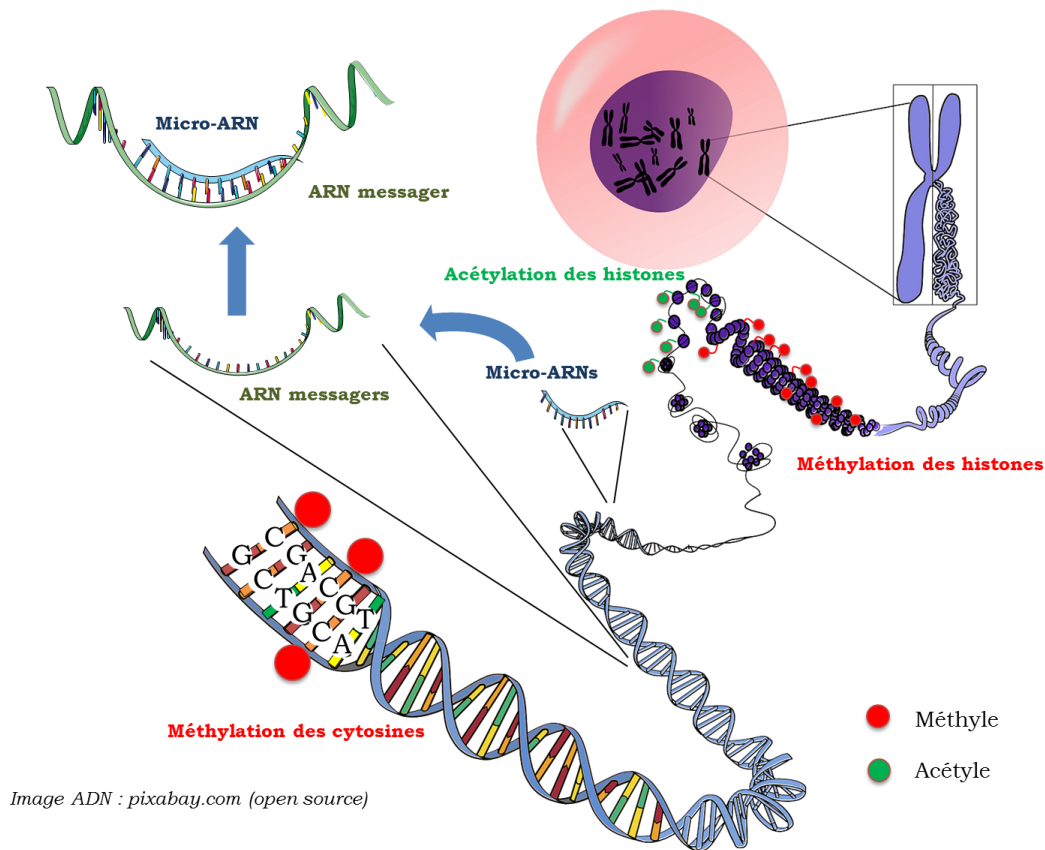


Image ADN : pixabay.com (open source)

Figure 5 : trois systèmes épigénétiques de régulation (méthylation de l'ADN, code histone et micro-ARNs)

☞ Environ 100 types cellulaires différents peuvent être identifiés à partir des dix mille milliards de cellules (10^{13}) qui constituent le corps humain. Chacune de ces cellules possède le même patrimoine génétique (composé de gènes), porté par les chromosomes qui sont des molécules d'ADN (environ 2 à 4 mètres de longueur) compactées dans le noyau des cellules grâce à des protéines (les histones) pour former la chromatine.

☞ L'espèce humaine possède environ 22 000 gènes alors que le petit ver *Caenorhabditis elegans* (1 millimètre) est formé d'environ 959 cellules qui contiennent 19 000 gènes. Bien qu'ayant un nombre de gènes du même ordre de grandeur, la différence phénotypique entre ces deux espèces, s'explique essentiellement par des différences significatives d'expression génique.

2.1.1. ACCESSIBILITE ET LECTURE DES GENES

Différents modes de régulation épigénétique sont capables d'activer ou d'inactiver l'expression des gènes. Parmi ces modes, deux processus sont directement liés à l'ADN et en assurent la capacité de transcription génique. Ces processus sont la méthylation de l'ADN (agissant directement sur l'accessibilité des facteurs de transcription au niveau des gènes) et l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation..., des histones qui contrôlent l'état de compaction de la chromatine (modifiant le niveau d'accessibilité des gènes).

☞ Les histones sont formées de 8 protéines entourées par une boucle d'ADN. Cette association (histone-ADN) forme un nucléosome. Le nucléosome est constitué de 4 paires d'histones (H2A, H2B, H3 et H4) qui sont stabilisées par 1 neuvième histone (H1). Le phénomène de compaction de la chromatine passe par des processus d'acétylation, la méthylation ou la phosphorylation de la lysine au niveau de la partie N terminale des queues des protéines des histones. La méthylation des histones (lysine) entraîne une compaction des nucléosomes qui compacte la chromatine (inhibant la transcription). L'acétylation des histones (lysine) crée un relâchement de la chromatine rendant les gènes accessibles aux facteurs de transcription. La fixation de ces groupements chimiques modifie la charge des histones mais aussi la stabilité du nucléosome, les interactions histones-ADN et la mobilité des histones le long de la chaîne l'ADN [52, 53].

☞ « Le code histone » est le lien qui peut être établi entre les modifications épigénétiques observable sur les queues des histones et l'état transcriptionnel de la chromatine.

La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique majeur. Elle se produit essentiellement au niveau des régions promotrices des gènes (situées en amont des gènes) [54]. La méthylation diminue la liaison de l'ADN avec les facteurs de transcription.

☞ Lorsque cette région est méthylée, le gène est incapable de s'exprimer (et vice et versa).

☞ Sur les 28 millions de régions promotrices du génome humain, environ 70 % sont méthylées pour éteindre l'expression de certains gènes.

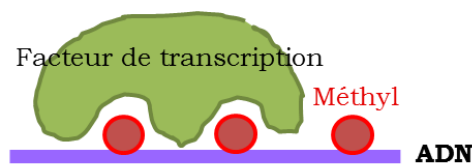


Figure 6 : inhibition transcriptionnelle par méthylation des zones promotrices des gènes

La méthylation de l'ADN se fait au niveau des cytosines des complexes cytosine-phosphate-Guanine (îlots CpG), modifiant l'architecture de la fibre de chromatine (encombrement stérique). Ce processus de méthylation nécessite l'action d'enzymes de méthylation de l'ADN (DNMTs) pour lesquelles il existe différents sous-types (DNMT1, 3a, 3b et L) [55].

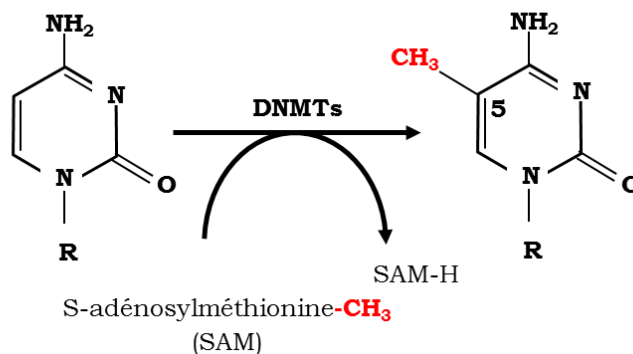


Figure 7 : réaction de méthylation des cytosines en 5-méthylcytosines (5-mC) au niveau des îlots CpG

Les DNMT1 agissent dans le maintien des marques épigénétiques au niveau des cellules filles (processus mis en œuvre sur les cytosines non méthylées, après la phase de réplication).

Les DNMT3 produisent de nouvelles marques de méthylation qui sont transmissibles aux cellules filles lors de la phase de réplication (méthylation de novo).

D'autres familles d'enzymes interviennent aussi dans le processus de déméthylation de l'ADN. Il s'agit des méthylcytosine dioxygénases (TET1, TET 2 et TET 3), apolipoprotéines B (APOBEC) et des Glycolases (TGD).

Les TETs et plus particulièrement TET1 interviennent dans le processus de déméthylation de la 5-méthylcytosine (5-mC) de l'ADN en 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC).

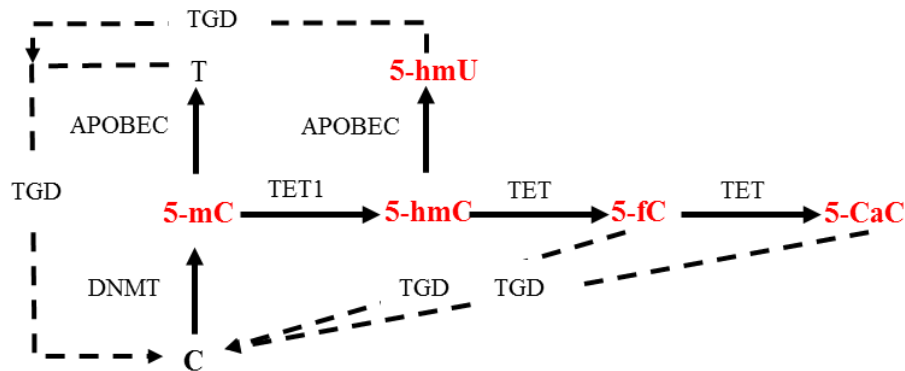


Figure 8 : réactions de déméthylation des cytosines en 5-méthylcytosines (5-mC) au niveau des îlots CpG

☞ La déméthylation augmente la transcription. Elle peut se faire soit par voie passive (manque de SAM lors des mitoses ou par inactivation de DNMT1) soit par voie active avec 3 familles d'enzymes (TET, APOBEC et Glycolases)

2.1.2. INHIBITION DES ARN CODANTS PAR DES ARN NON CODANTS

Un autre processus de régulation épigénétique passe par l'action post-transcriptionnelle des ARNs non-codants sur les ARN codants. Ces ARNs sont produits par transcription mais comme leur nom l'indique ils n'ont pas vocation à produire des protéines. Ils interviennent dans le contrôle des ARN messagers.

Ils sont impliqués dans les processus développementaux, la différenciation cellulaire, et le métabolisme. Dans cette famille, on recense différents types d'ARN non-codants (les micro-ARNs, les ARN-Inc, les ARN-pi- et les ARNs-Linc) [56].

☞ Les micro-ARNs sont des petites séquences d'ARN composés d'environ 22 nucléotides qui n'ont été découverts que dans les années 90. C'est le premier sous type d'ARN non codants (ARNnc) découvert. Environ 17000 micro-ARNs matures sont répertoriés à partir de 140 espèces dans la base de données miRbase.org (miRbase.org) [57].

Les micro-ARNs (ou miARNs ou miRs) sont impliqués au niveau des processus de régulation de l'expression des gènes (ils peuvent s'apparier à la séquence d'ARN complémentaire (ARNm) produite dont ils répriment la traduction ou activent la dégradation) et jouent un rôle très important dans les processus cellulaires, l'embryogénèse et les métabolismes cellulaires, en intervenant dans la régulation post-transcriptionnelle d'environ 10 et 30 % des gènes [58].

Ils sont aussi capables de moduler le niveau de méthylation de l'ADN en agissant sur l'expression génique des méthyltransférases (DNMTs), en entraînant une hypométhylation ou sur l'accessibilité des gènes dans la chromatine par action sur l'expression des histones déacétylases, entraînant un relâchement de la chromatine.

☞ D'un point de vue clinique, les micro-ARNs sont impliqués dans l'oncogenèse [59].

☞ On sait aussi que seulement 1 à 2% de la séquence du génome est codante et que le reste, considéré auparavant comme non fonctionnel, est en fait transcrit à 90% sous forme d'ARN non codants [60]. Une moitié des gènes codants pour des micro-ARNs sont situés dans les introns de gènes codants mais peuvent aussi être codés dans des exons non traduits.

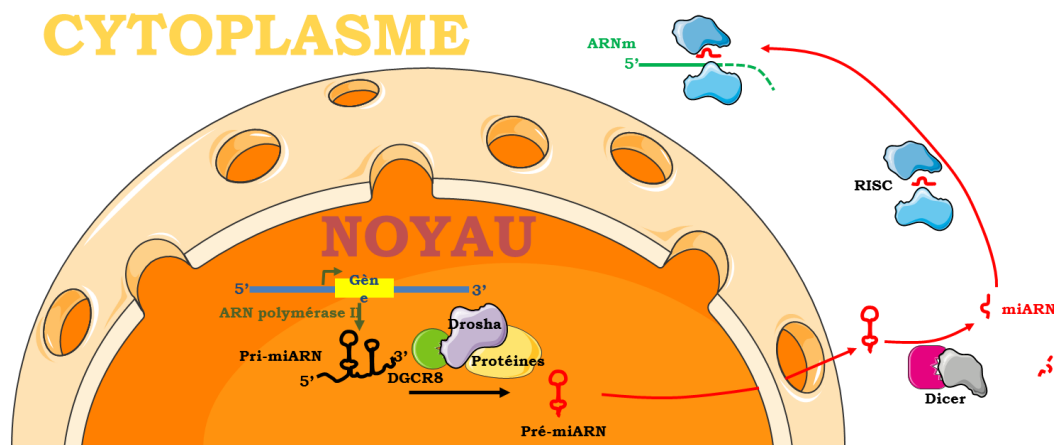


Figure 9 : schéma de synthèse nucléaire d'un micro-ARNs

☞ Les micro-ARNs sont produits dans le noyau à partir d'un transcrit primaire. Il s'assemblera ensuite à un complexe protéique (Drosha, DGCR8 et d'autres protéines) pour donner un pré-miARN qui sera exporté dans le cytoplasme (exportine 5). Le pré-miARN sera de nouveau clivé par un autre complexe protéique (Dicer) pour donner une structure en double brin d'environ 22 nucléotides. L'un des deux brins est supprimé et le miARN mature s'associera à un complexe protéique (miRISC) pour être transporté jusqu'à sa cible (ARNm). (La partie 5' du miARN mature qui constitue la tête, peut s'apparier avec sa cible (au niveau des bases 2 à 8-9 (seed)). La partie 3' a quant à elle, un rôle de reconnaissance de l'ARNm cible).

En fonction de la qualité de l'appariement (complémentarité des séquences) entre ARN messagers et micro-ARN, deux mécanismes d'action peuvent être observés. Ils peuvent agir soit par clivage de l'ARN, soit par blocage de la traduction (bloquant la lecture de certains codons par le ribosome).

☞ Si la complémentarité est totale, le complexe RISC permet l'action de ribonucléases qui dégraderont totalement le brin d'ARNm (c'est un contrôle transcriptionnel du brin d'ARNm circulant). Si la complémentarité nucléotidique avec les micro-ARNs est imparfaite, la liaison du micro-ARN avec l'ARNm au niveau des régions 3' (non traduites) inhibe la traduction protéique ribosomale (contrôle traductionnel).

Malgré une complémentarité de séquence nucléotidique partielle, la capacité pour les micro-ARNs à pouvoir se lier à des ARNs autorise la possibilité de pouvoir se lier à une multitude d'ARNs différents. Les ARNs cibles des micro-ARNs peuvent être multiples (jusqu'à quelques centaines) et un ARN peut aussi être régulé par plusieurs micro-ARNs.

☞ Un micro-ARN est susceptible en théorie, de pouvoir contrôler l'expression de 200 gènes différents par analogie séquentielle. Ce dernier mode étant prépondérant dans le règne animal, il confère à la cellule une plus grande finesse dans le contrôle et la modulation de l'expression de 30 % de gènes ainsi régulés [61].

Les micro-ARNs peuvent aussi avoir une action inhibitrice sur d'autres micro-ARNs et ainsi stimuler l'expression d'un gène.

Trois classes d'effets des micro-ARNs modulent l'expression d'un phénotype.

1. Inhibition traductionnelle par inactivation totale de la séquence d'ARN.
2. La fonctionnalité de l'ARN est diminuée par appariement partiel avec un micro-ARN (modulation d'expression).
3. Sans effet

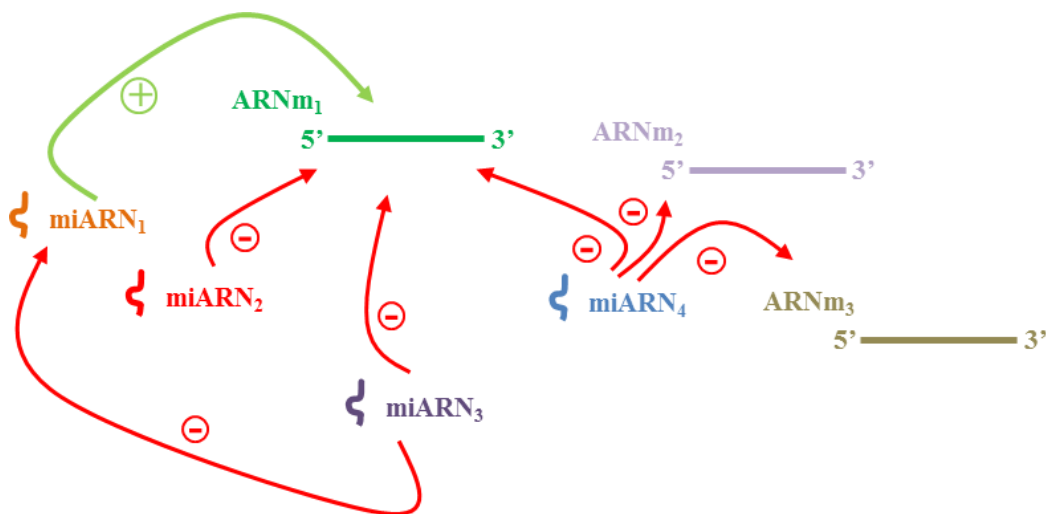


Figure 10 : contrôle post-transcriptionnel par les micro-ARNs

Les cellules sont aussi capables de sécréter des micro-ARNs que l'on appelle des micro-ARNs circulants. Selon certaines études, les micro-ARNs véhiculés par les exosomes pourraient avoir un rôle endocrine et paracrine au niveau de l'expression génique d'autres cellules [60].

☞ Dans 90% des cas, ces micro-ARNs peuvent être associés à d'autres structures moléculaires protéiques et complexés aux protéines argonautes (Ago2). Ce processus résulte d'un phénomène de libération passive du milieu cytoplasmique par apoptose cellulaire. La stabilité du complexe [micro-ARNs - protéines argonautes] protège les micro-ARNs des enzymes RNases qui sont très présentes dans la circulation sanguine. La représentativité de cette forme complexée par rapport aux autres est essentiellement due à sa stabilité. Ils peuvent aussi être véhiculés par des structures lipidiques comme les exosomes (40 à 100 nm de diamètre) ou par d'autres microvésicules de plus grandes tailles (500 à 2000 nm) qui se forment aux stades précoces de l'apoptose (exemple miR-126). Les lipoprotéines (HDL et LDL) peuvent aussi transporter les micro-ARNs.

Dans la famille des ARN non codants, il existe aussi d'autres petits ARNs tels que les siARNs et les IncARNs dont l'origine endogène/exogène et tissulaire est différente des micro-ARNs. Ils sont capables d'inhiber la traduction des ARNs.

☞ Les siARNs qui sont capables de se lier à la séquence complémentaire d'ARNm dont ils répriment la traduction. Les incARNs, beaucoup plus long (200 nucléotides) interviennent dans le mécanisme de régulation transcriptionnelle et agissent au niveau de différents processus physiologiques.

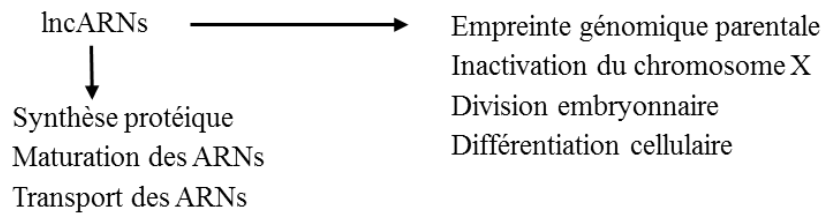


Figure 11 : rôles biologiques des longs ARNs non codants

2.2. FONCTIONS ET PROPRIETES BIOLOGIQUES

La chromatine subit un remodelage de ses marques épigénétiques au cours du temps (de la journée, des saisons et de la vie) sous l'influence des horloges biologiques et des influences environnementales (nutritionnels, chimiques, radiologiques, psychosociales etc.). Les marques épigénétiques portées par l'ADN sont le support des processus d'adaptation et de réponse cellulaire aux stress environnementaux (exogènes et endogènes). Grâce à leur grande plasticité, ces marques sont capables d'évoluer très rapidement pour modifier les niveaux de régulation des gènes mais aussi pour apprendre des expériences passées par la mise en place de marques persistantes (mémoire).

☞ Cette fonction régulatrice de l'expression des gènes explique comment en partant d'un génome identique, les cellules peuvent se différencier pour acquérir des caractères morphologiques et fonctionnels différents nécessaires pour constituer des tissus dont les fonctions physiologiques sont différentes, des organismes différents (métamorphose des insectes) voire des dimorphismes sexuels différents (différentiation sexuelle des reptiles en fonction de la température d'incubation des œufs).

A cause d'ajustements épigénétiques, des génomes identiques peuvent aussi présenter des niveaux de sensibilité différents à des stress environnementaux.

☞ Ce phénomène est observable chez des jumeaux monozygotes ayant été élevés différemment. Ils présentent des marques épigénétiques différentes voire des traits phénotypiques différents [62].

Une autre propriété liée à la sensibilité des populations aux expositions à faibles doses, concerne la survenue de stress environnementaux à un moment crucial du développement embryonnaire. Ces stress sont susceptibles d'entraîner des effets sanitaires tardifs qui surviennent au moment de la vie adulte.

☞ De tels effets ont pu être observés dans un contexte social dégradé tel que la famine de l'hiver 1944-1945 survenue aux Pays-Bas à cause d'un blocus Allemand. Outre la mort de 20 000 personnes, cette privation de nourriture a eu des répercussions métaboliques et phénotypiques tardives sur les petits enfants des femmes qui étaient enceintes à cette période. Les carences fœtales survenues à un stade de développement inférieur à 3 mois ont entraîné chez les enfants adultes l'apparition de diabète de type II, des maladies métaboliques telles que l'obésité et une diminution sensible de la taille des individus [63]. Dans un autre contexte d'exposition, une exposition maternelle au plomb au moment de la grossesse peut aussi avoir des répercussions épigénétique directes sur les patterns de méthylation des petits enfants [64].

Cette dernière observation soulève un point important au sujet du risque d'apparition d'effets tardifs des expositions environnementales. Une dissonance entre le milieu environnemental à l'âge adulte et celui au moment de la programmation développementale embryonnaire peut avoir des conséquences sanitaires néfastes sur la vie adulte [65].

Un dernier point, tout aussi important concerne l'existence d'une transmission somatique post-natale de marques épigénétiques directement liée à la relation affective que la mère entretient avec l'enfant.

☞ *Une expérience chez le rat a montré que de mauvais soins maternels entraînent une anxiété des ratons qui s'accompagne d'une différence de méthylation dans certaines zones du cerveau. Cet effet pourrait être expliqué par l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire, stimulant la sécrétion surrénalienne des glucocorticoïdes [66]. Des observations similaires ont été faites chez les enfant déprimés qui se sont suicidés à la suite de mauvais traitements [67].*

D'un point de vue sanitaire, ce risque d'effets tardifs d'une exposition précoce montre que la qualité des premiers stades de la vie est déterminante. Cette observation caractérisant la femme enceinte comme une population à risque dans les premières semaines du développement fœtal, durant lesquelles se déroule la phase de reprogrammation épigénétique des cellules embryonnaires mais aussi durant la période néonatale qui s'avère aussi particulièrement vulnérable aux stress d'ordre psychique.

Pour résumer, les phénomènes épigénétiques de programmation ont un rôle essentiel au niveau de la différenciation cellulaire mais aussi au niveau de l'adaptation cellulaire. Ils sont nécessaires au maintien de l'homéostasie par régulation des processus transcriptionnels. L'adaptabilité des cellules nécessite que ces mécanismes de régulation soient dynamiques et réversibles pour agir rapidement et maintenir l'homéostasie cellulaire.

L'épigénome peut ainsi être modifié de façons transitoires ou permanentes selon la période développementale ou la durée de l'exposition. Ces processus adaptatifs (voire évolutifs) sont aussi héréditaires car ils peuvent être transmis au cours des divisions cellulaires mais aussi au cours des générations.

Pour résumer, l'ensemble des processus épigénétiques intervient dans différents processus nécessaires à différentes fonctions biologiques.

2.2.1. DIFFERENCIATION CELLULAIRE

Malgré un patrimoine génétique commun, les cellules d'un même organisme peuvent exprimer des propriétés morphologiques et fonctionnelles très différentes selon le tissu considéré (peau, muscle, os, foie, rein, neurones...).

2.2.2. PHENOMENE D'EMPREINTE

Un certain nombre de gènes sont sujets à un phénomène d'empreinte qui inactive soit la copie du gène reçue du père soit celle reçue de la mère mais aussi celle du chromosome X en double chez les filles.

☞ *Ce principe module le principe général de l'hérédité mendélienne pour lequel les deux copies (père et mère) d'un gène s'expriment.*

2.2.3. ADAPTATION PRE ET POST-NATALE DE L'ORGANISME A SON ENVIRONNEMENT

Les processus de régulation épigénétique permettent de mettre en place des mécanismes d'acclimatation par plasticité épigénétique lors d'un stress transitoire. Pour un stress devenu permanent, des mécanismes épigénétiques d'adaptation peuvent entraîner des modifications permanentes des traits phénotypiques.

L'environnement peut influencer le développement génétiquement programmé d'un individu par l'action de mécanismes épigénétiques de rétrocontrôle. Ceci permet à la cellule, à l'organisme et même aux générations de s'adapter aux fluctuations environnementales par la mise en place de modifications épigénétiques réversibles (souplesse adaptative par épimutation).

☞ *Ces épimutations pourraient selon certaines hypothèses pouvoir évoluer vers des mutations génétiques définitives (liées à la fragilité des régions promotrice méthylées).*

Dans certains cas, cette propriété adaptative peut avoir des conséquences néfastes.

☞ *Lors des périodes les plus sensibles de la vie gamète, embryonnaire et néonatale, l'exposition à des facteurs nocifs peut être déterminante dans l'apparition de pathologies tardives à l'âge adulte (« Concept d'origine développementale de la santé et de la maladie » (DOHaD) [65].*

2.2.4. PATHOLOGIES TARDIVES ET CANCERS

Outre les risques de troubles cognitifs et motrices ou d'apparition de syndromes métaboliques tardifs dont les origines peuvent être épigénétiques [65], des stress qui peuvent affecter le niveau de méthylation de l'ADN, peuvent entraîner la perte d'empreinte sur certains gènes et avoir des répercussions directes sur le risque oncogène.

☞ *Dans la plupart des cancers, on observe des perturbations des profils de méthylation de l'ADN [59] avec en général une diminution globale de la méthylation de l'ensemble du génome (augmentant l'expression des oncogènes) accompagnée d'une hyperméthylation des régions promotrices des anti-oncogènes. Un lien a aussi été établi entre le degré d'hypométhylation des tumeurs et leur niveau agressivité [39].*

☞ *D'autres études qui s'intéressaient à la persistance d'effets épigénétiques, ont montré qu'une contamination par ingestion chronique d'une solution faiblement concentrée en uranium pouvait également induire des effets épigénétiques persistant bien au-delà de l'exposition. Cette observation pose la question de la réversibilité des effets et de la sensibilisation durable d'un système biologique qui pourrait aussi être à l'origine d'effets délétères tardifs voire d'effets intergénérationnels par le biais d'une transmission de marques épigénétiques [68].*

2.2.5. VIEILLISSEMENT

Le vieillissement d'un individu est aussi associé à des modifications épigénétiques durant lequel le niveau global de méthylation de l'ADN diminue alors que des hyperméthylation locales apparaissent, diminuant le niveau de réponse génique [69].

☞ *Ce profil de méthylation varie différemment selon l'environnement de l'individu (cf. cas de la divergence phénotypique des vrais jumeaux).*

2.2.6. STRESS OXYDATIF

Le stress oxydatif est en partie d'origine endogène mais il est aussi influencé par des facteurs exogènes comme le tabagisme, la pollution (pesticides, les désherbants et perturbateurs endocriniens tels que bisphénols et autres additifs plastiques, parabènes et phtalates) et les rayonnements ionisants qui peuvent en augmenter le niveau. Or, l'hypothèse d'un lien étroit entre les processus épigénétiques de méthylation et le stress oxydatif a récemment été montré.

Le stress oxydatif pourrait interagir avec le processus de méthylation de l'ADN ou des histones en agissant négativement sur le métabolisme de la molécule donneuse de groupements méthyles S-adénosyl méthionine (SAM), affectant l'activité des enzymes méthyltransférases (DNMTs) qui utilisent SAM comme cofacteur [70].

2.2.7. RELATION DOSE-EFFET

L'épigénétique pourrait aussi expliquer une part des effets stochastiques associés aux faibles doses de rayonnements ionisant [71]

2.2.8. TRANSMISSION DE MARQUES EPIGENETIQUES

Les ARNs non codants sont impliqués dans le maintien des niveaux d'expression des gènes.

Les marques de méthylation peuvent être transmises soit par mitose entre générations cellulaires (lors de la prolifération et différenciation cellulaire) soit par méiose entre générations d'individus.



Figure 12 : modes de transmission des marques épigénétiques portées par l'ADN

☞ *Le mécanisme de transmission mitotique des marques de méthylation de l'ADN est dit semi-conservatif car l'hémi-nucléosome synthétisé ne sera pas porteur des marques de méthylation. Ces marques de méthylation seront conservées après répllication par des méthyltransférases de maintien (DNMT1) qui méthylent le brin complémentaire néo-synthétisé (contrairement aux DNMT3 qui méthylent les deux brins lors du processus de méthylation « de novo ») (Figure 13).*

☞ *En l'absence d'action post-mitotique par l'enzyme de maintien (DNMT1), un processus de déméthylation passive se mettra en place par effet de dilution au cours des générations cellulaires.*

☞ *Les histones quant sont à elles désassemblées et transmises à l'ADN des cellules fille.*

☞ *Lors de la méiose, une transmission transgénérationnelle de marques épigénétiques peut avoir lieu.*

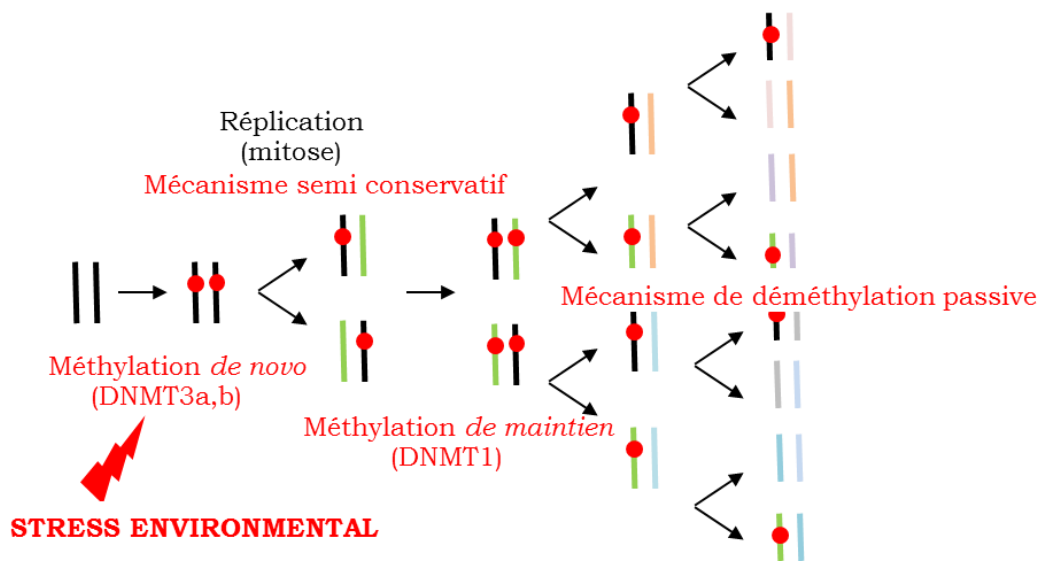


Figure 13 : mécanisme semi conservatif de méthylation de l'ADN

2.3. BIOINDICATEUR DE DIAGNOSTIC ET DE PRONOSTIC :

Un marqueur biologique est une molécule dont les teneurs chez un ensemble homogène d'individus, sont statistiquement très éloignées de celles d'un ensemble de sujets de référence.

Différents types de marqueurs peuvent être identifiés (marqueurs d'exposition, d'effet biologique, de susceptibilité). Ils peuvent être utilisés à des fins de diagnostic pour qualifier un état de santé ou de pronostic pour prédire un événement biologique avant toute apparition de signes phénotypiques. Un biomarqueur doit varier rapidement, spécifiquement et être sensible. Sa mesure doit aussi être non invasive.

Dans ce domaine, un certain nombre d'études montrent que des modifications épigénétiques peuvent être étroitement associées à des expositions environnementales (métaux lourds, rayonnements ionisants) et aussi à des maladies (cancer [59]).

2.3.1. LA METHYLATION DE L'ADN

Une exposition chronique au cadmium entraîne une hyperméthylation de l'ADN et une surexpression de l'activité des DNMTs alors qu'une exposition aiguë agit inversement [72].

Une altération du profil de méthylation de l'ADN est la première anomalie épigénétique découverte sur les cellules cancéreuses.

Les rayonnements ionisants peuvent aussi agir sur la méthylation de l'ADN [73].

☞ Il a été montré qu'une irradiation directe entraînait une hypométhylation de l'ADN dont le niveau varie selon le tissu biologique exposé, la dose d'irradiation mais aussi le sexe de l'individu exposé. Cette perte de méthylation passerait par une altération de l'expression des méthyltransférases (DNMT3a et b). Une perte de méthylation peut aussi résulter d'un effet bystander radio-induit (expérimentalement, une hypométhylation peut-être observée sur des cellules non irradiées cultivées avec du milieu de culture ayant été précédemment utilisé pour cultiver des cellules irradiées). De même chez le rat, une hypométhylation des cellules rénales est observable dès 24 heures et persiste sur une période de 7 mois après irradiation crânienne (effet bystander). Des effets épigénétiques multigénérationnels peuvent aussi être observés sur les générations suivantes par hypométhylation radio-induite des cellules germinales. Cette perte globale de méthylation peut aussi être associée à une augmentation de la fragilité de la molécule d'ADN entraînant un risque de fragmentation chromosomique et d'instabilité génomique.

2.3.2. LES MICRO-ARNs

En réponse à un stress cellulaire, le niveau d'expression des micro-ARNs est modifié.

Les micro-ARNs peuvent aussi être libérés dans le milieu extracellulaire de manière passive lors de la lyse cellulaire (apoptose). Ils peuvent selon leurs compositions et leurs intensités respectives être spécifiques d'une pathologie donnée.

Ils peuvent être utilisés comme marqueur de diagnostic mais aussi comme marqueurs de pronostic car ils sont capables d'être la marque des premiers signes cliniques d'une pathologie ou d'un risque de développement pathologique.

Selon leurs cibles, certains micro-ARNs peuvent avoir un rôle anti-tumoral ou à l'inverse être des oncogènes. Diverses pathologies cancéreuses et non-cancéreuses peuvent ainsi être associées à des signatures de micro-ARNs [59, 60].

☞ Concernant les ARNnc, la présence de micro-ARNs dans le milieu extracellulaire n'a été observée qu'en 2008 par Gilad et al. [74].

☞ miR-208, miR-499 et miR-133 sont surexprimés en cas d'infarctus du myocarde, miR-122 lors d'hépatite C chronique ou de stéatose hépatique non alcoolique.

☞ miR-126, miR-223 et miR-15a peuvent être des sentinelles d'un risque d'apparition de diabète de type II.

☞ miR15 et miR16 ciblent le gène anti-apoptotique BCL2 et miR7 réprime l'expression de l'oncogène RAS.

☞ Le test miRview[®] lung développé par la société Rosetta Genomics permet de différencier les quatre principales classes de cancer du poumon avec une précision de 94 % à partir d'une biopsie et d'une signature utilisant huit micro-ARNs.

☞ L'irradiation d'animaux mâles entraîne une surexpression des miR-29 dans les cellules germinales (associée à la diminution de l'expression de DNMT3a et par conséquent à une hypométhylation). Une répression d'expression de miR-468 dans le thymus est observée chez les enfants issus de ces animaux. Elle peut être associée à une baisse d'expression de l'enzyme LSH, elle-même associée à la méthylation de maintien via DNMT1 [73, 75].

Parmi les méthodes analytiques de nouvelles générations, l'épigénomique est une alternative pertinente qui a déjà prouvé sa capacité pour identifier des marqueurs biologiques utilisables en clinique. Elle s'inscrit dans le cadre des recommandations de la Société Française de Biologie Clinique (méthode d'évaluation Valtec) grâce à sa sensibilité, sa précision, sa reproductibilité et sa fiabilité.

3. IMPLICATION DU DIMORPHISME SEXUEL

Le sexe des individus est un paramètre important dans la réponse cellulaire aux expositions environnementales car il est susceptible de faire varier le niveau de sensibilité d'un individu à une exposition donnée. Ce dimorphisme sexuel peut être observé aux différents niveaux de l'échelle des systèmes de régulation biologiques et avoir des conséquences directes sur le niveau de sensibilité des individus à une exposition donnée [76-78].

La première différence constatée s'observe au niveau même des chromosomes. Les femelles ayant deux chromosomes X et les mâles, un chromosome X accompagné d'un chromosome Y (de longueur, de séquence et d'expression différentes de X), ils subissent des influences environnementales et hormonales différentes. Selon le sexe des individus, cette différence chromosomique s'exprimera de façon différente dans les tissus tout au long de la vie.

Les chromosomes sexuels ont une grande importance dans l'expression des sensibilités individuelles.

☞ *On compte environ 600 gènes différentiellement exprimés selon le sexe dans le blastocyste de la souris au stade E 3.5. Chez le bovin, l'analyse ontologique montre une surexpression liée au métabolisme des protéines dans les blastocystes femelles. A contrario, le métabolisme global du glucose est deux fois plus important chez le mâle et la voie des pentoses phosphates quatre fois plus importante que chez les femelles. Ces observations ayant été confirmées dans des embryons humains montrent l'existence d'un dimorphisme sexuel d'ordre chromosomique capable de moduler l'expression génique en l'absence de toute influence hormonale sexuelle.*

☞ *L'expérience montre aussi que l'ablation ou la supplémentation hormonale ne suffit pas à effacer certaines différences métaboliques.*

La deuxième différence s'observe au niveau des hormones sexuelles produites et de leur influence sur l'expression des gènes. Les hormones testiculaires ont aussi une influence dans certaines régions spécifiques du cerveau mais aussi sur la mort et la prolifération cellulaire au stade développemental périnatal.

☞ *Ces différences sexuelles ayant été récemment observées par imagerie à résonance magnétique (IRM). Elles confirment l'existence d'un dimorphisme sexuel au niveau de nombreuses structures du cérébrales dont le développement et/ou le fonctionnement diffère [79].*

La dernière différence vient des rapports sociaux culturels qu'entretient l'individu avec son environnement. Ceux-ci influent sur l'expression du genre mais aussi sur l'expression même des gènes par l'intermédiaire de phénomènes épigénétiques. Dès la naissance, l'influence maternelle et sociétale peut agir sur le déterminisme phénotypique et psychique par l'intermédiaire de mécanismes épigénétiques.

3.1. DIFFERENCES EPIGENETIQUES.

Les niveaux de régulations épigénétiques dépendent étroitement des influences chromosomiques, gonadiques et sociétales. La méthylation des promoteurs géniques liés à l'expression des récepteurs aux œstrogènes peut avoir des répercussions comportementales tardives sur le sentiment d'instinct maternel.

Des travaux effectués chez le rongeur montrent que l'état conformationnel de la chromatine est impliqué dans la régulation gènes associée au dimorphisme sexuel.

Il existe une différence temporelle de reprogrammation entre les gamètes mâles et femelles qui implique une différence de sensibilité des individus aux expositions environnementales à âge égal.

3.2. DIFFERENCES GENETIQUES.

Au stade E10.5 chez la souris, une cinquantaine de gènes impliqués dans les processus de différenciation, de prolifération cellulaires, de régulation transcriptionnelle et signalisation sont exprimés de manière différente dans le cerveau embryonnaire des mâles et des femelles [80].

La proportion des gènes sexuellement modulés varie d'un organe à l'autre. Seuls 8% de ces gènes sont exprimés similairement dans tous les organes.

Dans le cerveau adulte, 14 % des gènes sont exprimés de manière différente et cette proportion s'élève à 70 % dans le foie [78].

☞ *Par exemple, les gènes codant pour Cyp2a2 (cytochromes P450) sont exclusivement exprimés chez les mâles alors que Cyp2c12 l'est pour les femelles [81].*

3.3. DIFFERENCES METABOLIQUES.

Selon le sexe, on observe des différences métabolisme des embryons mais aussi au niveau de leur vitesse de développement, de leur taille mais aussi de leur sensibilité en terme de morbidité.

Chez le rongeur adulte, des différences moléculaires de régulation hépatique, rénale, cérébrale et cardiaque sont observables [82]. Néanmoins, ces différences fluctuent avec l'âge, l'état de santé des individus et les conditions environnementales.

3.4. DIFFERENCES PHENOTYPIQUES.

Chez le fœtus et le nouveau-né, des différences sexuelles peuvent être aussi observées au niveau des cerveaux (volume des noyaux de certaines régions cérébrales, nombre des neurones, densité et nombre des synapses, morphologie gliale, morphologie de l'hippocampe pouvant à la suite d'un stress précoce expliquer des incidences comportementales tardives) [83].

3.5. DIFFERENCES TOXICOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES.

On observe des différences de pharmacocinétique et de pharmacodynamie selon le sexe des individus. Ces différences contribuent à la part d'efficacité thérapeutique ou de toxicité des xénobiotiques. Ces différences peuvent s'expliquer par des différences de niveaux d'expression des gènes associés à certaines enzymes du système de détoxification telles que les cytochromes P450 (impliquées dans le métabolisme des stéroïdes, des acides gras, des médicaments et d'autres xénobiotiques) mais aussi au niveau de l'accumulation des protéines membranaires de transport des cellules tubulaires rénales (impliquées dans la clairance des xénobiotiques) [81].

3.6. DIFFERENCES GENERATIONNELLES.

D'un point de vue intergénérationnel, le dimorphisme sexuel intervient suivant différents modes d'action.

Le premier mode résulte de l'effet d'une transmission somatique de perturbateurs métaboliques (facteurs nutritionnels, stress maternel *in utero* voire pendant l'allaitement) qui peuvent agir directement sur les cellules somatiques durant la période fœtale et périnatale [84, 85].

Le second mode se fait par l'intermédiaire des lignées germinales parentales dont les périodes de sensibilité à l'environnement varient selon le sexe des individus [86, 87].

☞ *La transmission intergénérationnelle de l'empreinte d'un stress environnemental dépend à la fois du sexe du parent exposé et de celui de sa progéniture [88, 89].*

La différence sexuelle d'un effet environnemental dépendra aussi de la génération considérée [90].

☞ *Selon le sexe des individus considérés, une exposition donnée pourra avoir des répercussions directes ou indirectes sur la descendance*

4. HERITABILITE D'UNE EXPOSITION A FAIBLE DOSE

4.1. EFFET MULTI ET TRANSGENERATIONNEL

4.1.1. EFFET MULTIGENERATIONNEL

Un effet multigénérationnel résulte d'une exposition directe de plusieurs générations. Une telle exposition peut affecter directement jusqu'à trois générations successives (adulte (F0), fœtus (F1) et cellules germinales du fœtus (F2)).

☞ *Un triste exemple d'effet multigénérationnel fut celui du distilbène (DES), composé de synthèse aux propriétés oestrogéniques qui fut donné aux femmes enceintes à risque de fausses couches entre les années 40 et 70. Ce composé hormonal s'est avéré avoir affecté trois générations de filles (mère comprises) par une augmentation de la fréquence des cancers de l'appareil reproducteur [42].*

☞ *Au sujet des rayonnements ionisants, une hypométhylation radio-induite des cellules germinales de rats (F0) a pu être observée après exposition globale ou crânienne ainsi qu'une hypométhylation du thymus, de la moelle osseuse et de la rate, des ratons descendant (F1). Cette hypométhylation étant elle-même associée à une baisse significative de l'expression de DNMT1, 3a, b et MeCP2 (methyl CpG binding protein 2). Une modification de profil des micro-ARNs a aussi été observée chez des pères irradiés et retrouvée chez ses enfants [73, 75].*

4.1.2. EFFET TRANSGENERATIONNEL

Un effet transgénérationnel est un effet indirect. Il n'est pas lié à l'exposition directe des cellules germinales parentales mais à la transmission sexuelle de marques épigénétiques qui résultent d'une exposition ancestrale.

Suivant ce mode d'action, lorsqu'une lignée germinale est exposée à un stress environnemental, des marques épigénétiques portées par certains gènes pourraient être transmises par les gamètes à la génération suivante et à celle d'après.

Ce type d'effet ne peut être considéré qu'au-delà de la quatrième génération chez les femelles (troisième chez les mâles).

☞ *La Vinclozoline qui était utilisée sur les vignobles comme fongicide a montré expérimentalement chez la rate gestante, qu'elle pouvait affecter le système reproducteur des ratons mâles sur 3 voire 4 générations [91].*

Diverses études semblent montrer l'existence d'une telle transmission chez l'homme, mais le manque de recul épidémiologique ne permet pas encore d'établir si les marques épigénétiques identifiées peuvent traverser plus de deux générations.

☞ *Néanmoins, il est nécessaire dans ce type d'études de ne pas négliger la part psychosocial qui, à des stades prénataux et néonataux, peut impacter durablement des individus et qui peut être à l'origine d'effets sanitaires tardifs observés chez l'enfant et l'adulte. L'effet d'un stress maternel sur l'axe hypothalamo-hypophysaire peut agir sur la production de glucocorticoïdes et induire la mise en place de marques épigénétiques qui, selon le phénotype observé, peut être un facteur significatif de confusion.*

Le premier rôle attribué à l'épigénétique tenant dans ses propriétés adaptatives aux facteurs environnementaux, les effets tardifs d'une exposition ne sont pas forcément nocifs mais peuvent aussi être au contraire bénéfiques et protecteur pour la génération suivante [92]. Cependant, à cause des deux processus successifs d'effacement et de reprogrammation des marques épigénétiques de méthylation de l'ADN qui interviennent à chaque génération, la transmission intergénérationnelle de marques épigénétiques est un mécanisme rare, voire exceptionnel.

Le premier processus d'effacement et de reprogrammation épigénétique des marques de méthylation se déroule au moment de la gamétogenèse (très tôt chez le mâle et beaucoup plus tardivement chez la femelle) et le second survient au stade embryonnaire, dans la première partie de la vie foetale.

Ce processus de remise à zéro de l'épigénome foetal, permet d'effacer les marques parentales indésirables mais aussi d'initier la totipotence et la détermination des cellules germinales tout en mettant en place, dès le début de la vie intra-utérine, de nouvelles marques épigénétiques de régulation propres aux conditions environnementales du moment. Ces nouvelles marques étant nécessaires aux processus adaptatifs et vitaux. Cette programmation génique sera affinée tout au long de la vie [93].

4.2. PERIODES DE SENSIBILITE EPIGENETIQUE ET DEVELOPPEMENTALE

Ces périodes sont particulièrement sensibles car susceptible d'être à l'origine d'effets nocifs voire de pathologies tardives.

Comme décrit précédemment, deux grandes phases critiques de reprogrammation épigénétique sont à considérer. L'une au moment de la différenciation des cellules germinales primordiales en gamètes et l'autre pendant la première période du développement embryonnaire, durant lequel le phénomène de reprogrammation de l'ADN peut être durablement affecté. Une troisième correspondant à la période néonatale qui est aussi une période de sensibilité particulière durant laquelle les systèmes physiologiques nécessaires à la vie sont en plein développement.

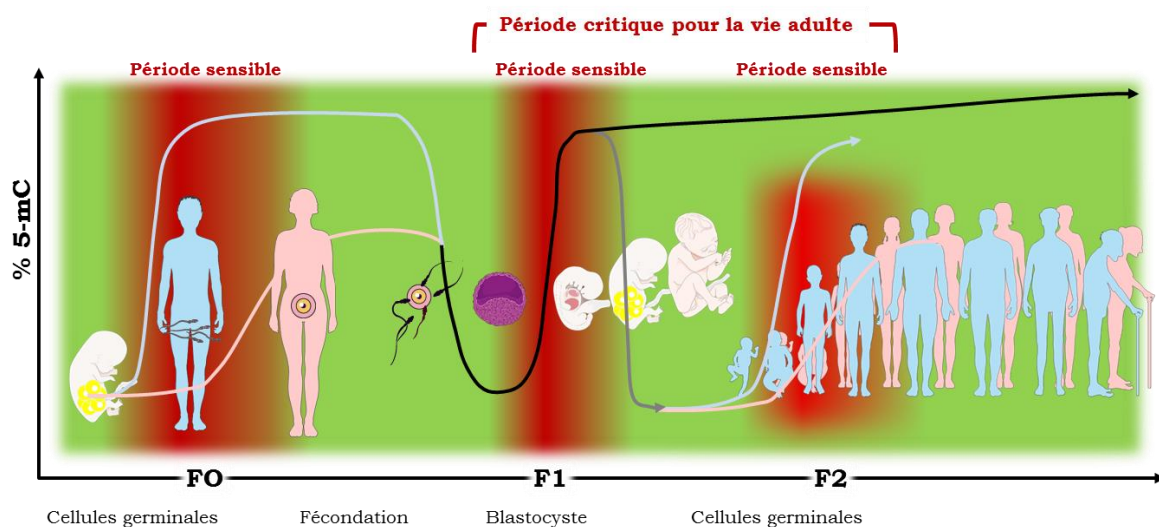


Figure 14 : périodes de sensibilité développementale liées aux phases de reprogrammations épigénétiques de l'ADN

4.2.1. LE DEVELOPPEMENT GERMINAL

La première période de sensibilité se déroule pendant la maturation des cellules sexuelles. Durant cette période, le profil de méthylation des cellules germinales des mammifères est remanié au cours des processus de différenciation et de formation des gamètes [94]. La phase de programmation épigénétique de la lignée germinale est liée au processus de différenciation des gonades. Cette différenciation est essentielle à la transmission génique de l’empreinte parentale et au maintien de l’intégrité génomique.

☞ *Chez la souris, cet effacement des marques épigénétiques germinales a lieu au 13^{ème} jour de gestation, réduisant le taux de méthylation de l’ADN de 60% à environ 7% du génome.*

A ce stade développemental, toutes les marques épigénétiques sont effacées. Une phase progressive de reprogrammation qui accompagne la maturation des gamètes suivra.

☞ *L’effacement des marques épigénétiques n’étant pas total au moment de la « remise à zéro » des cellules germinales, l’hypothèse d’un risque de transmission épigénétique chez l’homme par les gamètes demeure (bien que n’ayant pas encore été prouvé).*

Au niveau des gonades, cette déméthylation de l’ADN est suivie d’une reméthylation qui s’opèrera suivant des cinétiques différentes selon le sexe de l’individu. Cette différence temporelle influe sur période de sensibilité environnementale des gamètes paternels et maternels car cette reprogrammation se fait de façon précoce pour le spermatozoïde et beaucoup plus tardive pour l’ovule. Elle est assurée par les enzymes DNMT3A, B et L.

☞ *Chez la souris mâle, l’expression du gène de détermination sexuel SRY (porté par le chromosome Y), entraîne au 13^{ème} jour de gestation le processus de méthylation des cellules germinales. Cette méthylation touche des éléments transposables du génome et des gènes qui participent à l’empreinte paternelle. Ces marques de méthylation seront maintenues dans la lignée germinale du fœtus et même après la naissance jusqu’à la formation des spermatozoïdes matures.*

☞ *Chez la femelle par contre, la reméthylation n’a lieu qu’après la naissance, à chaque cycle d’ovulation. Des éléments transposables et gènes soumis à empreinte maternelle ainsi que des gènes impliqués dans les processus développementaux sont méthylés. Durant cette période, le processus de méthylation ovocytaire est particulièrement sensible aux stress environnementaux.*

A cause de cette différence de chronologie de reméthylation entre mâles et femelles, les mâles subissent un processus de reprogrammation des gamètes antérieur à celui des femelles. Cette différence temporelle leur confère une sensibilité plus précoce, débutant bien avant la puberté. La lignée germinale des femelles, ne pouvant être touchée qu’au moment de l’ovulation, n’est pas sensible au début du processus développemental de l’embryon.

☞ *Deux périodes critiques distinctes peuvent affecter l’empreinte paternelle alors qu’elles sont quasiment conjointes pour la partie issue du génome maternelle.*

Malgré la rareté du phénomène de transmission intergénérationnel (à cause des processus épigénétiques de reprogrammation présents chez les mammifères), des études ont montré l’existence de tels effets et interrogent sur le risque d’apparition d’épimutations durables et persistantes chez l’homme.

☞ *Les fils dont le père avait commencé à fumer avant l’âge de 11 ans pouvant montrer un surpoids par rapport au filles ou aux enfants dont le père avait fumé plus tard [95].*

☞ *De même, des études épidémiologiques font un lien entre une alimentation peu calorique du père pendant sa préadolescence et un risque cardiovasculaire de mortalité diminué chez les enfants.*

☞ *Une étude chez la souris montre aussi que le stress paternel peut avoir des répercussions sur sa descendance par transmission de marques épigénétiques portées par les spermatozoïdes.*

☞ *La consommation d'alcool peut aussi affecter l'ADN des spermatozoïdes par méthylation différentielle et avoir des conséquences tardives telles que sur le poids de naissance et sur les capacités motrices et cognitives des enfants [96].*

4.2.2. LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

La seconde période de sensibilité épigénétique survient *in utero*, au premier stade de la vie fœtale. Après fusion des gamètes mâles et femelles, une déméthylation génomique (accompagnée d'une modification des marques des histones) suivi d'une reprogrammation des marques de méthylation de l'ADN survient dans les premiers jours de la vie embryonnaire.

Ce mécanisme a pour but d'effacer les marques parentales indésirables (anomalies d'épimutations acquises) pour l'enfant. Il assure la totipotence des cellules souches embryonnaires et permet d'adapter l'embryon à son environnement au moment de la mise en place des processus de différenciation cellulaire, nécessaires au développement fœtal.

☞ *Chez le poisson zèbre, seul le brin d'ADN provenant de la femelle est effacé alors que celui du mâle est maintenu.*

Cette reprogrammation survient au moment de la différenciation des cellules embryonnaires (3^{ème} jours de gestation chez la souris) qui donneront lieu à un individu dans sa globalité.

☞ *Au cours du développement embryonnaire, le nombre des cellules souches se différencie par répression des gènes inutiles. L'ADN des cellules souches (pluripotentes) est très lâche et peu compacté. Il contient aussi peu de marques épigénétiques. Au cours des cycles de différenciations cellulaires, l'hétérochromatine augmente et le profil de méthylation se complexifie. Les cellules évoluent et acquièrent des propriétés de totipotence-pluripotence puis embryonnaire-multipotentes et enfin fœtales et adultes pour être des lignées cellulaires bien différenciées.*

Ce processus embryonnaire est particulièrement sensible aux expositions environnementales qui peuvent altérer la phase de reprogrammation épigénétique et être à l'origine d'effets biologiques tardifs et nocifs.

☞ *Un stress maternel peut avoir des répercussions sur l'empreinte épigénétique du fœtus (par implication de l'axe endocrinien hypothalamus/hypophysaire/surrénalien) et à terme, des répercussions sur son développement, son système immunitaires et sa future réponse au stress [97-99].*

☞ *Une exposition paternelle nocive peut avoir des répercussions intergénérationnelles sur le fœtus par mécanismes épigénétiques [96].*

☞ *Un stress nutritionnel pendant les deux premiers trimestres de gestation peut quant à lui, avoir une incidence significative sur le risque obésogène, et diabétogène de l'enfant [100]. La supplémentation en facteurs diététiques comme l'acide folique, la méthionine, la vitamine B12, la choline ou la bêtaïne, augmente chez la souris le processus de méthylation de l'ADN chez le fœtus. A l'inverse, l'appauvrissement de ces mêmes nutriments entraîne une réduction de la méthylation sur le génome entier et stimule l'apparition de tumeurs chez le rat. De même chez la brebis, on observe une surcharge graisseuse, une hypertension artérielle et du diabète [101, 102].*

☞ *Les pollutions chimiques prénatales telles que le tabac peuvent avoir des répercussions respiratoires, cardiovasculaires, obésogènes, diabétogènes et épigénétiques par le biais d'une hypométhylation globale et d'une hyperméthylation de certains gènes chez l'enfant [103].*

☞ *D'autres polluants comme l'arsenic, le benzopyrène, les phtalates le bisphénol A peuvent aussi agir sur le développement fœtal par l'action de mécanismes épigénétiques [104].*

4.2.3. LA PERIODE NEONATALE

La période néonatale est la dernière des périodes sensibles. Durant cette période, le nouveau-né est particulièrement vulnérable aux stress psycho-environnementaux tels que celui associé au comportement maternel.

Les structures en croissance sont aussi particulièrement sensibles au stress et durant l'enfance, le développement cérébral particulièrement actif. L'hippocampe et les amygdales qui sont en développement jusqu'à l'âge adulte sont aussi les plus vulnérables [105].

☞ *Observé chez le rat, un comportement maternel inapproprié peut avoir un effet direct sur le comportement des rats adultes par la mise en place d'une empreinte épigénétique au niveau des structures cérébrales [66, 106]*

5. «OMIQUES» : TECHNIQUES SENSIBLES A HAUTS DEBITS.

Durant ces vingt dernières années, de nouvelles stratégies analytiques, mêlant des méthodes physico-chimiques de très grandes sensibilités à des outils mathématiques et statistiques sont apparues et sont capables produire de grandes quantités d'information [107, 108].

Ces nouvelles approches permettent d'appréhender le vivant dans sa globalité et dans sa complexité par l'analyse exhaustive de l'ensemble des signaux moléculaires mesurables à un instant donné et dans des conditions données et dans un milieu biologique donné.

Cette masse d'information produite, permet à l'aide d'analyses statistiques multivariées, d'identifier des marqueurs d'intérêt qui seront utiles pour ensuite formuler des hypothèses scientifiques [109].

☞ Ces hypothèses pour être valides, devront être ensuite confirmées par la réalisation d'études ciblées sur l'analyse spécifique des marqueurs identifiés par approches « omiques » (Figure 15).



Figure 15 : stratégie analytique de découverte scientifique par les approches "omiques"

Outre le décryptage mécanistique des systèmes moléculaires de régulations biologiques, ces approches sont particulièrement pertinentes dans le domaine de la toxicologie prédictive. Elles peuvent être un outil de choix pour mettre en évidence des marqueurs biologiques d'exposition, d'effet ou même de susceptibilité, prédictifs de futurs effets néfastes [110].

Grace à leur extrême sensibilité et leur sélectivité, ces nouvelles technologies sont adaptées à l'évaluation des effets biologiques de faibles amplitudes qui peuvent être associés aux expositions environnementales à faibles doses [107, 111]. Elles permettent aussi par la mesure simultanée d'une très grande quantité d'information (variables biologiques), d'identifier les signaux biologiques divergents qui caractérisent la réaction cellulaire ou tissulaire à une exposition à un stress [112]. Ces techniques utilisables aux différents niveaux organisationnels des systèmes de régulation moléculaires couvrent différents domaines tels que la génomique, la génomique fonctionnelle ou transcriptomique, la protéomique et enfin la métabolomique (nouveau de régulation situé au près du déterminisme phénotypique) [113]. Des déclinaisons méthodologiques de ces dernières sont aussi apparues pour être plus spécifiques de certains systèmes comme l'épigénomique, la sécrétomique, la glycomique et la lipidomique.

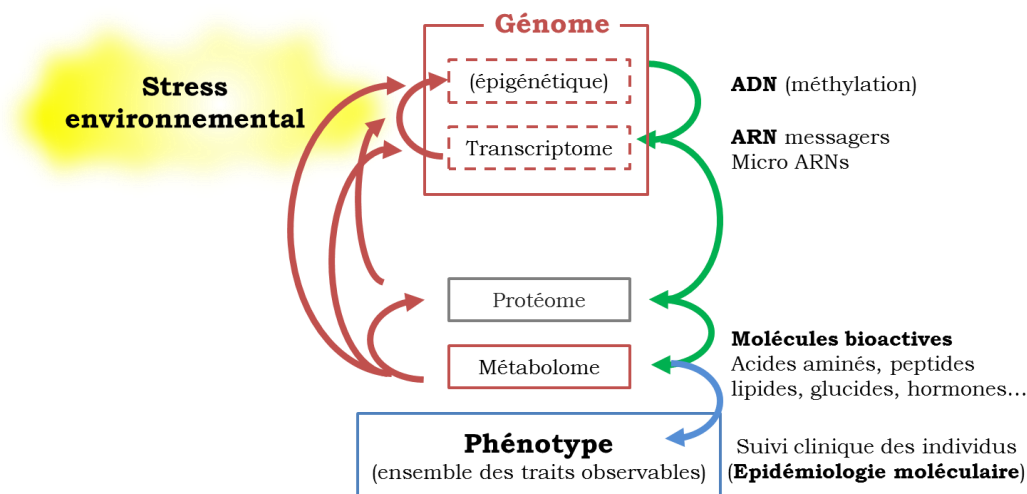


Figure 16 : mesure de la réponse dynamique à un stress environnemental par l'analyse des mécanismes et réseaux moléculaires d'un système complexe à régulations multiples par analyses intégratives de données « omiques »

Ces approches analytiques sont pertinentes pour rechercher les signatures biologiques d'une exposition, d'un stress, d'une maladie. A partir de ces signatures, pourront être identifiés des marqueurs d'expositions (réalisation de test de diagnostic par identification de marqueurs composites) et ou des marqueurs d'effets biologiques (marqueurs précoces de pronostic d'effets indésirables, d'évaluation du risque) [114, 115].

L'analyse différentielle des empreintes moléculaires produites par analyses omiques permet de décrypter et comprendre le fonctionnement des mécanismes cellulaires et tissulaires en conditions normales (maintien de l'homéostasie). Elle permet aussi d'identifier les cibles moléculaires des expositions environnementales impliquées dans les mécanismes de régulations d'adaptation et de réaction cellulaire à un stress [7, 116].

☞ Ces données biologiques sont autant d'indicateurs utilisables dans la recherche et la prédiction des risques à l'échelle des populations.

Elles permettent aussi d'identifier des groupes présentant des sensibilités particulières aux expositions (sensibilité d'origine ethnique, liée à l'âge, au sexe, aux influences psychosociales) [7, 117] mais aussi, consécutivement à des situations normales dégradées, accidentelles ou post-accidentelles, d'évaluer l'impact direct d'expositions professionnelles ou environnementales (simples ou multiples) sur l'individu et sa descendance (par des mécanismes d'exposition et de transmission intergénérationnelle [118, 119]).

5.1. METABOLOMIQUE

L'analyse du métabolome d'un organisme consiste à analyser simultanément l'ensemble de métabolites présents dans un tissu ou un fluide biologique.

☞ Le terme de métabolome a été employé pour la première fois en 1998 [120, 121].

Les métabolites sont des petites molécules chimiques (<1500 Da) qui sont présentes dans les fluides et tissus biologiques. Ils peuvent être d'origine endogène ou exogène et résultent des phénomènes de transcription et de traduction.

On distinguera deux sous catégories de métabolites endogènes : les métabolites primaires (impliqués dans ces processus physiologiques tels que la croissance, le développement et la reproduction) et les métabolites secondaires (qui ne sont pas impliqués dans des fonctions physiologiques vitales) [122-124].

La métabolomique est une approche analytique moderne apparue en 1999 grâce à l'équipe de Nicholson qui utilisait une approche analytique par résonance magnétique nucléaire (RMN) [125]. Depuis, la spectrométrie de masse s'est imposée dans ce domaine comme une seconde technique d'analyse qui a permis d'atteindre des niveaux de sensibilité nettement supérieurs à ceux de la RMN (**Figure 17**), mais qui présente aussi certains inconvénients.

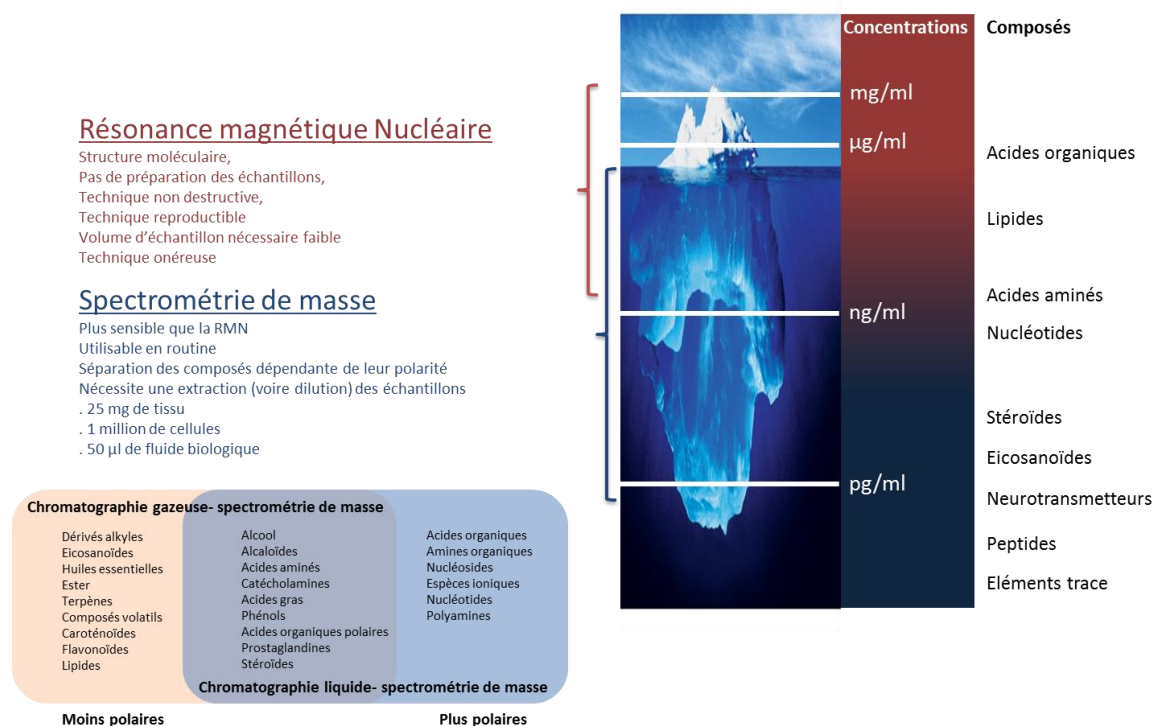


Figure 17 : limites techniques des deux approches métabolomiques.

La métabolomique rend compte de l'état homéostatique d'un système biologique à un instant donné. Situé au plus haut de l'échelle des systèmes de régulations moléculaires, au plus près du déterminisme phénotypique, le métabolome peut en être considéré comme le reflet moléculaire [126]. L'analyse du métabolome fournit « une description quantitative de la réponse dynamique et multiparamétrique d'un système vivant soumis à des stimulations physiopathologiques ou à des modifications génétiques/épigénétiques » [125, 127].

Cette technique analytique associe à la fois la chimie analytique par l'utilisation de techniques physiques ultrasensibles (spectrométrie de masse, RMN), les biomathématiques/biostatistiques pour l'analyse les ensembles de données spectrales et finalement la bioinformatique pour l'analyse biologique des données analytiques.

Elle s'avère pertinente pour décrire la signature (ou l'empreinte biologique) d'un stress environnemental voire d'une exposition interne telle qu'une contamination par un radionucléide, un xénobiotique [8, 128]. Elle peut être mise en œuvre aussi bien dans le cadre d'études expérimentales (*in vivo*, *in vitro*) que dans un cadre de suivis cliniques réalisés sur des cohortes à risques potentiels ou réels [111, 129, 130].

L’empreinte biologique d’une exposition fournit une description détaillée de la composition en métabolites et permet d’en identifier ceux qui sont différemment exprimés dans les fluides biologiques (sang, urine, salive, etc.), et les biopsies des individus étudiés. Elles rendent compte de l’activité biochimique du métabolisme cellulaire.

L’utilisation d’analyses statistiques discriminantes multivariées permet à partir des données analytiques, de désigner les métabolites dont le pouvoir discriminant est le plus fort ou le plus impliqués dans la réponse biologique à l’exposition. Ces identités sont à la fois utiles à la compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents à l’exposition mais ils sont aussi des marqueurs de diagnostic biologiques de l’exposition voire prédictifs d’un risque clinique [131]. Associée à des techniques bioinformatiques de modélisation, son analyse améliore la compréhension des processus biologiques et des interactions qui lient l’organisme à son environnement (produits chimiques, maladies) qui peuvent être la cause d’une rupture des équilibres homéostatiques [7, 132] (**Figure 18**).

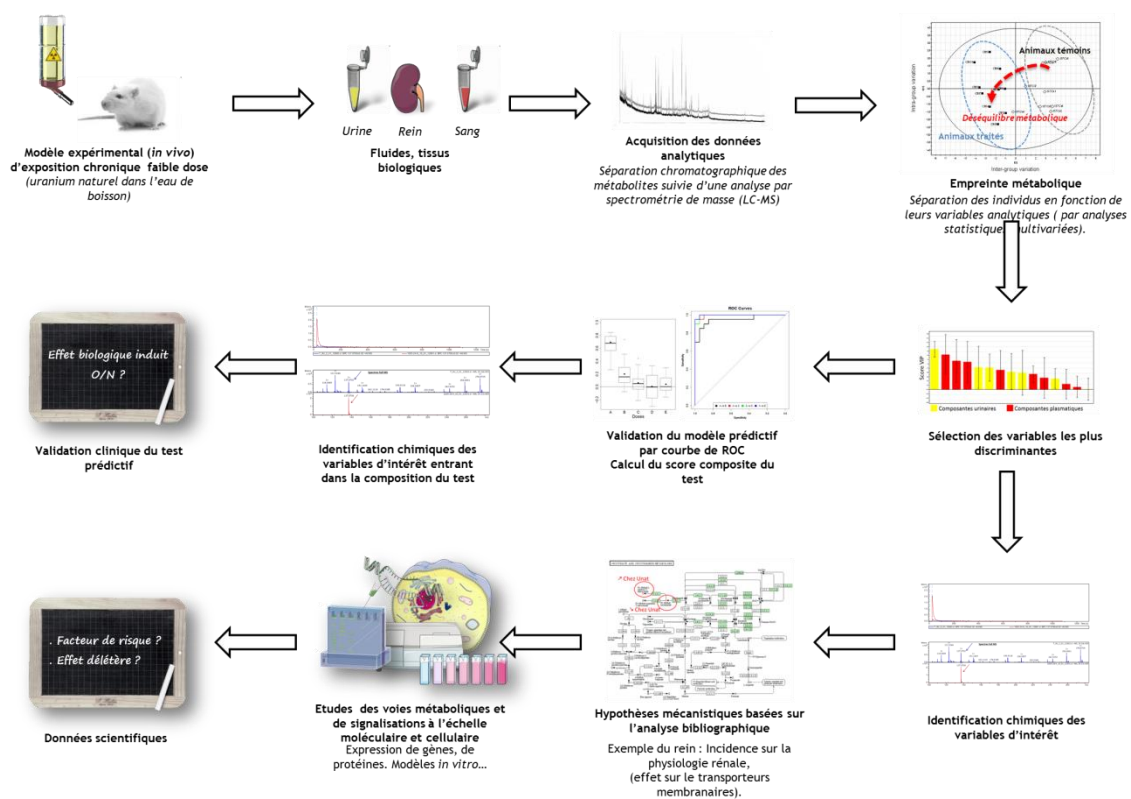


Figure 18 : principe méthodologique général d'une analyse métabolomique

☞ À titre d'exemples, dans le cadre des malades cardiovasculaires, la métabolomique est utilisée pour réaliser des diagnostics d'atteintes coronariennes [131, 133].

☞ Dans l'industrie pharmaceutique, elle est utilisée pour évaluer, la toxicité de nouvelles molécules thérapeutiques [134].

☞ Concernant les effets des rayonnements ionisants, outre l'intérêt scientifique porté par l'identification des voies métaboliques impliquées dans l'apparition d'effets nocifs des radiothérapies et de recherche de nouvelles thérapies [135], une étude métabolomique a permis de mettre en évidence une signature métabolique urinaire associée aux effets des rayonnements ionisants pour des irradiations externe de 3 Gy [136]. Une autre étude basée sur un protocole d'exposition chronique par ingestion de césium-137 a permis, pour des doses absorbées sur 9 mois inférieures à 4 mGy, d'identifier des rats exposés à partir d'une analyse sanguine ou urinaire [15]. Une étude similaire réalisée par ingestion d'uranium a aussi permis d'identifier des signatures métaboliques différentes dans les urines des animaux exposés à une dose calculée au rein inférieure à 0.15 mGy sur 9 mois ($< 0.5 \mu\text{g/g}$) [137].

☞ Plus récemment en cancérologie, une étude a permis d'identifier des marqueurs prédictifs du cancer bien avant l'apparition des marqueurs tumoraux circulant, chez des souris irradiées à forte dose (5 Gy) [138].

☞ Chez le rat, la signature métabolomique d'une exposition aux phtalates a été caractérisée. Cette signature analysée dans le plasma sanguin a aussi révélé l'existence d'une relation dose-effet à seuil [139]. Chez l'homme, une signature métabolomique associée à l'utilisation de pesticides sur les terres agricoles a été identifiée chez des femmes enceintes [129].

En se positionnant au stade ultime des systèmes de régulation cellulaire, La métabolomique permet de faire une description exhaustive des différents mécanismes moléculaires mis en jeu lors d'expositions ou de stress environnementaux, de réaliser des études dans une gamme doses-réponses comprise entre le niveau de fluctuation physiologique (marqueur prédictifs), le niveau infraclinique (marqueur précoces) et le niveau clinique (marqueurs d'atteinte).

En résumé, la métabolomique est capable de fournir une information précise et descriptive du phénotype métabolique d'un organisme vivant et de rendre compte de son niveau de sensibilité aux expositions environnementales. Grâce à son extrême sensibilité, cette technique est un atout considérable dans l'analyse et la mise en évidence des mécanismes biologiques associés à des faibles doses d'exposition.

5.2. TRANSCRIPTOMIQUE

On estime qu'il existe chez l'homme environ 22000 gènes actifs et exprimés dans une centaine de types cellulaires. Chez les eucaryotes, cette expression se traduit au niveau du noyau par la formation d'ARN messagers (ARNm). Ces petites séquences nucléotidiques à simple brin, sont les répliques des gènes actifs d'une cellule (phénomène de transcription). Ils se dirigent ensuite au niveau des ribosomes cytoplasmiques pour activer la synthèse des protéines constitutives et fonctionnelles (phénomène de traduction).

☞ D'autres ARNs (ARN ribosomiaux et de transfert), assurent un rôle dans le mécanisme de traduction des protéines.

Sur l'échelle des systèmes cellulaires de régulation moléculaires, le transcriptome se positionne entre le génome (ensemble des gènes présents sur les chromosomes) et le protéome (ensemble des protéines traduites et produites par activation des gènes).

Le transcriptome est défini comme l'ensemble des ARNs transcrits à partir des gènes à un instant donné, dans une population de cellules (un tissu biologique). Les principaux transcrits analysés sont les ARNs messagers car ce sont les ARNs codants. D'autres ARNs, cette fois-ci non codants, peuvent aussi être analysés comme les ARNs ribosomiaux et les micro-ARNs. Ces derniers sont impliqués dans les processus post-transcriptionnels épigénétiques. L'analyse du transcriptome fournit une indication sur l'état fonctionnel des gènes à un instant donné ainsi que leur implication au niveau des systèmes régulations biologiques.

La transcriptomique date des années 90. Elle se positionne au niveau de la génomique fonctionnelle [140] et ne s'intéresse pas à la lecture séquentielle du génome mais à l'observation de la réponse dynamique globale des niveaux d'expression des gènes d'une cellule (ou d'un groupe de cellules) à un instant donné dans des conditions expérimentales données.

Cette technique permet de réaliser un criblage préalable de l'activité génique, par la réalisation d'observations « naïves » larges (~45000 gènes) et descriptives des gènes exprimés, co-exprimés et différemment exprimés. Cette approche analytique pourra ensuite être complétée par la réalisation d'expérimentations plus ciblées et nécessaires à la validation des modèles mécanistiques proposés. Elle permet aussi de réaliser des constructions de réseaux de régulations par la mise en œuvre d'analyses temporelles (cinétique de régulation génique).

Le transcriptome est principalement analysé par puces à ADN ou par séquençage (*RNA-Seq* pour *RNA sequencing*).

☞ *L'utilisation en routine des puces à ADN remonte aux années 2000. Par cette méthode, il est possible de mesurer le niveau relatif d'expression d'un gène par rapport à un autre ou le plus souvent, d'un même gène dans des conditions expérimentales ou environnementales différentes [141, 142].*

Cette technique est fondée sur un principe d'hybridation de deux molécules présentant une séquence nucléotidique identique. Sur la puce, des acides nucléiques à analyser, sont mis en contact avec des fragments synthétiques d'ADN (sondes), regroupés en spots représentatifs de chacun des gènes étudiés.

Ces analytes (ADNc produits par rétro-transcription des ARNm) ont été préalablement couplés à un marqueur fluorescent. Les sondes greffées sur la puce étant en excès, l'intensité du signal fluorescent mesuré sera proportionnelle à la quantité relative d'ADNc (c'est-à-dire d'ARNm) fixé.

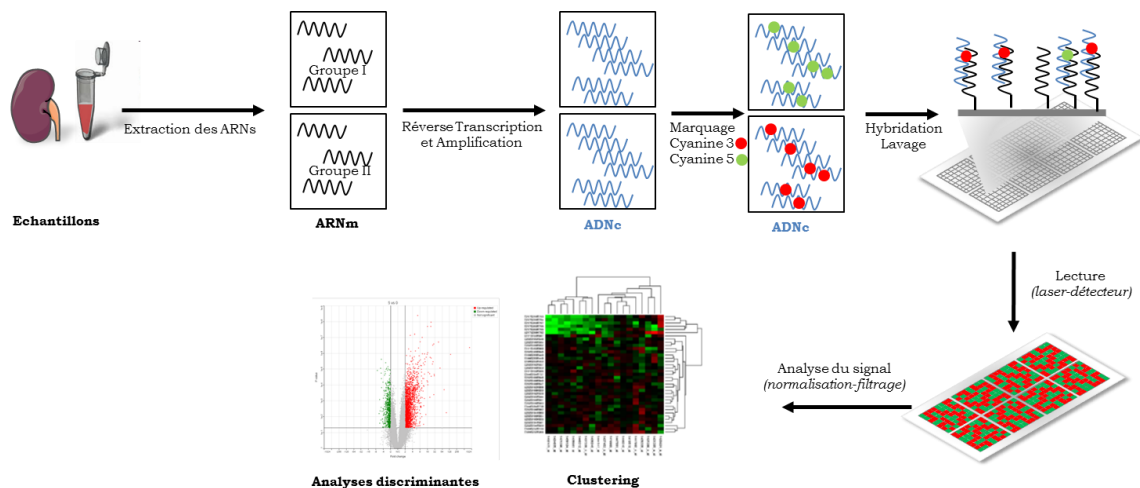


Figure 19 : principe général d'analyse transcriptomique par microarray.

L'identification de *patterns* de gènes dont le niveau d'expression est modifié par des conditions environnementales données, peuvent potentiellement être utilisés comme biomarqueurs d'exposition (outils de diagnostic) (**Figure 19**).

☞ Ce type d'application peut par exemple être utilisé en clinique pour estimer l'efficacité d'un traitement sur des cellules cancéreuses [143]. Elle est aussi utilisée pour estimer le risque métastatique de tumeur du sein [144] et les chances de survie d'un patient atteint par un cancer du poumon [145, 146].

☞ Pour estimer l'efficacité d'une radiothérapie ou décrypter les mécanismes géniques de la réponse cellulaire aux faibles et fortes doses de rayonnements ionisants, la transcriptomique permet de mettre en évidence des signatures géniques différentielles associables aux effets des expositions [147-150].

☞ Concernant les effets des perturbateurs endocriniens, des études fondées sur l'analyse du transcriptome ont mis en évidence des effets sur la différenciation, le cycle cellulaire, ou les processus de biosynthèse des hormones stéroïdes avec le bisphénol A ou les phtalates [151-153].

5.3. EPIGENOMIQUE

L'épigénome se définit par l'ensemble des processus capable de moduler de façon dynamique et réversible, le niveau d'expression des gènes [154, 155]. D'un point de vue analytique, le développement de techniques appropriées est très récent.

Le séquençage du génome humain étant achevé (2003), on s'est aperçu que les gènes n'étaient pas les seuls responsables des variations de niveau d'expression et que ces variations n'étaient pas uniquement dues à des mutations sur la séquence d'ADN, mais à un système moléculaire de régulation génique. Ce système « épigénétique » de régulation complexe est fondé sur des mécanismes moléculaires capables d'agir à différents niveaux pour réguler la capacité transcriptionnelle des gènes.

☞ Cette régulation peut se faire au niveau de l'adhésion des protéines (facteur de transcription) dans les régions promotrices des gènes par méthylation des îlots CpG. Elle peut aussi se faire par modification de la conformation de la chromatine (eu. ou hétérochromatine), par acétylation et méthylation des histones. Elle peut aussi se faire niveau post-transcriptionnel, par l'action de petites séquences d'ARN non codants qui sont capables d'interagir sur la capacité de traduction des ARN messagers (codants).

La méthylation de l'ADN est une composante essentielle car elle intervient au plus près des gènes (c'est aussi le mode d'action le plus étudié). La méthylation des gènes peut être étudiée selon deux méthodes analytiques (dosage du taux de méthylation global de l'ADN ou séquençage nucléotidiques méthylées pour identifier précisément l'état transcriptionnel des gènes après traitement de l'ADN au bisulfite). Il existe plusieurs techniques de dosage du taux de méthylation ou d'hydroxyméthylation global de l'ADN (5-mC, 5-hmC). Ce dosage peut être réalisé par couplage d'une chromatographie à une spectrométrie de masse ou comme dans cette étude, par immunofluorescence. Dans cette dernière, la mesure relative de fluorescence est directement proportionnelle au taux de méthylation de l'ADN analysé par spectrofluorimétrie.

Les profils d'expression des micro-ARNs peuvent aussi être étudiés par séquençage (RNAseq) ou par PCR en temps réel (qPCR). Cette dernière consiste à réaliser la mesure relative d'expression des différents micro-ARNs présents dans un milieu biologique à un instant donné. Dans le cadre de cette étude, la technique de réaction en chaîne par polymérase ou « Polymerase Chain Reaction » (PCR) en temps réel, a été mise en œuvre à partir de deux jeux de plaques de 384 puits (par échantillon analysé) dans lesquels sont fixés dans chacune d'entre elles 380 amorces PCR de micro-ARNs (plus des contrôles).

☞ Cette technique a été inventée en 1985 par Kary Mullis (Prix Nobel 1993). Elle est basée sur l'utilisation de sondes (ou amorces) qui offre l'avantage d'obtenir très rapidement par réverse transcription (RT), un nombre exponentiel de copies d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) produit à partir des séquences d'ARN contenues dans l'échantillon biologique. Le principe de la qPCR est basé sur la détection en temps réel par émission de fluorescence de l'extension d'une unique molécule d'ADNc complémentaire de la sonde. Cette augmentation exponentielle est mesurée au niveau de chaque puits et est proportionnelle à la quantité initiale d'ARN analysée.

☞ Les plaques 384 puits TaqMan Low Density Array (TLDA) sont un système de conception microfluidique à moyen débit basé sur la réaction chimique de qPCR dont les sondes complémentaires (séchées) des micro-ARNs analysés sont réparties au fond des puits.

5.4. ANALYSE « MULTIOMIQUE »

Face à la complexité mécanistique du vivant la réalisation d'approches intégratives multiéchelles fondées sur l'exploitation des résultats « omiques » devient incontournable si l'on souhaite pouvoir donner un sens biologique à l'observation d'évènements multiples et dynamiques de faibles amplitudes.

Pour formuler des hypothèses relationnelles, capables d'expliquer ces phénomènes biologiques dont les cinétiques temporelles d'évolution sont différentes [6, 156] et prédire d'éventuels effets délétères [118], l'analyse passe nécessairement par une phase d'observation suivie d'une phase de compréhension des mécanismes biologiques.

Cette approche multiparamétrique est aussi multidisciplinaire car l'intégration temporelle d'analytes issus de différentes « omiques » nécessite de faire appel aux mathématiques, à la bioinformatique, à la médecine, à la toxicologie, à l'épidémiologie, à la physiologie etc., pour pouvoir décrire et estimer l'impact des stressseurs environnementaux à l'échelle d'un système biologique ou d'une population [111].

Cette approche plus connue sous le nom de « biologie des systèmes » est dès à présent, utilisée en clinique dans l'étude de certaines maladies [157, 158].

6. L'URANIUM

L'uranium est un métal lourd radioactif présent à plus ou moins forte concentration dans la croûte terrestre. Il est exploité pour ses propriétés énergétiques [159, 160].

L'uranium a été découvert en 1789 par le chimiste allemand Martin Heinrich Klaproth mais ses propriétés radioactives n'ont été mises en évidence qu'en 1896 par le physicien français Henri Becquerel.

☞ Cette découverte a été faite par hasard. H. Becquerel avait rangé son flacon uranium avec des plaques photographiques dans le même tiroir durant plusieurs jours. Il découvrit que ses plaques avaient été exposées par autre chose que la lumière (**Figure 20**).

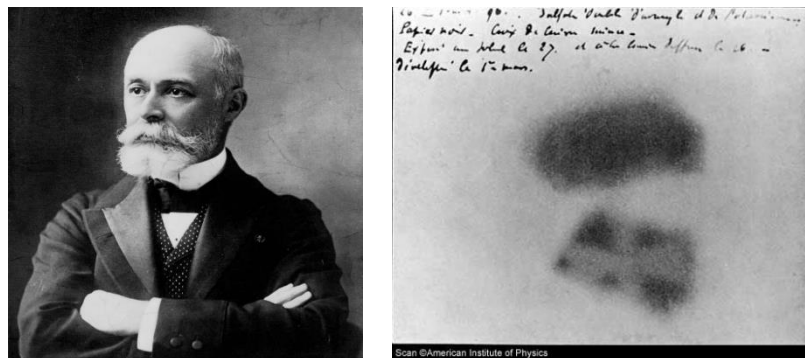


Figure 20 : découverte fortuite de la radioactivité en 1896 par Henri Becquerel à partir d'uranium

D'un point de vue géologique, les massifs granitiques sont beaucoup plus riches en uranium que les bassins sédimentaires et que les formations calcaires (~5 mg.Kg-1 contre ~0.5 mg.Kg-1 et ~1 mg.Kg-1). Les gisements uranifères ont des teneurs en uranium encore plus fortes (~10000 mg.Kg-1) et représentent une des principales sources de dispersion environnementale.

☞ En Europe, la concentration médiane des sols est estimée à 2 mg.kg-1 (source IRSN : Fiche environnement de l'uranium naturel). Dans les eaux souterraines, elle est comprise entre 0.1 et 3300 μ .L⁻¹.

Les teneurs en uranium des autres compartiments environnementaux (air, eau de surface, eaux souterraines, animaux et végétaux) sont étroitement liées aux formations géologiques locales mais aussi à l'exploitation anthropique qui en est faite.

☞ Différentes activités anthropiques telles que le cycle nucléaire du combustible, l'utilisation d'armes blindées à l'uranium appauvri, l'utilisation du charbon pour ses propriétés énergétiques (pollution atmosphérique) et l'épandage agricole d'engrais phosphatés (~1 mg/m² pour une utilisation de 100 kg d'engrais par hectare par an (source CEA : L'essentiel sur... L'uranium) sont responsables de la dispersion d'uranium dans la biosphère.

L'uranium possède plusieurs radio-isotopes naturels dont les principaux sont l'uranium-234 (²³⁴U), 235 (²³⁵U) et 238 (²³⁸U). À l'état naturel l'uranium-238 représente 99,275% de la masse du minerai extrait contre 0.719% pour l'isotope 235 et 0.0057% pour le 234.

L'uranium-235 étant le plus énergétique, son raffinage est destiné aux industries électronucléaires et militaires.

☞ À partir de la forme naturelle de l'uranium, des formes enrichies de 3 à 90% en ²³⁵U et un résidu appauvri contenant environ 0.25% d'²³⁵U sont produites.

Son niveau de mobilité dans les sols dépend essentiellement de son niveau d'oxydation et des complexes qu'il peut former avec la matière organique.

☞ *L'uranium est très mobile lorsqu'il se trouve sous la forme soluble d'ion uranyle (UO_2^{2+}).*

☞ *L'uranium peut facilement se complexer aux carbonates et sulfates avec lesquels il crée des zones d'accumulation dans les sols.*

L'ion uranyle est soluble dans les eaux de surface. On peut le retrouver sous forme hydroxylée pour des pH supérieurs à 6 et carbonaté au-delà de 8. Il peut aussi se lier à des molécules organiques.

☞ *En milieu biologique, l'uranium se trouve sous forme d'ion uranyle (très soluble dans l'eau). Dans les végétaux, sa teneur (provenant du transfert racinaire) est étroitement liée à la nature des plantes et des teneurs en phosphates, sulfates, carbonates et matières organiques des sols. Chez les animaux, on mesure aussi de l'uranium (d'origine végétale) dans la viande et les produits laitiers. Chez l'homme, l'absorption quotidienne par ingestion est estimée entre 1 et 4 $\mu\text{g}\cdot\text{j}^{-1}$ (le corps humain en contenant environ 90 μg d'uranium).*

6.1. TOXICITE DE L'URANIUM

L'uranium est un métal lourd de numéro atomique 92. Il fait partie de la famille des actinides (selon la classification périodique des éléments) et possède une double toxicité [160, 161].

6.1.1. L'URANIUM EST RADIOACTIF

Tous les isotopes de l'uranium sont radioactifs et leurs descendants le sont aussi.

☞ *L'atome d'uranium est instable et se désintègre en émettant principalement des particules alpha (hélium 4) dont le pouvoir pénétrant dans la matière est très faible (27.9 μm dans l'eau) mais dont le dépôt énergétique est très important et fortement ionisant (4.267 MeV). Sa période radioactive est extrêmement longue ($2.5 \cdot 10^5$ à $4.5 \cdot 10^9$ années) ce qui le classe parmi les éléments les plus radiotoxiques en cas d'exposition interne à l'organisme.*

☞ *Ces descendants comportent aussi des émetteurs de particules bêta qui sont beaucoup moins énergétiques mais plus pénétrantes (**Figure 21**).*

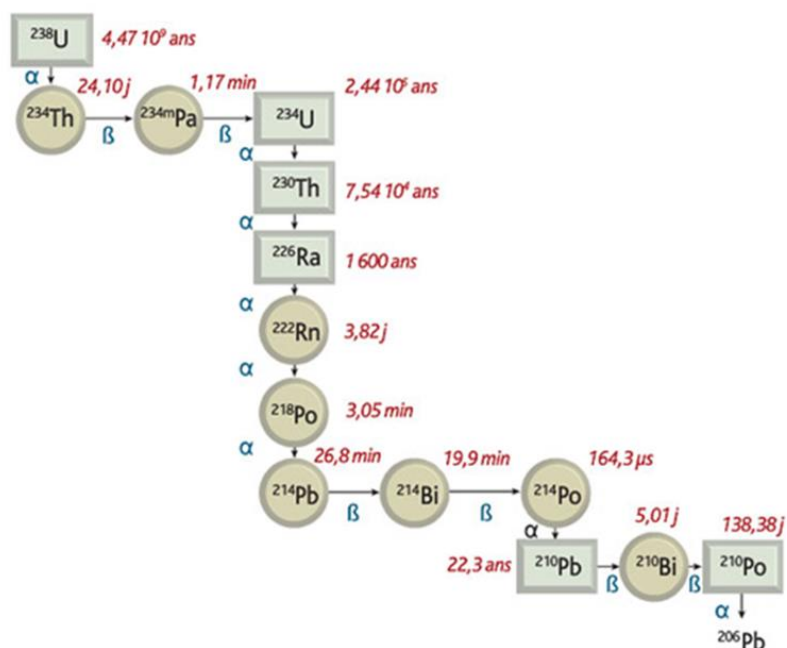


Figure 21 : chaîne de filiation de l'uranium 238 (source IRSN)

6.1.2. L'URANIUM EST UN METAL LOURD

L'uranium est aussi toxique à cause de ses propriétés chimiques car c'est un métal lourd (> $5g.cm^{-3}$) de masse volumique 19 fois supérieure à celle de l'eau.

☞ Si on considère pour la forme appauvrie de l'uranium que la quantité nécessaire pour induire une toxicité radiologique est très supérieure à celle nécessaire pour que la toxicité chimique soit fatale [162], la forme naturelle de l'uranium qui est un peu plus radioactive que l'appauvri présente aussi une toxicité chimique prépondérante.

Lors d'expositions internes, l'uranium adopte un comportement différent selon sa voie de pénétration dans l'organisme et selon sa forme physico-chimique.

☞ Selon la CIPR, la vitesse d'absorption sanguine, lors d'une contamination pulmonaire, est différente selon que l'uranium est sous la forme UF_6 , UO_2F_2 et $UO_2(NO_3)_2$, pour les plus solubles > UO_3 , UF_4 et UCl_4 > UO_2 et U_3O_8 , pour les moins solubles.

☞ En cas d'ingestion, seulement 2% de la quantité d'uranium ingérée par l'homme (0.2% chez le rat) est susceptible de traverser la barrière intestinale et passer dans la circulation sanguine [163] et seulement 0.2% pour les composés peu solubles selon la CIPR (la plus grande partie de l'uranium ingéré (~98 %) étant directement éliminée dans les fèces en 3 à 4 jours sans passer dans la voie systémique). Chez le nouveau-né (0-1 an), le taux d'absorption intestinal est vingt à cent fois supérieur à celui de l'adulte et deux fois supérieur à celui du jeune enfant. La dose létale 50 (DL50) par gavage est estimée à 204 mg/kg chez le rat [164].

Une fois passé dans la circulation sanguine, l'uranium est très rapidement distribué vers les différents tissus biologiques avant d'être excrété par l'urine.

☞ ~60 % de la quantité incorporée est excrétée en 24 heures, le reste pouvant être excrété en plus de 360 jours. Des études ont montré que le taux d'excrétion de l'uranium est chez le mâle, supérieur à celui mesuré chez la femelle.

☞ Dans l'organisme, l'uranium sera principalement retenu au niveau des os (10 à 36 %) et des reins (10 à 25 %). Il sera aussi retenu par d'autres tissus tels que le cerveau (0.2 à 0.6%) les testicules (1.3 à 3.3%) ganglions lymphatiques (0.8 à 2.1%) mais à des teneurs moindres.

L'os et le rein sont les principaux organes cibles de la toxicité de l'uranium. L'uranium reste présent dans l'organisme au-delà de 360 jours. Durant cette période, il exprimera sa cytotoxicité [165] (**Figure 22**).

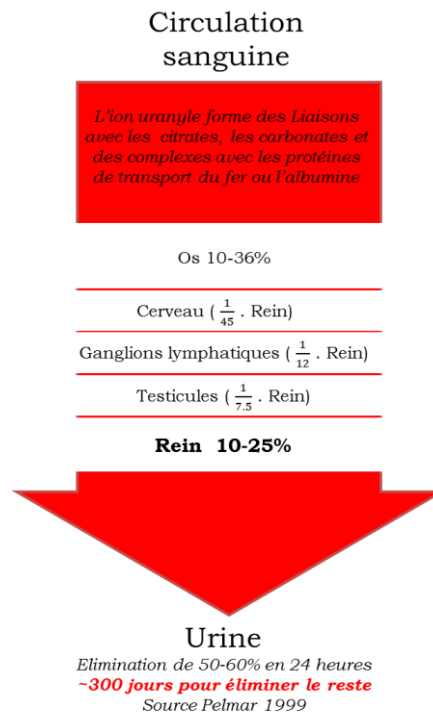


Figure 22 : biodistribution de l'uranium

Une partie de l'uranium sera retenu et s'accumulera au niveau des cellules tubulaires proximales du néphron des reins (segment S3), où la plus grande part de sa toxicité sera exprimée [166] (**Figure 23**).

☞ Suite à une contamination à l'uranium, une perte cellulaire peut-être observée dès le 8^{ème} jour, suivie d'une régénération tubulaire observable au 15^{ème} jour. Néanmoins, la concentration en uranium reste élevée au niveau du segment S3.

En milieu biologique, l'uranium se trouve sous forme d'ion uranyle (UO_2^{2+}). Cet ion est capable d'interagir au niveau de la liaison de certaines protéines (enzymes) avec leurs cofacteurs métalliques que sont le zinc (Zn^{2+}) et le calcium (Ca^{2+}). Cette liaison inhibe leur activité fonctionnelle [167, 168].

☞ Une altération (dépendante du temps et de la dose d'uranium) de l'expression génique de l'ostéopontine (facteur de régulation de la minéralisation osseuse) a pu être observée en présence d'ion uranyle sur deux lignées de cellules rénales [169]. L'ostéopontine est elle-même capable de se lier avec l'ion uranyle [170, 171].

Pour la forme naturelle de l'uranium, cette toxicité est surtout d'origine chimique mais elle a cependant une petite composante radioactive liée à l'émission des particules alpha ($2.6 \cdot 10^4 \text{ Bq.g}^{-1}$) dont le pouvoir pénétrant dans l'eau est de $27\mu\text{m}$ ($10 \mu\text{m}$ couvre environ 250 tubules rénaux).

☞ *Le seuil de toxicité chimique de l'uranium au rein est estimé à $3 \mu\text{g.g}^{-1}$ de rein (CIPR 1959). Cependant, une revue bibliographique réalisée en 2004 par I. Dublineau (data non publiée) montre que selon la cible biologique considérée, ce seuil de toxicité peut être bien en deçà de celui fixé par la CIPR. Parmi les études répertoriées, des observations de nécroses cellulaires ont été observées pour des concentrations d'uranium dans les reins situées entre 0.7 et $1.4 \mu\text{g.g}^{-1}$ [172].*

L'uranium affecte la fonction glomérulaire et tubulaire du rein en provoquant des lésions membranaires et de la mort cellulaire [31, 173-176]. On observe aussi des modifications morphologiques de la structure glomérulaire du rein, ainsi que des anomalies fonctionnelles des phénomènes de réabsorption avec une augmentation de l'excrétion du glucose, des acides aminés, des protéines (bêta microglobulines) et du débit de filtration glomérulaire.

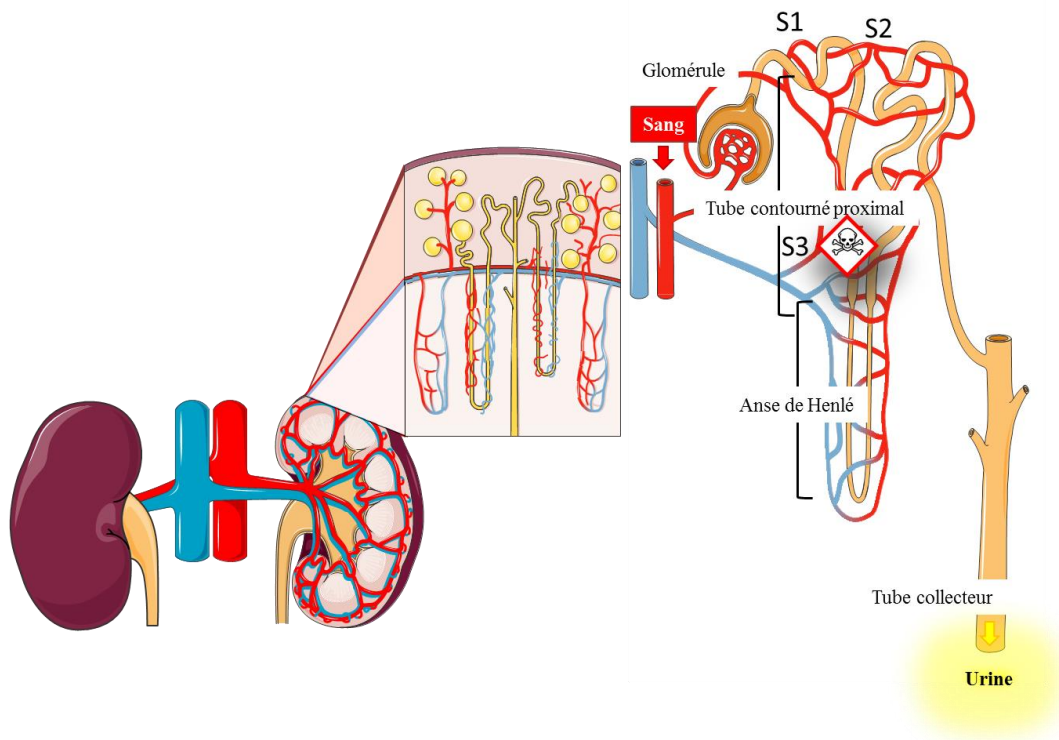


Figure 23 : rétention de l'uranium au niveau des cellules épithéliales du segment S3 du tube contourné proximal du néphron

Pour résumer : la toxicité de l'uranium dépend de sa voie d'entrée (transcutanée en cas de blessure, inhalation et ingestion), de sa forme physico-chimique (les formes les plus solubles étant les plus toxiques : $(\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} > \text{UO}_2\text{F}_2 > \text{Na}_2\text{U}_2\text{O}_7 > \text{UO}_4 > \text{UO}_3 > \text{UCl}_4 > \text{U}_3\text{O}_8 > \text{UF}_4 > \text{UO}_2)$, de son niveau d'enrichissement (uranium enrichi > uranium naturel > uranium appauvri) de l'espèce (lapin < souris-rat < hamster < chien < babouin < humain [177]), de l'âge [178], du sexe [179]. Les particules alpha entraînent l'apparition de cassures double-brin au niveau de la molécule d'ADN [180] mais aussi du stress oxydatif [181]. Elle dépend aussi la quantité d'uranium présent dans les reins, et du temps d'exposition [159, 182, 183].

6.2. FAIBLES DOSES D'URANIUM

À doses non néphrotoxique d'uranium, des études menées chez le rat ont montré que l'ingestion d'uranium pouvait avoir des effets sur différents systèmes biologiques tels que le système nerveux central [184, 185], le système reproducteur [186], le remodelage osseux [187] mais aussi sur certains métabolismes comme le métabolisme du cholestérol, des hormones stéroïdiennes, de la vitamine D, des xénobiotiques, du fer, de l'acétylcholine et osseux [159, 188].

☞ *Hormis quelques rares observations associées à des systèmes physiologiques (remodelage osseux et rythmes veille/sommeil), la grande majorité des effets observés dans cette gamme de doses sont essentiellement observables au niveau des systèmes de régulations géniques et métaboliques.*

Cependant, si aucun signe de toxicité n'a pu être décelé chez le rat contaminé à ces niveaux de doses d'uranium, la question du risque d'exposition chronique à faible dose d'uranium demeure car toutes les situations d'exposition n'ont à ce stade de la connaissance scientifique, pas encore été étudiées.

Plus récemment, une étude réalisée par approche « omique » a montré que l'uranium était capable de modifier significativement le métabolome urinaire des rats exposés à une dose non toxique [137].

☞ *Dans cette étude, l'observation d'un déséquilibre métabolique a été caractérisé par l'observation d'une signature métabolique urinaire différente chez des rats ayant été contaminés pendant 9 mois par ingestion d'eau de boisson additionnée d'une solution de nitrate d'uranyle (40 mg/L, soit 2µg absorbé par les rats par jour). Parmi les 1376 substances organiques détectées dans les urines de ces rats, 95 étaient capables d'identifier les animaux exposés des animaux non exposés.*

Ces premiers résultats, obtenus par une approche expérimentale de très grande sensibilité analytique, viennent compléter les autres résultats expérimentaux et montrent qu'en dehors de tous signes de toxicité, une exposition chronique à faible dose d'uranium susceptible d'avoir des répercussions sur différentes fonctions métaboliques.

☞ *Précédemment testée dans le cadre d'un protocole de contamination par le césium-137 à dose environnementale (radionucléide prépondérant dans l'environnement en situation post-accidentelle) [15], ces nouveaux résultats obtenus après exposition à l'uranium valident la « preuve de principe » que la métabolomique est pertinente dans le domaine de la radiotoxicologie appliquée à l'étude des effets de la chronicité des expositions à faibles doses [189, 190].*

Parmi l'ensemble des sources environnementales d'exposition des populations, l'uranium est un composé chimique et radioactif dont la toxicité est relativement bien connue à forte dose. A faibles doses d'expositions, ses effets sur la santé, sont beaucoup plus ambigus car si elles ne révèlent *a priori* pas de toxicité apparente, un certain nombre d'études montrent que l'uranium est toutefois capable d'agir sur différentes voies métaboliques, elles-mêmes impliquées dans différents processus et systèmes physiologiques majeurs.

En conclusion, dans un contexte plus général lié à l'évaluation des effets sanitaires des expositions à faibles doses, il s'avère à ce stade de la connaissance scientifique nécessaire de réaliser des études complémentaires en s'intéressant à l'ensemble des situations d'expositions environnementales, en tenant compte des facteurs biologiques susceptibles d'avoir une influence sur la qualité de la réponse biologique d'un organisme vivant (mode d'exposition, sexe, espèce, période développementale d'exposition, effets générationnels).

OBJECTIFS

Dans un contexte d'inquiétude sociétale, au sujet des risques des expositions environnementales pour la santé des populations vivant à proximité des sites d'exploitation électronucléaire et militaire, la question des conséquences biologiques des expositions chroniques par de faibles doses de radionucléides dont l'uranium se pose, d'autant plus qu'elle est essentielle à la définition même des normes et des politiques de santé.

☞ *Sur ce sujet, un grand nombre de questions persistent telles que celles des limites de doses admissibles pour assurer la protection des populations.*

Située en amont des futures évolutions réglementaires, l'expertise doit pouvoir s'appuyer sur des données scientifiques fiables pour formuler ses recommandations. Seulement, au sujet des effets des expositions chroniques à faibles doses, certaines questions sont toujours en suspens, soit parce qu'elles n'étaient jusqu'à lors pas considérées (pour des raisons sociales, culturelles, économique ou inintéressantes), soit parce que l'état des connaissances scientifiques et des capacités technologiques étaient insuffisantes pour pouvoir les aborder.

Pour rendre un avis fiable, l'expertise doit tenir compte des différentes situations d'expositions, en s'intéressant à différents paramètres tels que les cibles biologiques des expositions, les sensibilités individuelles et interindividuelles (liées aux dimorphismes génétiques, à l'âge ou au stade développemental de l'exposition, à une prédisposition pathologique mais aussi aux effets cumulatifs ou synergiques des co-expositions).

Se pose aussi dans ce contexte, la question des effets sur les futures générations qui peuvent être exposées soit directement à différents stades développementaux (expositions multigénérationnelles), soit indirectement par l'intermédiaire d'un mécanisme de transmission épigénétique véhiculé par les cellules sexuelles (transmission transgénérationnel).

Parmi l'ensemble des questions soulevées par ce sujet, les travaux de cette thèse tenteront d'aborder expérimentalement quelques-unes de ces grandes questions, pour fournir des informations et réponses scientifiques sur les effets des expositions chroniques à faibles doses d'uranium.

Le premier objectif expérimental visé s'intéresse à rechercher au niveau du métabolome d'un modèle vivant exposé à l'uranium, la limite de sensibilité biologique observable et d'identifier les principales perturbations métaboliques.

☞ *Cette première question, est abordée dans le premier article de cette thèse. Il s'intéresse à rechercher dans le cadre d'une étude dose-effet/temps-effet, des seuils ou limites d'effets biologiques observables d'une exposition chronique à faible dose d'uranium. À partir des résultats obtenus par analyse des urines de rat, il s'agira d'identifier les voies métaboliques les plus sensibles à l'exposition par la mesure de déséquilibres métaboliques qui pourraient eux-mêmes être des indicateurs reflétant la sensibilité rénale (cible biologique de la toxicité de l'uranium).*

La seconde question s'intéresse à l'impact du sexe des animaux dans la qualité de la réponse biologique. La troisième se s'intéresse à l'analyse des modifications d'activité génique et la quatrième, à l'analyse des modifications de régulation épigénétiques observables au niveau du rein des animaux exposés.

☞ Ces différentes questions seront abordées dans le second article de cette thèse. Basée sur les résultats obtenus dans la réponse à la première question (article I), la recherche d'effets biologiques spécifiques du sexe des animaux contaminés se fera principalement au niveau du métabolome, à partir de trois matrices biologiques d'intérêt (sang, urine et tissu rénal). Pour compléter cette étude, des effets moléculaires précurseurs du déterminisme métabolomique seront recherchés au niveau génique et épigénétique par l'analyse des niveaux d'expression relatifs des ARN messagers et des micro-ARNs. Finalement, une approche analytique multiomique des systèmes biologiques sera réalisée à l'échelle de l'épigénome, du transcriptome et du métabolome (dernier niveau des systèmes de régulation métaboliques et socle du déterminisme phénotypique) pour fournir une vision intégrée des principales modifications systémiques engagées par l'exposition chronique à l'uranium.

La dernière et cinquième question s'intéresse finalement à l'impact de l'uranium sur les générations futures ?

☞ A ce stade des connaissances, cette question trouve tout son sens d'un point de vue scientifique mais aussi sociétal. Le troisième article de cette thèse s'intéressera à rechercher dans l'ADN des reins, la signature épigénétique (niveau de méthylation de l'ADN) d'une exposition multigénérationnelle à l'uranium tout en s'intéressant au dimorphisme sexuel des animaux.

☞ Cette dernière question scientifique, dont une grande partie des résultats est en cours d'analyse (présentés en annexes), fera l'objet d'un futur quatrième article. Cette dernière présentera une vision de l'évolution multigénérationnelle des effets métaboliques et géniques associés à l'uranium par la mise en œuvre d'une approche intégrative « multiomique » d'analyse des systèmes biologiques.

1. STRATEGIE D'ETUDE EXPERIMENTALE

Contrairement aux problématiques cliniques qui par nécessités curatives, se focalisent principalement sur l'observation de phénotypes pathologiques pour fournir des explications scientifiques et des marqueurs descriptifs d'état biologique dégradé, la problématique des faibles doses est quant à elle confrontée à l'absence de nocivité clairement établie et attribuable à des expositions environnementales.

Cet état de fait cantonne la recherche à tenter d'établir des relations prédictives de nocivités ou de risques de toxicité tardives à partir de mesure de signaux biologiques dont l'amplitude des fluctuations, est dans la gamme homéostatique. Face à la complexité du vivant, donner un sens biologique à des signaux moléculaires dont le niveau des fluctuations est faible, nécessite pour décrypter les ajustements et déséquilibres associés à des expositions, dans toutes leurs subtilités, de réaliser des études expérimentales complexes.

L'aspect multiparamétrique des effets biologiques observés dans le domaine des faibles doses, et l'absence de signes cliniques ne permet pas d'être restrictif dans le choix des cibles biologiques à considérer (au risque de ne rien voir) mais invite à explorer cette réponse biologique dans son ensemble par des approches analytiques à hauts débits. Seule une observation intégrée de l'ensemble de fluctuations peut permettre d'une part, d'apprécier les subtilités des fluctuations biologiques mais aussi d'identifier des marqueurs descriptifs des expositions.

☞ *Ces mêmes marqueurs pouvant être les signes précoces d'une sensibilité ou être prédictifs d'un risque de toxicité tardive (marqueurs précoces d'atteintes ou d'effets cliniques).*

La démarche expérimentale mise en œuvre dans ces travaux commence par la réalisation d'un bilan clinique sur les modèles expérimentaux.

☞ *Ce bilan est nécessaire pour s'assurer d'un statut sanitaire satisfaisant des animaux étudiés (statut sanitaire sain et homogène des animaux issus des différents groupes expérimentaux).*

☞ *L'absence de signes cliniques notables associés au protocole d'exposition confirme l'absence de toxicité. Elle confirme aussi que le niveau d'exposition des animaux traités se situe bien dans la gamme des faibles doses. Cette absence d'effets cliniques est conforme à ce qui a déjà pu être observé expérimentalement dans le cadre des expositions environnementales chroniques à faibles doses de radionucléides.*

La démarche suivante consiste à élaborer des stratégies analytiques à haut débit, pour collecter le maximum d'information biologique et tenter de mettre en évidence les modifications subtiles du bruit de fond homéostatique.

☞ *Ces variations de concentrations moléculaires peuvent être enregistrées à différents niveaux de l'échelle des systèmes de régulation biologiques et pourraient être des facteurs d'intérêt, susceptibles d'être les précurseurs d'effets cliniques tardifs, voire de maladies.*

Le premier niveau moléculaire d'observation se situe au niveau du métabolome. L'analyse exhaustive des quantités relatives de métabolites présents dans un milieu biologique à un instant donné fournit un profil moléculaire étroitement lié au phénotype individuel (cette approche est présentée dans le premier article).

Ces données pourront être ensuite enrichies par l'analyse des niveaux organisationnels inférieurs, que sont les systèmes de régulation et d'expression génique.

☞ *Ces niveaux inférieurs (sensibles et réactifs aux expositions environnementales) ont un déterminisme phénotypique incertain mais peuvent néanmoins être de très bons indicateurs d'exposition voire des sentinelles de risque d'effets tardifs. Ces indicateurs peuvent constituer un « vivier » capables de fournir des marqueurs biologiques d'exposition/d'effet biologiques tardifs sensibles et spécifiques.*

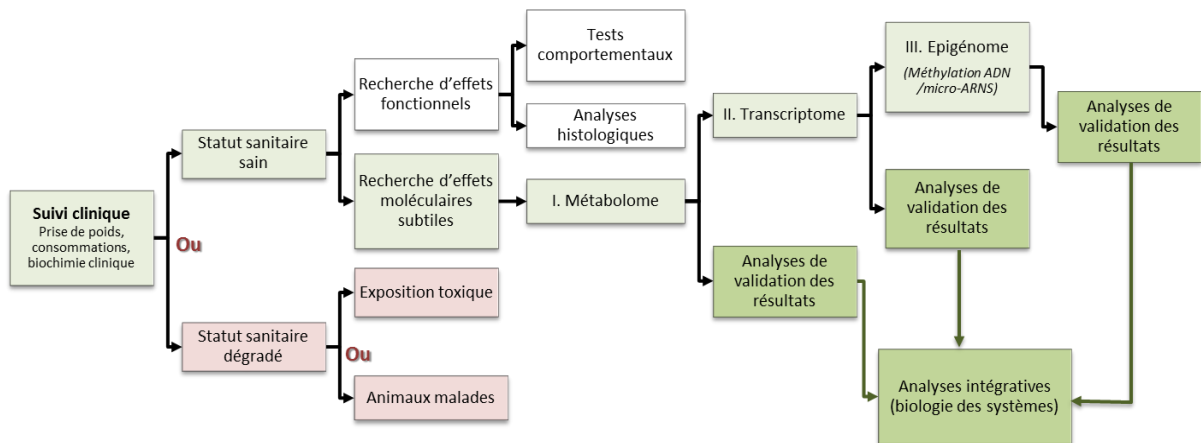


Figure 24 : proposition de stratégie expérimentale d'une étude basée sur les effets biologiques des faibles doses

Sur la base des observations réalisées à partir de l'ensemble des résultats collectés aux différents niveaux moléculaires (génomique, transcriptomique et métabolomique), des hypothèses mécanistiques d'effets biologiques (précoces ou tardifs) pourront être formulées. Ces effets pouvant être susceptibles d'induire des dysfonctionnements métaboliques, peuvent aussi être les initiateurs de maladies métaboliques ou de troubles physiologiques tardifs qui, dans certaines conditions, pourraient être transmis ou avoir une incidence sur les générations futures par le biais des mécanismes de régulation épigénétiques (ces différentes approches sont abordées dans les deuxièmes et troisièmes articles).

☞ Ces hypothèses sont essentiellement formulées à partir d'analyses à haut débit de type « omiques ». Elles pourront ensuite être confirmées et validées par des études mécanistiques ciblées réalisées à partir de modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro*.

A ce stade de la connaissance scientifique, il apparaît aussi nécessaire d'étudier l'incidence de telles expositions sur les générations suivantes. A partir d'un modèle d'exposition multigénérationnelle (décrit plus bas), l'emploi des techniques analytiques à haut débit que sont la métabolomique, la transcriptomique, et l'épigénomique permettra de fournir une « lecture » exhaustive des différents niveaux de fluctuations moléculaires impactés par l'exposition (ces résultats seront abordés dans un futur quatrième article).

Parallèlement à ces travaux de thèse, des études fonctionnelles pourront être mises en œuvre pour associer d'éventuels effets biologiques ou fonctionnels à l'observation des déséquilibres moléculaires et d'« empreintes » épigénétiques transmissibles. Ces recherches seront abordées par la mise en œuvre de tests ciblés sur les systèmes physiologiques connus pour être les plus sensibles aux expositions environnementales.

À ces fins, une étude s'attachera au système nerveux central en se focalisant principalement sur les fonctions comportementales et cognitives.

☞ Cette étude testera différents paramètres tels que l'activité locomotrice, la mémoire, l'anxiété et la dépression, mais aussi à la recherche de marques épigénétique et métaboliques dans le tissu cérébral.

Une autre étude, s'intéressera au système reproducteur mâle, connue pour être affecté par certaines conditions d'exposition environnementales.

☞ Cette étude s'attachera à l'étude de l'indice reproductif, aux niveaux d'hormones sexuelles gonadiques, à l'histologie testiculaire, aux paramètres spermatiques, au métabolisme des stéroïdes, à l'expression génique/épigénétique et activité protéique ainsi qu'au niveau méthylation global gonadique.

Les travaux de cette thèse, se sont préférentiellement focalisés sur les effets biologiques de l'uranium sur le rein, principale cible biologique de la toxicité de l'uranium.

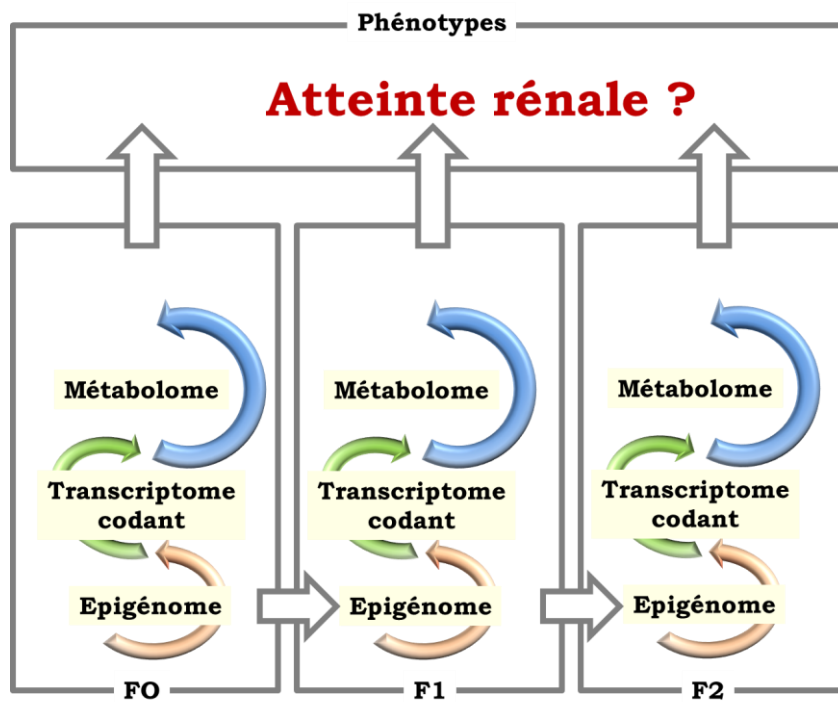


Figure 25 : stratégie analytique d'étude d'une exposition multigénérationnelle à l'uranium

2. MODELES EXPERIMENTAUX

2.1. MODELE I : EFFET-DOSE / EFFET-TEMPS.

Dans la continuité des travaux scientifiques réalisés sur les effets biologiques d'une contamination chronique à faible dose d'uranium par approche métabolomique [137] et pour répondre aux différentes questions citées ci-dessus, la démarche scientifique et méthodologique mise en œuvre dans ces travaux a nécessité de réaliser deux modèles *in vivo* d'exposition chronique.

Dans le cas des faibles doses, de nombreuses études ont montré que la relation dose-effet n'était pas une relation linéaire sans seuil mais plus une relation non linéaire qui présente des seuils d'apparition d'effets biologiques. Dans ces travaux, le premier modèle d'exposition a été mis au point pour rechercher la limite inférieure de dose d'uranium permettant de mesurer un effet biologique à court moyen et long terme (limite de sensibilité biologique ou de technique analytique) pour suivre l'évolution des paramètres métaboliques mesurés en fonction de la dose et du temps de contamination (premier article).

Partant d'une étude princeps [137] dont le protocole de contamination chronique utilisait une solution hydrique à la concentration égale à 40 mg.L⁻¹ d'uranium (dose non néphrotoxique), ce nouveau protocole permettra d'exposer des rats à divers à différentes doses selon une gamme décroissante.

☞ *Les différents groupes expérimentaux ont été contaminés pour des durées de contamination variant de 3, 6 et 9 mois par des solutions hydriques de nitrate d'uranyle variant de 40 à 0.015 mg/L (échelle située entre un niveau non toxique et un niveau deux fois inférieur à la limite de potabilité de l'eau de boisson dictée par la recommandation OMS-2011 en vigueur [191]).*

Pour maximiser l'impact biologique de cette contamination et potentialiser l'apparition d'effets métaboliques, les animaux seront contaminés dès le plus jeune âge (période néonatale) qui est une période particulièrement sensible aux agents toxiques [192].

Des collectes d'urine seront réalisées aux différents temps de mesures (3, 6 et 9 mois) et au terme du protocole de contamination, les animaux seront sacrifiés. Le sang et les principaux organes seront prélevés et pesés avant d'être échantillonnés et stockés à -80°C.

Cette étude se focalisera principalement sur l'analyse métabolomique des urines (produite par le rein (produits terminaux du métabolisme)).

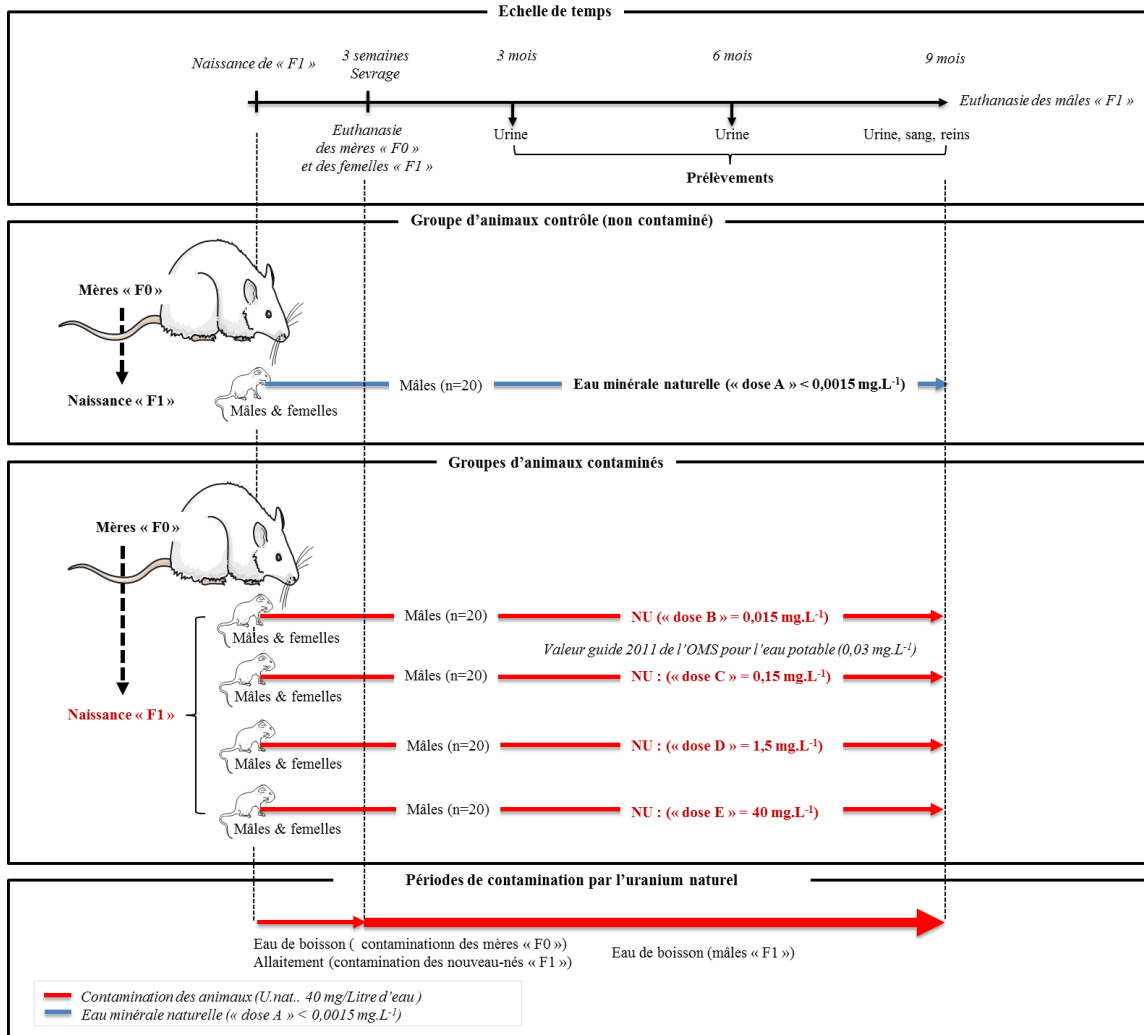


Figure 26 : protocole de contamination effet-dose / effet- temps (i.e. échelle de temps, groupe d'animaux contrôlés et groupes d'animaux contaminés, périodes de contamination par l'uranium naturel)

2.2. MODELE II : EFFETS D'UNE EXPOSITION MULTIGENERATIONNELLE.

Le deuxième protocole *in vivo* mis au point est un modèle d'exposition multigénérationnelle de rongeurs qui a été élaboré pour être à la fois suffisamment simple et pour répondre à la question des effets biologiques d'une contamination chronique multigénérationnelle par ingestion de faibles doses d'uranium tout en tenant compte des différences de sensibilité sexuelles des individus exposés (articles 2 et 3).

Bien que ce modèle ait été élaboré sur la base d'une situation d'exposition majorante par rapport à une situation réelle, il tente néanmoins de mimer une situation environnementale d'exposition d'une population vivant sur un territoire où l'eau de boisson dépasserait significativement le niveau de concentration admissible pour l'eau potable (recommandation OMS-2011 égale à 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'homme). Pour être représentatif d'une population normale, ce modèle est constitué d'individus des deux sexes, exposés à différents âges et à différents stades développementaux.

Dans ce protocole de contamination, la première génération (F0) est contaminée dès le premier instant de la vie terrestre (c'est-à-dire au moment de la naissance pour ne pas impacter les premiers stades développementaux qui sont des périodes cruciales au niveau des processus de programmation épigénétique de l'ADN embryonnaire).

☞ *Les gamètes parentaux ont aussi été exempts de toute forme d'exposition puisque que cette première génération a été produite à partir de femelles gestantes non contaminées.*

Par contre, pour majorer l'impact de l'exposition, les individus (mâle et femelle) de cette génération (F0) sont contaminés dès le stade néonatal (sachant qu'une population juvénile est plus vulnérable qu'une population adulte).

Née dans un environnement contaminé, une seconde génération (F1) sera produite à partir de cette première génération F0 (contaminée). Pour cette seconde génération (F1), l'exposition directe à l'uranium cessera au moment du sevrage (seule la partie d'uranium incorporée pouvant continuer à exprimer des effets biologiques).

☞ *Cette seconde génération d'animaux nés de parents contaminés, est susceptible d'être affectée par l'exposition des gamètes parentaux (dont les processus de reprogrammation épigénétique ont pu être affectés) mais aussi par exposition intra-utérine (durant laquelle des processus de programmation épigénétique de l'ADN embryonnaire peuvent survenir). L'exposition néonatale et le risque d'un stress psychologique associé à un comportement maternel dégradé pouvant aussi avoir un effet nocif sur cette dernière génération.*

A partir de la seconde génération (F1), naitront les animaux d'une troisième et dernière génération d'animaux exposés (F2) qui, s'ils n'ont jamais été directement exposés à l'uranium, sont issus des cellules germinales primordiales exposées des parents (F1) qui potentiellement, peuvent transmettre un effet lié à la programmation épigénétique des cellules sexuelles (qui survient durant les stades de maturation et de programmation gonadique) et qui dès la naissance, est susceptible d'affecter les gamètes mâles.

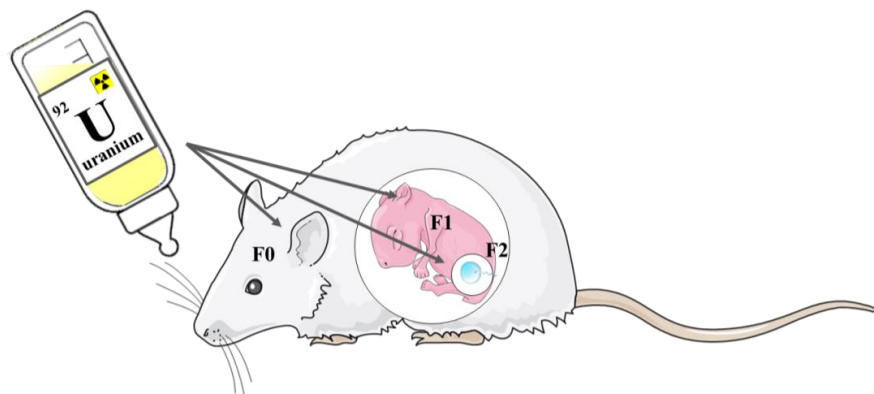


Figure 27 : principe d'une exposition multigénérationnelle à l'uranium sur trois générations successives

☞ Pour chacune des générations, les animaux seront répartis de la manière la plus homogène possible pour former des groupes de rats issus d'un nombre de mères le plus important possible. Cette homogénéisation des populations est nécessaire pour être le plus représentatif d'une population normale (hétérogène) en maximisant la variabilité interindividuelle. Ceci permet de minimiser la consanguinité ainsi que le poids statistique d'une fratrie sur les résultats de l'étude.

☞ Pour ne pas ajouter un autre facteur de variabilité biologique comme celui lié à la gestation des femelles [193, 194] au niveau du métabolisme basal des animaux dans la réponse à l'uranium, aucune analyse moléculaire ne sera réalisée sur les animaux reproducteurs issus de chaque générations. Pour ceci, des groupes distincts destinés aux analyses seront constitués à partir de chaque fratrie.

Pour réaliser un modèle de contamination chronique, il est aussi nécessaire que la période de contamination soit suffisamment longue. Les études réalisées au laboratoire à partir du modèle précédent [195] ont permis d'observer des effets dès 3 mois de contamination mais c'est à partir de 6 mois de contamination que les effets mesurés semblaient être les plus pertinents dans cette gamme de doses d'uranium. Par conséquent, il s'avère raisonnable dans ce protocole, de contaminer les animaux de la première génération « F0 » pendant au moins 6 mois.

☞ Ce temps d'exposition permettra d'accroître la probabilité d'apparition d'effets biologiques avant de les faire se reproduire.

☞ A contrario, ces 6 mois de contamination ont un impact négatif sur le système reproducteur, sachant que le pic de fertilité des rats se situe autour de 8 à 10 semaines.

Outre le risque de voir le rendement d'élevage diminuer, Ce modèle aura néanmoins l'avantage de potentialiser la probabilité d'apparition d'effets biologiques et toxiques associés à l'uranium.

Des prélèvements biologiques, des tests comportementaux et de mobilité spermatique seront effectués entre les temps 6 et 9 mois de contamination et un suivi analytique sera réalisé sur les trois générations, au niveau clinique, métabolomique, transcriptomique et épigénétique pour évaluer l'impact direct d'une contamination chronique à l'uranium sur une population néonatale de rats (mâles et femelles), sur une population exposée durant les stades embryonnaire, fœtale et néonatale et finalement, sur une population dont seuls les cellules germinales parentales étaient exposées.

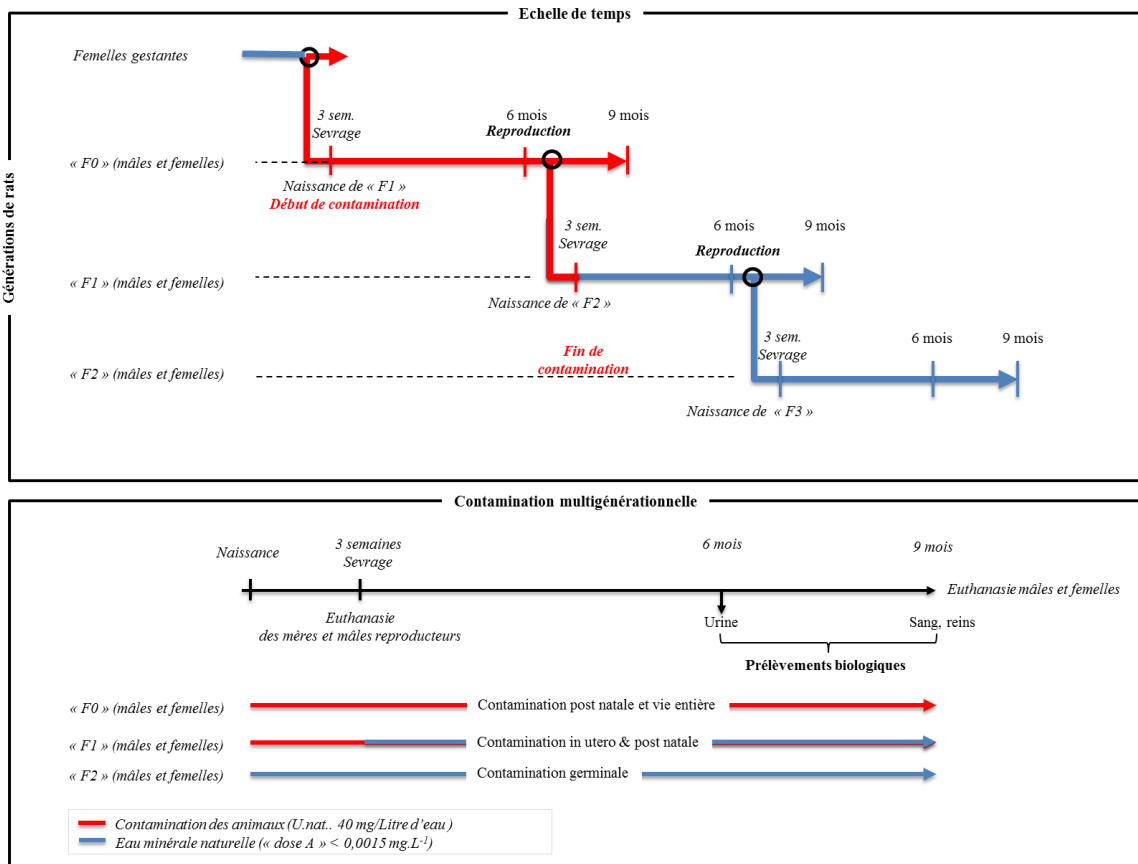


Figure 28 : protocole de contamination multigénérationnelle (i.e. échelle de temps, périodes de contamination par l'uranium naturel)

RESULTATS

LES ARTICLES

Article 1 : « L'analyse métabolomique révèle un effet-dose des expositions chroniques à faible dose d'uranium chez le rat : indentification de marqueurs biologiques potentiels dans les urines »

Article 2 : « Application d'une approche multiéchelle des systèmes biologiques pour étudier l'effet d'une exposition chronique à faible dose d'uranium dans les reins de rat »

Article 3 : « Une faible dose d'uranium induit des effets épigénétiques multigénérationnels chez le rat »

LES ANNEXES

Annexe 1 : « Dimorphisme sexuel d'une exposition à l'uranium »

Annexe 2 : « Résultats : approche multigénérationnelle : impact de l'uranium sur le métabolome de la génération F1 : « les enfants » »

Annexe 3 : « Résultats : approche multigénérationnelle : impact de l'uranium sur le métabolome de la génération F2 : « les petits enfants » »

1. ARTICLE I :

L'analyse métabolomique révèle un effet-dose des expositions chroniques à faible dose d'uranium chez le rat : indentification de marqueurs biologiques potentiels dans les urines

Metabolomics reveals dose effects of low-dose chronic exposure to uranium in rats: identification of candidate biomarkers in urine samples.

Grison, S., Favé, G., Maillot, M., Manens, L., Delissen, O., Blanchardon, E., Dublineau, I., Aigueperse, J., Bohand, S., Martin, J. C., & Souidi, M. 2016. *Metabolomics*, 12(10): 154.

Faute de données scientifiques suffisantes, des interrogations persistent au sujet de l'impact sanitaire des contaminations chroniques à de faibles doses d'uranium sur les populations.

Bien qu'aucune toxicité de l'uranium n'ait pu être mis en évidence par des études expérimentales à de tels niveaux de doses, un certain nombre d'entre elles rapportent des observations de déséquilibres moléculaires à des niveaux différents des systèmes biologiques (géniques, protéiques, métaboliques) et pouvant être associés à différentes fonctions biologiques.

Pour fournir des données au questionnement scientifique et sociétal qui se heurte à la complexité des effets des faibles doses d'exposition chronique, un protocole expérimental de contamination chronique de rats a été élaboré.

Les objectifs visés dans cette étude cherchent à fournir la preuve de principe qu'une approche analytique telle que la métabolomique, qui s'intéresse aux fluctuations et déséquilibres du métabolome, serait une technique appropriée et pertinente pour réaliser des études sur les effets biologiques des expositions chroniques de faible niveau.

Différents points seront abordés dans cette étude.

- a) Tester la pertinence et la robustesse de la métabolomique en validant des résultats obtenus précédemment dans une étude « princeps » [137] et tester la sensibilité analytique de cette technique pour des doses d'expositions chroniques très faibles.
- b) Rechercher le temps de contamination nécessaire pour observer des effets biologiques comme l'empreinte moléculaire de l'exposition à l'uranium (marqueur biologiques précoces).
- c) Rechercher la limite de sensibilité biologique ou technique qui permette d'observer un effet biologique.
- d) Identifier des marqueurs d'exposition communs à toutes les doses d'uranium.

Dans cette étude, des rats mâles (n=20 pour accroître la puissance statistique des analyses) ont été contaminés par ingestion d'uranium à différentes doses selon une gamme comprise entre une concentration non toxique forte (40 mg/L : supérieure de deux fois à la concentration maximale mesurée dans des puits Finlandais [196] et une très faible concentration de 0.015 mg/L : deux fois plus faible que celle recommandée comme limite de potabilité de l'eau de boisson selon l'OMS en vigueur depuis 2011 [191]). Les durées de contamination varient quant à elles de 3, 6 à 9 mois (**Figure 26**)

A partir de ce protocole, différents échantillons d'urine sont collectés à l'aide de cages à métabolisme et analysés par chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse. Les analyses statistiques multivariées des signaux analytiques obtenus sont réalisées à l'aide du logiciel SIMCA-P+ et de R.

La pertinence et la robustesse de la métabolomique, est testée par l'analyse d'une deuxième cohorte d'animaux exposés dans les mêmes conditions que celle de l'étude *princeps* réalisée à partir de groupes expérimentaux composés de 10 rats, contaminés par ingestion d'une solution d'uranium de concentration égale à 40 mg/L, sur une période de 9 mois [137]. Dans cette nouvelle étude, le nombre d'animaux par groupe a été doublé (n=20) pour augmenter la puissance statistique des analyses.

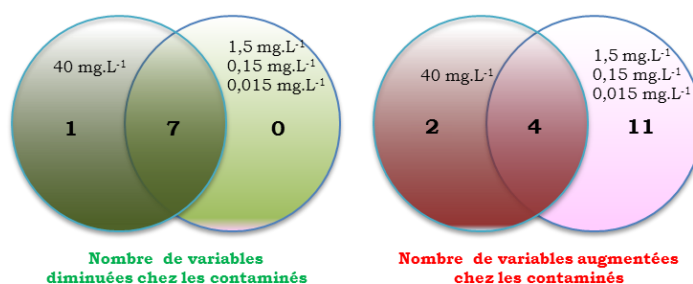
En suivant l'évolution des empreintes moléculaires discriminantes des animaux contaminés pour des doses d'exposition décroissantes, ce protocole d'étude permettra aussi de tester la sensibilité de l'approche analytique utilisée. Ensuite, il s'agira par l'étude de la relation dose-effet, de confirmer et d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques dont les niveaux varient par exposition à l'uranium dans les urines de rats.

Il s'agira aussi de réaliser à partir des différents marqueurs d'expositions observés, de réaliser un principe de test de diagnostic par la détermination d'un sous-groupe d'entités biologiques qui, associées sous forme d'un marqueur composite, sont capables d'identifier, quelle que soit la dose d'exposition à l'uranium, les animaux contaminés à l'uranium.

Les résultats de cette étude ont premièrement confirmé ceux de l'étude *princeps* [137]. Ils ont aussi validé la pertinence de l'usage de la métabolomique dans le domaine des expositions chroniques à faibles doses d'uranium et validé l'identité des marqueurs biologiques d'exposition à l'uranium suivant une relation qui dépend à la fois de la dose et du temps de contamination.

Grâce à cette approche analytique, des animaux contaminés par ingestion d'une solution d'uranium à 0.15 mg.L⁻¹ pendant 9 mois, peuvent être distingués des animaux non contaminés par l'analyse métabolomique d'un échantillon d'urine. Cette discrimination s'appuie sur l'identification de 11 signaux analytiques (métabolites) qui permettent de distinguer les animaux contaminés des autres (**Figure 29**).

Parmi ces 11 signaux analytiques, un test composite réalisé par combinaison des marqueurs d'exposition N1-méthylnicotinamide, N1-méthyl-2-pyridone-5-carboxamide et du 4-hydroxyphenylacetyl glycine, peut être validé par un test de ROC révélant une aire sous la courbe du rapport de spécificité sur sensibilité comprise entre 83 à 96%.



- 40 mg.L⁻¹ : 14 variables discriminantes dont 6 qui augmentent et 8 diminuent chez les animaux contaminés
- 0,015 à 1,5 mg /L⁻¹ : 22 variables dont 15 qui augmentent et 7 diminuent chez les contaminés
- Global : 25 variables associées à l'uranium
- **11 variables sont communes à toutes les doses**

Figure 29 : signaux analytiques discriminants chez les animaux contaminés à l'uranium

En conclusion, cette étude révèle que la métabolomique est une technique pertinente en radiotoxicologie des faibles doses d'uranium. Les résultats obtenus révèlent des effets métaboliques observables pour des doses d'exposition chroniques à l'uranium extrêmement faibles. Ces résultats révèlent des cinétiques d'évolution des niveaux de métabolites différents associées à des effets de seuils dépendant du temps et de la dose d'exposition.

25 variables métaboliques identifiées et validées sont discriminantes, sensibles et spécifiques à l'uranium. Elles peuvent servir à mettre au point un test de diagnostic d'exposition.

Dans le domaine de la radiotoxicologie des faibles doses, les résultats de cette étude s'avèrent prometteurs. Cette approche analytique de la famille des « omiques » devrait permettre de mieux comprendre et décrypter les mécanismes sous-jacents des expositions internes à l'uranium mais aussi d'établir des tests urinaires de diagnostic d'exposition qui sont utilisables dans une gamme de concentration d'eau de boisson comprise entre 0.015 and 0.15 mg.L⁻¹.

Metabolomics reveals dose effects of low-dose chronic exposure to uranium in rats: identification of candidate biomarkers in urine samples

Stéphane Grison¹ · Gaëlle Favé^{2,3,4} · Matthieu Maillot^{2,3,4,5} · Line Manens¹ · Olivia Delissen¹ · Éric Blanchardon⁶ · Isabelle Dublineau¹ · Jocelyne Aigueperse⁷ · Sandra Bohand⁸ · Jean-Charles Martin^{2,3,4} · Maâmar Souidi¹

Received: 4 February 2016 / Accepted: 21 July 2016
© The Author(s) 2016. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract

Introduction Data are sparse about the potential health risks of chronic low-dose contamination of humans by uranium (natural or anthropogenic) in drinking water. Previous studies report some molecular imbalances but no clinical signs due to uranium intake.

Objectives In a proof-of-principle study, we reported that metabolomics is an appropriate method for addressing this chronic low-dose exposure in a rat model (uranium dose: 40 mg L⁻¹; duration: 9 months, n = 10). In the present study, our aim was to investigate the dose–effect pattern and identify additional potential biomarkers in urine samples.

Methods Compared to our previous protocol, we doubled the number of rats per group (n = 20), added additional sampling time points (3 and 6 months) and included several lower doses of natural uranium (doses used: 40, 1.5, 0.15 and 0.015 mg L⁻¹). LC–MS metabolomics was performed on urine samples and statistical analyses were made with SIMCA-P+ and R packages.

Results The data confirmed our previous results and showed that discrimination was both dose and time related. Uranium exposure was revealed in rats contaminated for 9 months at a dose as low as 0.15 mg L⁻¹. Eleven features, including the confidently identified N1-methylnicotinamide, N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and 4-hydroxyphenylacetyl glycine, discriminated control from contaminated rats with a specificity and a sensitivity ranging from 83 to 96 %, when combined into a composite score.

Conclusion These findings show promise for the elucidation of underlying radiotoxicologic mechanisms and the design of a diagnostic test to assess exposure in urine, in a dose range experimentally estimated to be above a threshold between 0.015 and 0.15 mg L⁻¹.

Stéphane Grison and Gaëlle Favé contributed equally to the project.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11306-016-1092-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Maâmar Souidi
maamar.souidi@irsn.fr

- ¹ Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-HOM, SRBE, LRTOX, 92260 Fontenay-aux-roses, France
- ² Aix Marseille Université (AMU), NORT, 13005 Marseille, France
- ³ Inserm, UMR_S 1062, 13005 Marseille, France
- ⁴ Inra, UMR_INRA 1260, 13005 Marseille, France
- ⁵ MS-Nutrition, Marseille, France
- ⁶ Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-HOM, SDI, LEDI, 92260 Fontenay-aux-roses, France
- ⁷ Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-HOM, 92260 Fontenay-aux-roses, France
- ⁸ AREVA Mines, 92400 Courbevoie, France

Keywords Metabolomics · Chronic · Low dose · Contamination · Uranium · N1-methylnicotinamide

1 Introduction

Characterizing the long-term biological effects associated with exposure to chemical pollutants, such as drugs, pesticides and radionuclides, proves to be rather complex when it comes to chronic low-dose contamination. These effects generally include several molecular events involving several metabolic pathways that induce low amplitude

effects barely distinguishable from physiological variability. Primary data obtained from cohorts weakly exposed to chemical compounds regularly used in the chemical industry and agriculture recently revealed biological effects without any apparent phenotypic change or morbidity (Bonvallot et al. 2013; Dudka et al. 2014). Unfortunately, in this context the use of conventional clinical analysis combined with univariate statistical analyses is unsuitable for identifying low-dose biological effects, both because the body is an integrated system involving multiple and interconnected forms of complex metabolic regulation and because no phenotypic effect can be observed within narrow time-windows, especially in the low-dose ranges.

Among the various pollutants that have sparked societal concern about the risks of low doses, radionuclides are found dispersed in the environment, both naturally, since they are present in the Earth's crust, or from anthropogenic sources, such as nuclear fuel cycles or military use (MacKenzie 2000). The dispersion rate depends on their origin (natural, accidental or post-accidental) and geographical location (Hu et al. 2010). Routes of human exposure and contamination include skin injury, inhalation and, often, the ingestion of low concentrations of radionuclides through the food chain and spring water consumption. Radionuclide toxicity is relatively well described for the high-contamination dose ranges, which are associated with characteristic pathological effects (Kathren and Burklin 2008; Papadopoulou and Efthimiou 2009), but remains a controversial topic for low dose ranges, because of the scarcity of investigations (Morgan and Bair 2013). Nonetheless, the health consequences of chronic low-dose exposure to radionuclides are an important public issue because of their potential major societal and political impact. In particular, uranium is naturally present in the earth's crust and can be found in drinking water at various concentrations, depending on the geological nature of the soil (UNSCEAR 2008). Additionally, a major concern about uranium levels in drinking water is the biological impact of chronic ingestion during sensitive periods such as pregnancy, childhood and old age.

Some in vivo experimental studies in rodents chronically exposed with uranium report molecular imbalances associated, for example, with the cholinergic pathway and oxidative stress in the brain, with the cholesterol metabolism and the liver xenobiotic metabolism, with inflammatory mediators in the intestines and changes in the levels of biological markers in the kidneys (Dublineau et al. 2014). Others have investigated the ingestion of chronic low-dose cesium 137 and natural uranium in rats and, more recently, strontium 90 in mouse (Goudarzi et al. 2016; Grison et al. 2012, 2013). They pointed out specific metabolite fingerprint using a metabolomics approach. Metabolomics is a

post-genomic approach which allows an exhaustive analysis of all measured metabolites in a biological matrix, reflecting the biological phenotype. Unfortunately, few studies used metabolomics in the field of low doses ionizing radiations and, more particularly, in low dose radionuclides intake (i.e. less than 10 publications since 2012). Therefore, the lack of scientific data justifies following this topic. In our previous studies (Grison et al. 2012, 2013), metabolomics analysis performed in rats chronically contaminated with either natural uranium (40 mg L^{-1}) or cesium-137 (6500 Bq L^{-1}) in drinking water showed for the first time the relevance of metabolomics in the field of chronic low dose radiotoxicology. Indeed, unlike other analytical techniques, metabolomics provided a discriminant fingerprint from urine of the contaminated group. These results open new perspectives but have to be validated with other studies including new cohorts, radionuclide dose-response and kinetic effect before concluding about the ability of metabolomics to cover the low dose ranges biological effect of radionuclide intake.

The objective of this study is to determine both the uranium concentration and the time required to observe a metabolic disruption in rats using a metabolomics approach. To investigate the dose-effect pattern of low-dose chronic exposure and the metabolomic changes induced, we used a toxicologically sensitive postnatal rat model, sub- and chronically contaminated with natural uranium in drinking water, from birth to adulthood. The environmental conditions of population exposure through drinking water (UNSCEAR 2008) were reproduced using uranium concentrations ranging from the threshold set by the WHO drinking-water guideline for uranium (0.03 mg L^{-1}) (Frisbie et al. 2013) to the triple of the maximum environmental concentration measured in Finnish groundwater (12.4 mg L^{-1}) (Salonen 1994).

2 Materials and methods

2.1 Animals and contamination procedure

All experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN) and complied with French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848, October 19, 1987, modified May 20, 2001).

Sprague-Dawley rats, 12 weeks old and 16 days pregnant, were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). They were housed individually and maintained in a 12 h light/12 h dark cycle (regular cycle) at $21 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and 50 % humidity, with access ad libitum to a

standard rodent pellet diet and water. After weaning, female offspring and mothers were euthanized. Male offspring were housed, each paired with a rat from a different mother (assigned by randomization).

Rats were contaminated through their drinking water (Supplemental Fig. 1): natural uranium (NU) in a solution of uranyl nitrate hexahydrate ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) was prepared to four final uranium concentrations of 40 (E dose); 1.5 (D dose); 0.15 (C dose) and 0.015 mg L^{-1} (B dose) (daily uranium intake: 1; 0.04; 0.004 and 0.0004 mg/rat/day) and dissolved in mineral water. These doses ranged from triple the highest uranium concentration of 12.4 mg L^{-1} found naturally, in well water in Finland (Salonen 1994), to half of the WHO 2011 drinking-water guideline for uranium, defined as equal to 0.030 mg L^{-1} (Frisbie et al. 2013). Natural uranium (Olympic) was obtained from CERCA (Pierrelatte, France). Control animals drank uncontaminated mineral water (A dose). The specific activity of the NU was $2.42 \times 10^4 \text{ Bq g}^{-1}$, and its isotopic composition was $^{238}\text{U} = 99.307 \%$, $^{235}\text{U} = 0.688 \%$, and $^{234}\text{U} = 0.005 \%$. Mothers of the offspring in the treated group were also exposed to NU through drinking water from birth to euthanasia (mothers of the control rats received uncontaminated mineral water). Until weaning, offspring were theoretically contaminated by mother's milk [human offspring receive approximately 5 % of the mother's daily dose (Wappelhorst et al. 2002)]. We monitored the food and water intake of both groups weekly throughout the contamination period.

2.2 Collection of organs and biofluids

When rats were 3, 6 and 9 months old, they were placed in metabolic cages (in the morning, one per cage), with access to a rodent ground pellet diet and water (contaminated or not) ad libitum. Urine was collected twice a day for 48 h, with sodium azide (0.01 %) added to prevent bacterial growth (Griffin et al. 2001), and refrigerated at +4 °C. All samples for each rat were pooled, mixed, and centrifuged; supernatants were frozen at −80 °C. Rats were then moved back to conventional cages (one per cage) with food and drink ad libitum until the evening to reduce stress. At 9 months old, rats were euthanized. To control the diet cycle, food was removed in the evening until the next morning. Five hours before euthanasia, around 12 g of standard rodent pellet food was added directly to each cage to normalize food intake for all rats. Four hours later, rats were anesthetized by inhalation of 5 % isoflurane (Abbot France, Rungis, France) before an intracardiac puncture to collect blood, in heparinized tubes. Whole blood was centrifuged (5000 rpm) and plasma supernatants were immediately frozen at −80 °C. Kidneys were dissected on

ice, weighed, deep-frozen in liquid nitrogen, and stored at −80 °C until uranium quantification.

2.3 Biological and uranium analyses

2.3.1 Measurement of biochemical panel of markers

An automated spectrometric system (Konelab 20 from Thermo Electron Corporation, Cergy-Pontoise, France) was used for biochemical measurements of thawed urine samples, with the manufacturer's biological chemistry reagents and protocols. The markers measured in urine included amylase, calcium, uric acid, creatinine, glucose, phosphorus, total proteins and urea.

2.3.2 Measurement of natural uranium organ contamination

Samples were mineralized (Ejnik et al. 2000) and analyzed for their uranium content by ICP-MS (XSERIE 2, Thermo-electron, France). A multielement standard solution (Analab, France) was used to optimize experimental conditions and apparatus parameters to obtain the best signal/noise ratio for ^{238}U . In all solutions likely to be analyzed (biological samples or calibration solutions), bismuth 209 was added as an internal standard at 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Six standard solutions for the calibration curve (0, 0.005, 0.01, 0.1, 0.5, and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$) were freshly prepared by dilution of a standard solution at 10 mg L^{-1} in 2 % nitric acid (NORMATOM for trace metal analysis, VWR Prolabo). A linear relation—count number (^iU) = $f(^i\text{U})$ —was calculated for each isotope, $i = [235; 238]$ with $[^i\text{U}]$ equal to the isotope concentration in $\mu\text{g L}^{-1}$. Isotopy and dosage reliability were regularly verified with standard solutions (6 quality controls at different concentrations and isotopy distributed throughout the analysis). Blank samples were run every five samples to check the stability of the background and to prevent potential contamination. For ^{238}U , the detection and quantification limits were respectively $0.5 \cdot 10^{-3}$ and $1.5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$, and for ^{235}U , $0.01 \cdot 10^{-3}$ and $0.03 \cdot 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$. The limits for ^{238}U were applied to total uranium.

2.3.3 Renal dose estimation (9 months postnatal)

The radiation yield and energy emitted during the nuclear transformation of the isotopes forming NU come from ICRP (1983). Alpha particles and Auger and internal conversion electrons were assumed to be locally absorbed in the target organ. Photons were transported with the code MCNPX in a voxel phantom of an adult male rat from the same strain. Given the preponderant concentration of NU in kidneys and the small fraction of energy emitted as penetrating radiation, kidney irradiation by NU from the

rest of the body was ignored because negligible. The absorbed dose rate to the kidney was thus determined at 9 months of age based on the kidney concentration of NU and kidney mass (Table 1, panel A) and assuming a homogeneous concentration of NU throughout the entire 9 months.

2.3.4 Statistical analysis

Values of the biochemical and clinical parameters were reported as means \pm standard errors of the means (SEM). The control and contaminated groups were compared with Student's *t* test in normal populations or the rank sum test in non-normal populations. Statistical significance was defined by a *P* value less than 0.05. Statistical analyses were performed with SigmaStat statistical software (SPSS, Paris, France).

2.4 Metabolomic analyses

2.4.1 Sample preparation and LC–MS analyses

Urine samples were diluted with ultrapure water (1:4, v/v) before analysis. After centrifugation for 15 min at 11,000 rpm and 4 °C, 100 μ L of thawed urine was mixed and shaken for 1 min with 300 μ L of LC–MS (liquid chromatography–mass spectrometry) grade water. After a second centrifugation for 5 min at 3000 rpm, 50 μ L of supernatant was transferred into HPLC vials and stored at -80 °C prior to analysis.

To ensure reproducible and robust data acquisition (Dunn et al. 2011), the 300 samples (5 doses at each of 3 time points for each of the 20 rats) were analyzed as 5 smaller analytical batches of 60 samples. Each of the randomized batches followed a typical injection order: a blank sample (LC–MS grade water) was injected four times at the start, then a pooled sample (a mixture of all samples) was injected ten times; thereafter every fifth injection was inserted a pool quality control (QC) sample (made up with small aliquot of the samples of all series) throughout the batch series.

The samples were analyzed on an Agilent 1200 RRLC coupled to a Bruker micrOTOF ESI-hybrid quadrupole-time of flight mass spectrometer (Wisssembourg, France), both devices driven by the Compass 1.3 SR 1 for micrOTOF/maXis software (Bruker Daltonics). The LC conditions were: injection volume, 5 μ L; autosampler temperature, 4 °C; column type, EC 100/2 Nucleodur C18 pyramid (Macherey–Nagel, Les Ulis, France); particle size, 1.8 μ m; column length, 100 mm; column internal diameter, 2 mm; column temperature, 40 °C; solvent flow, 0.4 mL min⁻¹ (solvent A: 95 % water, 5 % acetonitrile, 0.1 % formic acid, and solvent B: 95 % acetonitrile, 5 % water, 0.1 % formic acid); and

gradient, 3 % B for 1 min, 3–30 % B for 7 min, 30–95 % B for 1 min, 95 % B for 1 min, 95–3 % B for 1 min, and 3 % B for 4 min (running time: 15 min). The MS conditions were as follows: acquisition mode, positive electrospray ionization (ESI+) and full scan 50–1500 *m/z*; capillary voltage, 4.5 kV; capillary temperature, 200 °C; cone voltage, 40 V; drying gas flow, 9.5 L min⁻¹; and nebulizing gas pressure (nitrogen), 2.9 bar; calibration, internal with injection of sodium formate acetate at the beginning of every run.

2.4.2 Data preprocessing and filtering

LC–MS raw data were exported to “.cdf” file format with the manufacturer's DataAnalysis software (Bruker, Wisssembourg, France) and preprocessed with the freely available XCMS software, including the CAMERA script (Smith et al. 2006). Peak picking was performed with the ‘centWave’ method (‘peakwidth’ parameter reduced to 3–15 s to fit UPLC performances, and ‘snthresh’ to 5 to detect more peaks), retention time correction with the obiwrap method (‘profStep’ reduced to 0.1 *m/z* as recommended for QTOF mass spectrometers), peak grouping with the ‘bw’ and ‘mzwidth’ parameters reduced respectively to 5 and 0.025, and gap filling with the default parameters.

Raw data quality was checked by principal component analysis (PCA), with SIMCA-P + 12.0 software (Umetrics, Umeå, Sweden), both for each single batch and for all batches together. The presence of any individual outlier was ruled out. Signal drift over time was quite weak within batches and unsurprisingly higher between them. Signals were corrected for both drifts with the Van der Kloet algorithm (a linear model) (van der Kloet et al. 2009) embedded into an R script (generous gift from Jean-François Martin, INRA AXIOM METATOUL, Toulouse, France).

Data normalization was followed by a filtering step based on the coefficient of variation of variable intensity in the pooled sample (cutoff set at 20 %), which reduced the number of variables from 2583 to 1736 (67 % remaining). The removal of variables detected before 24 s (mostly from the calibration solution) left the dataset with 1718 variables. Finally, the data were log₁₀-transformed and Pareto-scaled before the statistical analysis (Martin et al. 2015).

2.4.3 Statistical analyses

Multivariate statistical analyses were performed with either SIMCA-P + 12.0 software (Umetrics, Umeå, Sweden) or R packages (base, pRoc, HDMD). Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) models were validated by CV-ANOVA (threshold for significance set at 0.05) and by permutation tests (200 permutations, test passed for R2Y

Table 1 Biological and uranium analyses

	Total body weight (g)		Kidney weight (g)	Ratio kidney/total body (%)	Uranium concentrations in kidney (ng U g ⁻¹)					
	Weight	SEM			Urea	Phosphorus	Glucose	Total proteins	Urea	
Panel A										
Control (20)	577 ± 9		177 ± 0.03	0.3						
NU 0.015 mg L ⁻¹ (20)	572 ± 14		1.71 ± 0.08	0.3	6.3 ± 0.6					
NU 0.15 mg L ⁻¹ (20)	559 ± 8		1.71 ± 0.04	0.3	6.5 ± 0.6					
NU 1.5 mg L ⁻¹ (20)	593 ± 15		1.72 ± 0.05	0.3	8.7 ± 0.8*					
NU 40 mg L ⁻¹ (20)	561 ± 13		1.64* ± 0.03	0.3	16 ± 2***					
					268 ± 34***					
Panel B										
	Urine volume (g)	Amylase (U)	Calcium (mmol)	Uric acid (μmol)	Creatinine (μmol)	Glucose (mmol)	Phosphorus (mmol)	Total proteins (g)	Urea (mmol)	
3 months										
Control (20)	28.40 ± 1.20	174.05 ± 14.48	0.05 ± 0.01	47.34 ± 6.14	222.87 ± 6.93	0.08 ± 0.01	0.52 ± 0.10	0.06 ± 0.01	21.33 ± 1.15	
NU 0.015 mg L ⁻¹ (20)	25.25 ± 1.37	147.04 ± 16.10	0.04 ± 0.00*	43.71 ± 6.43	215.17 ± 6.56	0.07 ± 0.01	0.50 ± 0.08	0.10 ± 0.05	17.17 ± 1.0**	
NU 0.15 mg L ⁻¹ (20)	27.50 ± 2.59	135.51 ± 20.13	0.04 ± 0.01	93.64 ± 55.89	209.21 ± 7.83	0.08 ± 0.01	0.62 ± 0.14	0.13 ± 0.06	17.94 ± 0.82*	
NU 1.5 mg L ⁻¹ (20)	24.45 ± 1.22*	159.39 ± 19.90	0.04 ± 0	37.96 ± 3.68	220.05 ± 8.46	0.07 ± 0.01	0.46 ± 0.07	0.05 ± 0.00	18.65 ± 0.69	
NU 40 mg L ⁻¹ (20)	25.75 ± 1.37	156.94 ± 15.48	0.039 ± 0.00	35.82 ± 1.22	220.32 ± 5.75	0.09 ± 0.02	0.52 ± 0.06	0.06 ± 0.01	18.29 ± 0.47*	
6 months										
Control (20)	31.01 ± 1.29	217.45 ± 8.63	0.08 ± 0.01	40.30 ± 1.23	279.18 ± 8.79	0.06 ± 0.00	0.44 ± 0.05	0.08 ± 0.01	26.07 ± 0.76	
NU 0.015 mg L ⁻¹ (20)	26.50 ± 1.2*	193.63 ± 8.19	0.06* ± 0.01	41.30 ± 2.35	275.27 ± 8.45	0.06 ± 0.01	0.38 ± 0.04	0.06 ± 0.00**	23.47 ± 0.73*	
NU 0.15 mg L ⁻¹ (20)	26.06 ± 1.14**	206.52 ± 9.62	0.05** ± 0.01	39.11 ± 1.22	255.79 ± 8.27	0.06 ± 0.00	0.49 ± 0.04	0.07 ± 0.01	22.00 ± 0.73***	
NU 1.5 mg L ⁻¹ (20)	28.22 ± 1.65	226.06 ± 15.26	0.06 ± 0.01	38.23 ± 1.59	279.61 ± 11.87	0.06 ± 0.00	0.45 ± 0.06	0.07 ± 0.00	24.93 ± 0.95	
NU 40 mg L ⁻¹ (20)	26.03 ± 1.66*	206.85 ± 8.24	0.06** ± 0.01	39.80 ± 1.31	269.18 ± 8.62	0.06 ± 0.00	0.37 ± 0.06	0.06 ± 0.00**	22.85 ± 0.55***	
9 months										
Control (20)	31.17 ± 1.86	240.23 ± 10.02	0.07 ± 0.01	39.71 ± 1.53	292.78 ± 9.89	0.06 ± 0.01	0.66 ± 0.05	0.12 ± 0.02	26.33 ± 0.78	
NU 0.015 mg L ⁻¹ (20)	28.41 ± 2.00	216.90 ± 8.92	0.06 ± 0.01	40.67 ± 2.41	289.46 ± 7.88	0.06 ± 0.00	0.64 ± 0.04	0.08 ± 0.01*	24.49 ± 0.77	
NU 0.15 mg L ⁻¹ (20)	24.37 ± 0.90**	240.24 ± 14.90	0.06 ± 0.01	40.00 ± 1.49	277.05 ± 4.84	0.06 ± 0.00	0.65 ± 0.05	0.10 ± 0.02	22.53 ± 0.46***	
NU 1.5 mg L ⁻¹ (20)	27.30 ± 1.76	258.68 ± 15.75	0.06 ± 0.01	39.29 ± 1.73	301.15 ± 9.01	0.05 ± 0.00	0.72 ± 0.04	0.10 ± 0.01	26.13 ± 0.83	
NU 40 mg L ⁻¹ (20)	23.86 ± 1.21**	229.77 ± 12.97	0.06 ± 0.01	39.70 ± 1.28	286.41 ± 9.01	0.05 ± 0.00	0.56 ± 0.04	0.07 ± 0.01**	23.62 ± 0.82*	

Panel A Mean ± SEM of (i) whole-body weight, kidney weight and ratio of kidney to whole-body weight in each group, and (ii) uranium concentration in kidneys after 9 months of chronic radionuclide ingestion through drinking water (0.015, 0.15, 1.5 and 40 mg L⁻¹)

Panel B Mean ± SEM of (i) 48-h urine collection, and (ii) urine proteins, carbohydrates, ions and other metabolites in control and contaminated (NU) groups after 3, 6 and 9 months of chronic radionuclide ingestion through drinking water (0.015, 0.15, 1.5 and 40 mg L⁻¹)

The number of rats for each measurement is indicated in parentheses

Results are significantly different for: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

and Q2Y value decreased, below zero for Q2Y one). Three “blobs” of statistical analyses and features selection were applied to the preprocessed and filtered matrix (Supplemental Fig. 2), aiming at (1) compare the present cohort to a previous one, (2) distinguish the time point effect from the dose effect, and (3) investigate finely the dose effect.

2.4.3.1 Discrimination between controls and rats contaminated at the E-dose (40 mg L^{-1}) after 9 months The aim was to compare the results obtained in the present cohort with those obtained in our previous cohort in 2013 (Grison et al. 2013), to check its reproducibility. PLS-DA was performed on a subset of the filtered dataset including the control rats ($n = 20$) and the E-dose contaminated rats ($n = 19$; 1 sample lost) at 9 months. The most discriminatory metabolites were then selected, according to their ‘variable importance in projection’ (VIP) score of the PLS algorithm. The top 95 of these, having the highest VIP score, were retained for comparability with the number of variables selected in our previous cohort (and was again equivalent to $1.5 < \text{VIP score} < 2.4$) (Grison et al. 2013).

2.4.3.2 Separate analyses of time-point and dose effects

At this second step of our statistical analysis we performed ANOVA-PCA (APCA) on the overall dataset. Indeed, we investigated two contamination factors simultaneously: the duration (time-point effect) and the level (dose effect). As for the multivariate data, depending on several factors, we used APCA, which is a powerful tool to evaluate significant factors of an experimental design and select the principal features associated with each factor (Harrington et al. 2005; Zwanenburg et al. 2011; Climaco Pinto et al. 2008). Briefly, it decomposed the original matrix into effect matrices (time-point effect, dose effect, dose \times time-point interaction effect) and a matrix containing the residual error. Each effect matrix was calculated as the average of the variables at each level of the corresponding factor, and the residual matrix as the difference between the original matrix and the sum of the effect matrices. Adding the effect matrices to the residual matrices produced two separate matrices: the “time-point matrix”, which was the sum of the time-point factor and the residual error, and the “dose matrix”, the sum of the dose factor, the dose \times time-point interaction factor, and the residual error. PCA was then performed on each matrix to select the features most associated with each effect (cut-off was set at 2 standard deviations for absolute value of loading, which corresponds to the level of significance used for a standard normal distribution). As Harrington et al. point out, the dominant factor should appear on the first component of the PCA while the other components explain the residual errors. Nonetheless, the biological variation in metabolomics data may be greater than the experimental variation,

so that the significant factor might be found on the second or any subsequent PCA component. This was the case for the dose matrix. To overcome this weakness, we used the method for selective reduction of residual variability proposed by Climaco Pinto et al. (2008) to identify features associated with the dose effect. Finally, to check the robustness of each feature selection (i.e., for time-point effect and for dose effect), 3 PLS-DA models were built separately: one based on the time-point effect matrix and two based on the dose effect matrix. The first PLS-DA was built on all classes, i.e., the control group and all four contamination doses, one low (E: 40 mg L^{-1} of drinking water) and three very low (B: 0.015 mg L^{-1} ; C: 0.15 mg L^{-1} ; D: 1.5 mg L^{-1}), while the second PLS-DA model was built on all classes except that receiving the E dose, i.e., on the control group and the three very low-dose groups.

2.4.3.3 Dose effect according to contamination duration and selection of the most discriminant features

The third and last step of our statistical analysis aimed at refining our investigation of the dose effect (without the confounding factor of the duration in itself, but keeping the dose along with the dose \times time-point interaction factors) and was based on the features selected in APCA (supplemental Fig. 2). 16 PLS-DAs were performed on the dose effect matrix to search for any discrimination between the control group and each contaminated group, i.e. B-dose (0.015 mg L^{-1}), C-dose (0.15 mg L^{-1}), D-dose (1.5 mg L^{-1}) and E-dose (40 mg L^{-1}) contaminated rats, separately (main characteristics of these PLS-DA models are listed in Table 2, panel B). The existence of such discrimination was checked regardless of the time-points, or after 3, 6 and 9 months of contamination. For six out of the sixteen models, the most discriminatory features were selected by their VIP score (set at >1.2 , in accordance with our previous studies): control vs. B-dose (0.015 mg L^{-1}) contaminated rats at all time points (model 1, Table 2, panel B), control vs. C-dose (0.15 mg L^{-1}) contaminated rats at all time points (model 5, Table 2, panel B), control vs. D-dose contaminated rats at all time points (model 9, Table 2, panel B), control vs. E-dose (40 mg L^{-1}) contaminated rats after 3 months of contamination (model 14, Table 2, panel B), control vs. E-dose (40 mg L^{-1}) contaminated rats after 6 months of contamination (model 15, Table 2, panel B), and control vs. E-dose (40 mg L^{-1}) contaminated rats after 9 months of contamination (model 16, Table 2, panel B). Using Venn diagrams (Oliveros 2007), the lists of selected features were compared to each other to check for common features: on one hand, we compared the selected features for the three very low-dose groups (models 1, 5 and 9) and, on the other, the selected features for the E-dose (40 mg L^{-1}) group after 3, 6 and 9 months of contamination (models 14, 15 and 16).

Table 2 Characteristics of PLS-DA models

Cohort (number of variables in the matrix)	Components number	Observations number	R2Y (%)	Q2Y (%)	CV-ANOVA	
Panel A						
Grison et al. (2013) (1376)	2	20	91.9	55.2	9.40e−03	
Grison et al. (2013) (95)	2	20	88.9	74.2	4.60e−04	
Present article (1718)	3	39	95.5	75.2	1.70e−06	
Present article (95)	2	39	88.0	80.2	7.77e−12	
Discrimination	Model	Components number	Observations number	R2Y (%)	Q2Y (%)	CV-ANOVA
Panel B						
A vs. B						
All time points	1	2	120	26.9	16.7	2.23e−05
3 month	2	0	40	–	–	–
6 month	3	0	40	–	–	–
9 month	4	0	40	–	–	–
A vs C						
All time points	5	2	120	57.3	40.3	6.42e−10
3 month	6	0	40	–	–	–
6 month	7	2	40	46.6	16.7	0.0340864
9 month	8	2	40	51.6	30.3	0.00127167
A vs D						
All time points	9	3	120	53.2	33.3	6.04e−05
3 month	10	2	40	61.8	33.5	0.0105006
6 month	11	0	40	–	–	–
9 month	12	0	40	–	–	–
A vs E						
All time points	13	3	117	76.7	69.6	2.44e−23
3 month	14	3	39	81.4	58.3	0.00698012
6 month	15	2	39	81.5	64.4	6.87e−07
9 month	16	3	39	83.7	70.3	4.00e−05

Panel A Models discriminating the control rats from those contaminated for 9 months at the dose 40 mg L^{−1} in the present study and in our previous proof-of-principle study

Panel B Analyses performed on the “dose matrix” after feature selection (126 variables) to investigate the dose effect; models are discriminating the control from the contaminated rats for each dose (dose B: 0.015 mg L^{−1}; dose C: 0.15 mg L^{−1}; dose D: 1.5 mg L^{−1}; dose E: 40 mg L^{−1}) after 3, 6 and 9 months of contamination and all time-points together

Finally, the features thus selected were used to estimate composite scores able to distinguish each dose from the others to the possible extent. Four scores were calculated: one for all time points and one for each single time point (3, 6 and 9 months). These were built as linear combinations of the features and loadings estimated in the PLS-DA regression predicting the discrimination between the control group and each contaminated group. The distribution of the composite score was graphically represented with boxplots across each experimental group, both including all three time points and separately (at 3, 6 and 9 months). To test the robustness of the predictions, Receiver Operating Characteristic curves (ROC) and Area Under the Curve (AUC) were computed between the control and each

contaminated groups, for all time points, and separately (at 3, 6 and 9 months).

2.4.4 Metabolite identification

For the most discriminant features, a tentative annotation was performed with MZedDB (<http://www.maltese.dbs.aber.ac.uk:8888/hrmet/index.html>) (Draper et al. 2009) from the chemical formulas generated from the accurately measured masses (accuracy <10 ppm) and isotopic patterns, calculated with Bruker DataAnalysis software. According to the putative identifications returned, 20 standard molecules were purchased. L-lysine (L5501-1G, CAS 56-87-1), N6-methyl-L-lysine hydrochloride (04685-

100MG, CAS 7622-29-9), (-)-epinephrine (E4250-1G, CAS 51-43-4), 4-pyridoxic acid (P9630-25MG, CAS 82-82-6), 3-methoxytyramine hydrochloride (65390-250MG, CAS 1477-68-5), methyl hippurate (S750115-100MG, CAS 1205-08-9), suberic acid (S5200-5G, CAS 505-48-6), 4-methylcatechol (M34200-5G, 452-86-8), 2-phenylethanol (77861-250ML, 60-12-8), L-alpha-lysophosphatidylcholine type I from egg yolk (L4129-25MG, CAS 9008-30-4), sebacic acid (283258-5G, CAS 111-20-6), and linoleic acid (L1376-500MG, CAS 60-33-3) were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle D'Abeau Chesnes, 38297 St. Quentin Falavier, France). 1-Methylnicotinamide (3-carbamoyl-1-methylpyridinium chloride, M0375-5G, CAS 1005-24-9), N-tigloylglycine (T1260-100MG, CAS 35842-45-6), 2-hydroxy-*n*-octanoic acid (H0592-5G, CAS 617-73-2), and *trans*-2-octenoic acid (O0004-10ML, CAS 1871-67-6) were purchased from TCI Europe (Boerenveldseweg 6, Haven 1063, 2070 Zwijndrecht, Belgium). N1-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide (TLCN-0621-10MG, CAS 701-44-0), rac *N*-formiminoglutamic acid (TRC-F735500-100MG, 816-90-0), and 3-methylcrotonyl Glycine (TRC-M294540-50MG, CAS 33008-07-0) were purchased from LGC Standards (6 rue Alfred Kastler, BP 83076, 67123 Molsheim cedex, France). 4-Hydroxyphenylacetylglycine (EN300-65253-1G, CAS 28116-23-6) was purchased from Enamine Ltd (Vestienas iela 2b, 1035 Riga, Latvia). All standard molecules were solubilized in water/acetonitrile (50:50), except linoleic acid, which was solubilized in chloroform, and injected at a concentration of 10 mg L⁻¹. Experimental samples displaying the highest intensity for each discriminant feature were selected, and both standard molecules and experimental samples underwent MS and MS/MS experiments. MS conditions were the same as for initial acquisitions; MS/MS parameters were: isolation width, 0.8; cell (collision) energy, 15, 20, 25 and 30 eV; acquisition factor, 1. Full MS and MS/MS spectra were compared between standard molecules, experimental samples and spectral databases (mainly HMDB, Metlin and MassBank) for final metabolite identification.

3 Results

3.1 Effect of chronic low-dose exposure on biochemical and clinical parameters

Both consumption of drinking water and food and body weight gain were monitored once a week throughout the experiment and did not differ between control and contaminated rats. The whole body and one kidney (on the same side for each animal) were weighed at euthanasia for all rats and did not differ significantly between groups. The volume of urine collected during the 48-h period before

sacrifice (25 mL on average) and the relative weight of the kidneys were statistically homogeneous (Table 1, panels A, B). Several biochemical markers were also assessed in urine samples, including ions and kidney markers. Except for slight (but within the physiological range) modifications in some concentrations in the contaminated rats, no significant difference between the groups was observed (Table 1, panel B). These results confirm our previous observations for the E-dose (40 mg L⁻¹) after 9 months of contamination (Grison et al. 2013). Our data also confirm that uranium accumulates in the kidney at a rate equivalent to that we reported previously. Furthermore, our measurements of the rate of uranium accumulation in the kidneys were correlated to the uranium concentrations in the drinking water. Thus, for example, at 9 months of age and for the E-dose of 40 mg L⁻¹, the absorbed dose rate in the kidneys of the contaminated rats was estimated at 5.4×10^{-7} Gy day⁻¹, corresponding to a maximum dose absorbed by the kidneys at sacrifice as low as 0.15 mGy (assuming a constant intake of NU throughout the entire 9-month period).

3.2 Discrimination between control and E-dose (40 mg L⁻¹) contaminated rats after 9 months

The PLS-DA of the control and E-dose (40 mg L⁻¹) contaminated rats at 9 months produced a highly validated and robust model (CV-ANOVA = 1.70e-06, R2Y = 96 %, Q2Y = 75 %) that very clearly discriminated between the groups (Table 2, panel A). This intergroup variation was largely captured by the first component (40 % of total variance) (Fig. 1a). The selection of the 95 most discriminant features enhanced the CV-ANOVA (7.77e-12) and the Q2Y (80 %) values (Table 2, panel A). These results reproduced our previous findings and confirmed that untargeted metabolomics in urine is an appropriate approach for exploring low-dose uranium radiotoxicology. The characteristics of the PLS-DA models were quite similar (Grison et al. 2013) between the proof-of-principle (Grison et al. 2013) and the present validation cohorts, with an increase in CV-ANOVA and Q2Y values that appear to be explained by the doubling of the cohort size (Table 2, panel A). When we looked specifically at the LC-MS ID of the 95 most discriminant features in both cohorts (Fig. 1), we found that 7 of those were common. In particular, a previously identified metabolite, N1-methylnicotinamide (*m/z* 137), ranked 13th according to its VIP score in the validation cohort.

3.3 Separate analyses of time-point effect and dose effect

PCA of the time-point matrix showed that component 2 characterized the time-point effect, mostly represented by

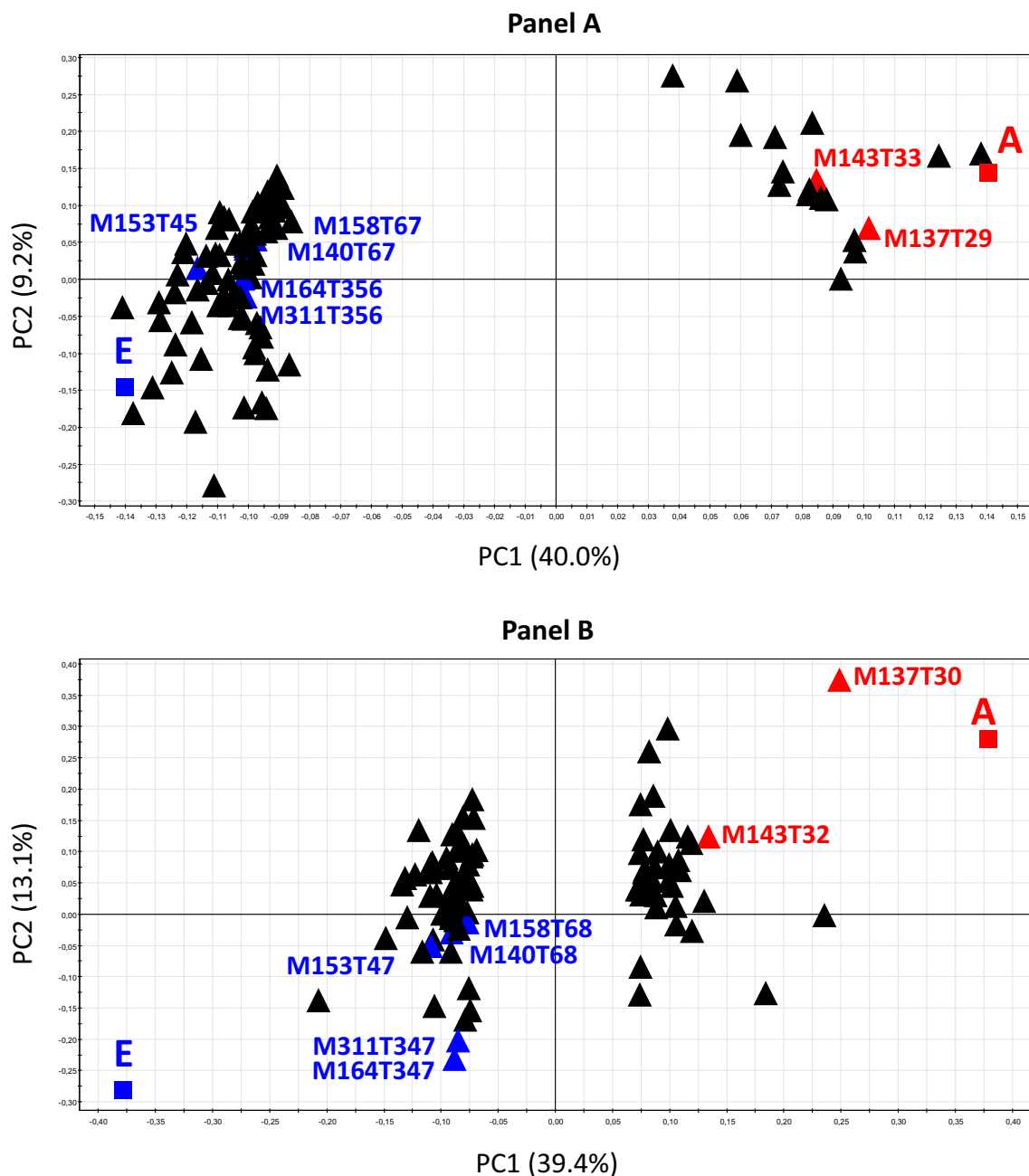


Fig. 1 Comparison between the present and a previous cohort. Discriminations were performed between the control rats (A group) and the rats contaminated at the dose 40 mg L^{-1} for 9 months (E group). Loading scatter plots from the partial least-square discriminant analysis (PLS-DA) were based on the 95 most discriminant

features. **a** Present cohort; variable selection was performed on the preprocessed and filtered matrix (1718 variables; VIP scores >2.4). **b** Cohort from Grison et al. (2013); variable selection was performed on the preprocessed and filtered matrix (1376 variables; VIP scores >1.8)

121 variables (2SD corresponded to absolute value of loadings >0.045). PLS-DA of the selected features showed a validated, robust discrimination between the samples collected at 3, 6 and 9 months (CV-ANOVA <0.001 ,

$R^2Y = 90 \%$, $Q^2Y = 87 \%$) (data not shown). This strong effect is unsurprising and probably associated more with the aging of the rats than with the duration of their contamination.

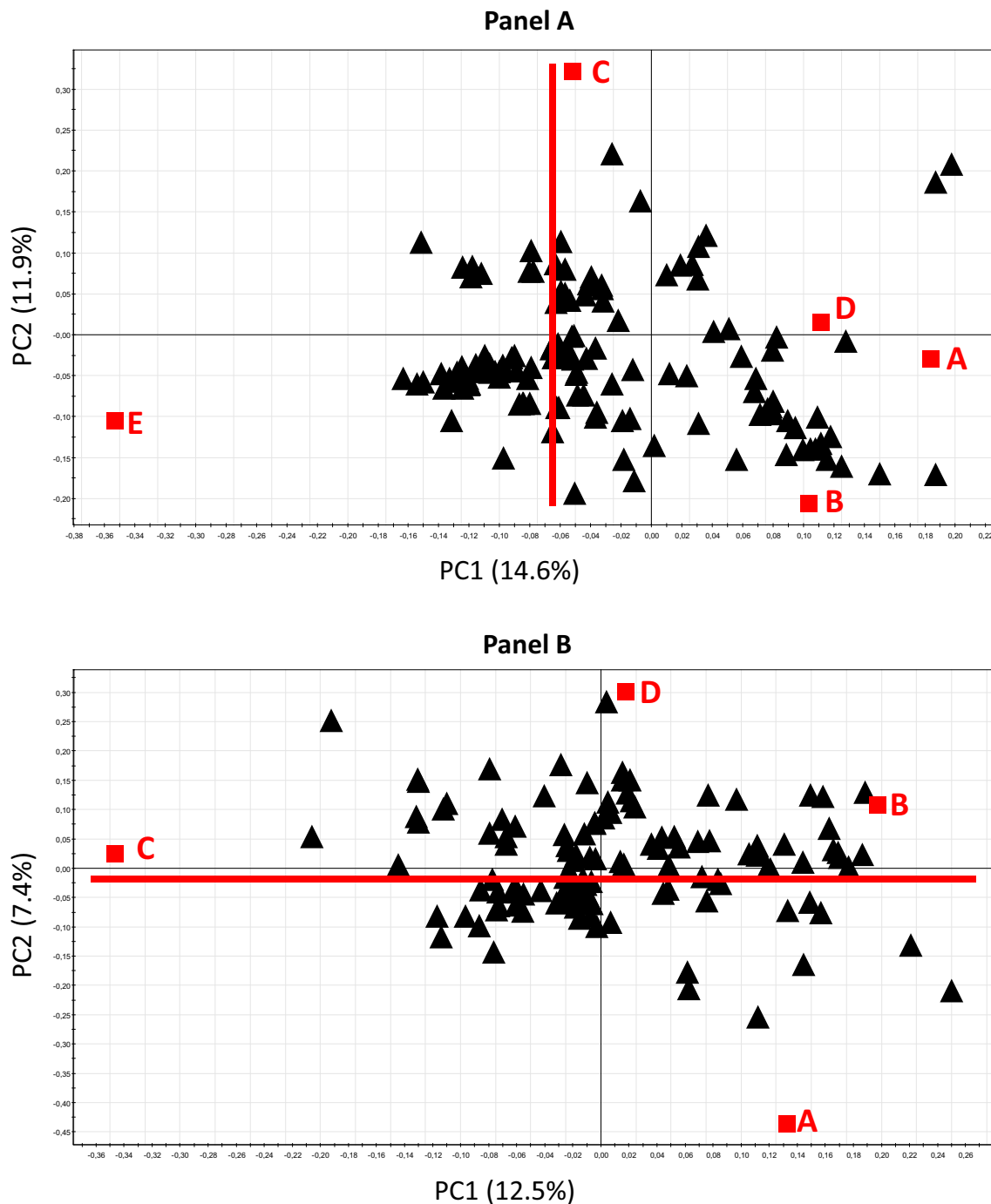


Fig. 2 Partial least-square discriminant analysis (PLS-DA) performed on the “dose matrix” after feature selection (126 variables); classes were: A, control; B contamination dose of 0.015 mg L^{-1} ; C

0.15 mg L^{-1} ; D 1.5 mg L^{-1} ; E 40 mg L^{-1} . **a** Loading scatter plot from the model built on all experimental doses. **b** Loading scatter plot from the model built on all experimental doses but the E one

PCA of the dose matrix showed that components 11 and 12 characterized the dose effect, with 126 variables highly associated with it (2SD corresponded to absolute value of loadings >0.040). PLS-DA of the selected features for all experimental doses (Fig. 2a) was validated (CV-ANOVA = $1.1\text{e}-20$, R2Y = 19 %, Q2Y = 14 %) and showed

a mild dose effect, but a clear shift between the low and the very low doses on the first principal component (describing 14.6 % of the total variance). The second PLS-DA of the selected features for all but the E dose (Fig. 2b) was also validated (CV-ANOVA = $4.0\text{e}-12$, R2Y = 15 %, Q2Y = 9.5 %); it too showed a mild dose effect, but

marked discrimination between the control and contaminated groups for the second principal component (describing 7.4 % of the total variance). Both PLS-DAs showed good discrimination between the control and C-dose (0.15 mg L^{-1}) contaminated rats (on PC2 and PC1 in the first and second models, respectively). These results highlighted a difference between the low (E: 40 mg L^{-1}) and very low (B: 0.015 mg L^{-1} , C: 0.15 mg L^{-1} and D: 1.5 mg L^{-1}) doses; we therefore analyze their data separately.

3.4 Dose effect according to contamination duration and selection of most discriminant features

Our first observation regarding the dose effect was that the higher was the dose, the greater was the robustness of the discrimination. This was assessed by the R2Y and Q2Y values of the models built on all time points (models 1, 5, 9 and 13, Table 2, panel B), which were all validated according to their CV-ANOVA (p values ranging from $2.23\text{e}-05$ to $2.44\text{e}-23$ for the B and E doses, respectively). Indeed, when increasing the dose of contamination, the observed variance (R2Y value) of the model increased (27, 57, 53 and 77 %, for the B (0.015 mg L^{-1}), C (0.15 mg L^{-1}), D (1.5 mg L^{-1}) and E (40 mg L^{-1}) doses, respectively), as did the predicted variance (Q2Y value) (17, 40, 33 and 70 % for the B (0.015 mg L^{-1}), C (0.15 mg L^{-1}), D (1.5 mg L^{-1}) and E (40 mg L^{-1}) doses, respectively).

We thereafter focused on the effect of the contamination duration for the E-dose. We observed that the discrimination between control and contaminated rats for this low dose started as a strong trend from 3 months of contamination onward (model 14, Table 2, panel B; R2Y = 81 %, Q2Y = 58 %) and increased with contamination duration after 6 months (model 15, Table 2, panel B; R2Y = 82 % and Q2Y = 64 %), and after 9 months (model 16, Table 2, panel B; R2Y = 84 % and Q2Y = 70 %). We selected the features most strongly associated with NU contamination after 3, 6 and 9 months (23, 34 and 29 features selected, respectively; data not shown), and compared the selection lists to each other to check for a set of features associated with NU contamination whatever the duration: 14 features were common to at least 2 contamination durations (Fig. 3, features in the “Low dose” group).

Thirdly, we scrutinized the effect of the contamination duration for the other lower doses. Except for the C-dose contamination, the data did not show results as easy to interpret as those obtained for the E-dose (0.15 mg). No supervised discrimination was achieved for the B-dose (0.015 mg) contamination whatever the duration (models 2, 3 and 4, Table 2, panel B). It remains unclear whether this result is explained by the too-low dose level or by too few observations, since discrimination was achieved on the model built with all time points (model 1, Table 2, panel B). For the C-dose (0.15 mg) contamination, a trend towards discrimination appeared after 6 months of contamination (model 7, Table 2, panel B; R2Y = 47 %,

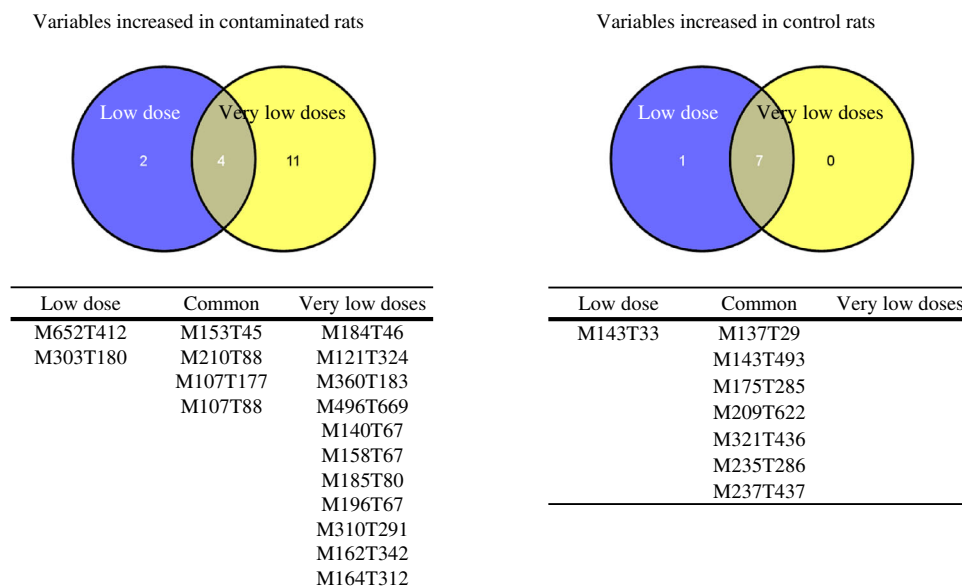


Fig. 3 Selection of the most robust features associated with low- and very low-dose exposure to natural uranium. Using Venn diagrams, the 14 features associated to the E-dose contamination whatever the duration of the contamination (“Low dose” group) were compared to

the 22 features associated to any of the other doses of contamination (B, C and D) when pooling all time points together (“Very low dose” group)

Q2Y = 17 %) and was stronger after 9 months (model 8, Table 2, panel B; R2Y = 52 %, Q2Y = 30 %). For the D-dose (1.5 mg) contamination, a trend was observed after 3 months (model 10, Table 2, panel B; RY2 = 62 %, Q2Y = 34 %), but was no longer observed after 6 or 9 months of contamination (models 11 and 12, Table 2, panel B, respectively). To smooth the inconstancy of the time effect, we then considered all the time points together to seek for discriminating features of contamination (models 1, 5 and 9, Table 2, panel B). There were 31 features highly responsible for discriminating the control group from the B-dose (0.015 mg L⁻¹) group (model 1), 26 from the C-dose (0.15 mg L⁻¹) group (model 5), and 28 from the D-dose (1.5 mg L⁻¹) group (model 9). Among those features, 22 were common to at least 2 contamination doses (Fig. 3, features in the “Very low doses” group).

To achieve a robust feature selection, we compared the 14 features associated to the E-dose contamination whatever the duration (Fig. 3, group “Low dose”) to the 22 features associated to the other doses of contamination when pooling all time points together (Fig. 3, group “Very low doses”). Eleven features were common to both groups, 4 of which were increased in contaminated rats (Fig. 3, table on the left, middle column) and 7 were increased in control rats (Fig. 3, table on the right, middle column). When compared to control rats, 4 ROC-AUCs were

computed for each of these 11 features the most associated with chronic low and very-low dose natural uranium contamination: (Supplemental Table 1). Of the 11 features, 10 had at least one ROC-AUC value >70 %, 6 of the 11 >80 %.

Finally, we used these 11 most robust discriminant features to build four composite scores: one for all time points and one for each single time point (3, 6 and 9 months). The PLS-DA models computing the composite scores were estimated (R2Y = 19.2 % and Q2Y = 14.3 % for the one built at all time points) and validated (CV-ANOVA <0.001 and a highly convincing permutation test). As the boxplots show, composite scores discriminated well between the control and contaminated groups, both for all time points (Fig. 4a) and for each single time point (Supplemental Fig. 2). The ROC curves and their AUC further demonstrated the robustness of these composite scores (Fig. 4b; Supplemental Fig. 2). All ROC-AUC values were greater than 81.5 (the B dose after 3 months of contamination). The best composite scores were observed for the C (94.8 %) and E (96.1 %) doses for all time points. The composite score even predicted discrimination between the control and contaminated groups at almost 100 % (ROC-AUC = 99.2 %, Supplemental Fig. 2) for the E dose after 9 months of contamination.

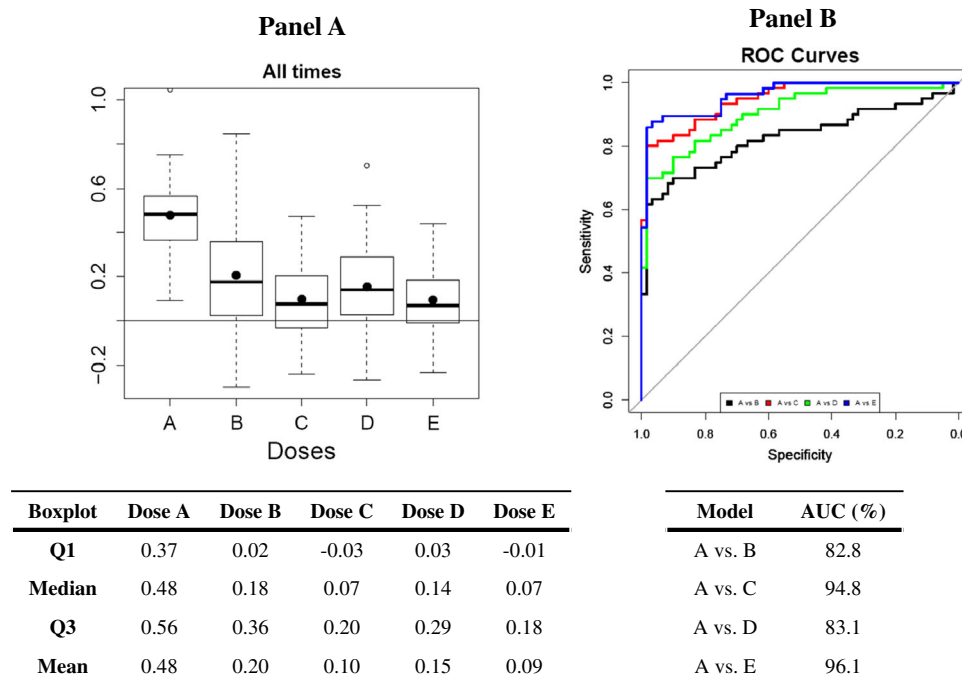


Fig. 4 Composite score built for all time points with the 11 features most associated with exposure to natural uranium (A control; B, contamination dose of 0.015 mg L⁻¹; C 0.15 mg L⁻¹; D

1.5 mg L⁻¹; E 40 mg L⁻¹) **a** Boxplots. **b** ROC curves and area under the ROC curves (AUC)

3.5 Identification of the most discriminant features associated with chronic low-dose contamination by natural uranium

We analyzed and tested 20 standard molecules for a match with the 11 top discriminant features common to all doses, and with the next 14. Five features were identified as existing metabolites: 3 among the 11 most discriminant features (N1-methylnicotinamide, N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, and 4-hydroxyphenylacetyl-glycine) and 2 of the other 14 (L- α -lysophosphatidylcholine and 4-pyridoxic acid). Identifications were confirmed according to high resolution retention time, accurate mass of parent ion, molecular formula based upon accurate m/z and isotope pattern, accurate mass tandem mass spectrum and, when available, matches to spectral libraries (Supplemental Fig. 3–7). According to the newly proposed scoring system for reporting metabolite identification (Sumner et al. 2014), these molecules all had score values higher than 11, which is the value proposed for confident identification (when not taking spectral libraries into account).

N1-methylnicotinamide was detected as [M1+] (m/z 137.07) in both standard solution and experimental sample at 29–30 s. Fragmentation spectra were superimposable and showed a major fragment at m/z 94.06 (Supplemental Fig. 3). This metabolite was previously identified in our proof-of-principle study (Grison et al. 2013). Such a fragmentation spectrum was recorded in the Human Metabolome Database (HMDB00699).

N1-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide was detected as [M + H] (m/z 153.06), along with its sodium adduct (m/z 175.05), in both the standard solutions and experimental samples at 50–53 s. Fragmentation spectra were superimposable and showed a major fragment at m/z 108.04 (Supplemental Fig. 4). No spectral data were available in databases.

4-Hydroxyphenylacetyl-glycine was detected as [M + H] (m/z 210.08), along with its sodium and potassium adducts (m/z 232.06 and 248.03, respectively), in both the standard solution and experimental sample at 123–126 s. Fragmentation spectra were superimposable and showed a major fragment at m/z 107.05, as recorded in the Human Metabolome Database (HMDB00735) (Supplemental Fig. 5). Both [M + H] and its fragment were in the top 11 discriminant features.

L- α -Lysophosphatidylcholine from egg yolk (with its usual fatty acid contents of approximately 66 % palmitic and 33 % stearic acids) was detected as [M + H] (m/z 496.34), along with its sodium adduct (m/z 518.32), in both the standard solution and experimental sample at 672–676 s. Both peaks had similar split shapes, corresponding to the isomerization of the molecule. Fragmentation spectra were superimposable and showed two major

fragments at m/z 104.10 and 184.07, corresponding to choline and phosphorylcholine, respectively (Supplemental Fig. 6). Such losses are described for phosphatidylcholine (Metlin spectra for MID182) but no spectra was available for LysoPC.

Finally, 4-pyridoxic acid was detected as [M + H] (m/z 184.06), along with a small peak corresponding to water loss (m/z 166.06), in both the standard solution and experimental sample at 60–61 s. Fragmentation spectra were superimposable and showed three major fragments at m/z 166.05, 148.04 and 138.05, as recorded in the Human Metabolome Database (HMDB00017) (Supplemental Fig. 7).

4 Discussion

Although some molecular studies report biological effects after exposure to low doses of chemical compounds dispersed in the environment (Xu et al. 2013; Bonvallot et al. 2013; Rochester 2013; Dudka et al. 2014), few have described the biological mechanisms underlying the effects of radionuclides. The metabolomic approach appears relevant for improving knowledge in this field: it is very sensitive and holistic, because it measures the end products of the metabolism, close to the individual phenotype. With regards to the peculiar issue of radionuclides intake, additional studies performed with cesium 137 or strontium 90 have also described specific metabolic profiles that demonstrated the interest of untargeted metabolomics in the field of radioprotection (Gouzarzi et al. 2016; Grison et al. 2012, 2013). Furthermore, studies performed in the field of external ionizing radiations found similar interests (Gouzarzi et al. 2014; Johnson et al. 2012). Targeted studies focused on several biological parameters, but not on the whole metabolome, also reported molecular imbalances consistent with the present metabolomics results (Dublineau et al. 2014).

The overall aim of this study was to discover markers of low-dose exposure to uranium. Our initial goal, therefore, was to confirm our previous results, namely the biological response of rats to chronic low-dose contamination (40 mg L⁻¹) for 9 months (Grison et al. 2013). As previously shown in the first cohort, our metabolomic approach enabled robust discrimination of exposed from control animals, even though standard clinical analyses revealed no significant differences between them. This confirms the analytical robustness of metabolomics in the field of low doses exposure.

The second goal of this study was to assess the minimal dose required to detect a measurable biological effect of uranium contamination in urine. We observed a shift in the metabolic profiles of the rats at a dose as low as

0.15 mg L⁻¹ (“C dose”). It should be noted that this dose is only 5 times higher to the maximum dose recommended by the 2013 WHO drinking-water guideline (0.03 mg L⁻¹) and that it is able to induce a measurable metabolic disruption after 9 months of contamination, and after only 6 months for the highest contamination dose tested (40 mg L⁻¹). This could suggest that the threshold for a dose effect in urine in our experimental model would lie between 0.015 and 0.15 mg L⁻¹. This analytical approach thus appears to be quite suitable for studies focused on low and very low doses of environmental pollutants such as radionuclides. Indeed, this work showed that metabolomics is able to identify contaminated rats despite normal level of clinical chemical markers. At the “D-dose” (1.5 mg L⁻¹), our approach no longer discriminated between the control and contaminated groups at 6 or 9 months, although it had done so after 3 months of exposure. This nonlinear effect observed could constitute the threshold of response above which physiological tolerance is impaired, and below which biological response is related only to non-detrimental exposure. Such a dose dependent cellular adaptive mechanism has been described for both low doses (Calabrese 2004) and low-dose irradiation (Tang and Loke 2015). However, this issue must be deepened in future work to allow conclusions.

The third objective of our study was to identify a panel of urinary features highly associated with chronic exposure to low doses of natural uranium with the ultimate aim of discovering potential biomarkers of exposure. According to the results of the present study and to those of a recent study (Bonvallot et al. 2013), metabolomics confirms its relevance in the field of low dose environmental exposures to find new biological markers of low dose chronic exposure. By using the top-ranked features shared in the different statistical models discriminating control and contaminated rats (for all contamination doses and durations), we were able to select 11 features independently of doses (Fig. 3). To evaluate the possibility of using them as biomarkers of uranium exposure, we assessed their robustness by calculating their ROC curves and AUC values. The latter ranged from 58 to 80 %, which is good but not good enough to assure the use of these features alone as a diagnostic biomarker. On the other hand, the composite score built on these 11 features had AUC values ranging from 83 to 96 % (depending on the dose), which is more than satisfactory and suggests the value of using a combination of a few biomarkers instead of just one to develop a diagnostic test of exposure. As an example, this methodological approach was recently applied successfully to insulin resistance and prediabetes (Cobb et al. 2013). Such a diagnostic test for uranium exposure would be valuable, not only for screening exposed populations, but also for monitoring immediate and persistent metabolic changes among them, as a tool for early diagnosis of any

disorders or even any risk of pathology induced by this chronic low-dose exposure.

Of course, the use of these features is not sufficient to build a diagnostic test because this requires identifying and quantifying metabolites. Accordingly, we confidently identified 5 metabolites (scores of 11), including N1-methylnicotinamide (NMN), N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (NMPC), and 4-hydroxyphenylacetyl-glycine. The latter is involved in tyrosine metabolism and its concentration increases in the urine of contaminated rats (1.5 times on average). NMN and NMPC are involved in the metabolism of nicotinate and nicotinamide; urinary concentration of NMPC (the oxidation product of NMN) increases with contamination (1.5 times on average) while NMN concentration decreases (4.2 times on average). Our previous cohort study had already identified NMN (Grison et al. 2013), the concentration of which varied in the same direction. NMN clearance by kidneys is known to decrease in experimental renal failure (affecting the renal tubule) induced by chemical substances such as uranium nitrate, injected in rats at an acute high dose of 5 mg kg⁻¹ (Shim et al. 1984). Another study reported a cortical uptake of NMN in rats after a single uranium nitrate injection at doses of 6, 1 and 0.5 mg kg⁻¹ (Hirsch 1972). Recently, NMN was proposed as an endogenous probe for the evaluation of organic cation secretion in proximal tubules and of drug interactions with renal organic cation transporters (Ito et al. 2012; Müller et al. 2015). Moreover, uranium ingested chronically through drinking water at a dose of 40 mg L⁻¹ accumulates primarily in the proximal tubules during the first 12 month and thereafter can be detected in all other segments of the nephron (Tessier et al. 2012). Finally, it has been reported that a single high dose of uranium (10 mg kg⁻¹ in rats) causes structural damage to the renal proximal tubules (Haley et al. 1982). In this as in our previous study (Grison et al. 2013), NMN concentration decreased in the urine of the chronically contaminated rats, although these studies used lower doses of uranium than those cited above. In our experiments, the contaminated rats ingested on average only 1.7 mg day⁻¹ kg⁻¹ through drinking water (40 mg L⁻¹) and no more than 0.4 % of it goes to the blood compartment. As with previous acute higher doses, chronic low-dose contamination by uranium also appears to decrease NMN renal clearance. One hypothesis to explain this reduction in the urinary concentration of NMN might be that uranium interacts with the renal secretion mechanisms of organic cation (Supplemental Fig. 8): uranium intake at a very low dose appears able to modify organic cation clearance without any renal tubular toxicity. This result might be interpreted as an early functional disorder in the kidneys that might lead to later morbidity. It also raises the question of the risk of drug-uranium interactions, which might lead to the onset

of nephropathies. As a significant example of a possible functional effect in kidney, another study based on the effects of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium (Gueguen et al. 2007) has showed an increase of this last in plasma of rats exposed with uranium. According to our present hypothesis, this observation could be a consequence of drug-uranium interaction in kidneys, therefore changing the pharmacokinetics of acetaminophen. In any case, this observation seems to support the utility of these metabolites as sentinels for detecting early kidney disorders induced by uranium contamination, before any clinical signs appear. This study also demonstrates the interest of an omics approach to discover markers associated with biological low dose effects, such as the discovery of NMN as a candidate marker of renal function in the case of uranium intake. In conclusion, metabolomics studies focusing on the effects of either ionizing radiation or radionuclides intake has revealed, specific signatures of such exposures (Goudarzi et al. 2016; Grison et al. 2013; Johnson et al. 2012; Grison et al. 2012; Lestaevel et al. 2016). The present study adds further evidence that untargeted metabolomics could be a powerful approach to investigating low-dose ionizing and chemical effects in the field of radiotoxicology and might be successfully extended to molecular epidemiological studies assessing radiological hazards. This work must be completed with additional experimental studies (i) to test additional biological matrices, (ii) to validate the nonlinear dose–effect response observed in urine and (iii) to examine major confounding factors such as species, gender and age (Clayton and Collins 2014; Slupsky et al. 2007). Our experimental study suggests the possibility of developing a diagnostic test sufficiently sensitive to screen and monitor populations exposed chronically to very low doses of radionuclides likely to cause subtle biological effects. It would also help to answer societal questions about environmental exposures and low-dose risks. The results displayed also allowed to provide some explanations with regards to the biological mechanisms triggered by low dose uranium exposure and even the risk of adverse effects in organ function. Finally, it could also help to provide epidemiological data to improve public health regulation and thereby contribute to updating future health standards.

Acknowledgments This study was partly supported by grants from AREVA. The authors would like to thank Frederic Voyer, Thierry Loiseau and Jean-Michel Guischet for expert animal care.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Bonvallot, N., Tremblay-Franco, M., Chevrier, C., Canlet, C., Warem-bourg, C., Cravedi, J. P., et al. (2013). Metabolomics tools for describing complex pesticide exposure in pregnant women in Brittany (France) [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS One*, 8(5), e64433. doi:10.1371/journal.pone.0064433.
- Calabrese, E.J. (2004). Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *EMBO Reports*, 5 Spec No, S37–40. doi:10.1038/sj.embor.7400222.
- Clayton, J. A., & Collins, F. S. (2014). Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature*, 509(7500), 282–283.
- Climaco Pinto, R., Bosc, V., Noçairi, H., Barros, A., & Rutledge, D. (2008). Using ANOVA-PCA for discriminant analysis: application to the study of mid-infrared spectra of carrageenan gels as a function of concentration and temperature. *Analytica Chimica Acta*, 629(1–2), 47–55.
- Cobb, J., Gall, W., Adam, K. P., Nakhle, P., Button, E., Hathorn, J., et al. (2013). A novel fasting blood test for insulin resistance and prediabetes. [Clinical Trial; Research Support, Non-U.S. Gov't; Validation Studies]. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 7(1), 100–110.
- Draper, J., Enot, D. P., Parker, D., Beckmann, M., Snowdon, S., Lin, W., et al. (2009). Metabolite signal identification in accurate mass metabolomics data with MZedDB, an interactive m/z annotation tool utilising predicted ionisation behaviour 'rules'. *BMC Bioinformatics*, 10, 227.
- Dublineau, I., Souidi, M., Gueguen, Y., Lestaevel, P., Bertho, J. M., Manens, L., et al. (2014). Unexpected lack of deleterious effects of uranium on physiological systems following a chronic oral intake in adult rat [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2014/181989.
- Dudka, I., Kossowska, B., Senhadri, H., Latajka, R., Hajek, J., Andrzejak, R., et al. (2014). Metabonomic analysis of serum of workers occupationally exposed to arsenic, cadmium and lead for biomarker research: a preliminary study. *Environment International*, 68C, 71–81. doi:10.1016/j.envint.2014.03.015.
- Dunn, W. B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-McIntyre, S., Anderson, N., et al. (2011). Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry [Research Support, Non-US. Gov't]. *Nature Protocols*, 6(7), 1060–1083. doi:10.1038/nprot.2011.335.
- Ejnik, J. W., Hamilton, M. M., Adams, P. R., & Carmichael, A. J. (2000). Optimal sample preparation conditions for the determination of uranium in biological samples by kinetic phosphorescence analysis (KPA). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(2), 227–235.
- Frisbie, S. H., Mitchell, E. J., & Sarkar, B. (2013). World Health Organization increases its drinking-water guideline for uranium [Research Support, Non-US. Gov't]. *Environment Science Process Impacts*, 15(10), 1817–1823. doi:10.1039/c3em00381g.
- Goudarzi, M., Chauthe, S., Strawn, S. J., Weber, W. M., Brenner, D. J., & Fornace, A. J. (2016). Quantitative metabolomic analysis of

- urinary citrulline and calcitric acid in mice after exposure to various types of ionizing radiation. *International journal of molecular sciences*, 17(5), 782. doi:10.3390/ijms17050782.
- Goudarzi, M., Mak, T. D., Chen, C., Smilenov, L. B., Brenner, D. J., & Fornace, A. J. (2014). The effect of low dose rate on metabolomic response to radiation in mice. *Radiation and Environmental Biophysics*. doi:10.1007/s00411-014-0558-1.
- Griffin, J. L., Walker, L. A., Shore, R. F., & Nicholson, J. K. (2001). Metabolic profiling of chronic cadmium exposure in the rat. *Chemical Research in Toxicology*, 14(10), 1428–1434.
- Grison, S., Fave, G., Maillot, M., Manens, L., Delissen, O., Blanchardon, E., et al. (2013). Metabolomics identifies a biological response to chronic low-dose natural uranium contamination in urine samples. *Metabolomics*, 9, 1168–1180. doi:10.1007/s11306-013-0544-7.
- Grison, S., Martin, J. C., Grandcolas, L., Banzet, N., Blanchardon, E., Tourlonias, E., et al. (2012). The metabolomic approach identifies a biological signature of low-dose chronic exposure to cesium 137. *Journal of Radiation Research*, 53(1), 33–43.
- Gueguen, Y., Grandcolas, L., Baudelin, C., Grison, S., Tissandie, E., Jourdain, J. R., et al. (2007). Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium. *Toxicology*, 229(1–2), 62–72.
- Haley, D. P., Bulger, R. E., & Dobyhan, D. C. (1982). The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 41(1–2), 181–192.
- Harrington, P. B., Vieira, N. E., Espinoza, J., Nien, J. K., Romero, R., Yergey, A. L., et al. (2005). Analysis of variance–principal component analysis: a soft tool for proteomic discovery. *Analytica Chimica Acta*, 544(1–2), 118–127.
- Hirsch, G. H. (1972). Stimulation of renal organic base transport by uranyl nitrate. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 50(6), 533–538.
- Hu, Q. H., Weng, J. Q., & Wang, J. S. (2010). Sources of anthropogenic radionuclides in the environment: a review. [Review]. *Journal of Environmental Radioactivity*, 101(6), 426–437. doi:10.1016/j.jenvrad.2008.08.004.
- Ito, S., Kusuhara, H., Kumagai, Y., Moriyama, Y., Inoue, K., Kondo, T., et al. (2012). N-methylnicotinamide is an endogenous probe for evaluation of drug–drug interactions involving multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) [Clinical Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 92(5), 635–641. doi:10.1038/clpt.2012.138.
- Johnson, C. H., Patterson, A. D., Krausz, K. W., Kalinich, J. F., Tyburski, J. B., Kang, D. W., et al. (2012). Radiation metabolomics. 5. Identification of urinary biomarkers of ionizing radiation exposure in nonhuman primates by mass spectrometry-based metabolomics [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, N.I.H., Intramural Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Radiation Research*, 178(4), 328–340.
- Kathren, R. L., & Burklin, R. K. (2008). Acute chemical toxicity of uranium. *Health Physics*, 94(2), 170–179.
- Lestaevel, P., Grison, S., Fave, G., Elie, C., Dhieux, B., Martin, J. C., et al. (2016). Assessment of the central effects of natural uranium via behavioural performances and the cerebrospinal fluid metabolome. *Neural Plast*, 2016, 9740353. doi:10.1155/2016/9740353.
- MacKenzie, A. B. (2000). Environmental radioactivity: experience from the 20th century–trends and issues for the 21st century. [Review]. *Science of the Total Environment*, 249(1–3), 313–329.
- Martin, J. C., Maillot, M., Mazerolles, G., Verdu, A., Lyan, B., Migne, C., et al. (2015). Can we trust untargeted metabolomics? Results of the metabo-ring initiative, a large-scale, multi-instrument inter-laboratory study. *Metabolomics*, 11(4), 807–821. doi:10.1007/s11306-014-0740-0.
- Morgan, W. F., & Bair, W. J. (2013). Issues in low dose radiation biology: the controversy continues. A perspective [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.Review]. *Radiation Research*, 179(5), 501–510. doi:10.1667/RR3306.1.
- Müller, F., Pontones, C., Renner, B., Mieth, M., Hoier, E., Auge, D., et al. (2015). N(1)-methylnicotinamide as an endogenous probe for drug interactions by renal cation transporters: studies on the metformin-trimethoprim interaction. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 71(1), 85–94.
- Oliveros, J. (2007). VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn diagrams.
- Papadopoulou, F., & Efthimiou, E. (2009). Thyroid cancer after external or internal ionizing irradiation [Review]. *Hellenic journal of nuclear medicine*, 12(3), 266–270.
- Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: a review of the literature [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Reproductive Toxicology*, 42, 132–155. doi:10.1016/j.reprotox.2013.08.008.
- Salonen, L. (1994). 238U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock. Proceedings of the Helsinki conference. IAHS Publication, 222, 71.
- Shim, C. K., Sawada, Y., Iga, T., & Hanano, M. (1984). Estimation of renal secretory function for organic cations by endogenous N1-methylnicotinamide in rats with experimental renal failure. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 12(1), 23–42.
- Slupsky, C. M., Rankin, K. N., Wagner, J., Fu, H., Chang, D., Weljie, A. M., et al. (2007). Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles [Research Support, Non-US. Gov't]. *Analytical Chemistry*, 79(18), 6995–7004. doi:10.1021/ac0708588.
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006). XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Analytical Chemistry*, 78(3), 779–787. doi:10.1021/ac051437y.
- Sumner, L. W., Lei, Z., Nilolau, B. J., Saito, K., Roessner, U., & Trengove, R. (2014). Proposed quantitative and alphanumeric metabolite identification metrics. *Metabolomics*, 10, 350–353.
- Tang, F. R., & Loke, W. K. (2015). Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability. *International Journal of Radiation Biology*, 91(1), 13–27. doi:10.3109/09553002.2014.937510.
- Tessier, C., Suhard, D., Rebiere, F., Souidi, M., Dublineau, I., & Agarande, M. (2012). Uranium microdistribution in renal cortex of rats after chronic exposure: a study by secondary ion mass spectrometry microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 18(1), 123–133. doi:10.1017/S1431927611012384.
- UNSCEAR (Ed.) (2008). Sources and effects of ionizing radiation report (Vol. 1, Annexes B). New York: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation.
- van der Kloet, F. M., Bobeldijk, I., Verheij, E. R., & Jellema, R. H. (2009). Analytical error reduction using single point calibration for accurate and precise metabolomic phenotyping [Evaluation Studies]. *Journal of Proteome Research*, 8(11), 5132–5141. doi:10.1021/pr900499r.
- Wappelhorst, O., Kuhn, I., Heidenreich, H., & Markert, B. (2002). Transfer of selected elements from food into human milk. *Nutrition*, 18(4), 316–322.
- Xu, T., Holzapfel, C., Dong, X., Bader, E., Yu, Z., Prehn, C., et al. (2013). Effects of smoking and smoking cessation on human serum metabolite profile: results from the KORA cohort study [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *BMC Medicine*, 11, 60. doi:10.1186/1741-7015-11-60.
- Zwanenburg, G., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Jansen, J. J., & Smilde, A. K. (2011). ANOVA–principal component analysis and ANOVA–simultaneous component analysis: a comparison. *Journal of Chemometrics*, 25(10), 561–567.

2. ARTICLE II :

Application d'une approche multiéchelle des systèmes biologiques pour étudier l'effet d'une exposition chronique à faible dose d'uranium dans les reins de rat

Applying a multi-Scale Systems Biology Approach to study the effect of chronic low-dose exposure to uranium in rat kidneys

Grison, S., Kereselidze, D., Cohen, D, Gloaguen, C., Elie, C., Lestaevel, P., Legendre, A., Manens, L., Habchi B., Benadjaoud M.A., Tarlet G., Milliat F., Martin, J.C., Lobaccaro, J. M., & Souidi, M. Soumis en septembre 2018 dans. *Int J Radiat Biol.*

Dans un contexte de questionnement sur les effets des expositions chroniques à faibles doses, cette étude se base sur une approche systémique d'analyse biologique (biologie des systèmes ou biologie intégrative) pour suivre les effets des contaminations chroniques à l'uranium. Elle cherche à mettre en évidence des profils différents à différents niveaux moléculaires, en s'intéressant préférentiellement au rein comme organe cible de la toxicité de l'uranium.

Pour cette étude, des analyses à haut débit seront réalisées à différents niveaux organisationnels de l'échelle des systèmes de régulation moléculaires que sont l'épigénétique (expression des micro-ARNs), l'expression génique (expression de ARNm) et les métabolismes (analyse du métabolome) à partir de différentes matrices biologiques (sang, urine et rein) de rats mâles et femelles. Cette étude permettra d'apprécier l'impact biologique d'une exposition à l'uranium en s'intéressant au dimorphisme sexuel des animaux qui pourrait révéler des différences de sensibilité à l'uranium.

Un protocole de contamination chronique *in vivo* de rats mâles et femelles a été élaboré. Dès leur naissance, les animaux ont été contaminés pendant 9 mois par ingestion d'une solution hydrique d'uranium à la concentration de 40 mg.L⁻¹ (concentration non néphrotoxique utilisée dans les études précédentes [137, 195]).

Parallèlement au protocole de contamination, un suivi clinique classique des animaux est réalisé (prise de poids, prise alimentaire et hydrique, suivi biochimique). Des analyses « omiques » sont aussi réalisées à partir d'échantillon de plasma, d'urine et de biopsies de rein.

Ces analyses se sont principalement concentrées sur trois systèmes moléculaires précurseurs du déterminisme phénotypique. Elles mesureront les niveaux d'expression des micro-ARNs (du rein), d'expression génique des ARN messagers (du rein) et finalement les fluctuations observables au niveau du métabolome du plasma, de l'urine et du rein.

Les résultats de cette étude ont montré par analyse métabolomique des reins, des effets biologiques de l'uranium qui diffèrent faiblement entre les animaux mâles et femelles. Si l'uranium a un effet sur le rein des animaux mâles et femelles, un quart des signaux analytiques discriminants observés dans les reins des animaux contaminés sont spécifiques au sexe.

En conclusion, le dimorphisme sexuel semble avoir peu d'influence sur le niveau de réponse biologique des reins à l'uranium.

Cette différence de réponse attribuable au sexe est par contre beaucoup plus nette dans le plasma (avec 50 % de signaux spécifiques au sexe) et plus encore dans l'urine (avec 80 % des signaux spécifiques au sexe).

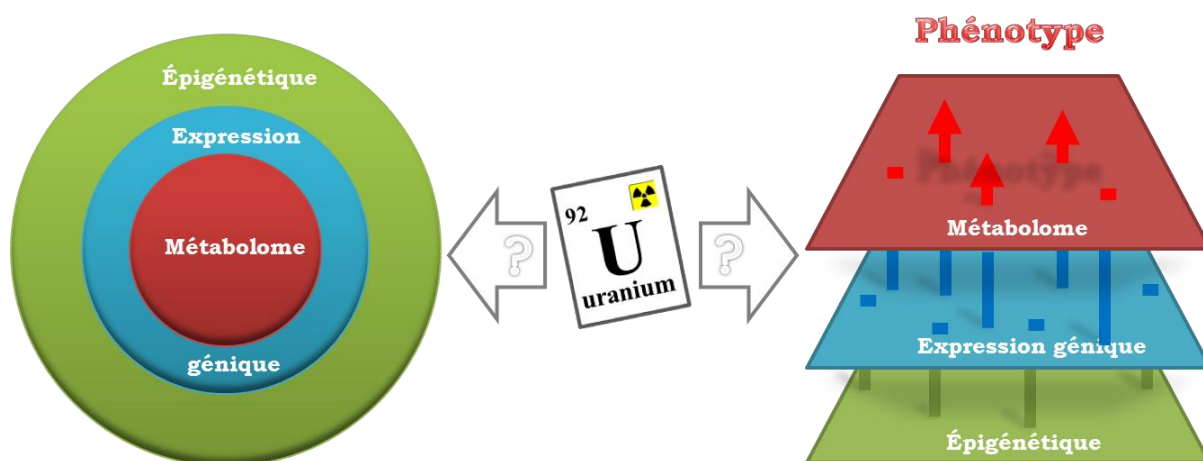
Une identification putative des signaux métaboliques discriminants fait ressortir l'existence de liens mécanistiques entre les profils urinaires et rénaux. Ces liens ciblent principalement les voies associées aux métabolismes du nicotinate-nicotinamide et de la biosynthèse des acides gras insaturés. Ce résultat suggère que ces voies pourraient être les principales cibles métaboliques de l'uranium dans le rein.

D'un point de vue mécanistique, une observation réalisée au niveau génique, pourrait compléter ces premiers résultats.

L'analyse exhaustive des ARNs extraits des reins de rats mâles révèle des profils d'activité génique différents chez les animaux contaminés. Ce résultat montre qu'à ce niveau de dose, certains gènes sont des cibles de l'uranium. Une identification des gènes d'intérêt impliqués dans la réponse cellulaire à l'uranium, révèle une activité génique associée aux processus de signalisation cellulaire, de structuration cellulaire, développementaux de prolifération cellulaire et d'apoptose qui pourraient être des cibles géniques de l'uranium.

Pour confirmer ces résultats d'activité génique obtenus par contamination à l'uranium, l'analyse d'un système épigénétique de régulation post-transcriptionnelle révèle aussi une activité liée à l'uranium par l'identification un groupe de 70 micro-ARNs différemment exprimés dans les reins des animaux mâles contaminés.

À ce niveau de l'étude, une question reste en suspens au sujet des relations moléculaires qui pourraient exister entre ces différents systèmes de régulations moléculaires (épigénétique, transcriptomique et métabolique). Une analyse intégrative des systèmes biologiques pourrait permettre de lier l'ensemble des résultats et révéler des liens mécanistiques entre les différentes entités (**Figure 30**). Cette approche multiéchelle pourrait fournir de nouvelles informations mécanistiques permettant de qualifier la réponse cellulaire à l'uranium.



Article II; Figure 3

Figure 30 : représentation multiéchelle d'une analyse systémique des effets biologiques d'une exposition chronique faible dose à l'uranium dans le rein

Pour conclure, une approche d'analyse multiomique des résultats obtenus révèlent l'existence d'une réponse biologique multiéchelle par observation de profils moléculaires différemment exprimés.

Cette observation montre que l'utilisation de techniques sensibles à haut débit permet de mettre en évidence des effets moléculaires significatifs entre les systèmes de régulations épigénétiques et géniques. Ces effets des faibles doses d'uranium pourraient se traduire par une modification du métabolome rénal et par conséquent affecter certains métabolismes.

Dans cette étude, les métabolismes du nicotinate-nicotinamide et de la biosynthèse des acides gras insaturés semblent être les principales cibles moléculaires de l'exposition à l'uranium au niveau des reins

L'analyse combinée des niveaux d'expression épigénétique et génique (micro-ARN et ARNm), permet d'identifier une activité multiéchelle sur le métabolisme des acides gras. Associée à l'observation d'une activité génique au niveau des processus de régulation, de signalisation, de structuration, de développement et de prolifération cellulaire et d'apoptose, l'hypothèse d'un effet biologique de l'uranium lié à un stress oxydatif et à une réponse immunitaire à l'uranium peut être formulée.

Ces résultats montrent aussi que la biologie intégrative est tout à fait pertinente dans le domaine des expositions de faible niveau pour observer et décrypter les mécanismes moléculaires qui pourraient être impliqués dans la réponse cellulaire à une exposition chronique à l'uranium.

Cette compréhension nécessite néanmoins d'aborder la complexité mécanistique du vivant dans sa globalité et de manière plus intégrée et plus approfondie.

A ce stade de l'étude, un grand nombre d'observations d'effets moléculaires ne présentent aucun lien entre les différents niveaux moléculaires. Ce constat est certainement lié aux décalages temporels observables dans les cinétiques d'action moléculaire des différents systèmes biologiques et des seuils de réponses moléculaires nécessaires pour assurer la continuité réactionnelle entre systèmes de régulation.

Fort de ce constat, la nécessité de réaliser des études longitudinales basées sur la mise en œuvre de suivis temporels des fluctuations de niveaux moléculaires s'impose. Or, à cause de la complexité et de la multiplicité des événements dynamiques à analyser, ces nouvelles approches toxicologiques qui s'intéressent à l'impact d'effets biologiques de faibles amplitudes, couverts par le bruit de fond environnemental (exposome) ne pourront se faire que par un investissement fort et par la collaboration de différentes sciences analytiques, capables d'analyser, de modéliser et de comprendre le sens des résultats observés.

La réalisation d'approches multidisciplinaires alliant épidémiologie, chimie analytique, biologie, mathématiques, statistiques et bioinformatique est devenue incontournable et nécessaire à l'expertise des effets des expositions environnementales sur les populations, et particulièrement dans le domaine des faibles doses.

Applying a multiscale systems biology approach to study the effect of chronic low-dose exposure to uranium in rat kidneys

Authors:

Stéphane Grison¹, Dimitri Kereselidze¹, David Cohen¹, Céline Gloaguen¹, Christelle Elie¹, Philippe Lestaevel¹, Audrey Legendre¹, Line Manens¹, Baninia Habchi⁴, Mohamed Amine Benadjaoud², Georges Tarlet³, Fabien Milliat³, Jean-Charles Martin⁴, Jean-Marc Lobaccaro⁵, Maâmar Souidi¹.

¹Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, PSE-SANTE, SESANE, LRTOX, Fontenay-aux-Roses, F-92260 France

²Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, PSE-SANTE, SERAMED, Fontenay-aux-Roses, F-92206 France

³Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, PSE-SANTE, SERAMED, LRMed, Fontenay-aux-Roses, F-92206 France

⁴Aix Marseille Université (AMU), NORT, UMR INSERM 1062, INRA 1260, F13005 Marseille, France

⁵Université Clermont Auvergne, GReD, UMR CNRS6293-INSERM U1103, Aubière, F-63001 France

Abstract:

Purpose: To examine the effects of low-dose exposure to uranium with a systems biology approach, a multiscale high-throughput multi-omics analysis was applied with a protocol for chronic exposure to the rat kidney.

Methods: Male and female rats were contaminated for nine months through their drinking water with a nontoxic solution of uranyl nitrate. A multiscale approach enabled clinical monitoring associated with metabolomic and transcriptomic (mRNA and microRNA) analyses.

Results: A sex-interaction effect was observed in the kidney, urine, and plasma metabolomes of contaminated rats. Moreover, urine and kidney metabolic profiles correlated and confirmed that the primary dysregulated metabolisms are those of nicotinate-nicotinamide and of unsaturated fatty acid biosynthesis. Upstream of the metabolic pathways, transcriptomic profiles of the kidney reveal gene activity focused on gene regulation mechanisms, cell signaling, cell structure, developmental processes, and cell proliferation.

Examination of epigenetic post-transcriptional gene regulation processes showed significant dysregulation of 70 micro-RNAs.

The multi-omics approach highlighted the activities of the cells' biological processes on multiple scales through analysis of gene expression, confirmed by changes observed in the metabolome.

Conclusion: Our results showed changes in multi-omic profiles of rats exposed to low doses of uranium contamination, compared with controls. These changes involved gene expression

1
2
3 as well as modifications in the transcriptome and the metabolome. The metabolomic profile
4
5 confirmed that the main molecular targets of uranium in kidney cells are the metabolism of
6
7 nicotinate-nicotinamide and the biosynthesis of unsaturated fatty acids. Additionally, gene
8
9 expression analysis showed that the metabolism of fatty acids is targeted by processes
10
11 associated with cell function. These results demonstrate that multiscale systems biology is
12
13 useful in elucidating the most discriminative pathways from genomic to metabolomic levels
14
15 for assessing the biological impact of this low-level environmental exposure, *i.e.*, the
16
17 exposome.
18
19
20
21
22
23
24

25 **Keywords:**

26
27 Systems biology, uranium, low-dose, omics, sex difference
28
29
30
31

32 **1. Introduction**

33
34 The rates of diseases such as metabolic syndrome, infertility, neuropsychiatric disorders, and
35
36 cancers have been rising for decades (Mnif et al. 2011; Schug et al. 2011; Campion et al.
37
38 2012; Vandenberg 2012; Skinner et al. 2013). According to the World Health Organization
39
40 (WHO), in 2012 more than 12 million people died because of their unhealthy environment
41
42 (WHO DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH 2016). Among the many factors that may explain
43
44 these outcomes, the chronic low-dose environmental exposure of populations to multiple
45
46 stressors is a priority policy concern for public health improvement. Risk assessments of
47
48 these exposures require enhanced efforts, especially for identifying early biomarkers of
49
50 delayed disruptive events that are easy to use for diagnostic purposes in a large-scale
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 exposed population. In this context, ionizing radiations are one of the environmental
4
5 stressor sources that could combine with chemical exposure to produce synergistic effects.
6
7
8 Over the past century, military and civil activities have added cumulative doses of ionizing
9
10 radiation (MacKenzie 2000; Hu et al. 2010) to those from natural sources (telluric and
11
12 cosmic), thereby heightening the risk of adverse effects and delayed diseases (European-
13
14 Commission 2009). Moreover, the risk from internal contamination by radionuclides,
15
16 compared to external ionizing radiation emitters, is still higher, because of its greater cell
17
18 toxicity (which nonetheless varies with its biokinetics and target organ). Improvement in
19
20 radioprotection of populations chronically exposed to low-dose radionuclide contamination
21
22 has therefore become a social and scientific concern.
23
24
25
26
27

28 Among the radionuclides, uranium is a particularly interesting telluric element ($\sim 2 \text{ mg Kg}^{-1}$ in
29
30 Europe) with its dual toxicity (radioactive as an alpha particle emitter and chemical as a
31
32 heavy metal). Low doses of uranium can be easily ingested by mammals from many sources
33
34 including spring water, phosphate fertilizers, nuclear fuel exploitation, and military weapons.
35
36 Depending on where they live, therefore, human populations can be chronically exposed to
37
38 low doses of environmental uranium (Pereira R et al. 2014; Zhivin et al. 2014; Jakhu et al.
39
40 2016; Besic et al. 2017; Bigalke et al. 2018; Faa et al. 2018).
41
42
43
44
45

46 By definition, low doses induce only small biological effects (Hubert 2010). Nevertheless,
47
48 delayed adverse effects of such exposures cannot be ruled out, especially when they are
49
50 chronic or take place during a sensitive fetal developmental window (Poore et al. 2017) or
51
52 growth (Preston 2004), or are affected by sex-dependent differences in toxicology (Gochfeld
53
54 2017). Unfortunately, the absence of any clinical signs of low-dose exposure makes
55
56
57
58
59
60

1
2
3 understanding these effects in complex dynamic systems very challenging, in part because of
4
5 the lack of scientific knowledge and in part due to the multiplicity of parameters influencing
6
7 it (i.e., nonlinear low-dose-response relations (Calabrese 2004; Tubiana et al. 2009; Lagarde
8
9 et al. 2015) that overlap numerous confounding factors (Mothersill and Seymour 2009,
10
11 2014)).
12
13

14
15
16 However, the emergence of new analytical technologies, characterized by their chemical
17
18 selectivity, instrumental sensitivity, and the robustness of their analytical methods (the so-
19
20 called “omics” technologies), has improved our ability to analyze complex molecular
21
22 systems. For example, global untargeted observations can be performed in a homeostatic
23
24 biological background (Morgan and Bair 2013). Moreover, these omic methods allow a
25
26 multiscale systems biology approach, i.e., enable the study of dynamic gene expression by
27
28 the joint analysis of mRNAs, miRNAs (micro-RNAs), and molecules at the top level of the
29
30 system, such as metabolites (the global analysis of which is metabolomics) (Oliver et al.
31
32 1998). These final products of gene expression are considered the last step leading to the
33
34 individual’s phenotypic presentation, so that analysis of the metabolome can be used to
35
36 describe the homeostatic state of a living organism at a given time (Fiehn 2002). These
37
38 methodological approaches, combined with statistical methods for processing data, may
39
40 help to understand the underlying dynamic mechanisms of homeostatic regulation by
41
42 explaining the molecular relations that allow the cell to survive in a stressful environment. In
43
44 addition, comparison of different phenotypic traits makes it possible to identify potential
45
46 biomarkers for a given pathological state.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

Our aim in this study was to analyze the *in vivo* effects of chronic low-dose uranium intake in rats by using multi-omics approaches including transcriptomics (mRNAs and miRNAs) and metabolomics to determine the specify cellular system dysregulated. Close attention was paid to the kidneys, which are known to be the toxicological target of uranium and to differ morphologically between male and female rats. This work could be useful for improving health policies, by identifying early prognostic markers for an elevated risk of delayed adverse effects in the different molecular profiles.

2. Material and methods

2.1. Materials

Ultrapure water was produced from a Milli-Q® system (Merck Millipore, France). Natural uranium (NU, Mc Arthur) was obtained from CERCA (Pierrelatte, France). Uranyl nitrate hexahydrate ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) was prepared to obtain a final uranium concentration (NU) of 40 mg L^{-1} in drinking water obtained from Evian® (Evian-les-Bains, France) for a daily uranium intake dose of 1 mg per rat (1.8 mg Kg-1 on average) (Paquet et al. 2006; Dublineau et al. 2014). The amount of uranyl intestinal absorption is estimated around 0.06% for rats. In our experimental model, the daily uranium dose transferred from intestine to the blood flow was estimated to 0,001 mg Kg-1 d-1. The specific activity of the NU was $2.42 \times 10^4 \text{ Bq g}^{-1}$, and its isotopic composition was $^{238}\text{U} = 99.307\%$, $^{235}\text{U} = 0.688\%$, and $^{234}\text{U} = 0.005\%$. Claritas PPT grade nitric acid, used for uranium assays, was produced by Horiba Scientific (Longjumeau, France). Isoflurane used for anesthesia was produced by Abbot France (Rungis, France).

2.2. Animal experiments

a. Animal treatment

Outbred Sprague-Dawley rats, 12 weeks old and 16 days pregnant, were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). They were housed individually and maintained in a monitored environment (temperature 21 °C and 50% humidity) under a light–dark cycle (dark on from 8:00 p.m. to 8:00 a.m). A standard rodent pellet diet and water were available *ad libitum*.

From birth, both mothers and newborns of the treated group were exposed to NU through their drinking water. During the three weeks of weaning, offspring were mostly contaminated by the mother's milk (human offspring receive approximately 5% of the mother's daily uranium dose (Wappelhorst et al. 2002)). After weaning, mothers were euthanized. Their offspring were housed, each paired with a rat from a different mother (assigned by randomization to form groups of 20 animals per condition) to the age of 9 months; during this period they were contaminated by NU through their drinking water. Finally, the control group of rats received uncontaminated Evian® drinking water *ad libitum*. All animals were euthanized at 9 months of age. The experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN) and complied with the French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848, October 19, 1987, modified May 20, 2001).

b. Sample collection

1
2
3 Based on previous results (Grison et al. 2016), at the age of 6 months, the rats were placed
4
5 in metabolic cages (in the morning, one per cage), with access to a rodent ground pellet diet
6
7 and water (contaminated or not) *ad libitum*. Urine was collected twice a day for 48 h, with
8
9 sodium azide (0.01%) added to prevent bacterial growth (Griffin et al. 2001) and stored at
10
11 4 °C. All urine samples for each rat were pooled, mixed, and frozen at -80 °C. At the age of 9
12
13 months, the rats were moved back to conventional cages (one per cage) with food and drink
14
15 *ad libitum* until the evening to reduce stress. To control the diet cycle, food was removed in
16
17 the evening until the next morning. Five hours before euthanasia, around 12 g of standard
18
19 rodent pellet food was added directly to each cage to normalize food intake for all rats. Four
20
21 hours later, rats were anesthetized by inhalation of 5% isoflurane before an intracardiac
22
23 puncture euthanized them and collected blood, in heparinized tubes. Whole blood was
24
25 centrifuged (5000 rpm) and plasma supernatants were immediately frozen at -80 °C. Kidneys
26
27 were dissected on ice, weighed, deep-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until
28
29 analysis and measurement of uranium concentration.
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **2.3. Clinical evaluation**

39 **a. Animal monitoring**

40
41 Throughout this protocol of NU exposure, intake of food and water was weighed weekly and
42
43 each rat monthly.
44
45
46
47

48 **b. Uranium level in kidney samples**

49
50 To measure the NU burden in kidneys, samples were prepared by adding 8 mL of ultrapure
51
52 nitric acid (69%) and 2 mL of hydrogen peroxide (30%) and then mineralized in a 1000 W
53
54
55
56
57

1
2
3 microwave (Ethos Touch, Milestone Microwave Laboratory Systems, (Soriso, Italy) with an
4
5 increasing rate of 9 degrees per minutes until a temperature of 180°C that was maintained
6
7 for 10 min. Samples were analyzed by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-
8
9 MS; XSERIES 2, ThermoElectron, France). Experimental conditions were optimized by using a
10
11 multi-element standard solution (ThermoElectron, France), and bismuth 209 was added to
12
13 all samples as an internal standard at 1 µg L⁻¹. A calibration curve was calculated based on a
14
15 standard solution at 1000 mg L⁻¹ in 2% nitric acid freshly diluted to obtain (0, 0.001, 0.005,
16
17 0.01, 0.1, 0.5, and 1 µg L⁻¹) in 2% nitric acid. A linear relation—count number (ⁱU) = f([ⁱU]) was
18
19 calculated for each isotope, i= [235;238] with [ⁱU] equal to the isotope concentration in µg L⁻¹.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
1. The ICP-MS limit of detection for uranium is 1 ng L⁻¹.

c. Chemical assessment in plasma and urine samples

An automated spectrometric system (Konelab 20 from ThermoElectron Corporation, France) was used for biochemical measurements of thawed plasma and urine samples, with the manufacturer's biological chemistry reagents and protocols. To obtain a global overview, some biochemical and clinical parameters were measured in plasma, including ALAT/GPT, ASAT/GOT, albumin, direct bilirubin, total bilirubin, calcium, cholesterol, CK-MB, creatinine, iron, glucose, HDL-cholesterol, chlorine, potassium, sodium, LDH, LDL-cholesterol, magnesium, alkaline phosphatase, phosphorus, total proteins, phospholipids B, transferrin, triglycerides, and urea. In addition, urinary volume/24h, amylase, uric acid, creatinine, glucose, chlorine, potassium, sodium, phosphorus, calcium, total proteins, and urea were measured in urine. Values of the biochemical and clinical parameters are reported as means ± standard errors of the means (SEM). Statistical analysis was also performed with SigmaStat

1
2
3 statistical software (SPSS, Paris, France) to calculate items such as Student's t-test in normal
4
5 populations or the rank sum test in non-normal populations for comparison of the control
6
7 and contaminated groups. Statistical significance was defined by a p -value less than 0.05.
8
9

10 **2.4. Omics approaches**

11 **2.4.1. Metabolomic analyses**

12 **a. Sample preparation procedures**

13 *i. Kidney samples*

14
15
16 Thawed kidney tissue samples (10 to 20 mg) were added to cold methanol (40 μ L per mg)
17
18 and placed in a powerful grinding mixer mill system (MM400, Retsch Technology) with two
19
20 metallic balls. Samples were homogenized for 2 min at 25 Hz, incubated 30 min at 20 °C, and
21
22 centrifuged for 15 min at 11,000 rpm and 4 °C. From each sample, 350 μ L of supernatant
23
24 was again centrifuged under the same conditions, and the upper phase dried in a new vial
25
26 under nitrogen flow. Dried extracts were dissolved into 175 μ L of water plus 0.1 % formic
27
28 acid. Samples were vortexed for 1 minute and centrifuged as described above. Finally,
29
30 supernatant was transferred into HPLC vials and stored at -80 °C until analysis.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 *ii. Plasma samples*

44
45
46 For hydrophilic plasma metabolites, samples were diluted with two volumes of cold
47
48 methanol (-20 °C) and slightly homogenized before incubation for 30 min at -20 °C to
49
50 precipitate proteins and then centrifuged for 15 min at 11,000 rpm and 4 °C. Plasma
51
52 supernatant was collected and centrifuged a second time for 45 min under the same
53
54 conditions. Supernatant was dried under nitrogen flow and stored at -80 °C until analysis.
55
56
57

1
2
3 Dried plasma extracts were dissolved in 500 μL water plus 0.1% formic acid. Samples were
4
5 vortexed for 1 min and centrifuged for 15 min at 11,000 rpm and 4 $^{\circ}\text{C}$. Supernatant was
6
7 transferred into HPLC vials and stored at -80 $^{\circ}\text{C}$ before analysis (Pereira Hln et al. 2010).
8
9

10
11 *iii. Urine samples*
12
13

14 All urine samples were treated before mass spectrometry analysis. Each sample was first
15
16 centrifuged for 15 min at 11,000 rpm and 4 $^{\circ}\text{C}$. Then, 100 μL of urine supernatant was
17
18 diluted with 300 μL ultrapure water (1:4 v/v) and centrifuged again for 5 min at 3,000 rpm
19
20 and 4 $^{\circ}\text{C}$. Supernatant was divided into 50- μL aliquots, each transferred into an HPLC vial and
21
22 stored at -80 $^{\circ}\text{C}$ until analysis.
23
24
25

26
27 **b. LC-MS analyses**
28
29

30 Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analyses were performed with
31
32 electrospray ionization (ESI)-hybrid quadrupole-time of flight (microTOF) mass spectrometer
33
34 (Bruker, Wissembourg, France) coupled to the Agilent 1200 RRLLC chromatographic system.
35
36 Chromatographic separation was performed as described previously (Grison et al. 2016).
37
38

39
40 Mass spectra were acquired in the m/z 50-1500 range with a cycle time of 15 min per
41
42 analysis. Internal mass calibration was performed by injecting sodium formate acetate
43
44 solution at the beginning of every run. The conditions of instrumentation have previously
45
46 been described (Grison et al. 2016). Tandem mass spectrometry (MS/MS) experiments were
47
48 performed on the monoisotopic peaks of some metabolite species, with the following
49
50 parameters: precursor ion isolation width 0.8 u, cell collision energy about 15 to 30 eV.
51
52
53
54
55
56
57

1
2
3 All group samples were randomized and analyzed in 5 analytical batches of 60 samples each,
4
5 to minimize analytical variability (Dunn et al. 2011). In addition, a quality control sample (QC)
6
7 representing a pool of each matrix collected from every prepared samples was made-up to
8
9 evaluate data quality. The QC sample was injected ten times at the beginning of each batch
10
11 for column equilibration and then analyzed throughout the batch series after every set of 5
12
13 samples.
14
15

16 17 18 **c. Data analysis**

19 20 21 *i. Data pre-processing and chemometric analyses*

22
23
24 LC-MS raw data were converted to netCDF file format with the manufacturer's DataAnalysis
25
26 software (Bruker, Wissembourg, France). The pre-processing workflow, based on XCMS
27
28 software including the CAMERA script and all alignment and filtration steps, was as
29
30 previously described (Grison et al. 2016). SIMCA-P+ 12.0 software (Umetrics, Umeå, Sweden)
31
32 was used for multivariate statistical analyses. Partial least squares discriminant analysis (PLS-
33
34 DA) models were validated by CV-ANOVA and permutation tests.
35
36
37

38 39 40 *ii. Metabolite selection and identification*

41
42
43 The most discriminant variables were selected, according to their variable importance in
44
45 projection (VIP) scores SIMCA algorithm; and normal probability plot (NNP) distribution was
46
47 used to determine the appropriate threshold of significance. The robustness of these
48
49 features for discriminating the control and NU groups was validated by testing the receiver
50
51 operating characteristic (ROC) curve.
52
53
54
55
56
57

1
2
3 Putative metabolite annotation was performed by using the MZedDB database browser,
4
5 freely available online (Draper et al. 2009), based on the chemical formulas generated from
6
7 the accurately measured masses (error < 10 ppm) and isotopic patterns (calculated with
8
9 Bruker DataAnalysis software). The putative annotations enabled the purchase of authentic
10
11 standard molecules, and MS/MS experiments were performed when sufficient peak
12
13 intensity was obtained for discriminant ions in the biological samples. Full MS and MS/MS
14
15 spectra were compared between authentic standard molecules, biological samples, and
16
17 spectral databases (mainly HMDB, Metlin, and MassBank) for metabolite identification.
18
19 Finally, we used both the Cytoscape plug-in Metscape (Gao et al. 2010) to map the
20
21 metabolites into KEGG metabolic pathways and Metaboanalyst (Xia and Wishart 2016) to
22
23 analyze the metabolomic data.
24
25
26
27
28
29

30 **2.4.2. Transcriptomic analyses**

31 **a. Sample preparation procedures**

32
33
34 Total RNA was isolated from approximately 30 mg of frozen kidney sample with the
35
36 mirVana™ isolation kit (ThermoFisher Scientific, France), according to the manufacturer's
37
38 protocol.
39
40
41
42
43

44 **b. RNA microarray analysis**

45
46
47 Total RNA concentration and purity were assessed by a NanoDrop ONE Spectrophotometer
48
49 (ThermoFisher Scientific, France), and RNA integrity was evaluated with the RNA 6000 Nano
50
51 Chip Kit (Series II) and Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Waldbronn,
52
53
54
55
56
57

1
2
3 Germany and Palo Alto, CA, USA). Quality of RNA was defined by a 260/280 absorbance ratio
4
5 > 1.8; a 260/230 ratio > 1.5 and a RIN value > 7.5 were desired.
6
7

8
9 Each experimental group (control and NU-contaminated) was differentially labeled by
10
11 Cyanine 3-CTP (Cy3) or Cyanine 5-CTP (Cy5). Labeled RNAs were hybridized on SurePrint G3
12
13 8 x 60 K microarrays (Agilent Technologies) at 65 °C for 17 h in an Agilent Microarray
14
15 hybridization chamber rotating at 10 rpm, according to the manufacturer's protocol for two-
16
17 color microarray-based gene expression analysis, low input quick amp labeling, version 6.9.1.
18
19 Slices were scanned with the DNA Microarray Scanner SureScan (Agilent Technologies).
20
21 Fluorescent signal intensities for each microarray spot were extracted and quantified by
22
23 using Feature Extraction software V 10.7.3.1 (Agilent Technologies).
24
25
26
27
28

29 **c. MiRNA expression analysis**

30
31
32 In accordance with the manufacturer's protocol, Megaplex with Pre-amplification (Applied
33
34 Biosystems, Foster City, CA, USA) was used to analyze miRNA expression profiles from 3 µL
35
36 containing 100 ng total RNAs previously extracted from kidney samples (n=20). The qPCR
37
38 was performed on a QuantStudio 12 K Flex system with 384 TLDA arrays (Applied
39
40 Biosystems).
41
42
43
44

45 **d. Data analysis**

46 47 *i. Data pre-processing and statistical analysis*

48
49
50
51 The raw data obtained from the DNA microarray (N=10) were analyzed by R version 3.3.2
52
53 with the R-package Limma, by following the instruction in the manual (Ritchie et al. 2015).
54
55
56
57

1
2
3 Genes were considered differentially expressed (DE) when the adjusted p -value was below
4
5 0.05.
6
7

8
9 For miRNA expression, comparative threshold (Ct) values were analyzed by QuantStudio
10
11 12 K Flex Software V1.2.2 and then by Expression Suite Software V1.0.4 (Applied Biosystems)
12
13 to obtain a clean data matrix. Cleaned data were exported to DataAssist v3.01 (Applied
14
15 Biosystems) to exclude outlier samples and miRNAs. Given the difficulty of observing
16
17 statistical differences for miRNAs known for their low level of fluctuation, especially in low-
18
19 dose exposure contexts, we used an “elastic net” linear regression model to search for
20
21 miRNAs that contributed to either the control or the uranium group. Elastic Net performs
22
23 best when there are many more predictors (p) than observations (n). The data table
24
25 obtained after miRNAomics contains values that are no longer available after quality control.
26
27 We used the Bayesian PCA (principal component analysis) tool available in the R-PCA
28
29 Methods Bioconductor package (Schmitt et al. 2015) to impute the missing values.
30
31
32
33
34
35

36
37 After data imputation, the Elastic Net method from the glmnet R-package was run (Friedman
38
39 et al. 2010). The mixing parameter alpha for Elastic Net was tuned through a line search with
40
41 a range between 0 (Ridge) and 1 (LASSO) with increasing steps of 0.01. The best values for
42
43 alpha and for lambda were estimated through cross-validation to produces the lowest mean-
44
45 cross-validated error with a fixed folded vector. Both values were then used to calculate the
46
47 best predictors.
48
49

50 51 52 **2.4.3. Multiscale systems biology** 53 54 55 56 57

1
2
3 The list of miRNAs obtained from Elastic Net was used to depict a multiscale network of the
4 data from the miRNAomic, transcriptomic, and metabolomic analyses. A database search
5 was performed to find targets of the miRNA. The miRTarBase database (Hsu et al. 2011;
6 Chou et al. 2018), which includes experimentally validated miRNA-target interactions, was
7 searched to find these targets. We defined a target of interest whether the gene is present
8 in one of the following metabolic pathways identified by the metabolomic results (those to
9 which the most discriminant metabolites identified belonged). In addition, other pathways in
10 which as genes obtained from the transcriptomic results are also included. The interactions
11 between miRNA and their targets, and interactions between genes and pathways were
12 visualized in a multiscale network with Cytoscape version 3.4.0 (Shannon et al. 2003).

3. Results

3.1. Clinical monitoring

35 The clinical evaluation based on consumption of drinking water and of food and on body
36 weight gain showed no significant statistical differences between controls and the
37 contaminated group among either males or females.

43 Similarly, none of the clinical markers assessed in plasma and urine samples, including ions
44 and kidney markers (data not shown), revealed any significant differences that might reflect
45 either a significant metabolic disorder or an adverse health effect associated with these NU
46 exposure conditions. A mean NU concentration in kidney tissue less than 500 ng.g⁻¹ (data not
47 shown) confirmed its tubular accumulation in the chronically contaminated rats and, as
48 previously reported, its non-nephrotoxic level, confirmed by histological observations

1
2
3 (Leggett 1989; Dublineau et al. 2014; Poisson et al. 2014). Moreover, for 1.6 g of kidney
4
5 mass, the absorbed dose rate in the kidneys of the contaminated rats, was estimated at 9
6
7 months of age at 5.4×10^{-7} Gy d⁻¹. Under the maximizing assumption of a constant dose
8
9 rate over 9 months, the maximum dose absorbed by the kidneys at sacrifice should still be as
10
11 low as 0.15 mGy and considered as a very low dose of radiological exposure as previously
12
13 reported (Grison et al. 2013).
14
15
16

17 18 **3.2. Metabolomic profiles**

19 20 **3.2.1. Discrimination of sex and NU contamination in kidney profiles**

21
22 The LC-MS data for the supernatant extracted from the kidney tissue (624 variables) were
23
24 run on different PLS-DA models. The first model was calculated on the matrix that included
25
26 all samples — males, females, NU-exposed, and control — and taking into account the
27
28 dummy matrix representing the sex effect. This PLS-DA model showed a very clear
29
30 separation between males and females ($CV\text{-ANOVA} = 2.5 \times 10^{-32}$, $R^2Y = 95.9\%$, $Q^2Y = 91.3\%$).
31
32 That is, as expected, it revealed a highly discriminant molecular dimorphism associated with
33
34 the sex of rats, which obscured the effect of the 9-month NU contamination. Therefore, a
35
36 second PLS-DA model was calculated on the same matrix but treating the exposure effect as
37
38 the dummy matrix. This model ($CV\text{-ANOVA} = 1.2 \times 10^{-28}$, $R^2Y = 94.5\%$, $Q^2Y = 87.8\%$) successfully
39
40 discriminated between the control and contaminated rats (male and female combined). In
41
42 this model, however, the distinction between the male and female rats could not be
43
44 observed directly.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Next, two validated and robust PLS-DA models were run separately for males and females to
4
5 assess the sex differences associated with NU exposure (CV-ANOVA = $3.1e^{-16}/2.0e^{-19}$,
6
7 $R^2Y = 91.2/92.2\%$, $Q^2Y = 89.5/90.2\%$). The untargeted metabolomic analysis clearly
8
9 discriminated NU contamination in both the male and female rat groups and confirmed the
10
11 high impact of NU on the kidney cell metabolism.
12
13
14
15

16 Based on their VIP (> 2.24) and NPP threshold ($p > 95\%$), LC-MS identified 31 features
17
18 discriminating NU from control rats among both males and females. Among the males in the
19
20 NU group, 27 variables increased and 4 decreased, and among the females, 26 increased and
21
22 5 decreased. Of these discriminant features, 23 were common to both sexes (74% similarity)
23
24 and thus revealed the low sexual dimorphism relative to NU exposure (**Table 1**). Most of
25
26 these 23 discriminant features increased (from +27 to 192%). PLS-DA characteristics
27
28 combined in a composite score yielded an area under the curve (AUC) value equal to 1 when
29
30 tested by the ROC curve) (figure not shown). This result validates the robustness of these
31
32 features for discriminating between the control and NU groups.
33
34
35
36
37
38

39 **3.2.2. Discrimination of sex and NU contamination in plasma profiles**

40
41 As expected, the PLS-DA for plasma profiles, calculated with sex as the predictor variable Y
42
43 (CV-ANOVA $p = 0$, $R^2Y(\text{cum}) = 97.4\%$, $Q^2(\text{cum}) = 95.4\%$) demonstrates a very clear
44
45 separation between males and females after nine months of contamination. Discrimination
46
47 between the control and contaminated group was also good with the PLS-DA model using
48
49 NU contamination as predictor variable Y (CV-ANOVA $p = 9.4e^{-24}$, $R^2Y(\text{cum}) = 84.7\%$,
50
51 $Q^2(\text{cum}) = 80.2\%$).
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 The PLS-DA model (CV-ANOVA $p = 6.5e^{-15}$, $R2Y(cum) = 93\%$, $Q2(cum) = 86.8\%$) showed that
4 the features in the male group very clearly discriminated the NU-contaminated from the
5 control group. The model's discrimination for female rats was also good, although not as
6 good as for males (CV-ANOVA $p = 4.0e^{-8}$, $R2Y(cum) = 77.5\%$, $Q2(cum) = 68.1\%$). For both
7 male and female models, the NPP, based on the PLS-DA coefficients for each mode, again
8 selected the same number of features for male and female rats (34 each), and 17 features
9 increased and 17 decreased for both THE male and female groups of contaminated rats
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(**Table 1**). The comparison of these discriminant features in the plasma metabolome showed that 17 were shared by males and females: 4 decreased and 13 increased among the contaminated rats. This result indicates low sexual dimorphism between males and females, with only 50% of shared features discriminating NU exposure. The VIP score rate showed that 5 of these 17 common features were among the most discriminative (**Table 1**).

3.2.3. Discrimination of sex and NU contamination in urine profiles

The PLS-DA discriminant analysis performed on all male and female samples (exposed and non-exposed) with sex as predictor variable Y confirmed a sex difference observable in the metabolome (CV-ANOVA $p = 0$, $R2Y(cum) = 99.3\%$, $Q2(cum) = 98.1\%$). Like those for the other biological matrices, this strong sex fingerprint (all observable by PCA analysis) prevented a direct distinction between contaminated and non-contaminated rats. The PLS-DA model calculated with NU contamination as the predictor variable Y initially did not discriminate NU contaminated rats ($p = 1$) in a mixed population of males and females; this situation changed when the most discriminant features were selected based on their VIP score in the PLS-DA model (CV-ANOVA $p = 4.6e^{-10}$, $R2Y(cum) = 79.0\%$, $Q2(cum) = 61.6\%$).

1
2
3 Discrimination between control and contaminated rats by the PLS-DA model of male rats
4
5 only was good after variable selection (CV-ANOVA $p = 1.0 \times 10^{-5}$, $R^2Y(\text{cum}) = 95.7\%$,
6
7 $Q^2(\text{cum}) = 76.2\%$). Of 226 discriminant features selected for their high NPP threshold value,
8
9 115 decreased and 111 increased in the contaminated group. The PLS-DA was also able to
10
11 discriminate between control and contaminated female rats after variable selection (CV-
12
13 ANOVA $p = 7.9 \times 10^{-11}$, $R^2Y(\text{cum}) = 98.4\%$, $Q^2(\text{cum}) = 89.4\%$). They had 222 discriminant features
14
15 selected for their NPP values, based on the PLS-DA coefficients; 106 decreased and 116
16
17 increased in the contaminated group. The males and females shared 34 discriminant
18
19 features (15 decreased and 19 increased in the contaminated group). These metabolomic
20
21 analyses of the urine showed that the sexual difference is strong, with only 18% similarity
22
23 between the male and female groups (**Table 1**).

3.2.4. Main marker identity

24
25 Putative annotation of the most discriminant features was performed with the freely
26
27 accessible MZedDB database browser. The MS/MS spectra of some of these discriminative
28
29 ions in biological samples were then compared with their authentic standard molecules to
30
31 confirm the putative identification. **Table 1** presents a list of the main discriminative markers
32
33 identified in each of the three biological matrices. Palmitic acid, pentanoic acid, nicotinamide
34
35 D-ribonucleotide, riboflavin-5-phosphate, phytosphingosine, prostaglandin F1 alpha, 2-
36
37 lysolecithin, glycochenodeoxycholate 7-sulfate, linoleic acid, oleic acid, 25-Hydroxyvitamin
38
39 D3, and palmitoleoyl-ethanolamide were identified in kidney tissue. Docosatetraenoyl
40
41 ethanolamide, arachidonyl ethanolamide, dihomo-gamma-linolenoyl ethanolamide,
42
43 androstenediol and 7 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione were identified in plasma. Finally,
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, 4-hydroxyphenylacetyl glycine, 4-pyridoxic acid,
4
5 lysophosphatidylcholine (LysoPc 16:0), creatine, and N1-methylnicotinamide were found in
6
7
8 urine.
9

10
11 Their putative identifications show that these discriminant metabolites represent essentially
12
13 the metabolisms for fatty acid, nicotinate-nicotinamide, steroids, vitamin B6, and tryptophan
14
15
16 **(Figure 1)**.
17

18 19 **3.2.5. Interactions of metabolic pathways**

20
21
22 To describe discriminative metabolite relations and to detect the metabolic pathways most
23
24 strongly affected, metabolic networks of all annotated and identified discriminative
25
26 metabolites were constructed with the Metscape plug-in for Cytoscape and MetaboAnalyst
27
28 (<http://metaboanalyst.ca>). The Metscape analysis of the discriminant markers detected in all
29
30 three matrices (shown in Table 1) revealed metabolic interactions with some metabolic
31
32 pathways, including those for tryptophan, riboflavin, nicotinate-nicotinamide, pyridoxine,
33
34 glycerophospholipid, di-unsaturated fatty acid, linoleate, de novo fatty acid biosynthesis,
35
36 glycine, serine, alanine, threonine, glycosphingolipid, and cholecalciferol. no plasma
37
38 metabolites were mapped in these pathways **(Figure 1)**. The MetaboAnalyst classification
39
40 tool then showed that nicotinate-nicotinamide ($p = 0.002$) and the biosynthesis of
41
42 unsaturated fatty acid metabolisms ($p = 0.01$) were the two metabolic pathways most
43
44 strongly affected.
45
46
47
48
49
50
51

52 **3.3. Transcriptomic profiles in male kidney samples**

53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 In view of the previous reports of metabolomic results in male rats only, this study also
4
5 arbitrarily omitted genetic analysis of female rats.
6
7

8 9 **3.3.1. mRNA array**

10
11 Transcriptomic analysis showed 49 (putative) genes differentially expressed and belonging to
12
13 a variety of different functional classes, including gene regulation mechanisms (24%), cell
14
15 signaling (24%), cell structure (16%), developmental processes (8%), and cell proliferation
16
17 (8%) (**Figure 2A**). Other genes *e.g.* NT5C2, SIRT6, NNT, Nmnat1, and ENPP3 might be
18
19 functionally linked to metabolites, through either a direct or indirect link, according to the
20
21 Metscape plug-in running the KEGG pathways database (**Figure 2B**).
22
23
24
25

26 27 **3.3.2. MiRNA analysis**

28
29 The aim of Elastic Net was to obtain a list of variables that can be used as predictors for the
30
31 phenotypes of interest. With lambda as 0.01336 and alpha 0.34, Elastic Net obtained a set of
32
33 70 miRNAs that can be used as predictors for affected metabolic pathways or cell biological
34
35 processes (**Table 2**). The results showed an increase in expression (fold change > 1) for 42
36
37 miRNAs (highlighted in red) and a decrease (in green) in expression (fold change < 1) for 28.
38
39
40
41
42

43 44 **3.4. Multiscale systems biology**

45
46 The construction of the network was based on links between the discriminative miRNA
47
48 transcripts, differentially expressed (DE) genes, and metabolomic observations (**Figure 3**).
49
50 MiRNAs are linked to mRNAs, presented in deep blue if discriminative in this study (adjusted
51
52 p -value < 0.05) and in light blue for putative (unadjusted p -value < 0.05) target mRNAs.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Metabolic pathways or biological functions are represented in red and increase in size with
4
5 the number of connecting edges to their transcripts.
6
7

8
9 In this network, pathways associated with the metabolism of fatty acids, glycosphingolipids,
10
11 and arachidonic acid were highly connected, compared with others, such as tryptophan and
12
13 nicotinate-nicotinamide (**Figure 3**, in red). In addition, other pathways, including those for
14
15 amino acid metabolisms, energy metabolism, and cellular processes, including cell cycle,
16
17 transcription, apoptosis, and cancer development, as well as aspects of cell structure were
18
19 connected to DE genes obtained from transcriptomic analyses.
20
21
22
23
24
25

26 **4. Discussion**

27
28 Organisms undergo stress during either acute or chronic low-dose environmental exposure
29
30 *e.g.*, when living in a polluted area. Environmental exposures are suspected to induce
31
32 delayed adverse effects that might cause increased susceptibility to some cancers and to
33
34 metabolic diseases through direct metabolic dysregulation or affecting gene transcription by
35
36 epigenetic regulation processes that can even impact the offspring. However, low-dose
37
38 exposure has a low-level impact, with measurable effects within or just above the range of
39
40 homeostatic fluctuation. New analytical strategies must be developed that are able to
41
42 describe these biological effects that have amplitudes that are often too small to be easily
43
44 distinguished from the biological background. For example, in our study, despite the
45
46 retention of NU in the kidney, no clinical signs related to body weight, food/water
47
48 consumption, or urine/plasma chemical parameters differentiated the contaminated groups
49
50 of rats of both sexes from the uncontaminated groups. These observations are consistent
51
52
53
54
55
56
57

1
2
3 with previous studies (Grison et al. 2013; Dublineau et al. 2014) and demonstrate that
4
5 clinical parameters do not account for any biological effects at this low level of
6
7 contamination (concentration in kidney less than 450 ng g⁻¹ for a total radiological dose
8
9 absorbed less than 0.15 mGy). An important point in health risk evaluation is the easily
10
11 observed genetic differences between the sexes and between people of different ethnic
12
13 origins; these must be taken into account when drawing conclusions. In addition, age, quality
14
15 of life, living area, and psychosocial environment are other important parameters that may
16
17 alter the biological response to various stress stimulants.
18
19
20
21
22

23 In our study, the rat model was contaminated from birth to mimic a real situation in which a
24
25 growing organism (more sensitive than adults) is exposed to an uranium-polluted residential
26
27 area to investigate the effect of chronic uranium contamination during growth. As expected,
28
29 the metabolomic analyses confirmed that the differential effect of sex on uranium exposure
30
31 was higher in urine and plasma than in kidney samples (respectively, 82%, 50%, and 26% of
32
33 the metabolite features were sensitive to either gender). These sex-based genetic
34
35 differences can imply impairment in functionality and cellular sensitivity due to modulation
36
37 in xenobiotic biokinetics, which can result in higher doses of exposure. In terms of risk, this
38
39 low metabolic dimorphism in the kidney does not rule out strong differential effects, which
40
41 will depend on the specific metabolic pathway. Although clinical diagnostics showed no
42
43 effects, metabolomic results did show a biological effect associated with the chronic low-
44
45 dose uranium intake. In particular, the metabolisms of fatty acids, nicotinate-nicotinamide,
46
47 steroids, vitamin B6, and tryptophan were affected by NU exposure. A classification test
48
49 based on the number of discriminative metabolites involved in each pathway shows that the
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 highest score was for nicotinate-nicotinamide, with unsaturated fatty acids in second place.

4
5 The nicotinate-nicotinamide pathway has previously been reported to be involved in a
6
7 uranium-related dose-response effect (Grison et al. 2016). Urine is composed of metabolic
8
9 waste that reflects the maintenance of homeostasis. The final status of urine and its absence
10
11 of subsequent metabolic regulation in urine certainly appear to reflect the functional state
12
13 of organs and any renal metabolic or physiological disruptions better than plasma does.
14
15
16

17
18 In urine, the N1-methylnicotinalide (NMN) level decreased, consistent with our previous
19
20 results for male rats only (Grison et al. 2013; Grison et al. 2016). In addition, an increased
21
22 level of N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide was observed (putatively confirmed). This
23
24 result was affected, however, by the sexual dimorphism that, albeit low, appears to affect
25
26 the consequence of NU exposure on kidney physiology. These data confirm the need to
27
28 consider sex dimorphism as well as other constitutive factors such as age, health status, and
29
30 ethnic origin in human health risk assessment. Nevertheless, metabolomic analysis of urine
31
32 samples can be a convenient and sensitive method for risk assessment and diagnostic
33
34 purposes that can detect metabolic dysregulation of the kidneys due to accidental low-dose
35
36 uranium exposure.
37
38
39
40
41
42
43

44 Plasma is another relevant biological matrix due to its easy accessibility, and it can be used
45
46 to discriminate between contaminated male and female rats. The metabolites identified
47
48 cannot be directly associated with the renal effects observed. Nevertheless,
49
50 docosatetraenoyl, ethanolamide, arachidonylethanolamide, and dihomogamma-
51
52 linolenylethanolamide are endocannabinoid molecules associated with the cannabinergic
53
54
55
56
57

1
2
3 neurotransmitters and can directly influence brain functions and behavior (Vlachou and
4
5 Panagis 2014).

6
7
8 Among all the discriminative metabolites identified in the three biological compartments
9
10 **(Table 1)**, the nicotinate-nicotinamide and unsaturated fatty acid pathways were identified
11
12 in more than one matrix; they were found after analyses of both kidneys and urine. Other
13
14 dysregulated pathways include those for the metabolism of linoleic acid, vitamin B6,
15
16 riboflavin, sphingolipids, glycerophospholipids, glycine, serine, threonine, other fatty acid
17
18 metabolisms, tryptophan, arginine, and proline, for the biosynthesis of fatty acids and
19
20 steroids and finally for the elongation of fatty acids in mitochondria. Among these pathways,
21
22 several have already been described as biomarkers of oxidative stress after exposure to
23
24 copper (Taylor et al. 2009) and long-term exposure to heavy metals (Sarma et al. 2018).
25
26 Moreover, fatty acids have been described as one of the most important biomarkers of
27
28 chemical stressors such as heavy metals (Filimonova et al. 2016); they are associated with
29
30 oxidative stress (Reglero et al. 2009) and closely linked to the inflammatory immune
31
32 response (Cornet et al. 2018) **(Figure 1)**.

33
34
35 These pathways indicate the broad effect of uranium through inter-network relations
36
37 between metabolic pathways and possible physiological consequences. Urine appears to be
38
39 a more interesting biofluid than plasma for studies of the effects of low-dose uranium
40
41 exposures. Both urine and the kidneys share affected pathways, with still other pathways
42
43 differentially affected depending on the individual's sex. The involvement of different sex-
44
45 dependent pathways might explain the differences in sensitivity in terms of health risk
46
47 assessment.

1
2
3 These discriminative metabolic fluctuations raise the question of upstream genetic
4 regulation involved in the biological response to NU. Analyses of transcript fluctuations
5 (mRNAs and miRNAs) in kidney cells might provide information about the parent molecular
6 events driving the metabolic outcomes. For contaminated kidneys of males, analysis of RNA
7 expression identified a set of differentially expressed transcripts linked to cell signaling, cell
8 structure, developmental processes, cell proliferation, transport, apoptosis, inflammation,
9 and the metabolism of fatty acids, which NU can target, as previously observed in other
10 studies of uranium as a cell stressor (Sano et al. 2000; Dublineau et al. 2007; Webb-
11 Robertson et al. 2011).

12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26 Nonetheless, except for the fatty acid metabolisms, our results do not show any direct
27 correlations of the results from transcriptomic to metabolomic results, e.g., for the
28 nicotinate-nicotinamide metabolism, which was the pathway most strongly dysregulated in
29 the kidney metabolome. Moreover, N-methylnicotinamide has previously been reported to
30 be dysregulated in cases of experimentally-induced renal failure by a nephrotoxic agent such
31 as uranium (Hirsch 1972; Shim et al. 1984). It has even been suggested for use as an
32 endogenous probe to evaluate drug-drug interactions in the kidney (Ito et al. 2012).
33 However, deeper research into metabolic pathway for genes such as *ALDH2* provided links to
34 metabolic pathways such as those for glycerophospholipids, pyruvate, tyrosine, glycolysis,
35 urea, histidine, leukotriene, and lysine. *DGKQ* is involved in glycerophospholipid metabolism,
36 which our metabolomic analyses showed were affected. *Atp6v1h* is involved in purine
37 metabolism, which is linked in turn to those of histidine and riboflavin (both detected in the
38 metabolomic analysis).

1
2
3 The low range of transcript fluctuations measured after low-dose exposures is likely to
4
5 explain the small number of discriminative transcripts, which in turn may explain the
6
7 difficulty of establishing a direct correlation between gene expression and metabolite
8
9 fluctuations. It is noteworthy that the number of features differentially expressed between
10
11 contaminated and control groups decreased substantially after we corrected p -values by the
12
13 Benjamini-Hochberg False Discovery Rate method for p -value correction. It might be useful
14
15 to consider alternative methods for handling multiple testing corrections in the context of
16
17 specific effects of low-dose exposure from small biological fluctuations, to be able to
18
19 formulate new hypotheses about effects on downstream metabolites. Wang and colleagues
20
21 (Wang et al. 2013) have described such a method. When we applied this method to our
22
23 results, four genes involved in the nicotinate-nicotinamide pathway were found to be
24
25 differentially expressed by the uranium exposure. This establishes a gene profile associated
26
27 with uranium exposure in the kidneys and can be used to find new mechanistic pathways.
28
29 Depending on the gene regulation process, mRNAs may be silenced by miRNAs through an
30
31 epigenetic post-transcriptional mechanism (Filipowicz et al. 2008); these miRNAs might be
32
33 used as biomarkers of exposure and even of toxicant injuries (Kanki et al. 2014) .
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 In our study, Elastic Net selected 70 miRNAs differentially expressed in contaminated
44
45 kidneys after NU exposure (Figure 3). These miRNAs can be putatively linked to major
46
47 metabolic pathways, including those for sphingolipids, nicotinate-nicotinamide, fatty acids
48
49 biosynthesis, and cell processes, which were identified by our metabolomic and
50
51 transcriptomic analyses. These multiscale results confirm the relevance of this method for
52
53 understanding the biological response to low-dose uranium exposure and the dysregulation
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 that occurred at several scales. The difficulty in establishing links between fluctuations of
4
5 miRNAs, mRNAs, and metabolites is not surprising in view of the time-lag between gene
6
7 expression and the fluctuations it can cause in metabolite concentrations. This lag can range
8
9 from minutes to days, so that simultaneous measurements allow only partial observation of
10
11 the cell molecular response at a given time (Takahashi et al. 2011). To improve the analysis,
12
13 this approach needs to be completed by a time-related study. In addition, in this range of
14
15 low-dose effects, non-pathological dysregulations are difficult to determine as they fall
16
17 within or just above the homeostatic background level. The dose-time/effect relations are
18
19 known to be non-linear and consequently unpredictable by extrapolation (Calabrese 2004;
20
21 Tubiana et al. 2009; Lagarde et al. 2015). Depending on the confounding environmental
22
23 factors, observable effects are often stochastic (Mothersill and Seymour 2009, 2014).
24
25 Nonetheless, our results confirm a multiscale biological effect by chronic low-dose uranium
26
27 exposure at the epigenetic and genetic levels, as well as at the metabolomic level, which
28
29 represents the final read-out of cellular regulation processes.
30
31
32
33
34
35
36
37

38 In conclusion, these new generations of large-scale and untargeted methodological
39
40 approaches appear suited to use in the field of low-dose exposures, for the formulation of
41
42 mechanistic hypotheses and the identification of biological targets of exposure to be used as
43
44 a new generation of biological markers. In this study, although no specific adverse effects of
45
46 uranium were observed at this level of dose exposure, the results confirm that nicotinate-
47
48 nicotinamide and fatty acids are the principal metabolisms affected in the kidneys and urine
49
50 after chronic low-dose uranium exposure. Other results revealed cellular processes through
51
52 the activation of genes that can be associated with oxidative stress and inflammatory
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 immune response as well as with uranium-contaminated kidneys. Moreover, the multi-omics
4
5 approach allowed us to observe sex differences in analytical profiles, which can be
6
7 correlated with differences in biological sensitivity to uranium exposure. This parameter
8
9 must be taken into account in risk assessments. Our results confirm that omic analysis is
10
11 relevant for multiscale fingerprinting in the field of low-dose exposure, which can be used to
12
13 assess the impact of the exposome. These analytical methods are an important asset for
14
15 health monitoring policy for public health risk assessment. Finally, in the field of radiation
16
17 protection, the complexity of assessing low-dose ionizing radiation exposures is a major
18
19 issue that needs to be considered, in view of the need to consider time and dose, external
20
21 *versus* internal exposure, acute *versus* chronic exposures, risk of delayed adverse effects,
22
23 and even impact on future generations, sex, age, ethnic origin, and finally the synergic
24
25 effects of combined radiological and chemical multiple exposures (Boobis et al. 2011).
26
27 Therefore, further studies should work at overcoming these scientific challenges to improve
28
29 health policy.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 **5. Acknowledgment:**

41
42 The authors thank Frédéric Voyer and Thierry Loiseau for animal care.
43
44

45 Part of this study was supported by grants from Orano.
46
47
48
49

50 **6. Declaration of interest**

51
52 No potential conflict of interest was reported by the authors.
53
54
55
56
57
58
59
60

7. References

- 1
2
3
4
5
6 Besic L, Muhovic I, Asic A, Kurtovic-Kozaric A. 2017. Meta-analysis of depleted uranium levels in the
7 Balkan region. *Journal of environmental radioactivity*. 172:207-217. eng.
- 8 Bigalke M, Schwab L, Rehmus A, Tondo P, Flisch M. 2018. Uranium in agricultural soils and drinking
9 water wells on the Swiss Plateau. *Environ Pollut*. 233:943-951. eng.
- 10 Boobis A, Budinsky R, Collie S, Crofton K, Embry M, Felter S, Hertzberg R, Kopp D, Mihlan G, Mumtaz
11 M et al. 2011. Critical analysis of literature on low-dose synergy for use in screening chemical
12 mixtures for risk assessment [Research Support, Non-U.S. Gov't
13
14 Review]. *Critical reviews in toxicology*. 41(5):369-383. eng.
- 15 Calabrese EJ. 2004. Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine [Research
16 Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *EMBO reports*. 5 Spec No:S37-40. eng.
- 17 Campion S, Catlin N, Heger N, McDonnell EV, Pacheco SE, Saffarini C, Sandrof MA, Boekelheide K.
18 2012. Male reprotoxicity and endocrine disruption [Review]. *Exs*. 101:315-360. eng.
- 19 Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW, Huang WC, Sun TH, Tu SJ, Lee WH et al.
20 2018. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target
21 interactions. *Nucleic acids research*. 46(D1):D296-D302. eng.
- 22 Cornet V, Ouaach A, Mandiki SNM, Flamion E, Ferain A, Van Larebeke M, Lemaire B, Reyes Lopez FE,
23 Tort L, Larondelle Y et al. 2018. Environmentally-realistic concentration of cadmium combined with
24 polyunsaturated fatty acids enriched diets modulated non-specific immunity in rainbow trout. *Aquat
25 Toxicol*. 196:104-116. eng.
- 26 Draper J, Enot DP, Parker D, Beckmann M, Snowdon S, Lin W, Zubair H. 2009. Metabolite signal
27 identification in accurate mass metabolomics data with MZedDB, an interactive m/z annotation tool
28 utilising predicted ionisation behaviour 'rules'. *BMC bioinformatics*. 10:227. eng.
- 29 Dublineau I, Grandcolas L, Grison S, Baudelin C, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P. 2007.
30 Modifications of inflammatory pathways in rat intestine following chronic ingestion of depleted
31 uranium [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Toxicological sciences : an official journal of the Society
32 of Toxicology*. 98(2):458-468. eng.
- 33 Dublineau I, Souidi M, Gueguen Y, Lestaevel P, Bertho JM, Manens L, Delissen O, Grison S, Paulard A,
34 Monin A et al. 2014. Unexpected lack of deleterious effects of uranium on physiological systems
35 following a chronic oral intake in adult rat [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *BioMed research
36 international*. 2014:181989. eng.
- 37 Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, Brown M, Knowles JD,
38 Halsall A, Haselden JN et al. 2011. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma
39 using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry [Research
40 Support, Non-U.S. Gov't]. *Nature protocols*. 6(7):1060-1083. eng.
- 41 European-Commission. 2009. Report of High Level and Expert Group on European Low Dose Risk
42 Research. Luxembourg: European-Commission.
- 43 Faa A, Gerosa C, Fanni D, Floris G, Eyken PV, Lachowicz JI, Nurchi VM. 2018. Depleted Uranium and
44 Human Health [Review]. *Current medicinal chemistry*. 25(1):49-64. eng.
- 45 Fiehn O. 2002. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes [Review]. *Plant
46 molecular biology*. 48(1-2):155-171. eng.
- 47 Filimonova V, Gonçalves F, Marques JC, De Troch M, Gonçalves AMM. 2016. Fatty acid profiling as
48 bioindicator of chemical stress in marine organisms: A review. *Ecological Indicators*. 67:657-672.
- 49 Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation
50 by microRNAs: are the answers in sight? [Research Support, Non-U.S. Gov't
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Review]. *Nature reviews Genetics*. 9(2):102-114. eng.
- 4 Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. 2010. Regularization Paths for Generalized Linear Models via
5 Coordinate Descent. *Journal of statistical software*. 33(1):1-22. eng.
- 6 Gao J, Tarcea VG, Karnovsky A, Mirel BR, Weymouth TE, Beecher CW, Cavalcoli JD, Athey BD, Omenn
7 GS, Burant CF et al. 2010. Metscape: a Cytoscape plug-in for visualizing and interpreting metabolomic
8 data in the context of human metabolic networks [Research Support, N.I.H., Extramural].
9 *Bioinformatics*. 26(7):971-973. eng.
- 10 Gochfeld M. 2017. Sex Differences in Human and Animal Toxicology [Review
11
12
13 Research Support, N.I.H., Extramural
14
15 Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Toxicologic pathology*. 45(1):172-189. eng.
- 16 Griffin JL, Walker LA, Shore RF, Nicholson JK. 2001. Metabolic profiling of chronic cadmium exposure
17 in the rat. *Chemical research in toxicology*. 14(10):1428-1434. eng.
- 18 Grison S, Fave G, Maillot M, Manens L, Delissen O, Blanchardon E, Banzet N, Defoort C, Bott R,
19 Dublineau I et al. 2013. Metabolomics identifies a biological response to chronic low-dose natural
20 uranium contamination in urine samples. *Metabolomics*. 9:1168-1180. Eng.
- 21 Grison S, Fave G, Maillot M, Manens L, Delissen O, Blanchardon E, Dublineau I, Aigueperse J, Bohand
22 S, Martin JC et al. 2016. Metabolomics reveals dose effects of low-dose chronic exposure to uranium
23 in rats: identification of candidate biomarkers in urine samples. *Metabolomics*. 12(10):154. Eng.
- 24 Hirsch GH. 1972. Stimulation of renal organic base transport by uranyl nitrate. *Canadian journal of
25 physiology and pharmacology*. 50(6):533-538. eng.
- 26 Hsu SD, Lin FM, Wu WY, Liang C, Huang WC, Chan WL, Tsai WT, Chen GZ, Lee CJ, Chiu CM et al. 2011.
27 miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions [Research
28 Support, Non-U.S. Gov't]. *Nucleic acids research*. 39(Database issue):D163-169. eng.
- 29 Hu QH, Weng JQ, Wang JS. 2010. Sources of anthropogenic radionuclides in the environment: a
30 review [Review]. *Journal of environmental radioactivity*. 101(6):426-437. eng.
- 31 Hubert P. 2010. Effects of low doses: Proof and inferences. *Environnement, Risques & Santé*.
32 9(4):295-302.
- 33 Ito S, Kusuhara H, Kumagai Y, Moriyama Y, Inoue K, Kondo T, Nakayama H, Horita S, Tanabe K, Yuasa
34 H et al. 2012. N-methylnicotinamide is an endogenous probe for evaluation of drug-drug interactions
35 involving multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) [Clinical Trial
36
37
38 Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 92(5):635-641. eng.
- 39 Jakhu R, Mehra R, Mittal HM. 2016. Exposure assessment of natural uranium from drinking water.
40 *Environmental science Processes & impacts*. 18(12):1540-1549. eng.
- 41 Kanki M, Moriguchi A, Sasaki D, Mitori H, Yamada A, Unami A, Miyamae Y. 2014. Identification of
42 urinary miRNA biomarkers for detecting cisplatin-induced proximal tubular injury in rats. *Toxicology*.
43 324:158-168. eng.
- 44 Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, Rousselle C. 2015. Non-
45 monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of
46 assessment [Review]. *Environmental health : a global access science source*. 14:13. eng.
- 47 Leggett RW. 1989. The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment [Review].
48 *Health physics*. 57(3):365-383. eng.
- 49 MacKenzie AB. 2000. Environmental radioactivity: experience from the 20th century--trends and
50 issues for the 21st century [Review]. *The Science of the total environment*. 249(1-3):313-329. eng.
- 51 Mnif W, Hassine AI, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. 2011. Effect of endocrine disruptor
52 pesticides: a review [Review]. *International journal of environmental research and public health*.
53 8(6):2265-2303. eng.
- 54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Morgan WF, Bair WJ. 2013. Issues in low dose radiation biology: the controversy continues. A
4 perspective [Research Support, Non-U.S. Gov't
5
6 Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.
7
8 Review]. *Radiation research*. 179(5):501-510. eng.
9 Mothersill C, Seymour C. 2009. Implications for environmental health of multiple stressors [Research
10 Support, Non-U.S. Gov't
11
12 Review]. *Journal of radiological protection : official journal of the Society for Radiological Protection*.
13 29(2A):A21-28. eng.
14 Mothersill C, Seymour C. 2014. Implications for human and environmental health of low doses of
15 ionising radiation. *Journal of environmental radioactivity*. 133:5-9. eng.
16 Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome
17 [Research Support, Non-U.S. Gov't
18
19 Review]. *Trends in biotechnology*. 16(9):373-378. eng.
20 Paquet F, Houpert P, Blanchardon E, Delissen O, Maubert C, Dhieux B, Moreels AM, Frelon S,
21 Gourmelon P. 2006. Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by
22 ingestion. *Health physics*. 90(2):139-147. eng.
23 Pereira HIn, Martin J-Fo, Joly C, SÃ©bÃ©dio J-L, Pujos-Guillot E. 2010. Development and validation of
24 a UPLC/MS method for a nutritional metabolomic study of human plasma. *Metabolomics*. 6(2):207-
25 218.
26 Pereira R, Barbosa S, Carvalho FP. 2014. Uranium mining in Portugal: a review of the environmental
27 legacies of the largest mines and environmental and human health impacts [Research Support, Non-
28 U.S. Gov't
29
30 Review]. *Environmental geochemistry and health*. 36(2):285-301. eng.
31 Poisson C, Stefani J, Manens L, Delissen O, Suhard D, Tessier C, Dublineau I, Gueguen Y. 2014. Chronic
32 uranium exposure dose-dependently induces glutathione in rats without any nephrotoxicity
33 [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Free radical research*. 48(10):1218-1231. eng.
34 Poore KR, Hanson MA, Faustman EM, Neira M. 2017. Avoidable early life environmental exposures.
35 *The Lancet Planetary Health*. 1(5):e172-e173.
36 Preston RJ. 2004. Children as a sensitive subpopulation for the risk assessment process [Review].
37 *Toxicology and applied pharmacology*. 199(2):132-141. eng.
38 Reglero MM, Taggart MA, Monsalve-Gonzalez L, Mateo R. 2009. Heavy metal exposure in large game
39 from a lead mining area: effects on oxidative stress and fatty acid composition in liver [Comparative
40 Study
41
42 Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Environ Pollut*. 157(4):1388-1395. eng.
43 Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. 2015. limma powers differential
44 expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [Research Support, Non-U.S. Gov't].
45 *Nucleic acids research*. 43(7):e47. eng.
46 Sano K, Fujigaki Y, Miyaji T, Ikegaya N, Ohishi K, Yonemura K, Hishida A. 2000. Role of apoptosis in
47 uranyl acetate-induced acute renal failure and acquired resistance to uranyl acetate [Research
48 Support, Non-U.S. Gov't]. *Kidney international*. 57(4):1560-1570. eng.
49 Sarma SN, Saleem A, Lee JY, Tokumoto M, Hwang GW, Man Chan H, Satoh M. 2018. Effects of long-
50 term cadmium exposure on urinary metabolite profiles in mice. *The Journal of toxicological sciences*.
51 43(2):89-100. eng.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Schmitt P, Mandel J, Guedj M. 2015. A Comparison of Six Methods for Missing Data Imputation. *Journal of Biometrics & Biostatistics*.(6):224.
- 4
5 Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. 2011. Endocrine disrupting chemicals and disease
6 susceptibility [Review]. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 127(3-5):204-215.
7 eng.
- 8
9 Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T.
10 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction
11 networks [Research Support, Non-U.S. Gov't
12
13 Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.
14
15 Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Genome research*. 13(11):2498-2504. eng.
- 16 Shim CK, Sawada Y, Iga T, Hanano M. 1984. Estimation of renal secretory function for organic cations
17 by endogenous N1-methylnicotinamide in rats with experimental renal failure. *Journal of*
18 *pharmacokinetics and biopharmaceutics*. 12(1):23-42. eng.
- 19 Skinner MK, Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Haque M, Nilsson EE. 2013. Ancestral
20 dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) exposure promotes epigenetic transgenerational inheritance
21 of obesity [Research Support, N.I.H., Extramural]. *BMC medicine*. 11:228. eng.
- 22 Takahashi H, Morioka R, Ito R, Oshima T, Altaf-Ul-Amin M, Ogasawara N, Kanaya S. 2011. Dynamics of
23 time-lagged gene-to-metabolite networks of *Escherichia coli* elucidated by integrative omics
24 approach [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Omics : a journal of integrative biology*. 15(1-2):15-23.
25 eng.
- 26 Taylor NS, Weber RJM, Southam AD, Payne TG, Hrydziuszko O, Arvanitis TN, Viant MR. 2009. A new
27 approach to toxicity testing in *Daphnia magna*: application of high throughput FT-ICR mass
28 spectrometry metabolomics [journal article]. *Metabolomics*. 5(1):44-58.
- 29 Tubiana M, Feinendegen LE, Yang C, Kaminski JM. 2009. The linear no-threshold relationship is
30 inconsistent with radiation biologic and experimental data [Comment]. *Radiology*. 251(1):13-22. eng.
- 31 Vandenberg L. 2012. Low-dose effects of endocrine disruptors, with Laura Vandenberg. Interview by
32 Ashley Ahearn [Interview]. *Environmental health perspectives*. 120(6):1 p preceding A228. eng.
- 33 Vlachou S, Panagis G. 2014. Regulation of brain reward by the endocannabinoid system: a critical
34 review of behavioral studies in animals [Review]. *Current pharmaceutical design*. 20(13):2072-2088.
35 eng.
- 36 Wang B, Shi Z, Weber GF, Kennedy MA. 2013. Introduction of a new critical p value correction
37 method for statistical significance analysis of metabonomics data [Research Support, N I H ,
38 Extramural
39
40
41
42 Research Support, Non-U S Gov't
43
44 Research Support, U S Gov't, Non-P H S]. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 405(26):8419-8429.
- 45 Wappelhorst O, Kuhn I, Heidenreich H, Markert B. 2002. Transfer of selected elements from food into
46 human milk. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 18(4):316-322. eng.
- 47 Webb-Robertson BJ, Bunn AL, Bailey VL. 2011. Phospholipid fatty acid biomarkers in a freshwater
48 periphyton community exposed to uranium: discovery by non-linear statistical learning [Research
49 Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Journal of environmental radioactivity*. 102(1):64-71. eng.
- 50 WHO DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH EASDOH. 2016 An estimated 12.6 million deaths each year
51 are attributable to unhealthy environments. *Health and environment News*:82.
52 <http://www.who.int/phe/news/e-News-82.pdf>.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Xia J, Wishart DS. 2016. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis
4 [Review]. Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D Baxevanis [et al]. 55:14 10
5 11-14 10 91. eng.

6 Zhivin S, Laurier D, Guseva Canu I. 2014. Health effects of occupational exposure to uranium: do
7 physicochemical properties matter? [Research Support, Non-U.S. Gov't

8 Review]. International journal of radiation biology. 90(11):1104-1113. eng.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review Only

A

	Identities	International Journal of Radiation Biology	KEGG ID	HMDB ID	PubChem ID
Kidney	Palmitic acid	Increased : M +75%, F +74%	C00249	HMDB00220	985
	Pentanoic acid	Increased : M +23%, F +27%	C00803	HMDB00892	7991
	Nicotinamide D-ribonucleotide	Decreased : M -73%, F -71%	C00455	HMDB00229	14180
	Riboflavin-5-phosphate	Decreased : M - 41%, F -43%	C00061	HMDB01520	643976
	Phytosphingosine	Increased : M +89%, F +117%	C12144	HMDB04610	122121
	Prostaglandin F1 alpha	Increased : M +88%, F +87%	C06475	HMDB02685	5280939
	2-Lysolecithin	Increased : M +81%, F +69%	C04230	HMDB10386	11005824
	Glycochenodeoxycholate 7-sulfate	Increased : M +192%, F +131%	C15559	HMDB02496	11954205
	Linoleic acid	Increased : M +140%, F +116%	C01595	HMDB00673	5280450
	Oleic acid	Increased : M +110%, F +106%	C00712	HMDB00207	445639
	25-Hydroxyvitamin D3	Increased : M +46%, F +154%	C01561	HMDB03550	5283731
	Palmitoleoyl-ethanolamide	Increased : M +184%, F +140%	C16512	HMDB02100	9835868
	Plasma	Androstenediol	Decreased	C07632	HMDB00495
7a-Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione		Decreased	C05296	HMDB06771	65542
Adrenoyl ethanolamide		Decreased	C13829	HMDB13626	5282273
Dihomo-gamma-Linolenoyl ethanolamide		Decreased	C13828	HMDB13625	5282272
Arachidonyl ethanolamide		Decreased	C11695	HMDB04080	5281969
Urine	N1-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide	Decreased: M - 10%, F -10%	C05842	HMDB04193	69698
	4-Hydroxyphenylacetyl glycine	Increased: F +24%	C05596	HMDB00735	440732
	N(1)-Methylnicotinamide	Decreased: M -44%	C02918	HMDB00699	457
	4-Pyridoxic acid	Increased: F +16%	C00847	HMDB00017	6723
	Creatine	Increased: M +23%, F +52%	C00300	HMDB00064	586
	5-Hydroxyindoleacetate	Increased: M +11%, F +29%	C05635	HMDB00763	1826
	LysoPc 16:0	Increased: M +17%, F +163%	C04230	HMDB10382	460602

B

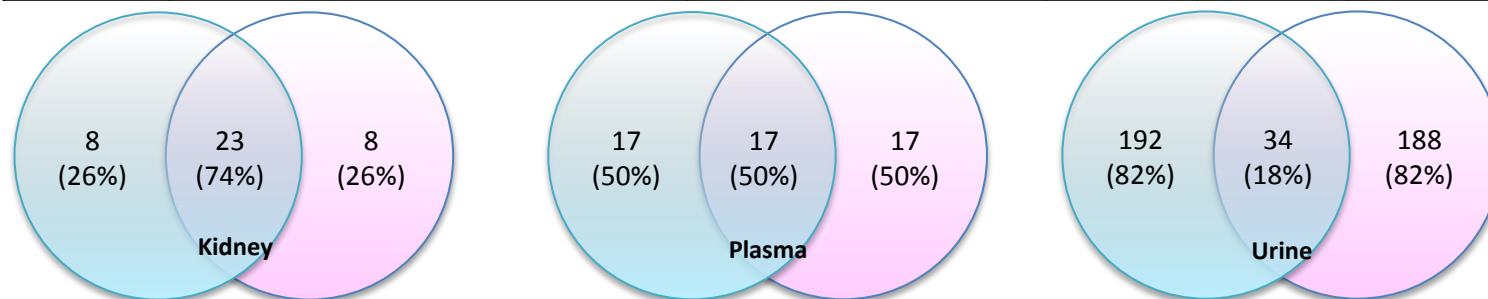
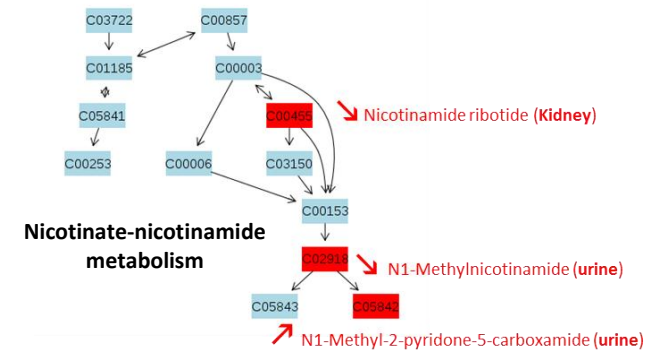


Table 1.A: Main discriminant markers in the three biological matrices (kidney, plasma, and urine) for both male (M) and female (F) rats. Rate differences between control and 1-NU-contaminated values are noted as percentages. **B:** In plasma, 34 variables were discriminative for male (blue) and 34 for female (pink). 17 were common to both. In kidneys, 31 variables were discriminative for male and 31 for female. 23 were common for both. In urine, 226 variables were discriminative for males and 222 for females (17 were common to both).

Pathway Name	Metabolites	Match Status	p
Nicotinate and nicotinamide metabolism	Nicotinamide ribotide; 1-Methylnicotinamide; N1-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide	3/13	0.002
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	Palmitic acid; Stearic acid; Oleic acid; Linoleic acid	4/42	0.01
Fatty acid biosynthesis	Stearic acid; Oleic acid; Palmitic acid	3/43	0.056
Linoleic acid metabolism	Linoleic acid	1/5	0.099
Vitamin B6 metabolism	4-Pyridoxic acid	1/9	0.172
Riboflavin metabolism	Flavin Mononucleotide	1/11	0.206
Sphingolipid metabolism	Phytosphingosine	1/21	0.357
Fatty acid elongation in mitochondria	Palmitic acid	1/27	0.434
Porphyrin and chlorophyll metabolism	Bilirubin	1/27	0.434
Glycerophospholipid metabolism	Lysophosphatidylcholine	1/30	0.469
Glycine, serine and threonine metabolism	Creatine	1/32	0.492
Steroid biosynthesis	Calcidiol ou 25-hydroxy-vitamin D [25(OH)D]	1/35	0.523
Fatty acid metabolism	Palmitic acid	1/39	0.562
Tryptophan metabolism	5-Hydroxyindoleacetic acid	1/41	0.581
Arginine and proline metabolism	Creatine	1/44	0.607



A.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

B.

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

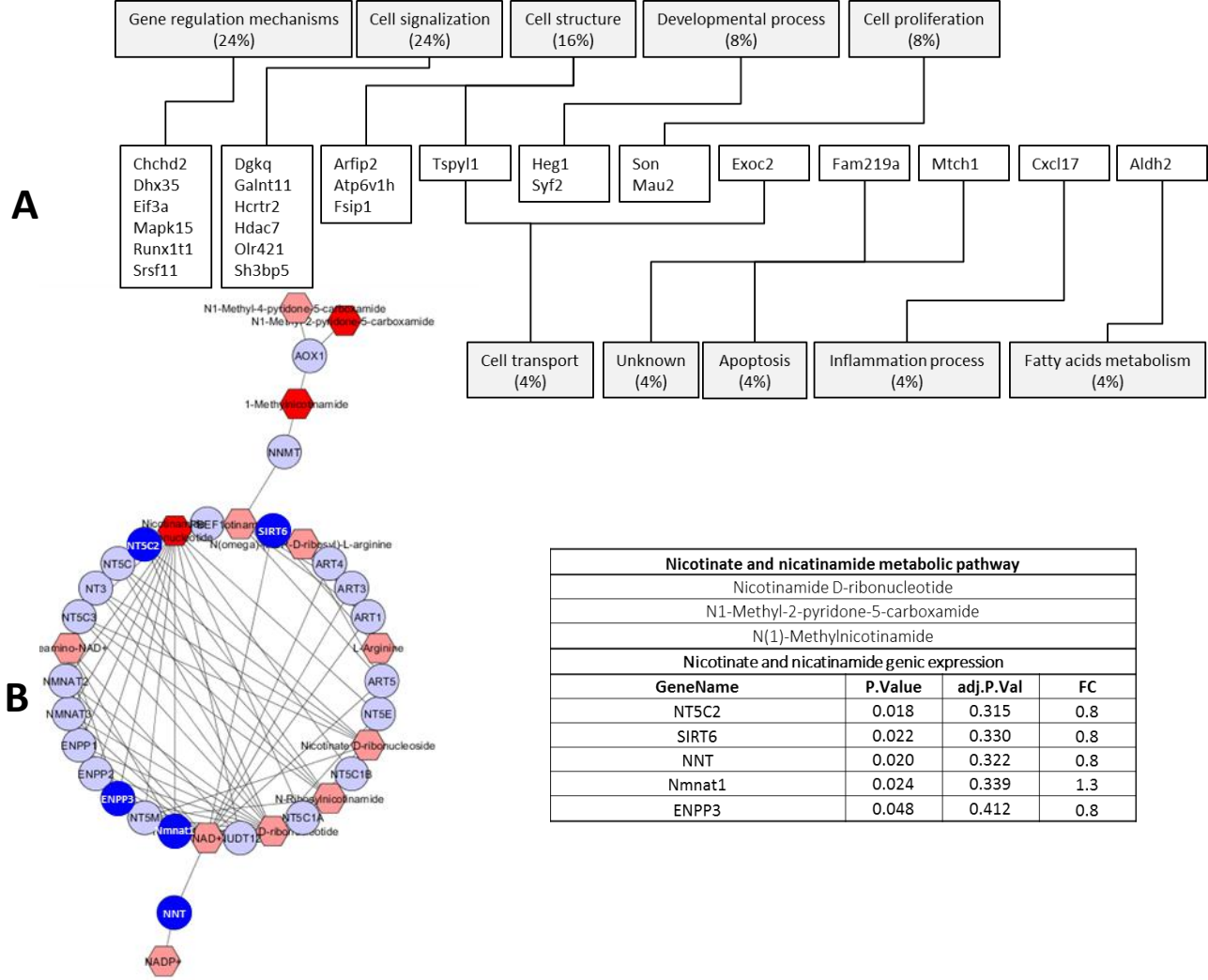


Figure 2.A: Genes differentially expressed in NU-contaminated kidneys. **B:** Nicotinate-nicotinamide network (MetScape application of Cytoscape). Discriminant genes (deep blue) and metabolites (dark red) are shown. *The p-value was not adjusted in order to reveal putative experimental multiscale links.*

Micro-RNAs id.	FC	Micro-RNAs id.	FC
mmu-miR-219	2.2833	hsa-miR-22#	0.9881
mmu-miR-696	2.2829	mmu-miR-199b	0.9653
mmu-miR-434-3p	2.2801	mmu-miR-335-5p	0.9579
mmu-miR-199a-5p	1.8691	mmu-miR-532-3p	0.9115
mmu-miR-363	1.6618	mmu-miR-324-3p	0.9102
mmu-miR-138	1.407	mmu-miR-351	0.8847
mmu-let-7g	1.3578	hsa-miR-196a	0.8606
mmu-miR-129-3p	1.3493	mmu-miR-2146	0.8364
mmu-miR-449a	1.3389	mmu-miR-467a	0.8264
mmu-miR-193b	1.3373	mmu-miR-2134	0.8196
mmu-miR-218	1.3228	mmu-miR-672	0.7911
mmu-let-7i	1.3128	mmu-miR-322	0.7571
mmu-miR-99a	1.3058	mmu-miR-877#	0.7551
mmu-miR-103	1.2973	mmu-miR-1961	0.7533
mmu-miR-324-5p	1.2951	mmu-miR-467b	0.7313
mmu-miR-29b	1.295	mmu-miR-20a	0.7268
mmu-miR-484	1.2889	mmu-miR-494	0.7176
mmu-miR-101a	1.2631	hsa-miR-10a#	0.6994
mmu-let-7e	1.25	mmu-miR-1951	0.6949
mmu-miR-151-3p	1.2537	mmu-miR-17#	0.6715
mmu-miR-100	1.2499	mmu-miR-2182	0.6611
mmu-miR-301a	1.2166	hsa-miR-27a#	0.6317
mmu-let-7d	1.2155	mmu-miR-290-3p	0.6235
mmu-miR-331-3p	1.1988	hsa-miR-206	0.6001
mmu-miR-140	1.1972	mmu-miR-2183	0.5526
mmu-miR-872	1.1869	mmu-miR-1960	0.4619
mmu-miR-23b	1.1777	hsa-miR-200a#	0.4284
mmu-miR-345-5p	1.1628	mmu-miR-804	0.066
mmu-miR-191	1.1584		
mmu-miR-10b	1.146		
hsa-miR-22	1.1427		
mmu-let-7b	1.1411		
mmu-miR-1954	1.134		
mmu-miR-139-5p	1.1288		
hsa-let-7e#	1.1082		
mmu-miR-671-3p	1.108		
mmu-miR-17	1.0921		
mmu-miR-345	1.0774		
mmu-miR-186	1.0569		
hsa-let-7i#	1.0194		
mmu-miR-1898	1.0131		
mmu-miR-429	1.0034		

Table 2 : Micro-RNAs differentially expressed in kidneys of NU-contaminated rates. Increased expression of the fold change (FC) is highlighted in red, decreases in green.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

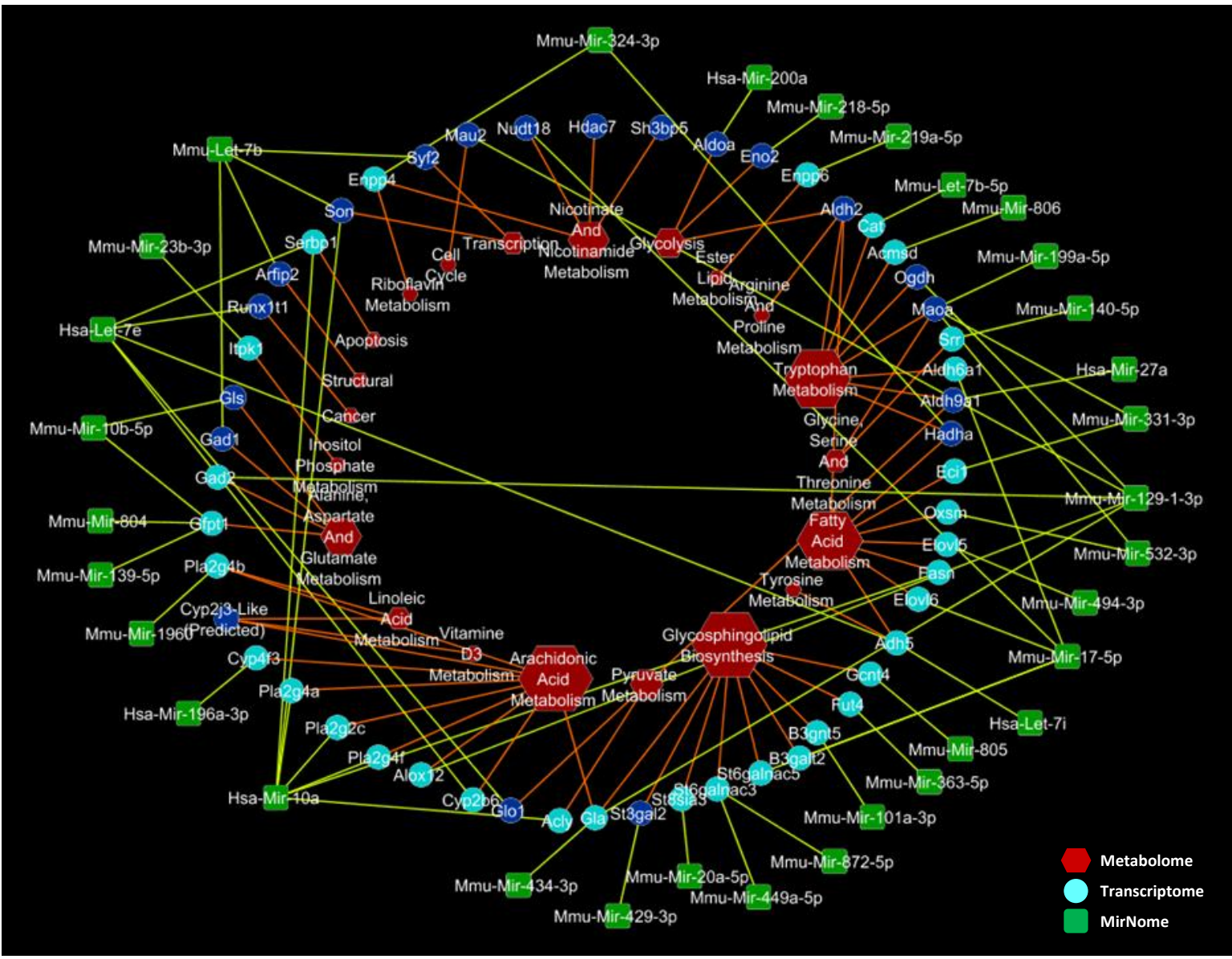


Figure 3 : Multiscale network depicting data from miRomics in green, transcriptomics in blue, and metabolomics in red. Significantly differential gene expression are noted in deep blue.

F-mail: URB@Northwestern.edu URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/ijrb>

3. ARTICLE III :

Une faible dose d'uranium induit des effets épigénétiques multigénérationnels chez le rat.

Low dose of uranium induces multigenerational epigenetic effects in rat kidney.

Grison, S., Elmhiri, G., Gloaguen, C., Elie, C., Kereselidze, D., Tack, K., Lestaevel, P., Legendre, A., Manens, L., Benadjaoud, M. A., Lobaccaro, J. M., & Souidi, M. 2018. *Int J Radiat Biol*, 2: 1-25.

La problématique des faibles doses interroge de plus en plus sur les possibles effets tardifs et même multigénérationnels qui ont pu être observés chez l'homme sur trois générations dans certaines conditions d'expositions à des composés chimiques. Malgré ces quelques rares observations d'effets directs d'une exposition sur plusieurs générations, peu de données scientifiques existent sur le sujet des risques d'effets multigénérationnelles et même transgénérationnelles (pour laquelle aucune observation n'existe chez l'homme).

Dans le cadre de cette étude, la mise en œuvre d'un protocole d'exposition chronique multigénérationnelle de rats à faible dose d'uranium (**Figures 27, 28**) a pour objectif d'étudier l'impact épigénétique de l'exposition par analyse des profils globaux de méthylation de l'ADN rénal de trois générations de rats (mâles et femelles).

Les résultats de cette étude devraient permettre d'estimer l'existence d'un effet direct de l'uranium sur le profil de méthylation de l'ADN et, par conséquent, sur la régulation génique. Ils permettront ensuite, d'estimer le niveau d'importance de cet effet selon la génération considérée mais surtout selon la période développementale touchée. Enfin, la comparaison des profils de méthylation de l'ADN observés chez les mâles et les femelles permettra d'observer l'impact du dimorphisme sexuel sur les profils épigénétiques d'une exposition rénale à l'uranium.

Pour réaliser cette d'exposition intergénérationnelle, des rats mâles et femelles ont été contaminés pendant 9 mois depuis leur naissance par ingestion d'une solution hydrique non toxique d'uranium à la dose de 40 mg.L⁻¹ (F0). Leur descendance quant à elle, n'est contaminée que jusqu'au sevrage (F1). Les animaux des trois générations (F0, F1 et F2) ont été examinés par la réalisation d'un suivi clinique, complété par l'analyse des profils de méthylation de l'ADN des reins et d'expression génique des enzymes méthyltransférases et déméthylases impliquées dans le processus épigénétique de contrôle du niveau de méthylation des gènes (**Figure 31**).

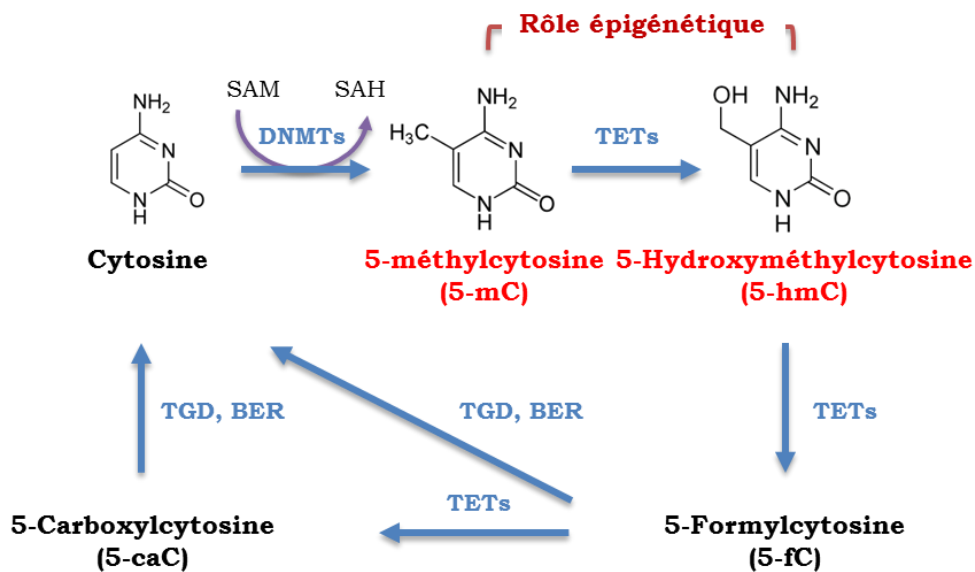


Figure 31 : cycle de méthylation de l'ADN au niveau des cytosines des îlots CpG

L'analyse des résultats obtenus a premièrement permis d'observer une augmentation du poids corporel des mâles de la seconde génération (F1) descendant des animaux issus du groupe contaminé de la première génération (F0). A contrario, le poids corporel est légèrement diminué pour la génération suivante (F2). Pour cette dernière, une légère baisse du poids des reins a aussi été observée chez les mâles du groupe contaminé.

Une hyperméthylation des ADNs de rein est observée chez les mâles de la seconde (F1) et troisième génération (F2).

L'analyse qPCR des niveaux d'expression géniques des enzymes associées au processus de méthylation et de déméthylation des cytosines révèlent une augmentation du niveau d'expression des gènes associés aux enzymes méthyltransférases 1 et 3a (*DNMT1*, *DNMT3a*) dans les reins des femelles de la dernière génération (F2). Aucune modification n'est observable à ce niveau dans les reins des mâles.

Pour conclure, les résultats de cette étude montrent que l'uranium a une action épigénétique au niveau de l'ADN des reins par la modification des profils de méthylation. Cet effet est observable pour la seconde et la dernière génération de mâles exposés.

Cette observation montre qu'en l'absence d'effets cliniques observables, l'exposition chronique d'une génération peut avoir des répercussions biologiques sur deux générations suivantes.

Ces résultats confirment aussi que les périodes développementales d'exposition sont primordiales dans la réponse épigénétique à l'uranium lorsque celle-ci survient durant la période de vie utérine ou même au stade de cellules germinales primordiales. Elles le sont aussi en matière de sensibilité et de risque d'effets indésirables qui peuvent survenir à plus long terme (**Figure 32**).

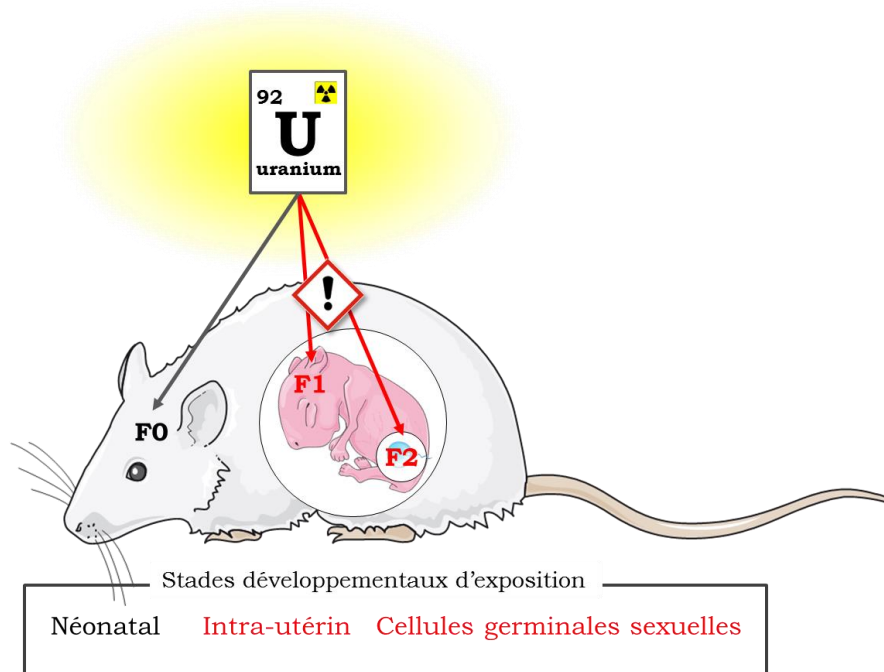


Figure 32 : effet épigénétique d'une exposition multigénérationnelle à l'uranium

Une différence de réponse liée au sexe des animaux est aussi observable (absence d'effet chez les femelles). Ce résultat révèle l'existence d'un niveau de sensibilité épigénétique à l'uranium différent selon le sexe des animaux.

Cependant, la signification phénotypique de ces résultats est à ce stade de l'étude encore incertaine et celle d'une nocivité l'est encore moins. Malgré quelques modifications morphométriques mesurables, des analyses complémentaires réalisées au niveau d'autres systèmes moléculaires supérieurs s'avèrent nécessaire pour voir si cette signature épigénétique rénale peut être traduite au niveau des expressions géniques et même en terme de déséquilibres métaboliques.

Dans un souci d'amélioration des politiques de santé public au sujet des risques d'effets tardifs associés aux expositions environnementales, il s'avère à présent nécessaire de mieux considérer le dimorphisme sexuel des individus en matière de sensibilité aux expositions car de plus en plus d'études confirment que les différences métaboliques et physiologiques associés au sexe des individus influent significativement sur leur niveau de sensibilité et par conséquent sur les seuils de toxicité des sources d'exposition.

Un autre niveau de sensibilité concerne la descendance des individus exposés qui peut être plus ou moins affectée selon la période développementale d'exposition qui peut engager des effets multigénérationnels directs ou indirectement (par transmission sexuelle de marques épigénétiques).

Cette composante générationnelle des effets des faibles doses est une composante déterminante dans l'évaluation des effets tardifs d'une exposition qu'il s'avère nécessaire de prendre en compte en toxicologie prédictive dans la recherche des risques associés aux expositions environnementales.

Cette étude montre que la part épigénétique d'une exposition est primordiale et certainement un des pivots de la réponse cellulaire aux faibles doses. Agissant en aval du déterminisme sexuel des gènes, cette composante est capable d'influer sur la qualité des ajustements mécanistiques de maintien des équilibres homéostatiques mais s'avère aussi particulièrement vulnérable à certaines périodes développementales de la vie.

Low dose of uranium induces multigenerational epigenetic effects in rat kidney

Stéphane Grison^a, Ghada Elmhiri^a, Céline Gloaguen^a, Christelle Elie^a, Dimitri Kereselidze^a, Karine Tack^a, Philippe Lestaevel^a, Audrey Legendre^a, Line Manens^a, Mohamed Amine Benadjaoud^b, Jean-Marc Lobaccaro^c and Maâmar Souidi^a

^aPSE-SANTE, SESANE, LRTOX, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, France; ^bPSE-SANTE, SERAMED, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, France; ^cGReD, UMR CNRS 6293-INSERM U1103, Université Clermont Auvergne, Aubière, France

ABSTRACT

Purpose: A protocol of chronic exposure to low dose of uranium was established in order to distinguish the sexual differences and the developmental process that are critical windows for epigenetic effects over generations.

Methods: Both male and female rats were contaminated through their drinking water with a non-toxic solution of uranyl nitrate for 9 months. The exposed generation (F0) and the following two generations (F1 and F2) were examined. Clinical monitoring, global DNA methylation profile and DNA methyltransferases (DNMTs) gene expression were analyzed in kidneys.

Results: While the body weight of F1 males increased, a small decrease in kidney and body weight was observed in F2 males. In addition, global DNA hypermethylation profile in kidney cells was observed in F1 and F2 males. qPCR results reveal a significant increase of methyltransferase genes expression (*DNMT1* and *DNMT3a*) for F2 females.

Conclusions: In the field of public health policy and to raise attention to generational effects for the risk assessment of the environmental exposures, low doses of uranium do not imply clinical effects on adult exposed rats. However, our results confirm the importance of the developmental windows' sensitivity in addition to the sexual dimorphisms of the offspring.

ARTICLE HISTORY

Received 13 April 2018

Revised 30 May 2018

Accepted 21 June 2018

KEYWORDS

DNA methylation; uranium; kidney; epigenetic; multigenerational; low dose; sex difference

1. Introduction

The incidence of metabolic diseases, neurological disorders and cancers is increasing in populations and still animates the debate about risk, particularly those associated with early-life environmental exposures. As reported, such health risk has become a major social and economic concern for civil society (Poore et al. 2017). In this context, to study the environmental impact on health, scientists have recently defined the exposome as all exposures that an individual undergoes throughout his life (Wild 2012; Siroux et al. 2016). Unfortunately, the difficulty in addressing this topic does not allow making conclusions for most environmental stressors. Firstly, there is the lack of experimental, epidemiological and clinical data on this topic. Secondly, as for endocrine disrupting chemicals (Vandenberg et al. 2012) or ionizing radiation (Ray et al. 2012), biological dose-response relationship differs between low-dose and high-dose exposures. Thirdly, close to the homeostatic background, it is difficult to estimate the occurrence of subtle molecular effects influenced by many confounding factors (Mothersill and Seymour 2009, 2014). Finally, in the absence of proven morbidity, the ability to predict delayed adverse and even multigenerational effects of such exposures remains tricky.

Human environmental exposures have both natural and anthropogenic origins and in this field, radionuclides are a subject of interest. Uranium is a natural element exploited for its energetic properties, and prone to pollute and expose individuals. The chemical toxicity of natural uranium (NU) outweighs its radioactive toxicity. Moreover, the kidney is the major biological target of uranium, known to accumulate in the proximal tubule and to induce renal toxicity (Leggett 1989).

These last decades recent technical progress combining analytical sensitivity with big data analysis (omics) have allowed exploring new dimension of biological systems like multiscale analysis of small biological regulations from environmental injuries (Fernandes and Husi 2017). At these different molecular levels of cell regulation, epigenetics is defined as a set of molecular mechanisms able to rapidly and reversibly modulate the gene activity without modification of the DNA nucleotide sequence. DNA methylation is the most documented epigenetic mechanism: the addition of a methyl group at the cytosine residues located within CpG dinucleotides inhibits the access to the promoter region for transcription factors and hence gene expression (Bird 1992). It is involved in several cell processes including differentiation, proliferation and environmental cell adaptation (Hackett and

Surani 2012). Indeed, DNA methylation has already been associated with metabolic disrupts and pathologies such as metabolic syndrome, cancers and can be transmitted to other generations (Esteller 2008; Heijmans et al. 2008; Zeybel et al. 2012; Sen et al. 2015; Day 2016).

In previous experimental studies (*in vitro* and *in vivo*), uranium exposures were associated with modifications of Global DNA methylation profile in gonads, brain and spleen (Miller et al. 2009; Gombeau et al. 2016; Elmhiri et al. 2018). Based on this knowledge, DNA methylation can also be used as a sensitive marker associated with uranium exposure. Other studies have shown that the cellular response to an early environmental exposures is a consequence of epigenetic mechanisms, such as methylation of DNA, which can either allow the cell to adapt to its new environmental conditions or be the vector of adverse effects (Martos et al. 1989).

In the context of improving public health policy concerning chronic low-dose exposure to uranium, this study focuses on assessing global DNA methylation profile of kidneys in both male and female rats to consider the sex differences (Joseph et al. 2017) through three directly and indirectly exposed-generations. In order to perform it, we have developed a multi-generational model of chronic low-dose exposure to uranium in rats and performed analysis of global DNA methylation and genes expression level of demethylase and methyltransferase enzymes which control the methylation process (Lyko 2018) on three generations. The results could provide data about uranium-specific sensitivity associated with sex differences and offspring generations.

2. Methods

2.1. Animals and contamination procedure

NU (Mc Arthur) was obtained from CERCA (Pierrelatte, France). Uranyl nitrate hexahydrate ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) was prepared to obtain a final uranium concentration of 40 mg L^{-1} in mineral water (daily uranium intake dose: 1 mg/rat/day) (Paquet et al. 2006). The specific activity of the NU was $2.42 \times 10^4 \text{ Bq g}^{-1}$, and its isotopic composition was $^{238}\text{U} = 99.307\%$, $^{235}\text{U} = 0.688\%$, and $^{234}\text{U} = 0.005\%$. All experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN) and complied with the French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848, 19 October 1987, modified 20 May 2001). To realize a multi-generational protocol of chronic exposure (Figure 1), three generations of rats (F0, F1 and F2) male and female were used. Outbred Sprague Dawley rats, 12 weeks old and 16 days pregnant, were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). The number of animal used in this protocol was 20 per experimental group to increase the statistical power necessary to highlight low biological effects associated with low-dose exposure (Table 1, panel A). They were housed individually and maintained under a 12 h light/12 h dark cycle (regular cycle) at 21°C and 50% humidity, with access *ad libitum* to a standard rodent pellet diet and water. Since the birth of the first generation (F0), both mothers and offspring of the treated group were exposed to NU through drinking water until 9-month old. During the

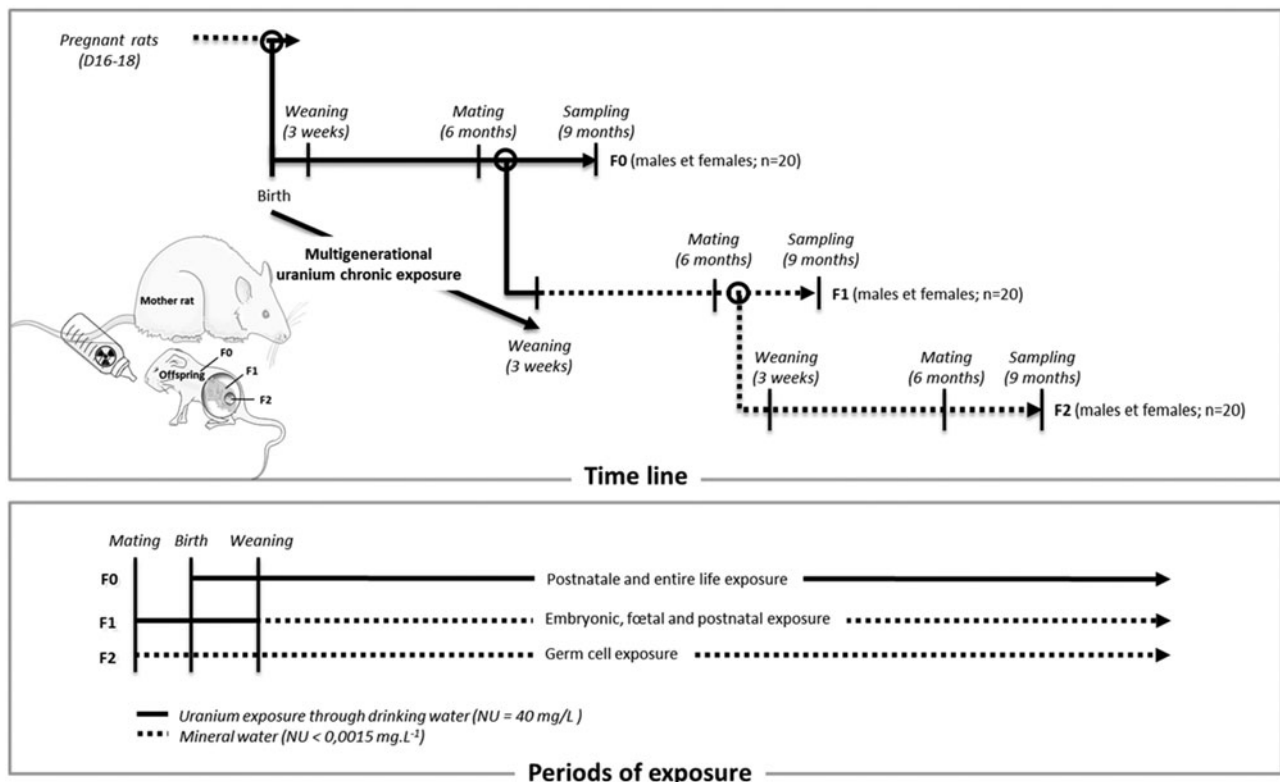


Figure 1. Multi-generational protocol of exposure, i.e. three generations of rats (F0, F1 and F2) males and females ($n = 20$) were followed. F0 were exposed during 9 months from birth through drinking water with natural uranium (NU). Control animals drank uncontaminated mineral water. F1 has been contaminated in utero and through the mother milk (F0) until weaning. After weaning, contamination was stopped and all groups of rats received *ad libitum* uncontaminated mineral drinking water. The F2 generation has been only exposed to uranium from parental (F1) germ cells.

Table 1. (Panel A) Mean \pm SEM of (i) whole-body weight, kidney weight and ratio of kidney to whole-body weight in each group, and (ii) drinking water consumption and uranium concentration in kidneys after 9 months of radionuclide ingestion through drinking water (40 mg L^{-1}). (Panel B) Mean \pm SEM of plasma ions, creatinine and urea and other metabolites in control and contaminated (NU) groups after 9 months of chronic radionuclide ingestion through drinking water (40 mg L^{-1}) for F0 and 9 month.

	F0						F1						F2												
	Females			Males			Females			Males			Females			Males									
	Control (20)	NU 40 mg/L (20)	NU 40 mg/L (20)	Control (20)	NU 40 mg/L (20)	NU 40 mg/L (20)	Control (20)	NU 40 mg/L (20)	NU 40 mg/L (20)	Control (20)	NU 40 mg/L (20)	NU 40 mg/L (20)	Control (20)	NU 40 mg/L (20)	NU 40 mg/L (20)	Control (20)	NU 40 mg/L (20)	NU 40 mg/L (20)							
Panel A																									
9 months total body	347 \pm 11	338 \pm 10	631 \pm 18	625 \pm 21	305 \pm 6	308 \pm 11	543 \pm 12	598 \pm 16*	291 \pm 6	269 \pm 9	578 \pm 16	525 \pm 13*	0.95 \pm 0.03	0.97 \pm 0.03	1.66 \pm 0.05	1.64 \pm 0.06	0.96 \pm 0.02	0.92 \pm 0.02	1.45 \pm 0.05	1.56 \pm 0.03	0.88 \pm 0.03	0.88 \pm 0.03	1.65 \pm 0.06	1.44 \pm 0.05**	
Kidney weight (g)	0.27 \pm 0.01	0.29 \pm 0.01	0.27 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01	0.31 \pm 0.01	0.30 \pm 0.01	0.27 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01	0.34 \pm 0.01	0.33 \pm 0.01	0.29 \pm 0.01	0.28 \pm 0.01	Ratio Kidney/Total body (%)	23.83 \pm 1.73	22.66 \pm 1.72	25.49 \pm 1.27	25.38 \pm 1.85	16.29 \pm 0.66	18.1 \pm 0.95	20.15 \pm 0.96	20.03 \pm 0.75	22.24 \pm 1.72	21.19 \pm 2.43	25.07 \pm 1.97	23.08 \pm 0.98
Daily water consumption (mL/day/rat)	10.24 \pm 0.89	468 \pm 84.54***	9.77 \pm 1.54	347.05 \pm 48.48***	9.76 \pm 0.74	12.5 \pm 1.51	8.75 \pm 0.81	10.58 \pm 1.28	8.7 \pm 0.78	8.95 \pm 0.81	7.34 \pm 1.29	8.38 \pm 0.89	Uranium concentrations in kidney (ng U/g)	2.32 \pm 0.05	2.38 \pm 0.03	2.33 \pm 0.09	2.43 \pm 0.06	2.11 \pm 0.08	2.15 \pm 0.07	2.01 \pm 0.07	2.16 \pm 0.05	2.37 \pm 0.02	2.34 \pm 0.02	2.39 \pm 0.04	2.35 \pm 0.03
Panel B																									
Calcium (mM)	102.93 \pm 0.53	103.74 \pm 0.36	101.95 \pm 0.42	102.13 \pm 0.5	104.46 \pm 0.4	103.36 \pm 0.53	104.64 \pm 0.37	103.67 \pm 0.32	104.41 \pm 0.52	104.23 \pm 0.43	104.35 \pm 0.32	104.47 \pm 0.43	Chlorine (mM)	4.22 \pm 0.17	4.30 \pm 0.18	4.43 \pm 0.08	4.31 \pm 0.1	4.57 \pm 0.25	4.14 \pm 0.19	4.57 \pm 0.13	4.66 \pm 0.09	4.39 \pm 0.15	4.47 \pm 0.09	4.54 \pm 0.13	4.48 \pm 0.15
Potassium (mM)	136.83 \pm 0.61	137.46 \pm 0.43	136.68 \pm 0.57	137.1 \pm 0.49	138.2 \pm 0.62	136.82 \pm 0.41	138.74 \pm 0.23	138.01 \pm 0.31	137.66 \pm 0.28	137.66 \pm 0.49	138.50 \pm 0.24	138.34 \pm 0.5	Sodium (mM)	1.51 \pm 0.12	1.41 \pm 0.09	1.69 \pm 0.11	1.66 \pm 0.09	1.17 \pm 0.09	1.11 \pm 0.1	1.01 \pm 0.07	1.00 \pm 0.04	1.27 \pm 0.08	1.27 \pm 0.1	1.29 \pm 0.09	1.24 \pm 0.06
Phosphorus (mM)	56.52 \pm 1.04	54.74 \pm 1.05	53.47 \pm 2.56	56.11 \pm 1.19	48.34 \pm 0.87	49.41 \pm 1.42	46.8 \pm 1.33	47.01 \pm 0.95	50.21 \pm 0.82	52.31 \pm 0.8	49.18 \pm 0.81	51.23 \pm 1.07	Creatinine (μM)	5.90 \pm 0.26	5.92 \pm 0.34	6.20 \pm 0.23	6.75 \pm 0.2	5.38 \pm 0.23	5.31 \pm 0.14	5.2 \pm 0.24	5.48 \pm 0.28	6.06 \pm 0.30	5.16 \pm 0.29	5.52 \pm 0.37	
Urea (mM)																									

The number of rats for each measurement is indicated in parentheses. Results are significantly different for * $p < .05$, ** $p < .01$, and *** $p < .001$ and are indicated in bold.

three weeks of weaning, offspring (F0) were mostly contaminated through lactation (human offspring receive approximately 5% of the mother's daily uranium dose (Wappelhorst et al. 2002) and through drinking water supplemented with NU. After the weaning of the first generation (F0), male and female offspring of different bearing were randomly housed together. Each group (control vs contaminated) was divided into two subgroups (breeding and non-breeding) to obtain a total of four experimental groups. For a chronic contamination, a sufficiently long time of exposure must be respected. Indeed, rats of the breeding group were mated after 6 months of exposure. One male was housed with two females for 5 days as usually recommended (Bohacek and Mansuy 2017). The next generation, F1, was contaminated *in utero* and through the F0 mother milk. Indeed for F1, the sensitive fetal-developmental windows could particularly be impacted (St-Cyr and McGowan 2018). After weaning, males and females of F1 offsprings were housed with rats coming from different mother by randomization (control vs contaminated) and the protocol of contamination was stopped at this time. All control groups of rats received *ad libitum* uncontaminated mineral drinking water Evian® (Evian-les-Bains, France). Reproductive animals F1 were mated in the same conditions as previously done for F0. The next generation F2 was contaminated only from the parental germ cells F1. All animals were euthanized at 9-month old.

2.2. Clinical monitoring and samples collection

Food and water intakes were monitored weekly throughout this multigenerational protocol of uranium exposure (Table 1 panel A). At 9-month old, rats were euthanized and biological samples were collected. Rats were anesthetized by inhalation of 5% isoflurane (Abbot France, Rungis, France). An intracardiac puncture was performed to collect blood, in heparinized tubes. Whole blood was centrifuged (5000 rpm) and plasma supernatants were immediately frozen at -80°C . Kidneys were dissected on ice, weighed, deep-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until biological analysis and measurement of uranium intake.

Depending on the number of animals born, the crossing rules necessary for randomization, and the unexplained deaths, this number of animals (20) was reduced in some experimental groups (Table 1, panel B),

2.3. Measurement of natural uranium in kidney

Kidney samples were prepared by adding 8 mL of ultrapure 69% nitric acid to 2 mL of 30% hydrogen peroxide. They were mineralized in a 1000 W microwave (Ethos Touch, Milestone Microwave Laboratory Systems, Italy) with a 20-min ramp to 180°C then 10 min at 180°C . Samples were analyzed by ICP-MS (XSERIES 2, ThermoElectron, France). A multi-element standard solution (ThermoElectron, France) was used to optimize experimental conditions and apparatus parameters to obtain the best signal/noise ratio for uranium 238. In all solutions likely to be analyzed (biological samples or calibration solutions), bismuth 209 was added as an

internal standard at $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Seven standard solutions for the calibration curve (0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 0.5, and $1 \mu\text{g L}^{-1}$) were freshly prepared by dilution of a standard solution of 1000 mg L^{-1} uranium in 2% nitric acid (Claritas PPT, Horiba Scientific). A linear relation—count number (${}^i\text{U}$) = $f({}^i\text{U})$) was calculated for each isotope, $i = [235;238]$ with ${}^i\text{U}$ equal to the isotope concentration in $\mu\text{g L}^{-1}$. Isotopy and dosage reliability were regularly verified with standard solutions. The ICP-MS limit of detection for uranium is 1 ng L^{-1} .

2.4. Measurement of biochemical clinical markers

An automated spectrometric system (Konelab 20i from Thermo Electron Corporation, Cergy-Pontoise, France) was used for biochemical measurements of thawed blood plasma samples, with the manufacturer's biological chemistry reagents and protocols. The markers measured in blood plasma included calcium, chlorine, potassium, sodium, phosphorus, creatinine and urea (Table 1 panel B).

Based on our experience in low-dose exposure we believed that any clinical or pathologic effects in the kidney could be observed in the urine. For these analyses, only $n = 10$ was estimated necessary.

2.5. DNA extraction and global DNA methylation

DNA was extracted from approximately 20-mg kidney samples (stored at -80°C) using the QIAmp Mini kit (Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions. Methylation profile in kidney tissue was measured using the 5-mC DNA ELISA kit (Zymoresearch, California, USA). The global methylation level of gDNA in samples was elucidated as per the protocol and guidelines mentioned in the kit. Negative and positive controls consisting of $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ double-stranded DNA, was included in each run. The standard curve was prepared using multiple combinations of negative and positive controls according to manufacturer's instruction. Absorbance measured at 450 nm using a TECAN reader (Infinite® 200 PRO NanoQuant Plate Reader). All results were validated using duplicate samples.

2.6. RNA extraction and qPCR of the gene expression

Total RNA was extracted from an average of 35 mg of frozen kidney samples, using mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, cat.no.1560). Concentration of RNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) was determined by using a NanoDrop apparatus (ThermoFisher Scientific, Cergy Pontoise, France). $1 \mu\text{g}$ of total RNA was reversely transcribed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Real-time qPCR was performed with QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, Cergy Pontoise, France) using TAQMAN (Applied Biosystems), to analyze the mRNA levels of demethylase genes TET1 (Rn01428192_m1), TET2 (Rn01522037_m1), TET3 (Rn01425643_m1), TDG (Rn00821513_m1), with three internal controls (GAPDH (Rn01775763_g1), Ywaz (Rn00755072_m1) and β 2M (Rn00560865_m1)) and using SYBER Green® (Applied

Table 2. Sequence of primers set for gene expression studies in kidneys.

DNMT1	5'-CGGCGGAGGTGTCCTAACTTGGC-3' 5'-GGGTGACGGCAACTCTGGTA-3'
DNMT3a	5'-CGGTAGCGCCTCTTTGAGTTCTAC-3' 5'-GCGATCATCTCCCTCTGG-3'
HPRT	5'-GCTCGAGATGTCATGAAGGAGA-3' 5'-TCAGCGCTTAATGTAATCCAGC-3'
β 2M	5'-ACATCCTGGCTCACACTGAA-3' 5'-ATGTCTCGGTCCAGGTG-3'
ACTB	5'-TTCAACACCCAGCCATGT-3' 5'-TGGTACGACCAGGCATACAG-3'

Biosystems) to measure the mRNA levels of methyltransferases: *DNMT1*, *DNMT3a*, with three internal controls HPRT, β 2M, and ACTB (Table 2). Relative quantification of mRNA expression in tissue was calculated with real efficiency of each couple of primers using $e^{-\Delta CT}$ method. Three referenced genes were used to normalize the mRNA expression of genes.

2.7. Statistical analysis

Values of the biochemical and clinical parameters were reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). In each generation, the control and contaminated groups were compared with Student's *t*-test in normal populations or the rank sum test in non-normal populations. Resampling-based multiple comparison (Westfall and Young 1993) has been used for a nonparametric *p*-value adjustment since it produces an exact inference procedure despite non normal characteristics of the data, and unknown covariance structures (Bretz et al. 2011). Statistical significance was defined by a value of $p < .05$. Statistical analyses were performed with SigmaStat statistical software (SPSS, Paris, France) and the 'multtest' R package (R Core Team (2017) (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria: <http://www.R-project.org>) (Westfall and Young 1993).

3. Results

3.1. Clinical monitoring

Both water and food consumption, and body weight gain were monitored once a week throughout the experiment. No statistical difference of uranium level in kidney was shown for F1 and F2 that only drank natural spring water without added uranium. The whole body and one kidney (left side for each animal) were weighed for all rats. Body weight was slightly increased for male F1 and decreased for F2. In comparison, body weight of females did not differ significantly between control and contaminated groups for the three generations. Although, we are able to observe a downward trend for F2 ($p = .058$). The weights of the kidney, known as a toxicological target of uranium, revealed a significant decrease exclusively for F2 male rats (13%). However, the relative weight of the kidneys was not statistically different (Table 1, panel A). Amounts of uranium in kidneys were correlated with drinking water uranium concentration, showing a higher level for both males and females F0 of the contaminated experimental group contrarily to the F1 and F2 groups. Several clinical markers assessed in blood plasma

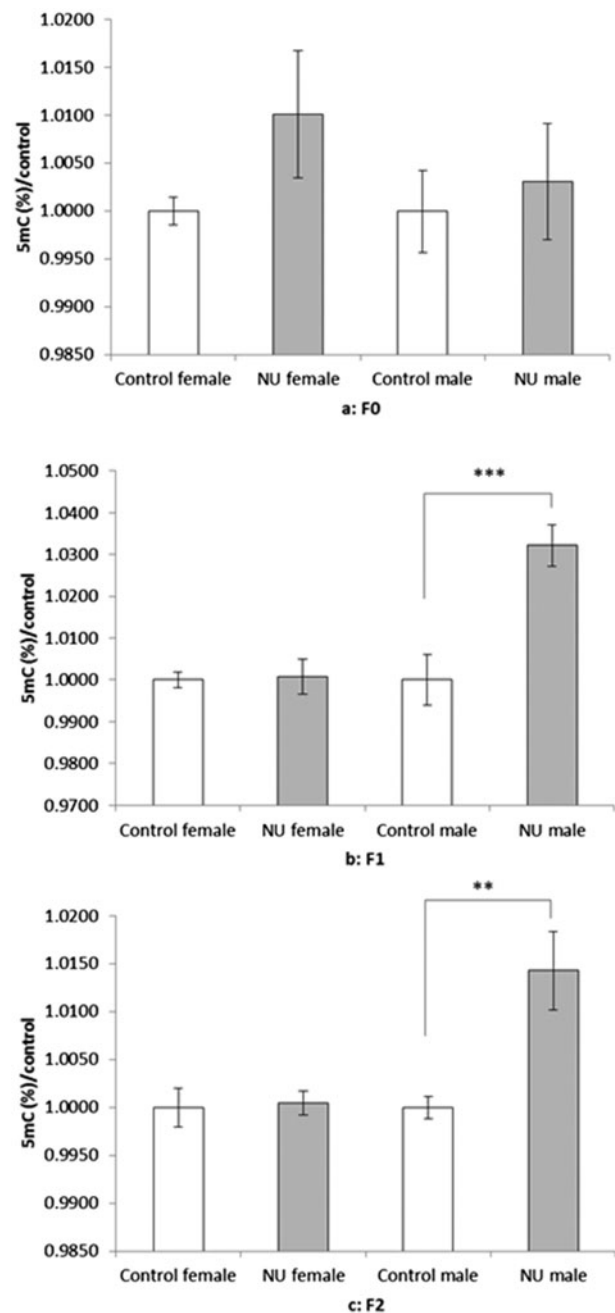


Figure 2. Global DNA methylation (5 mC (%)/control) assessed with ELISA. Data are means normalized ($n = 10$) in the kidney for male and female groups. Results are significantly different for * $p < .05$, ** $p < .01$, and *** $p < .001$.

samples, including ions and kidney markers as creatinine and urea reveal no pathological status (Table 1, panel B).

3.2. Global DNA methylation

For the first generation F0 (Figure 2a), no significant differences were observed in kidney tissue compared to control group. Interestingly, DNA was significantly hypermethylated in male uranium group as compared to control group in the second and third generation (Figure 2b and 2c), determined to be 2.8% and 1.5%, respectively. Moreover the effect in DNA methylation seems higher for the second generation

than the third. No significant differences were shown in kidney of females in the three generations (Figure 2).

3.3. DNA methyltransferases and demethylases gene expression

To complete this study, we measured other markers such as the mRNA expression levels of methyltransferases and demethylases

which are known to regulate gene methylation. In order to investigate the gene activity in DNA methylation we analyzed the mRNA levels of TET1, 2, 3 and TDG, as well as DNMT1 and 3A. Analyses revealed a significantly lower expression of TGD ($p < .05$) in the male kidneys for the first generation. On the other hand, we get a significant increase of the mRNA expression of DNMT1 ($p < .05$) in the kidneys of females F3 and DNMT3a ($p < .001$) in the kidneys of females F2 (Figure 3).

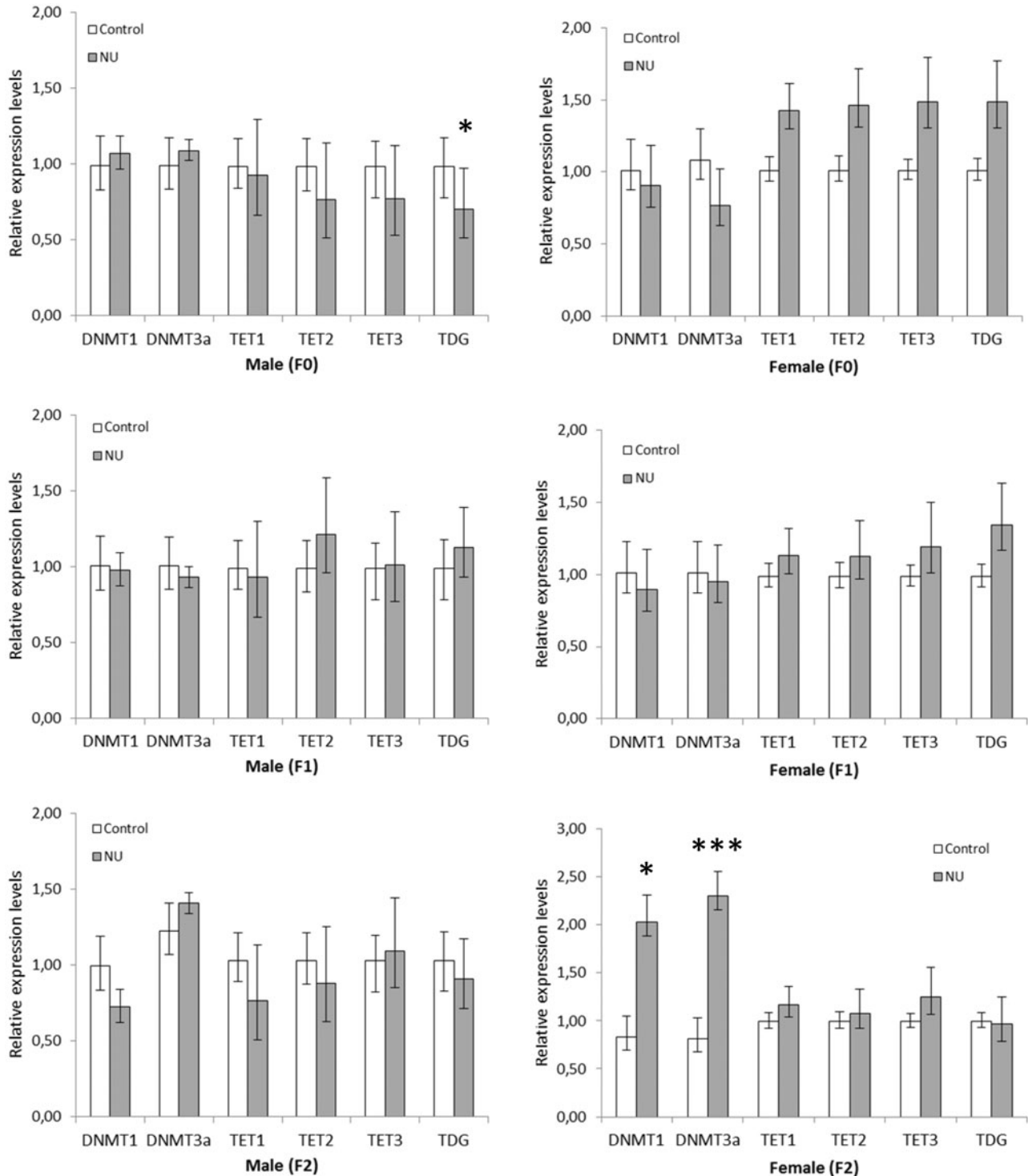


Figure 3. DNA methyltransferases (DNMT1, DNMT3a) and demethylases (TET1, TET2, TET3, TDG) gene expression. Results are significantly different for * $p < .05$, ** $p < .01$, and *** $p < .001$ ($n = 8$).

4. Discussion

DNA methylation is an important mechanism of epigenetic process. Gene methylation can be modified in response to environmental stress (such as ionizing radiation, chemical or psychosocial injuries) and developmental processes (Cortessis et al. 2012). This biological mechanism of regulation can impact metabolism and consequently have a positive or negative physiological effect (Zeybel et al. 2012). In the worst case this may lead to adverse effects and diseases (McBirney et al. 2017) like early epigenetic changes that contribute to delayed metabolic effects. Moreover, epigenetic profiles can be used as biological markers of risk in clinical and social fields (Ladd-Acosta and Fallin 2016; Holland 2017).

In the present study, the epigenetic effect of uranium over three generations of rats was studied in kidney cells exposed to contaminated drinking solution of uranyl nitrate at a concentration of 40 mg L^{-1} . The concentration of 40 mg L^{-1} refers to three times the maximal value found in a Finnish well (Salonen 1994). Moreover, the uranyl intestinal absorption amount is estimated to be around 1 to 1.5% for human, while 0.06% for rat, i.e. 10 times less (corresponding grossly to 4 mg L^{-1} for human drinking water and therefore 10 times less than in this Finnish well). Based on previous experimental studies, this concentration delivers a higher daily dose than environmental but is nevertheless non-toxic for rat kidneys (Poisson et al. 2014). Nine months later, the uranium amount in the kidneys of the first exposed generation of rats (F0) was measured and the result confirms a significant but non-toxic level of exposure. For kidneys the limit of toxicity to uranium is estimated around $3 \mu\text{g g}^{-1}$ (ICPR 1959). At this dose, tubular morphological injuries and necrosis can be observed. In our study, the average amount of uranium in kidney after 9 months contamination is under to $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ and is consequently estimated as non-toxic (Grison et al. 2013). Earlier studies have confirmed this dose is non-toxic by histological observations (Poisson et al. 2014). This first generation of rats (F0) was exposed from birth and the neonatal period which is known as a life period particularly sensitive to environmental stressor (Schwenk et al. 2003; Preston 2004). During the fetal development, high mitotic activity is present that implies a higher sensitivity to stress. In previous studies, such exposure has revealed a delayed metabolome dysregulation (Grison et al. 2013; Grison et al. 2016). However in this present study, whereas the kidney is considered as the major toxicological target for uranium, global DNA methylation profiles in kidney cells of F0 reveal surprisingly no significant modification in either male and female rats. As a hypothesis, this absence of epigenetic effect can be explained by absence of renal toxicity at this level of uranium intake. Nevertheless, because global DNA methylation analyses don't provide a complete observation of the methylated genes, this absence of a significant effect cannot exclude underlying DNA methylation effects on specific genes. Moreover, to go further, we analyzed gene expression of the DNA methylases and demethylases enzymes (DNMTs, TET and TDG) that could reflect a part of epigenetic activity (Lyko 2018). Only a decrease in TDG expression for F0 males was observed. So, for the first contaminated generation, few

epigenetic DNA effects were revealed except for a small significant decrease in TGD gene expression exclusively for males.

For the two following generations (F1, F2) which did not consume contaminated drinking solution from weaning of F1 (21 days after born), early uranium exposure led to persistent epigenetic marks in kidneys cells 9 months later, while uranium became undetectable in the kidneys. On the one hand, contrarily to males, which showed a DNA hypermethylation in kidney cells both F1 and F2 generations, we did not observe significant differences for the female. On the other hand, an increase of *DNMT1* and *DNMT3a* can be noted for F2 females despite the lack of DNA methylation differences. DNMT3a is an enzyme known in the *de novo* process of DNA methylation and takes part in environmental cell adaptive mechanisms and in cell differentiation (Okano et al. 1999). However, this increase of *DNMT3a* gene expression for the F3 females could be related to an adaptive cell response to the uranium exposure. For all of these three generations, these results show a sexual difference of epigenetic regulation level between males and females. Nevertheless, in order to confirm these significant modifications at the RNA levels, it is mandatory to measure the levels of the protein abundance and to measure the gene expression levels of known downstream genes affected by these DNA modifying enzymes to really prove that this affects the enzyme activity. For these two generations, uranium exposure impacted the earlier periods of the embryonic and fetal development, i.e. for F1 from germinal cells of F0 to embryonic, fetal and neonatal and for F2 only from germinal cells of F1 parents. As an example, similar results have been observed in human cohorts for whom the pregnant grandmothers have been exposed to lead (Sen et al. 2015). This molecular epidemiological study revealed an epigenetic DNA methylation effect over generations for grandchildren. Other study, interested in the cadmium effect, a nephrotoxic heavy metal, showed a DNA methylation effect for offspring of exposed rats (Dharmadasa et al. 2017).

In toxicology, germinal cells and embryos are sensitive during the developmental windows because this period of life is essential for setting up metabolic regulations and consequently physiological systems (Schagdarsurengin and Steger 2016; Bommarito et al. 2017; Johansson et al. 2017). During this period, epigenetic imprinting and cell differentiations are very active and *de novo* DNA methylation contributes to reprogramming cells for future physiological functions. Moreover, epigenetic imprinting like DNA methylation, contribute to the cell adaptation against environmental stress. Nevertheless, if an early environmental exposure can stimulate genetic adaptive process, it can unfortunately have adverse and delayed health effects like metabolic syndrome. Indeed, it is currently admitted that epigenetic processes can explain and lead to phenotypic modifications when exposed to low doses of an environmental stressor (Perera and Herbstman 2011). Regarding our present study, this effect was exclusively highlighted for F1 and F2 males and not for females when compared to control group. This observation could be interpreted as a higher renal sensitivity for males

than females to uranium and agrees with those of male gonads which have shown a significant global hypermethylation (Gombeau et al. 2016; Elmhiri et al. 2018). However, in contrast to kidneys, which revealed an effect from the second generation of rat, an effect is observable for the first exposed generation F0, in testes. The testes' sensitivity can be explained by the intense process of cell division and differentiation for gametogenesis while, in kidney cells, the epigenetic profile seems globally more stable to low-dose uranium toxicity. Moreover, sexual differences in sensitivity to xenobiotics are relatively well documented and can explain the differences in DNA methylation observed in kidney after uranium chronic exposure. Indeed, sexual dimorphisms are explained by genetic origins and through regulations of the endocrine systems which modulate the activity of physiological systems and toxicity of xenobiotics (Yang et al. 2006; Shepard et al. 2009; Gombeau et al. 2016; Lestaevel et al. 2016). It seems evident that a mother's lifestyle can impact their fetus; recent studies revealed the importance of the paternal genome imprinting in inheritance (Day et al. 2016). Indeed, individual male or female can specifically transmit epigenetic inheritance marks to their progeny (Sen et al. 2015; Day et al. 2016).

At the individual phenotype level, body weight for males F1 increased (10%). Then a decrease in kidney weight (13%) and body weight (9%) for males for F2 was observed. Clinical chemical parameters measured in plasma revealed no significant modification for markers associated with renal dysfunction. Indeed, despite some body and kidney weight differences, no clinical signs of renal harmful effects were observed. These results confirm our previous observations (Grison et al. 2013; Grison et al. 2016) that no renal toxicity was shown at this dose of contamination for F0 and to our knowledge, we report for the first time no renal toxicity for the following generations. From these results, epigenetic effects do not seem to correlate to renal toxicity but they might be the molecular mechanisms that maintain homeostasis against low-dose environmental stress like chronic uranium intake. Further investigations are needed to confirm and better understanding of the underlying biological mechanisms, e.g. the reversibility of the effects, the use of a sensitive (predisposed) or pathological model (Knock-out) or the relation dose or time/effect can be studied.

In conclusion, a multigenerational protocol of chronic exposure was established to study the impact of an environmental exposure on the progeny. In this model, exposure of rats to uranium implies consecutively the exposure of the next two generations. Moreover, if low-dose exposure to uranium does not imply major phenotypic effects, biological consequences can nevertheless be observed through epigenetic imprinting in kidney over generations.

Actually, this multigenerational study showed an epigenetic effect in rat kidneys by involvement of DNA methylation disruption after chronic intake of a non-toxic dose of uranium. Surprisingly, these epigenetic modifications linked to uranium were revealed only from the second and the third generation of male rats exclusively. For the first generation, the lack of significant biological effects associated to low-

dose exposure was confirmed but for the two next, results confirm the importance of the developmental windows' sensitivity and the sexual dimorphisms in low-dose risk assessment. Indeed, in the field of environmental low-dose effects, public health policies must particularly raise their attention to the offspring which are a particularly vulnerable subpopulation during their fetal development (Preston 2004; Wadhwa et al. 2009).

Beyond these adaptive mechanisms of gene imprinting of a direct environmental exposure, as outstanding questions, e.g. knowing if modifications are reversible and can be transmit to future generations still remain. The exclusive transmission of epigenetic markers of an ancestral environmental exposure could be tested by following progenies of exposed rats beyond the fourth and fifth generation in a transgenerational model. Nowadays, in the aim of understanding underlying epigenetic mechanisms associated to such condition of exposure, an exhaustive scientific approach including DNA methylation array analysis and other like microRNA or histone code, will be interesting to perform. Another point of interest associated to the transmission of epigenetic marks will be to test paternal or maternal exposures differentially. In the context of public health, epigenetic analysis could reveal markers of uranium exposure usable as prognostic test of delayed biological effects or diseases. Such markers can be used as diagnostic tests of metabolic effect as well as an indicator of health risk.

Acknowledgments

The authors thank Frédéric Voyer and Thierry Loiseau for animal care. A word of thanks also goes to David Cohen for the revision of this paper.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Notes on contributors

Stéphane Grison, researcher at the Experimental Radiotoxicology and Radiobiology Laboratory of IRSN.

Ghada Elmhiri, postdoctoral researcher at the Experimental Radiotoxicology and Radiobiology Laboratory of IRSN.

Céline Gloaguen, research technician at the Experimental Radiotoxicology and Radiobiology Laboratory of IRSN.

Christelle Elie, research technician at the Experimental Radiotoxicology and Radiobiology Laboratory of IRSN.

Dimitri Kereselidze, research technician at the Experimental Radiotoxicology and Radiobiology Laboratory of IRSN.

Karine Tack, PhD, is the head of the Experimental Radiotoxicology and Radiobiology Laboratory of IRSN.

Philippe Lestaevel, PhD, conducts research in the field of low-dose exposure at the Experimental Radiotoxicology and Radiobiology Laboratory of IRSN.

Audrey Legendre, PhD, conducts research in the field of low-dose exposure at the Experimental Radiotoxicology and Radiobiology Laboratory of IRSN.

Line Manens, research technician at the Experimental Radiotoxicology and Radiobiology Laboratory of IRSN.

Mohamed Amine Benadjaoud, PhD, Biomathematicien/ Biostatisticien at IRSN.

Jean-Marc Lobaccaro, PhD, Professor of molecular physiology at Clermont-Auvergne University.

Maamar Souidi, PhD, conducts research in the field of low-dose exposure at the Experimental Radiotoxicology and Radiobiology Laboratory of IRSN.

References

- Bird A. 1992. The essentials of DNA methylation. *Cell* 70:5–8.
- Bohacek J, Mansuy IM. 2017. A guide to designing germline-dependent epigenetic inheritance experiments in mammals. *Nat Methods*. 14:243–249.
- Bommarito PA, Martin E, Fry RC. 2017. Effects of prenatal exposure to endocrine disruptors and toxic metals on the fetal epigenome. *Epigenomics* 9:333–350.
- Bretz F, Hothorn T, Westfall P. 2011. Hall/CRC C, editor. Multiple Comparisons using R. Taylor & Francis Group ed.
- Cortessis VK, Thomas DC, Levine AJ, Breton CV, Mack TM, Siegmund KD, Haile RW, Laird PW. 2012. Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure-response relationships. *Hum Genet*. 131:1565–1589.
- Day J, Savani S, Krempley BD, Nguyen M, Kitlinska JB. 2016. Influence of paternal preconception exposures on their offspring: through epigenetics to phenotype. *Am J Stem Cells* 5:11–18.
- Day T. 2016. Interpreting phenotypic antibiotic tolerance and persister cells as evolution via epigenetic inheritance. *Mol Ecol*. 25:1869–1882.
- Dharmadasa P, Kim N, Thunders M. 2017. Maternal cadmium exposure and impact on foetal gene expression through methylation changes. *Food Chem Toxicol*. 109:714–720.
- Elmhiri G, Gloaguen C, Grison S, Kereselidze D, Elie C, Tack K, Benderitter M, Lestaevel P, Legendre A, Souidi M. 2018. DNA methylation and potential multigenerational epigenetic effects linked to uranium chronic low-dose exposure in gonads of males and females rats. *Toxicol Lett*. 282:64–70.
- Esteller M. 2008. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 358:1148–1159.
- Fernandes M, Husi H. 2017. Establishment of an integrative multi-omics expression database CKDdb in the context of chronic kidney disease (CKD). *Sci Rep*. 7:40367.
- Gombeau K, Pereira S, Ravanat JL, Camilleri V, Cavale I, Bourdineaud JP, Adam-Guillermin C. 2016. Depleted uranium induces sex- and tissue-specific methylation patterns in adult zebrafish. *J Environ Radioactiv*. 154:25–33.
- Grison S, Fave G, Maillot M, Manens L, Delissen O, Blanchardon E, Banzet N, Defoort C, Bott R, Dublineau I. 2013. Metabolomics identifies a biological response to chronic low-dose natural uranium contamination in urine samples. *Metabolomics* 9:1168–1180.
- Grison S, Fave G, Maillot M, Manens L, Delissen O, Blanchardon E, Dublineau I, Aigueperse J, Bohand S, Martin JC, et al. 2016. Metabolomics reveals dose effects of low-dose chronic exposure to uranium in rats: identification of candidate biomarkers in urine samples. *Metabolomics* 12:154.
- Hackett JA, Surani MA. 2012. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos T Roy Soc B*. 368:20110328.
- Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH. 2008. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:17046–17049.
- Holland N. 2017. Future of environmental research in the age of epigenomics and exposomics. *Rev Environ Health*. 32:45–54.
- Johansson HKL, Svingen T, Fowler PA, Vinggaard AM, Boberg J. 2017. Environmental influences on ovarian dysgenesis – developmental windows sensitive to chemical exposures. *Nat Rev Endocrinol*. 13:400–414.
- Joseph S, George NI, Green-Knox B, Nicolson T, Hammons G, Word B, Huang S-Mlyn-Cook BD. 2017. Epigenome-Wide Association (DNA Methylation) Study of sex differences in normal human kidney. *J Drug Metabol Toxicol*. 8(1):225.
- Ladd-Acosta C, Fallin MD. 2016. The role of epigenetics in genetic and environmental epidemiology. *Epigenomics* 8:271–283.
- Leggett RW. 1989. The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys*. 57:365–383.
- Lestaevel P, Grison S, Fave G, Elie C, Dhieux B, Martin JC, Tack K, Souidi M. 2016. Assessment of the central effects of natural uranium via behavioural performances and the cerebrospinal fluid metabolome. *Neural Plast*. 2016:1.
- Lyko F. 2018. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet*. 19(2):81–92.
- Martos SN, Tang WY, Wang Z. 1989. Elusive inheritance: transgenerational effects and epigenetic inheritance in human environmental disease. *Prog Biophys Mol Biol*. 54:iii–i54.
- McBirney M, King SE, Pappalardo M, Houser E, Unkefer M, Nilsson E, Sadler-Riggelman I, Beck D, Winchester P, Skinner MK. 2017. Atrazine induced epigenetic transgenerational inheritance of disease, lean phenotype and sperm epimutation pathology biomarkers. *PLoS One*. 12:e0184306.
- Miller AC, Stewart M, Rivas R. 2009. DNA methylation during depleted uranium-induced leukemia. *Biochimie* 91:1328–1330.
- Mothersill C, Seymour C. 2009. Implications for environmental health of multiple stressors. *J Radiol Prot*. 29:A21–A28.
- Mothersill C, Seymour C. 2014. Implications for human and environmental health of low doses of ionising radiation. *J Environ Radioactiv*. 133:5–9.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99:247–257.
- Paquet F, Houpert P, Blanchardon E, Delissen O, Maubert C, Dhieux B, Moreels AM, Frelon S, Gourmelon P. 2006. Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys*. 90:139–147.
- Perera F, Herbstman J. 2011. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod Toxicol*. 31:363–373.
- Poisson C, Stefani J, Manens L, Delissen O, Suhard D, Tessier C, Dublineau I, Gueguen Y. 2014. Chronic uranium exposure dose-dependently induces glutathione in rats without any nephrotoxicity. *Free Radical Res*. 48:1218–1231.
- Poore KR, Hanson MA, Faustman EM, Neira M. 2017. Avoidable early life environmental exposures. *Lancet Planet Health*. 1:e172–e173.
- Preston RJ. 2004. Children as a sensitive subpopulation for the risk assessment process. *Toxicol Appl Pharmacol*. 199:132–141.
- Ray M, Yunis R, Chen X, Rocke DM. 2012. Comparison of low and high dose ionising radiation using topological analysis of gene coexpression networks. *BMC Genomics*. 13:190.
- Salonen L. 1994. 238U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock [Proceedings of the Helsinki Conference]. *IAHS Publ* 222:71.
- Schagdarsurengin U, Steger K. 2016. Epigenetics in male reproduction: effect of paternal diet on sperm quality and offspring health. *Nat Rev Urol*. 13:584–595.
- Schwenk M, Gundert-Remy U, Heinemeyer G, Olejniczak K, Stahlmann R, Kaufmann W, Bolt HM, Greim H, von Keutz E, Gelbke HP. 2003. Children as a sensitive subgroup and their role in regulatory toxicology: DGPT workshop report. *Arc Toxicol*. 77. 2–6.
- Sen A, Heredia N, Senut MC, Land S, Hollocher K, Lu X, Dereski MO, Ruden DM. 2015. Multigenerational epigenetic inheritance in humans: DNA methylation changes associated with maternal exposure to lead can be transmitted to the grandchildren. *Sci Rep*. 5:14466.
- Shepard KN, Michopoulos V, Toufexis DJ, Wilson ME. 2009. Genetic, epigenetic and environmental impact on sex differences in social behavior. *Physiol Behav*. 97:157–170.

- Siroux V, Agier L, Slama R. 2016. The exposome concept: a challenge and a potential driver for environmental health research. *Eur Respir Rev.* 25:124–129.
- St-Cyr S, McGowan PO. 2018. Adaptation or pathology? The role of prenatal stressor type and intensity in the developmental programming of adult phenotype. *Neurotoxicol Teratol.* 66:113–124.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr., Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev.* 33:378–455.
- Wadhwa PD, Buss C, Entringer S, Swanson JM. 2009. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin Reprod Med.* 27:431–368.
- Wappelhorst O, Kuhn I, Heidenreich H, Markert B. 2002. Transfer of selected elements from food into human milk. *Nutrition.* 18:316–322.
- Westfall PH, Young SS. 1993. Resampling-based multiple testing. New York: Wiley.
- Wild CP. 2012. The exposome: from concept to utility. *Int J Epidemiol.* 41:1852–1832.
- Yang X, Schadt EE, Wang S, Wang H, Arnold AP, Ingram-Drake L, Drake TA, Lusis AJ. 2006. Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res.* 16:995–1004.
- Zeybel M, Hardy T, Wong YK, Mathers JC, Fox CR, Gackowska A, Oakley F, Burt AD, Wilson CL, Anstee QM, et al. 2012. Multigenerational epigenetic adaptation of the hepatic wound-healing response. *Nat Med.* 18:1369–1377.

ANNEXES

Dans la continuité des résultats déjà présentés, le premier point abordé dans ces annexes (annexe 1) vient compléter le second article « **Application d'une approche multiéchelle des systèmes biologiques pour étudier l'effet d'une exposition chronique à faible dose d'uranium dans les reins de rat** ». Il vise à observer l'effet du dimorphisme sexuel sur la réponse épigénétique post-transcriptionnelle d'une contamination chronique à l'uranium par l'analyse des profils de micro-ARNs extraits à partir des reins de rats femelles et mâles.

Le deuxième point abordé dans ces annexes (annexes 2 et 3) s'inscrit dans la continuité de l'étude des effets biologiques multigénérationnels d'une exposition chronique à l'uranium. Il complète les résultats présentés dans le troisième article « **Une faible dose d'uranium induit des effets épigénétiques multigénérationnels chez le rat** ». Une partie des résultats d'analyses sont présentés et discutés dans ce manuscrit. Pour pouvoir réaliser des observations proches du phénotype, les résultats d'analyses métabolomiques ont été traités prioritairement. Dans ce travail, il s'agira de s'intéresser en priorité aux différences de profils métaboliques observables dans les urines et les reins des rats pour les deux générations descendantes (F1 et F2) de la première génération contaminée (F0). L'impact du dimorphisme sexuel sur la qualité de la réponse à l'uranium sera aussi analysé.

1. RESULTATS : DIMORPHISME SEXUEL D'UNE EXPOSITION A L'URANIUM.

1.1. PROFILS EPIGENETIQUES POST-TRANSCRIPTIONNELS DES MICRO-ARNs DANS LE TISSU RENAL DES MALES ET FEMELLES

Une première observation réalisée par comparaison des profils de micro-ARNs exprimés dans les reins des mâles et des femelles rats, montre qu'il existe un dimorphisme sexuel basal des identités des micro-ARNs simplement exprimés.

☞ 9% des micro-ARNs exprimés dans les reins des mâles et 12% dans les reins des femelles sont spécifiques au sexe des rats.

Une seconde observation réalisée par analyse en composante principale (ACP ou PCA en anglais) des valeurs relatives d'expression des micro-ARNs exprimés dans les reins mâles et femelles, montre l'existence d'un fort dimorphisme sexuel par l'observation de niveaux d'expression différents d'un sexe à l'autre.

☞ Ce résultat n'étant que le reflet de profils d'activités géniques différentes entre mâles et femelles.

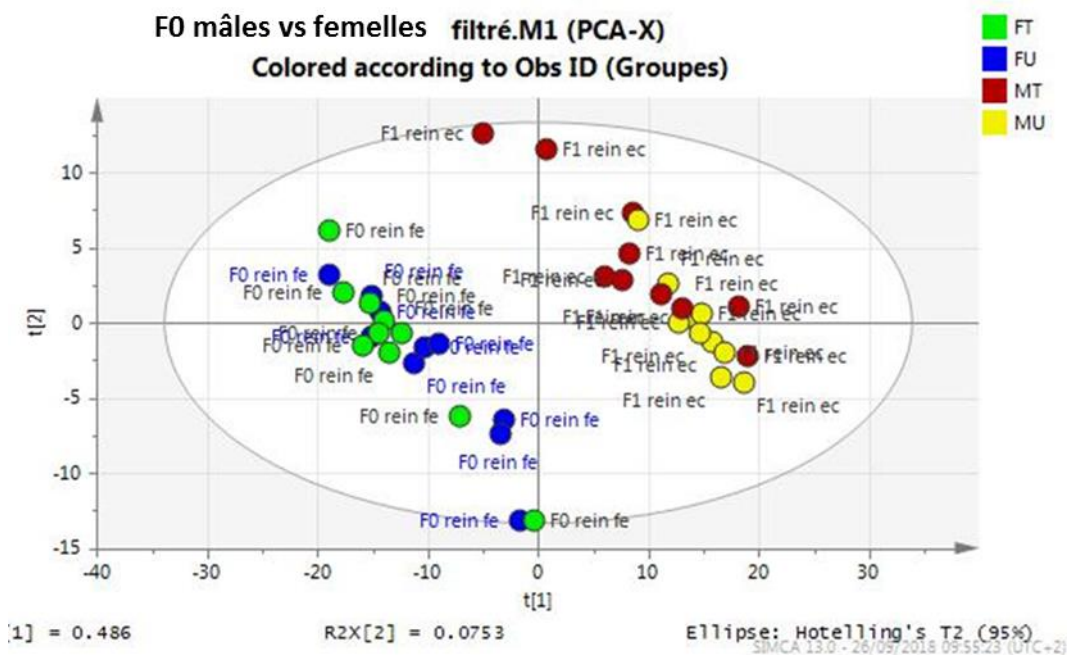


Figure 33 : Dimorphisme sexuel des profils épigénétiques post-transcriptionnels (micro-ARNs) par analyse en composante principale (ACP). FT : femelles témoins, FU : femelles contaminées, MT : mâles témoins, MU : mâles contaminés

1.2. DIMORPHISME EPIGENETIQUE D'UNE CONTAMINATION A L'URANIUM

A partir des profils d'expression des **355 micro-ARNs** rénaux mâles identifiés, une sélection affinée des « Variables Importantes dans la Projection du modèle » (VIP) d'une analyse multivariée discriminante (PLS-DA) par test « Normal Probability Plot » (NPP) a permis de sélectionner un sous-groupe de **18 micro-ARNs** dont les niveaux d'expression varient spécifiquement avec l'exposition à l'uranium.

☞ A partir des **18 micro-ARNs** sélectionnées par NPP ($VIP > 1.5$), le modèle obtenu est validé sur une composante, très discriminant et robuste pour séparer les animaux contaminés des non contaminés ($p=0.0003$, $R_2(Y)=0,789$, $Q_2(Y)=0,613$ et $R_2(X) = 0,223$) et validé par le test de permutation.

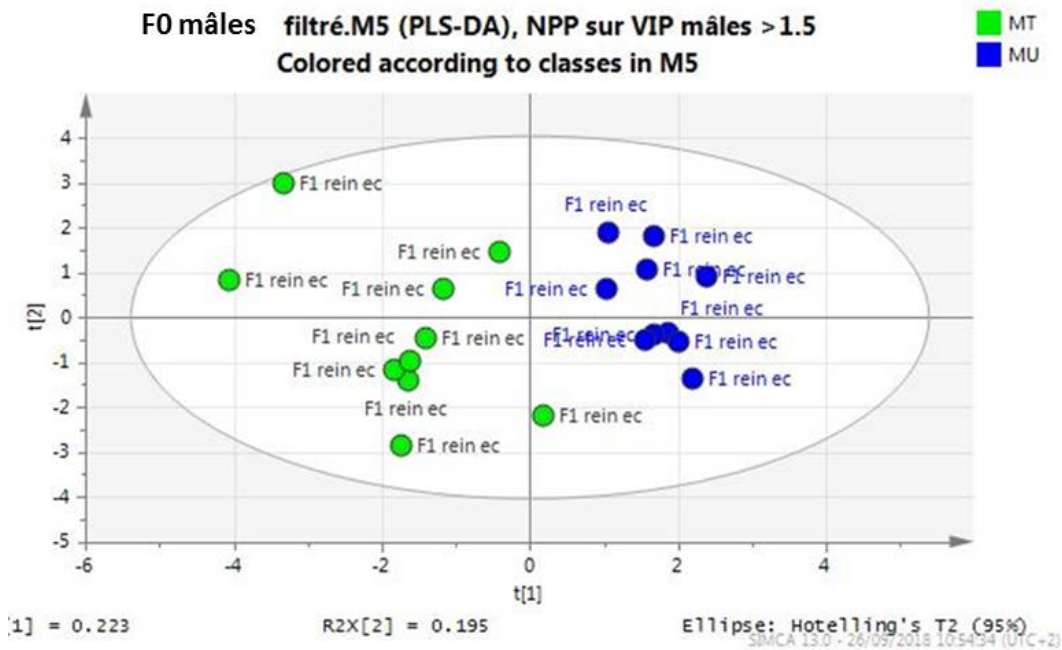


Figure 34 : profils de micro-ARNs rénaux discriminants chez les mâles contaminés à l'uranium par analyse PLS-DA

A partir des profils des **355 micro-ARNs** rénaux femelles la même méthodologie a permis de sélectionner un sous-groupe de **22 micro-ARNs** dont les niveaux d'expression varient spécifiquement avec l'exposition à l'uranium.

☞ A partir des **22 micro-ARNs** sélectionnées ($VIP > 1.5$), le modèle obtenu est très discriminant et robuste pour séparer les animaux contaminés des non contaminés ($p=0.0001$, $R_2(Y)=0,874$, $Q_2(Y)=0,754$ et $R_2(X) = 0,654$) et validé par le test de permutation.

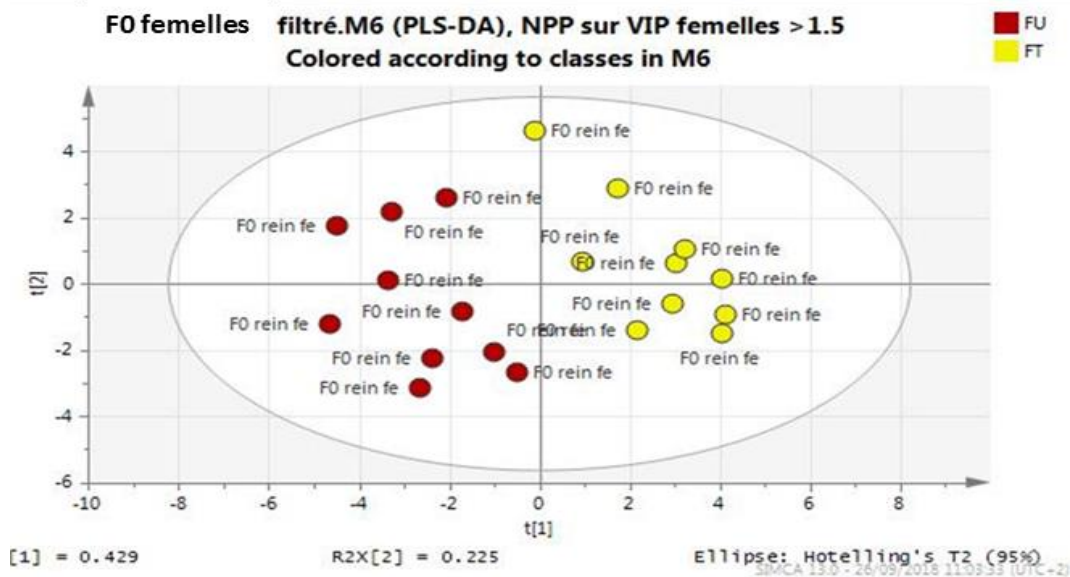
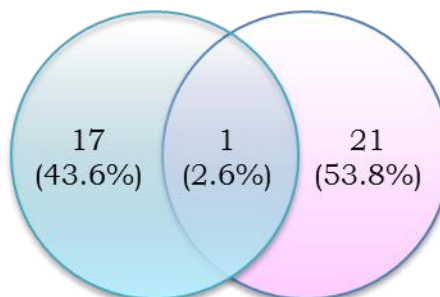


Figure 35 : profils de micro-ARNs rénaux discriminants chez les femelles contaminées à l'uranium par analyse PLS-DA

La comparaison des profils discriminants de micro-ARNs de mâles et de femelles révèle un très fort dimorphisme dans la réponse épigénétique post-transcriptionnelle à l'uranium avec seulement 2.6% de similitude entre les profils.



Mâles : 18 MiRs (bleu); femelles : 22 MiRs (rose).
1 MiR commun aux deux sexes dans le rein (F0).

Figure 36 : Dimorphisme sexuel de la réponse épigénétique post-transcriptionnelle du rein

1.3. CONCLUSION

Les différents profils d'expression de micro-ARNs révèlent au niveau des reins, un dimorphisme sexuel basal important (entre mâle et femelles) avec 9 et 12% des micro-ARNs exclusivement exprimés pour l'un ou l'autre des sexes.

Une comparaison des niveaux de réponse à l'uranium des micro-ARNs exprimés chez les mâles et les femelles montre aussi qu'il existe à ce niveau un dimorphisme très fort avec seulement 2.6% de micro-ARNs discriminants communs aux deux sexes.

2. RESULTATS : APPROCHE MULTIGENERATIONNELLE : IMPACT DE L'URANIUM SUR LE METABOLOME DE LA GENERATION F1 : « LES ENFANTS »

2.1. PROFILS URINAIRES

Une analyse LC-MS a été réalisée par la plateforme analytique CriBiom (Aix-Marseille Université), suivant les conditions définies et décrites ci-dessous, à partir des urines des animaux mâles et femelles de la génération F1 qui ont été collectées à l'âge de 6 mois (n=20 par groupe).

2.1.1. MATERIEL ET METHODES

2.1.1.1. Préparation des échantillons

- Agitation des tubes d'urine au vortex pendant 1 minute
- Centrifugation : 4°C, 15 min, 11000 RPM
- Prélèvement de 50 µL d'urine
- Ajout de 400 µL d'eau déionisée
- Agitation : 30 secondes au vortex
- Centrifugation : 4°C, 15 min, 11000 RPM
- Transfert de 70 µL de surnageant dans un flacon en verre avec l'insert et conservation à +4°C dans l'attente de l'analyse LC-MS

☞ Les contrôles qualité ont été créés en assemblant le même volume de chaque échantillon d'urine (pool d'échantillon).

2.1.1.2. Chromatographie liquide

- Instrument analytique utilisé : Dionex UltiMate 3000
- Solvant A : Eau (H₂O) + 0,1 % Acide Formique (HCOOH)
- Solvant B : Acétonitrile (ACN) 0,1 % Acide Formique (HCOOH)
- Débit : 0,4 mL.min⁻¹
- Température : 40°C
- Température du passeur automatique d'échantillons : 4°C
- Volume d'injection : 5 µL
- Colonne utilisée : Hypersil Gold (100 mm x 2.1 mm x 1.9 µm)
- Gradient utilisé :

Min	A%	B%
0	100	0
1	100	0
11	0	100
13	0	100
14	100	0
16	100	0

2.1.1.3. Spectrométrie de masse

- Instrument utilisé : Q-Exactive Plus

Paramètre (mode "switching polarity)	Valeur	Paramètre	Valeur
Spray voltage	3500 V	Résolution (pour m/z 200 théorique)	35 000
Capillary temperature	320°C	Microscans	1
Sheath Gas flow rate	30	Scan rate (scan/sec)	4
Auxiliary Gas flow rate	8	Inject time (ms)	250
Auxiliary temperature	310°C	Mass range (m/z)	80-1000
S-lens RF	55 V		
Lock mass	391.2843		

- Les échantillons sont randomisés.
- La séquence d'analyse débute par le passage de 5 échantillons blancs (échantillons d'eau pour stabiliser le système analytique), suivie d'une première série d'échantillons contrôles qualité (Pool d'aliquote d'échantillons pour contrôler la dérive analytique).
- Les échantillons d'urine sont ensuite analysés en une seule série dans laquelle est intercalé, un contrôle qualité tous les 5 échantillons analysés. L'analyse est réalisée en mode positif et négatif.

2.1.1.4. Déconvolution

- Le logiciel ProteoWizard MSConvert a été utilisé pour convertir les fichiers originaux de données (*.raw) en des formats plus échangeables (*.mzXML).

☞ *Les empreintes métabolomiques obtenues à partir des acquisitions de données de masse (ions moléculaires) ont été déconvoluées pour permettre la conversion des données brutes tridimensionnelles (m/z, temps de rétention et l'intensité d'ions) en une matrice composée de pics chromatographiques alignés par le temps et le rapport masse sur charge (m/z) avec l'intensité des ions respectifs.*

- Traitement des données par le logiciel open-source XCMS pour obtenir une matrice de données brutes récupérable sur un tableur.

2.1.1.5. Filtration

Plusieurs filtres sont appliqués pour éliminer le bruit de fond analytique et corriger la dérive analytique.

- L'ensemble des signaux issus du bruit électronique ainsi que ceux des échantillons « blancs » ont été éliminés manuellement.
- Une correction de série a été appliquée pour éliminer la dérive analytique (encrassement de source d'ionisation).
- Les pics instables et l'information redondante (fragments, adduits, isotopes) sont éliminés par utilisation des coefficients de variation des pics appliqués aux échantillons de contrôle qualité et par coefficient de corrélation entre ions appartenant à la même fenêtre de temps (1 sec).

☞ *À partir des **6296 variables** analytiques obtenues par LC-MS, **1687 signaux** analytiques sont retenus à l'issue de la procédure de filtration du signal.*

2.1.1.6. Analyse des données

- Les analyses statistiques multivariées ont été réalisées par le logiciel SIMCA-P+ (version 14, Umetrics).

- Les modèles statistiques ont été validés par ANOVA (P -values $<0,05$ considérées significatives), par validation croisée et par appréciation des valeurs de variance expliquée (R^2Y) et prédites (Q^2Y).
- Les analyses en Composantes Principales (ACP) et les analyses discriminantes (PLS-DA) ont été effectuées sur des données transformées en $\log 10[1 + 10^7]$ et normalisées la loi de Pareto.

2.1.2. RESULTATS

La première observation réalisée à partir d'une Analyse en Composante Principale de l'ensemble des signaux analytiques bruts mesurés (mâles et femelles témoins et contaminés) dans chaque échantillon (6296 variables analytiques non filtrées) permet de mettre en évidence un dimorphisme sexuel basal net entre mâles et femelles.

2.1.2.1. Profils urinaires des mâles

L'analyse discriminante (PLS-DA) réalisée sur les **1687 variables** identifiées dans les échantillons d'urine des mâles permet de discriminer les animaux contaminés des non contaminés.

☞ *Le modèle statistique est significatif et robuste (p -value par CV-ANOVA = $3,45 \cdot 10^{-3}$, $R^2(Y)=0,897$, avec une variance prédite de $Q^2(Y)=0,601$ et une variance interindividuelle $R^2(X)=0,243$) qui est validé par le test de permutation.*

84 variables très discriminantes sont sélectionnées par un test « Normal Probability Plot » réalisé à partir de la liste des VIP du modèle.

☞ *Ces 84 variables permettent d'obtenir un modèle est très discriminant et robuste pour séparer les animaux contaminés des non contaminés ($p=2,5 \cdot 10^{-10}$, $R^2(Y)=0,849$, $Q^2(Y)=0,395$ et $R^2(X)=0,762$) qui est validé par test de permutation.*

Parmi ces **84 variables** discriminantes, **33 métabolites** peuvent être identifiés de façon putative et parmi celles-ci, le **n-méthyl nicotinamide** et le **N-méthyl-2-pyridone-5-carboxamide** associés à la voie du **nicotinate-nicotinamide** sont encore présents dans les profils discriminants urinaires des mâles (**Figure 37**).

Variable	mzmed	rtmed	Annotation	Base de données
M132T42	132,07690	0,70	CREATINE_+H+	BDD maison
M153T106	153,06607	1,76	N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide_+H+	BDD maison
M124T53	124,03960	0,88	NICOTINATE_+H+ ou PICOLINATE_+H+	BDD maison
M137T40	137,07102	0,66	2-Methylnicotinamide_+H+ ou 3-carbamyl-1-methylpyridinium_+H+	BDD maison
M133T51	133,06084	0,84	UREIDOPROPIONATE_+H+	BDD maison
M373T495	373,27377	8,24	CHOLATE_+H-2H2O+	BDD maison
M203T35	203,22318	0,58	SPERMINE_+H+	BDD maison
M255T390	255,06539	6,49	Naringenin_M-H2O+H	BDD CEA
M158T233	158,08138	3,89	Methyl acetoacetate_M+ACN+H ou 3-Methylcrotonyl glycine_M+H ou N-Tiglylglycine_M+H	BDD CEA
M208T343	208,09710	5,72	N-ACETYLPHENYLALANINE_+H+	BDD maison
M160T71	160,10819	1,18	delta-Guanidinovaleric acid_M+H ou L-2,4-diaminobutyric acid_M+ACN+H	BDD CEA
M229T143	229,15481	2,38	1-L-Leucyl-L-Proline_M+H ou Leu-Pro_M+H ou Pro-Leu_M+H	BDD CEA
M520T617	520,34045	10,29	LysopC(18:2(9Z,12Z))_M+H	BDD CEA
M496T649	496,34021	10,82	PC(0:0/16:0)_M+H+	BDD CEA
M119T68	119,04952	1,14	Phenylacetic acid_M-H2O+H	BDD CEA
M289T224	289,17576	3,73	Hydroxybutyrylcarnitine_M+ACN+H	BDD CEA
M190T108	190,10739	1,81	Mevalonic acid_M+ACN+H	BDD CEA
M91T316	91,05474	5,27	BENZYL_ALCOHOL_+H-2H2O+	BDD maison
M127T46	127,08680	0,77	Gly-Pro_-HCOOH+H+	BDD maison
M183T56	183,07703	0,93	DEOXYURIDINE_-HCOOH+H+	BDD maison
M183T83	183,06306	1,38	mono-Methyl adipate_M+Na ou 2,2-Dimethylglutaric acid_M+Na ou 3,3-Dimethylglutaric acid_M+Na ou Pimelic acid_M+Na	BDD CEA
M239T337	239,12599	5,62	undecanedioic acid_M+Na	BDD CEA
M214T347	214,14393	5,78	Butyrylcarnitine_M-H2O+H	BDD CEA
M357T556	357,27891	9,27	DEOXYCHOLATE_+H-2H2O+	BDD maison
M246T299	246,17012	4,99	2-Methylbutyrylcarnitine_M+H ou Isovaleryl-L-carnitine_M+H	BDD CEA
M233T336	232,98624	5,60	o-, m-, ou p-Cresolsulfate_M+2Na-H	BDD CEA
M188T319	188,12848	5,32	Panthenol_M-H2O+H	BDD CEA
M408T229	408,18639	3,82	Phe Val Val_M+2Na-H	BDD CEA
M302T353	302,23268	5,88	2,6 dimethylheptanoyl carnitine_M+H	BDD CEA
M184T376	184,13357	6,27	(S)-(-)-Perillic acid_M+NH4	BDD CEA
M308T211	308,12563	3,52	Indole-3-acetyl-L-aspartic acid_M+NH4	BDD CEA
M302T225	302,15974	3,74	Lys Ala Gly_M+H+CO	BDD CEA
M196T113	196,09706	1,88	Hydroxytyrosol_M-i-ACN-i-H	BDD CEA

Figure 37 : identités putatives des métabolites discriminants identifiés dans les urines de rats mâles contaminés

2.1.2.2. Profils urinaires des femelles

L'analyse discriminante (PLS-DA) réalisée sur les **1687 variables** identifiées dans les échantillons d'urine des femelles permet de discriminer les animaux contaminés.

☞ Le modèle statistique est significatif et robuste (p -value par CV-ANOVA = $1,4.10^{-6}$, $R^2(Y)=0,996$, avec une variance prédite de $Q^2(Y)=0,511$ et une variance interindividuelle $R^2(X)=0,854$) et validé par le test de permutation.

84 variables très discriminantes sont sélectionnées par un test « Normal Probability Plot » réalisé à partir de la liste des VIP du modèle. Elles permettent de séparer les animaux contaminés des non contaminés.

☞ Le modèle statistique est très discriminant et robuste ($p=2,9.10^{-8}$, $R^2(Y)=0,932$, $Q^2(Y)=0,796$ et $R^2(X)=0,584$) et validé par le test de permutation.

Parmi ces **84 variables** discriminantes, **26 métabolites** peuvent être identifiés de façon putative (**Figure 38**) :

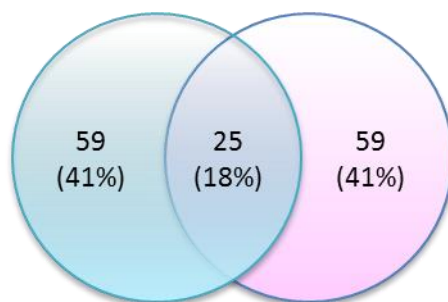
Variable	mzmed	rtmed	Annotation	Base de données
M132T42	132,07730	0,66	CREATINE_+H+	BDD maison
M151T33	151,03535	0,55	Diethylene glycol_[M+2NaH]+	LC-MS/ MZedDB
M125T52	125,07149	0,54	HISTIDINOL_-NH3+H+	
M373T495	373,27427	8,17	CHOLATE_+H-2H2O+	BDD maison
M230T201	230,13877	3,34	Hydroxybutyrylcarnitine_M-H2O+H ou DL-metanephriine_M+CH3OH+H ou Azelaic acid_M+ACN+H	BDD CEA
M187T139	187,05786	2,32	Beta-D ou L -fucose_M+Na ou ramanose_M+Na	BDD CEA
M174T328	174,11302	5,47	N-ACETYLLEUCINE_+H+	BDD maison
M208T343	208,09737	5,73	N-ACETYLPHENYLALANINE_+H+	BDD maison
M174T116	174,12389	1,94	Ornithine_M+ACN+H	BDD maison
M520T617	520,34045	10,29	LysoPC(18:2(9Z,12Z))_M+H	BDD CEA
M496T649	496,34021	10,82	LysoPC(16:0)_M+H+	LC-MS/ METLIN
M211T275	211,05792	4,59	[C8 H12 O5 Na]+	LC-MS
M347T514	347,22180	8,57	Urocortisone_M-H2O+H ou 21-Deoxycortisol_M+H ou Corticosterone_M+H	BDD CEA
M198T382	198,11282	6,37	C10H15NO3_[M+H]+	LC-MS
M174T344	174,11302	5,47	N-ACETYLLEUCINE_+H+	BDD maison
M126T54_2	126,09189	0,62	L-CARNITINE_+H-2H2O+	BDD maison
M143T52	143,11844	0,72	N-ALPHA-ACETYLLYSINE_-HCOOH+H+	BDD maison
M130T297	130,15919	4,95	Octylamine_[M+H]+	LC-MS/METLIN
M152T47	152,07115	0,77	6-HYDROXYDOPAMINE_+H-H2O+	BDD maison
M186T49	186,07663	0,67	N-ACETYLGALECTOSAMINE_+H-2H2O+ ou N-ACETYLMANNOSAMINE_+H-2H2O+ ou N-ACETYLGLUCOSAMINE_+H-2H2O+	BDD maison
M176T375	176,07115	6,22	INDOLE-3-ACETATE_+H+	BDD maison
M132T93	132,06607	1,24	N-ACETYALANINE_+H+	BDD maison
M255T428	255,12294	7,14	methyl 4-[2-(2-formyl-vinyl)-3-hydroxy-5-oxo-cyclopentyl]-butanoate_[M+H]+	LC-MS/METLIN/MZedDB
M128T322	128,10754	5,47	N-ACETYLLEUCINE_-HCOOH+H+	BDD maison
M367T427	367,24845	7,02	3-ALPHA.11-BETA.17-ALPHA.21-TETRAHYDROXY-_5-ALPHA-PREGNAN-20-ONE_3.21- DIACETATE_+H+	BDD maison

Figure 38 : identités putatives des métabolites discriminants identifiés dans les urines de rats femelles contaminées

2.1.2.3. Dimorphisme sexuel de l'exposition à l'uranium

18 % de similitude sont observables entre les profils discriminants des urines de femelles et de mâles.

On constate un fort dimorphisme sexuel des profils métabolomiques urinaires des rats contaminés à l'uranium de la seconde génération (F1) (**Figure 39**).



Mâles : 84 variables (bleu); femelles : 84 variables (rose). 25 variables communes dans l'urine (F1).

Figure 39 : dimorphisme sexuel d'une exposition chronique à l'uranium dans les urines de la seconde génération (F1)

2.2. PROFILS RENAUX

Une analyse LC-MS a été réalisée par la plateforme analytique CriBiom-Aix-Marseille Université), suivant les conditions définies et décrites ci-dessus, à partir d'échantillons de reins des animaux mâles et femelles de la génération F1 qui ont été prélevés à l'âge de 9 mois (n=20 par groupe).

2.2.1. MATERIEL ET METHODES

- ✓ A 325 mg de reins, ajouter 1,5 mL de MeOH gardé à -20°C dans les micro-tubes de 2 mL
- ✓ Broyage 4 min, 30 Hz en utilisant 2 billes métalliques
- ✓ Incubation des échantillons pendant 30 min à 4°C
- ✓ Vortex 30 sec
- ✓ Centrifugation 20 min, 11000 rpm, 4 °C
- ✓ Récupération de 400 µL de surnageant dans des filtres 10 kDa
- ✓ Centrifugation 45 min, 11000 rpm, 4°C
- ✓ Evaporation sous flux d'azote
- ✓ Reprise des extraits secs dans 250 µL ACN/H₂O, 10/90 (v/v)
- ✓ Echantillon de blanc (ACN/H₂O, 10/90 (v/v))

☞ Les contrôles qualité ont été créés en assemblant le même volume (30 µL) de chaque échantillon d'extrait de rein (pool d'échantillon).

☞ Les conditions analytiques LC-MS et le prétraitement des données spectrales sont en tous points identiques à ceux utilisés pour l'analyse des urines.

Les analyses statistiques multivariées ont été réalisées par le logiciel SIMCA-P+ (version 14, Umetrics). Les analyses en Composantes Principales (ACP) et analyses discriminantes (PLS-DA) ont été effectuées à partir des données transformées en $\log 10[1 + 10^5]$ et normalisées par la loi de Pareto.

2.2.2. RESULTATS

☞ **864 signaux filtrés** sont obtenus par extrait de reins des animaux mâles et femelles.

L'analyse en composante principale réalisée à partir des **864 signaux** (normalisés et centrés) permet d'observer une séparation nette entre mâles et femelles (tous groupes expérimentaux confondus). Cette observation confirme le dimorphisme métabolique sexuel basal des reins (malgré l'existence de quelques points aberrants) dont le pouvoir discriminant est très nettement supérieur à celui de l'uranium.

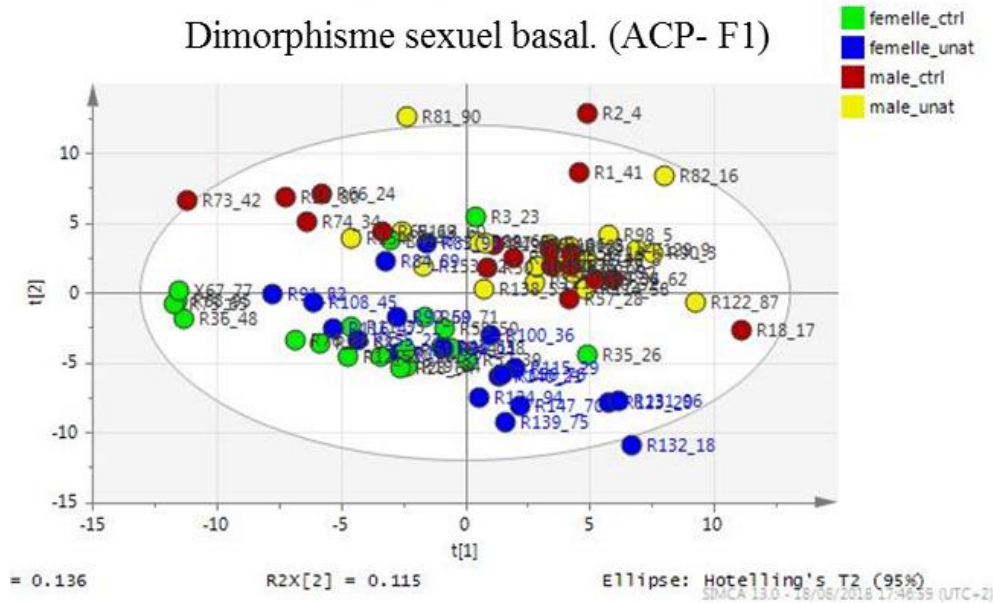


Figure 40 : analyse en composante principale réalisée à partir des signaux enregistrés par LC-MS sur l'ensemble des échantillons de rein des animaux de génération F1 (mâles, femelles, témoins et traités confondus)

Cette forte différence entre le métabolome rénal des mâles et celui des femelles est confirmée par analyse OPLS-DA avec une p-value = $1.17 \cdot 10^{-15}$.

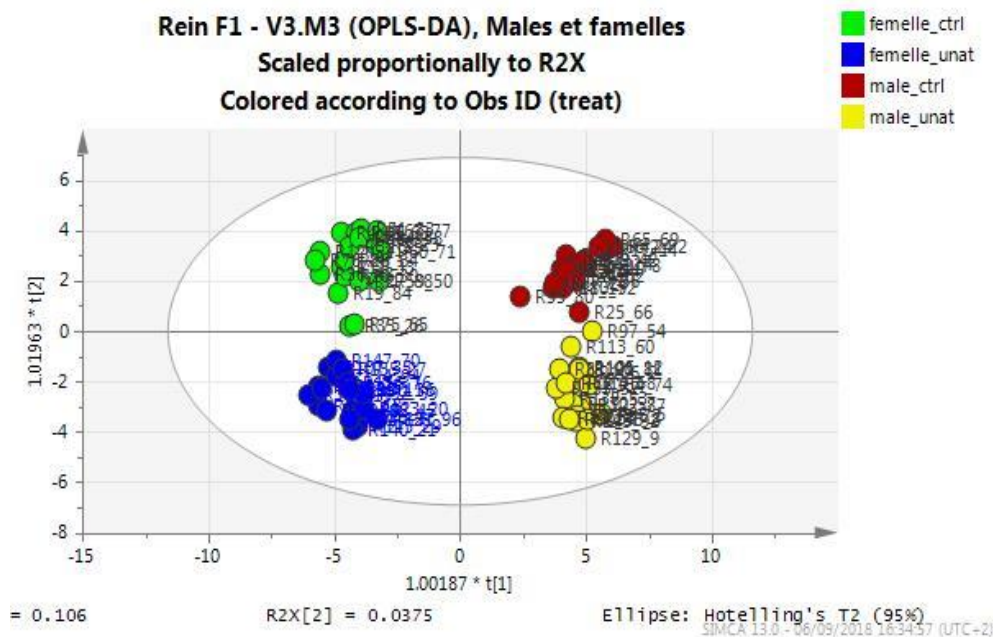


Figure 41 : OPLS-DA réalisée à partir des signaux enregistrés par LC-MS avec l'ensemble des échantillons de rein des animaux de génération F1 (mâles, femelles, témoins et traités confondus)

Par analyse OPLS-DA, les groupes contaminés peuvent aussi être distingués des non-contaminés (**Figure 41**).

2.2.2.1. Profils rénaux des mâles

L'analyse PLS-DA réalisée à partir des signaux des 40 échantillons de reins mâles permet d'obtenir un modèle statistique significatif et robuste.

☞ (*p-value CV ANOVA = 0.0062 ; R2(Y)= 0.834 ; Q2(Y)= 0.425*).

Après sélection de **164 variables** d'intérêt (VIP>1.2 ajustés par « Normal Probability Plot »), on obtient un modèle discriminant et très significatif explicatif et robuste et validé par test de permutation (**Figure 42**).

☞ (*p-value CV-ANOVA = 1.0 10⁻⁸ ; R2(Y)= 0.862 avec une variance prédite de Q2(Y)=0.718*)

Parmi ces **164 variables**, **16** sont identifiables de façon putative.

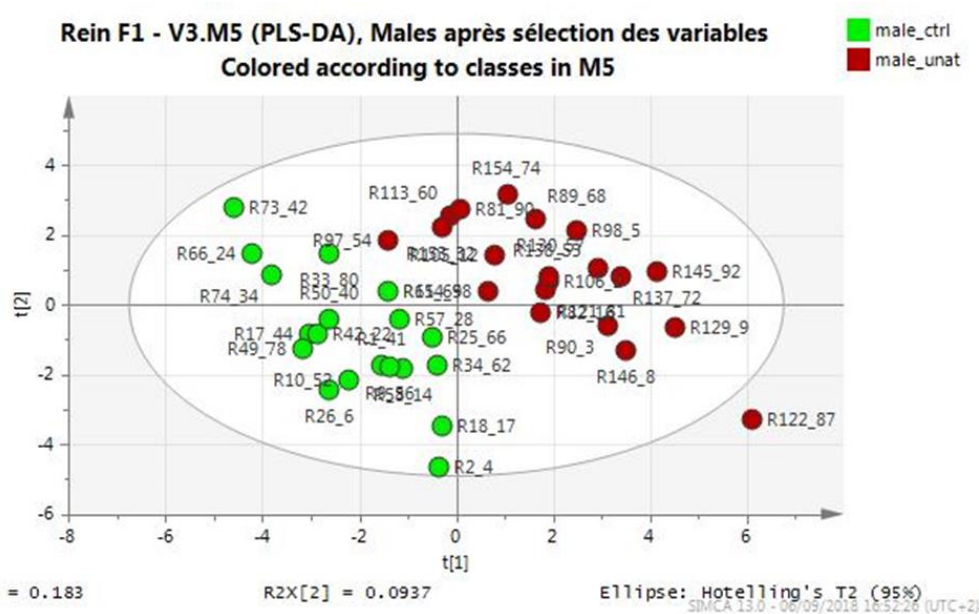


Figure 42 : analyse PLS-DA des signaux d'échantillons des reins mâles après sélection des variables (NPP sur VIP)

2.2.2.2. Profils rénaux des femelles

L'analyse PLS-DA réalisée à partir des signaux des 40 échantillons de reins femelles permet d'obtenir un modèle statistique discriminant significatif

☞ (*p-value CV ANOVA = P=0.01 ; R2(Y)= 0.817 ; Q2(Y)= 0.28*).

Après sélection des variables d'intérêt (VIP>1.3 ajustés par « Normal Probability Plot »), on obtient un modèle discriminant très significatif, explicatif et robuste validé par test de permutation (**Figure 43**).

φ (p -value CV-ANOVA = $8.0 \cdot 10^{-9}$; $R_2(Y) = 0.887$ avec une variance prédite de $Q_2(Y) = 0.771$)

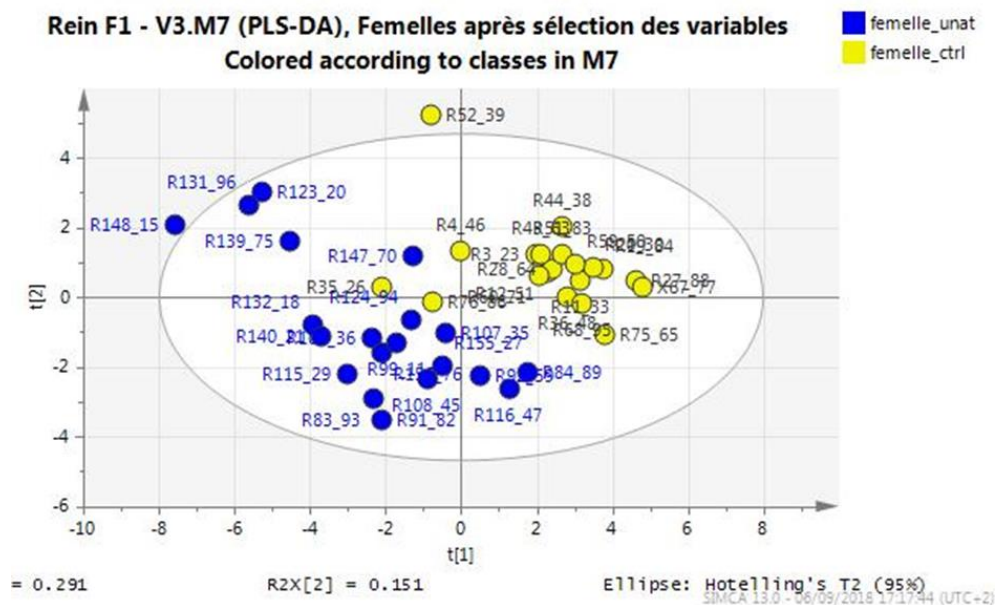
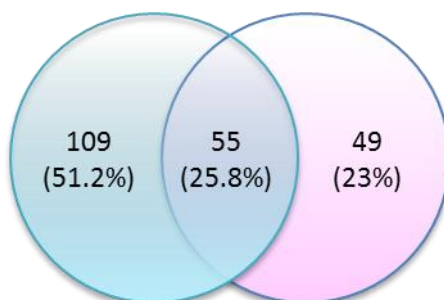


Figure 43 : analyse PLS-DA des signaux d'échantillons des reins femelles après sélection des variables (NPP sur VIP)

Parmi ces **104 signaux** très discriminants, **11 métabolites** sont putativement identifiables.

2.2.2.3. Dimorphisme sexuel rénal d'une contamination à l'uranium

L'analyse comparative des **164 signaux** discriminants observés dans les reins des mâles contaminés et des **104** femelles révèle l'existence de **55 signaux** discriminant communs aux deux sexes. Avec 25 % de similitude, les signatures métabolomiques discriminantes des mâles et des femelles révèlent un dimorphisme sexuel associé à l'uranium très fort au niveau du rein (**Figure 44**).



Mâles : 164 variables (bleu); femelles : 104 variables (rose). 55 variables communes dans le rein (F1).

Figure 44 : dimorphisme sexuel d'une exposition chronique à l'uranium dans les reins de la seconde génération (F1)

2.3. CONCLUSIONS

Les animaux de la seconde génération (F1) qui ont été contaminés depuis le stade embryonnaire jusqu'à la période néonatale et dont les gamètes parentaux ont aussi été exposés, présentent une signature métabolomique urinaire d'exposition. On note aussi au niveau de cette signature métabolomique d'exposition à l'uranium un fort dimorphisme sexuel avec seulement 25% de similitude entre les signatures d'exposition des mâles et des femelles.

Comme pour la première génération, la voie du nicotinate-nicotinamide est touchée par l'exposition (mais exclusivement chez les mâles).

Au niveau des reins, les signatures métabolomiques d'exposition présentent aussi un dimorphisme sexuel fort.

Ainsi, à partir de l'analyse des résultats urinaires et rénaux, une signature métabolomique d'exposition est observable chez les animaux de la seconde génération (F1) qui ont été directement contaminés jusqu'à l'âge de 3 semaines. Ce résultat révèle l'existence de la persistance d'une signature d'exposition 8 mois après l'arrêt de la contamination. Ces profils pourraient être associés à l'exposition des cellules germinales parentales et à l'exposition intra utérine des rats durant les périodes développementales (fœtale et néonatale), connues pour être extrêmement sensibles aux expositions environnementales.

Cette étude révèle l'existence d'effets métaboliques tardifs associés à une exposition précoce. Ce déséquilibre métabolomique semble aussi irréversible (au moins dans ce laps de temps) et étroitement liée au sexe des individus.

3. RESULTATS : APPROCHE MULTIGENERATIONNELLE : IMPACT DE L'URANIUM SUR LE METABOLOME DE LA GENERATION F2 : « LES PETITS ENFANTS »

3.1. PROFILS URINAIRES

À partir des animaux de la troisième génération (F2), des urines ont été collectées à 6 mois (20 mâles exposés, 20 mâles contrôles, 20 femelles exposées et 20 femelles contrôles). Une analyse LC-MS a été réalisée selon les conditions définies par la plateforme analytiques CriBiom (Aix-Marseille Université) comme décrites ci-dessus.

☞ **1760 signaux** LC-MS sont obtenus à partir de la matrice nettoyée et sont utilisables pour réaliser des analyses statistiques.

Une identification des signaux analytiques dans la base de données de la plateforme CriBiom a permis d'identifier putativement **214 molécules** choisies parmi celles qui avaient la meilleure précision de masse (le plus petit delta m/z) et le plus proche temps de rétention (en appliquant un delta de signal m/z de 5 ppm (+/- 0.0005 m/z) et un delta de temps de rétention (RT) de 0.5 min).

3.1.1. RESULTATS

Une Analyse en Composante Principale (**Figure 45**) permet de faire une première observation sur l'ensemble des **1760 variables** identifiées dans les échantillons d'urine (mâles et femelles confondus).

Cette observation permet de mettre en évidence l'existence d'un dimorphisme sexuel basal des animaux sur la première composante et montre aussi une très légère distribution différentielle des groupes mâles (contrôles versus ex-contaminés) sur la sixième composante.

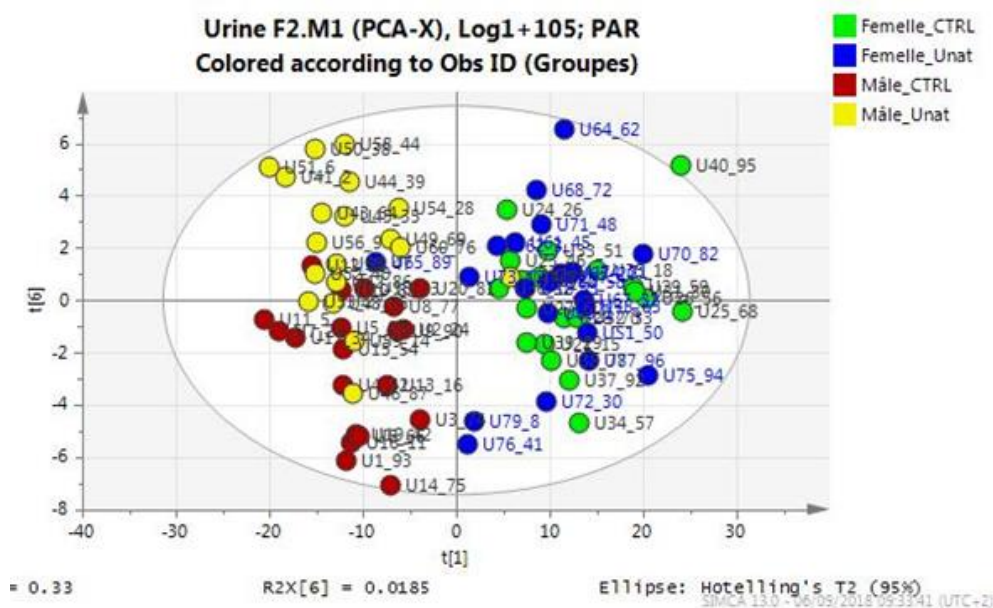


Figure 45 : analyse en composante principale des urines de mâles et femelles confondus

3.1.1.1. Profils urinaires des Mâles

L'analyse discriminante (PLS-DA) réalisée à partir des **1760 variables** identifiées dans les échantillons d'urine des mâles permet de discriminer les animaux contaminés des non contaminés sur la deuxième composante.

☞ *Le modèle statistique est cependant peu significatif (p -value par CV-ANOVA = 0.014 $R^2(Y)$ = 0.837 avec une variance prédite de $Q^2(Y)$ =0.446) et n'est pas validé par le test de permutation.*

☞ *Ce résultat signifie qu'il existe assez peu de différence entre les profils métabolomiques des animaux mâles contaminés et non contaminés et qu'une grande part de l'observation est due au hasard.*

Après sélection des variables d'intérêt ($VIP > 1$) ajustés par « Normal Probability Plot », on obtient un modèle significatif, explicatif et robuste.

☞ (p -value CV-ANOVA = $7.4 \cdot 10^{-8}$; $R^2(Y)$ = 0.984 avec une variance prédite de $Q^2(Y)$ =0.831)

513 variables discriminantes ont été extraites à partir de ce modèle dont **53** sont identifiables de façon putative.

Parmi ces variables, on retrouve le N-Methylnicotinamide et le N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide.

3.1.1.2. Profils urinaires des femelles

L'analyse discriminante (PLS-DA) réalisée à partir des **1760 variables** identifiées dans les échantillons d'urine des femelles permet de discriminer les animaux contaminés des non contaminés par un modèle très significatif et robuste.

☞ (p -value par CV-ANOVA = $9 \cdot 10^{-5}$ $R^2(Y)$ =0.733 avec une variance prédite de $Q^2(Y)$ =0.495) mais le modèle n'est pas validé par le test de permutation.

☞ *Le résultat de ce test signifie qu'il existe peu de différence entre les profils métabolomiques des animaux femelles contaminés et non contaminés et qu'une grande part de l'observation est due au hasard.*

Après sélection des variables d'intérêt ($VIP > 1.2$) ajustées par « Normal Probability Plot », on obtient un modèle significatif, explicatif et robuste

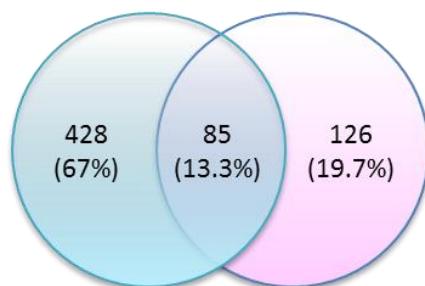
☞ (p -value CV-ANOVA = $8 \cdot 10^{-5}$; $R^2(Y)$ = 0.882 avec une variance prédite de $Q^2(Y)$ =0.547) validé par test de permutation.

211 variables discriminantes ont été extraites à partir de ce modèle et **21** sont putativement identifiables.

Parmi ces variables, on retrouve le N-Methylnicotinamide.

3.1.1.3. Dimorphisme sexuel de l'exposition à l'uranium

L'analyse différentielle des profils métabolomiques des urines mâles et femelles ne présentent que 13% de similitude (**85 variables communes**). L'urine des animaux révèle un très fort dimorphisme sexuel de la réponse biologique à l'uranium (**Figure 46**).



Mâles : 513 variables (bleu); femelles : 211 variables (rose). 85 variables communes dans les urines (F2).

Figure 46 : dimorphisme sexuel d'une exposition chronique à l'uranium dans les urines de la troisième génération (F2)

3.2. PROFILS RENAUX

A partir d'échantillons de reins des animaux mâles et femelles de la troisième génération F2 qui ont été prélevés à l'âge de 9 mois (n=20 par groupe). Une analyse LC-MS a été réalisée selon les conditions définies par la plateforme analytiques CriBiom (Aix-Marseille Université) comme décrites ci-dessus.

3.2.1. RESULTATS

2934 signaux LC-MS sont obtenus à partir de la matrice nettoyée et sont utilisables pour réaliser des analyses statistiques. Une identification des signaux analytiques dans la base de données de la plateforme CriBiom a permis d'identifier putativement **201 molécules** choisies parmi celles qui ont la meilleure précision de masse (le plus petit delta m/z) et le plus proche temps de rétention (en appliquant un delta de signal m/z de 5 ppm (+/- 0.0005 m/z) et un delta de temps de rétention (RT) de 0.5 min).

L'analyse en composante principale réalisée à partir de l'ensemble des signaux mâles et femelles normalisés et centrés ($\log_{10}[1 + 10^5]$, Pareto) permet d'observer une séparation entre les profils métabolomiques mâles et femelles sur la première composante.

☞ Cette observation confirme le dimorphisme sexuel basal des reins mais ne permet pas d'observer l'effet de l'uranium sur les composantes suivantes (**Figure 47**).

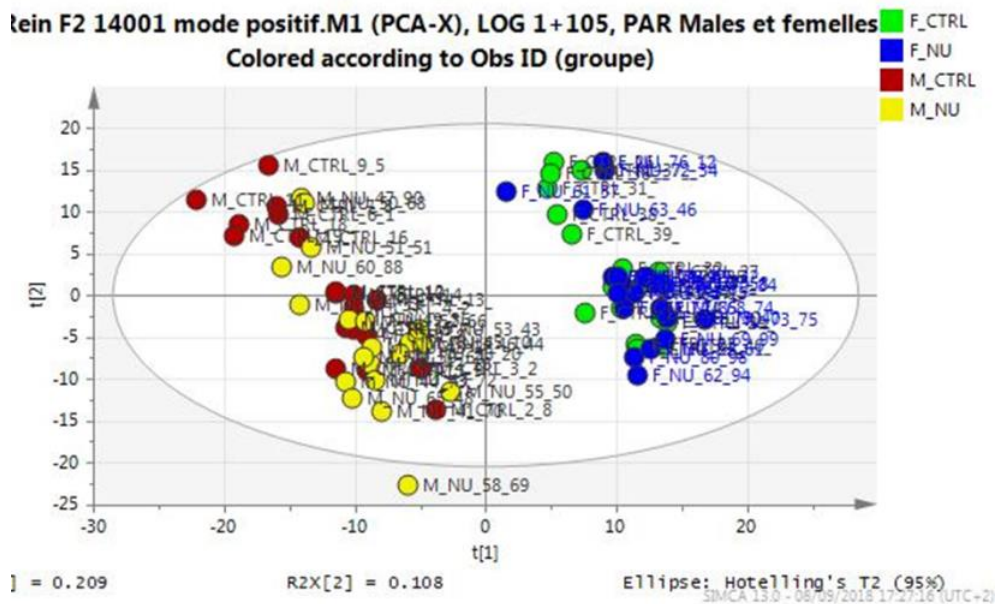


Figure 47 : ACP réalisée à partir des 2934 signaux analytiques des reins mâles et femelles F2

3.2.1.1. Profils rénaux des mâles

L'analyse PLS-DA réalisée à partir des signaux des 39 échantillons de reins mâles (un point aberrant éliminé) permet d'obtenir après sélection des variables d'intérêt (VIP>1.7 ajustés par Normal Probability Plot), un modèle statistique significatif et robuste, validé par test de permutation.

$$p\text{-value CV ANOVA} = 1.4 \cdot 10^{-8} ; R^2(Y) = 0.930 ; Q^2(Y) = 0.754$$

25 variables discriminantes ont été extraites de ce modèle, dont **1** (déoxycytidine) est putativement identifiable.

3.2.1.2. Profils rénaux des femelles

L'analyse PLS-DA réalisée à partir des signaux des 40 échantillons de reins femelles ne permet pas d'obtenir un modèle statistique significatif et robuste.

3.2.1.3. Dimorphisme sexuel rénal d'une contamination à l'uranium

Ne pouvant obtenir un modèle discriminant à partir des échantillons de reins des femelles, le dimorphisme sexuel associé à l'uranium s'impose chez les mâles qui, à ce stade de l'étude, semblent plus sensibles à l'uranium que les femelles.

Ces résultats sont aussi visualisables par analyse discriminante OPLS-DA (réalisée à partir de l'ensemble des échantillons mâles et femelles, témoins et contaminés confondus) (**Figure 48**).

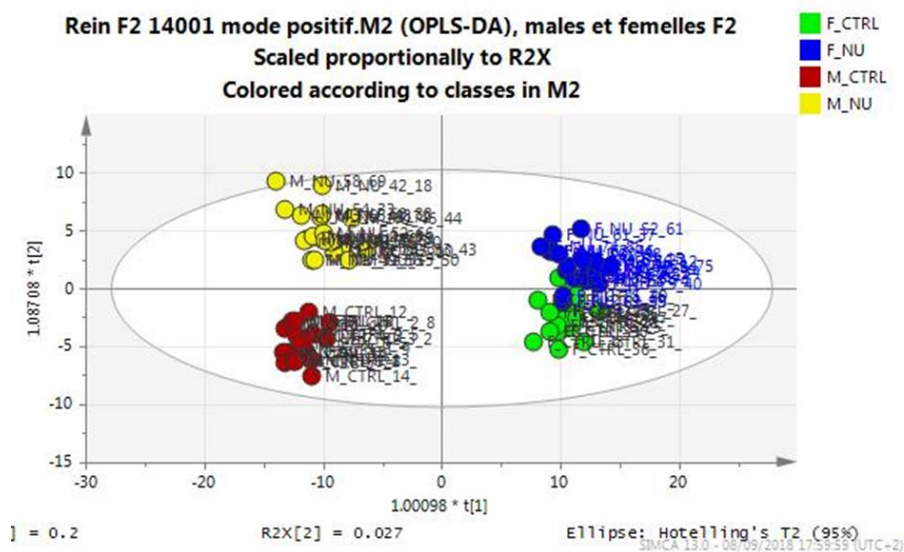


Figure 48 : analyse OPLS-DA réalisée sur l'ensemble des échantillons des reins F2 (mâles et femelles)

3.3. CONCLUSIONS

Les animaux de la dernière génération (F2), contaminés au stade des cellules germinales parentales, présentent des signatures urinaires d'exposition accompagnées d'un fort dimorphisme sexuel. Seulement 13% de similitude sont observables entre les signatures d'exposition des mâles et des femelles.

La voie du **nicotinate-nicotinamide** est encore identifiée comme une cible prépondérante de l'exposition.

Au niveau des reins, seuls les mâles présentent une signature métabolomique d'exposition à l'uranium.

25 variables seulement sont capables de discriminer les reins d'animaux contaminés des non contaminés.

On observe donc, à partir de ces résultats des signatures métabolomiques d'exposition dans les urines des rats mâles et femelles. Par contre, seuls les mâles semblent présenter une signature rénale. On notera aussi que ces résultats pourraient être le reflet d'une différence de sensibilité rénale à l'uranium entre mâles et femelles et que **la voie du nicotinate-nicotinamide est toujours marquée par les urines au bout de la troisième génération.**

Ces résultats expérimentaux, obtenus à l'échelle du métabolome, confirment l'existence de l'effet multigénérationnel d'une exposition à l'uranium sur trois générations de rats.

DISCUSSION

L'uranium est une source environnementale d'exposition dont l'origine des dispersions, à la fois naturelle et entropique (Enrichissement isotopique accompagnée de la production d'un résidu appauvri), présente un risque de toxicité pour les écosystèmes et pour l'homme en tant que métal lourd radioactif.

Parmi les différentes situations d'expositions à risque pour les populations humaines, la question des effets biologiques ou sanitaires des contaminations chroniques par l'uranium naturel présent dans la chaîne alimentaire se pose et interroge au sujet des limites de doses admissibles en matière de radioprotection.

Dès l'après-guerre, avec le développement des armes atomiques et de l'industrie électronucléaire, l'uranium a beaucoup été étudié mais ce n'est qu'à partir des années 70 qu'on commence à observer une augmentation significative du nombre d'études publiées. Depuis les années 90, en réponse aux diverses interrogations scientifiques et questionnements sociétaux sur sa toxicité, le nombre d'études réalisées s'est accru de manière exponentielle.

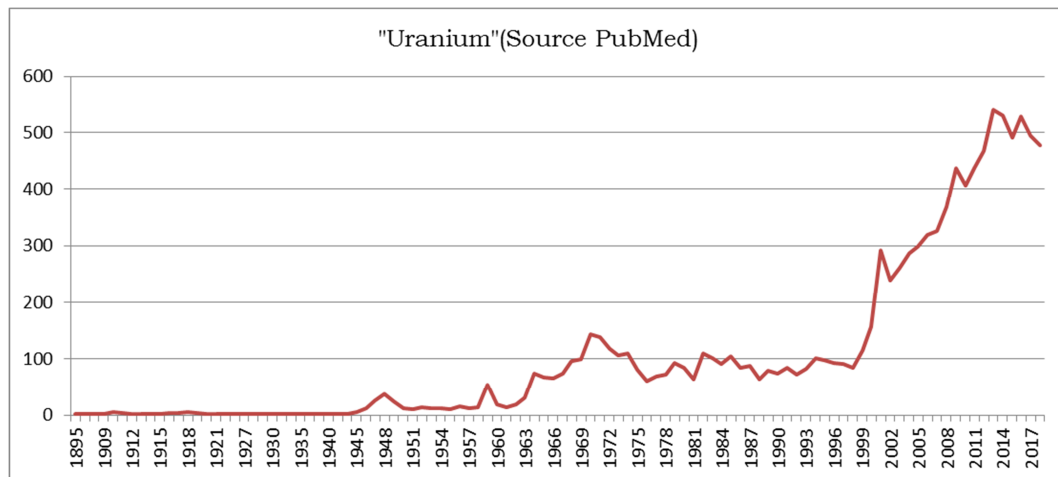


Figure 49 : fréquence des publications produites sur la thématique de la toxicité de l'uranium entre 1895 et 2018

Si les toxicités des fortes doses d'exposition à l'uranium sont à présent bien connues, celles attribuables à des expositions chroniques à faibles doses ne sont pas encore très claires et ceci d'autant plus, si on cherche à identifier un seuil de toxicité (NOAEL). Or, pour pouvoir proposer des recommandations nécessaires à la définition des normes réglementaires en matière de radioprotection, identifier ses limites toxicologiques s'avère crucial si l'on souhaite sortir du principe de précaution tout en évitant un risque de dommage sanitaire.

La première difficulté rencontrée lorsqu'on cherche à évaluer les risques des effets biologiques des expositions à faibles doses d'uranium tient de la gamme de dose elle-même pour laquelle très peu voire aucun effet clinique (marqueur moléculaire d'atteinte rénale, trouble neurologique...), est observable à court terme ou avec des niveaux et fréquences d'apparition considérée comme non significative (effets stochastiques).

☞ Cette absence de toxicité associable aux faibles doses d'exposition est une problématique en radioprotection, car certaines questions de santé public demeurent.

Dans la gamme des expositions chroniques à faibles doses d'uranium, les résultats d'études épidémiologiques ne permettent pas d'identifier clairement un risque pour les populations même si de fortes suspicions continuent à animer les débats entre les exploitants et la société civile. Expérimentalement, aucune pathologie n'a pu être jusqu'alors observée à ces niveaux d'exposition. Seuls des effets d'ordre infraclinique, observables à l'échelle moléculaire ont pu être décrits au niveau de différents systèmes biologiques.

Or, parmi l'ensemble des questions de société attribuables aux faibles doses, les principales inquiétudes concernent les risques de maladies tardives (cancéreuses et non cancéreuses) pour lesquelles on ne relève aucun signe de toxicité précoce. Dans ce contexte, la poursuite des recherches en radiotoxicologie des faibles doses d'uranium ou d'autres radionucléides, impose de se pencher sur des approches et protocoles analytiques adaptés au domaine de la toxicologie prédictive, si l'on souhaite pouvoir proposer des hypothèses «solides en matière d'évaluation des risques»,

Ces approches passent par la réalisation de modèles expérimentaux pertinents et complexes qui nécessitent une parfaite maîtrise de l'ensemble des paramètres influents sur la qualité et l'amplitude de la réponse biologique. Basés sur des approches *in vivo*, *in vitro* ou *in silico*, ils doivent être adaptés à la question scientifique posée. L'utilisation d'outils analytiques capables de fournir une analyse exhaustive et multiparamétrique (tels que ceux issus des sciences omiques qui sont déjà utilisées en médecine, toxicologie, pharmacologie, nutrition...), semble opportun pour mettre en évidence une réponse biologique caractérisée par des effets multiples et de faibles amplitudes, qui suivent des cinétiques temporelles asynchrones et des réponses dose-effet non linéaires. A l'occasion des travaux réalisés dans cette thèse, certaines de ces approches ont prouvé leur pertinence dans le domaine de la radiotoxicologie des faibles doses.

☞ *Aussi, dans un domaine d'études basées sur l'observation de petits effets biologiques, la réalisation d'analyses à haut débit qui mesurent simultanément des milliers voire des dizaines de milliers d'identités biologiques permet, à partir de niveaux de fluctuations faibles, de décrire des effets significatifs par l'emploi d'analyses statistiques multivariées qui par réalisation d'analyses intégrées de l'ensemble des entités mesurées permet d'en accroître la puissance statistique.*

Finalement, la réalisation d'analyses intégratives multiéchelles se heurtant à des problématiques de cinétique temporelle, cette dernière composante nécessite de mettre en œuvre des protocoles d'études capables de réaliser des cinétiques temporelles de suivi de l'ensemble des fluctuations moléculaires pour pouvoir décrypter le sens biologique des effets observés sur ces systèmes dynamiques de régulation.

☞ *Cette analyse s'appuiera sur des modèles d'analyses intégratives des systèmes biologiques, plus connues sous le terme de Biologie des Systèmes qui font appel à des outils biostatistiques et bioinformatiques.*

Parmi l'ensemble des questions soulevées par la problématique des effets des faibles doses d'exposition à l'uranium, les travaux de cette thèse se sont principalement et graduellement intéressés à quelques-unes d'entre elles qui sont énumérées dans le schéma présenté dans la **Figure 50**.



Figure 50 : principaux questionnements scientifiques abordés dans cette thèse

Pour aborder ces différentes questions relatives à l'étude des effets infracliniques des expositions à faibles doses d'uranium, cette thèse se décompose en deux grandes parties.

La première partie de cette thèse s'intéresse à rechercher des déséquilibres qui pourraient être le reflet de la réponse biologique de la cellule à l'uranium, au niveau des systèmes de régulations moléculaires. Ces observations seront réalisées à différents niveaux moléculaires, en commençant par le niveau le plus proche de l'expression des phénotypes (le métabolome) pour ensuite s'intéresser au niveau d'expression génique de la réponse cellulaires à l'uranium.

☞ *L'analyse de la réponse génique sera abordée par l'étude des fluctuations des niveaux d'expression de deux grands systèmes qui sont : l'expression des ARN messagers et pour une partie du système de régulation épigénétique (la méthylation de l'ADN et l'expression des micro-ARNs).*

Pour mener ce travail de thèse, un modèle expérimental *in vivo* de contamination chronique de rats à l'uranium a été dans un premier temps mis en place, pour réaliser un suivi temporel, à différentes doses et à court, moyen et long terme, par l'analyse des métabolomes des urines (fluide biologique facile à prélever), du sang et des reins. Cette étude qui cherche à mettre en évidence l'impact de l'uranium sur le rein (principale cible de la toxicité de l'uranium), a permis de mettre en avant les résultats suivants :

Le premier résultat d'analyse observable, montre que l'uranium peut modifier les profils métabolomiques urinaires, sanguins et rénaux à des doses extrêmement faibles (niveau de dose admissible dans l'eau potable).

L'intérêt porté par ce résultat est double. Il prouve d'une part, que l'apport de la métabolomique en radiotoxicologie des faibles doses est pertinent lorsque l'on s'intéresse à l'uranium et d'autre part, que les systèmes métaboliques révèlent une extrême sensibilité à l'uranium.

Les résultats obtenus dans cette étude, ont montré que l'ingestion chronique de doses admissibles d'uranium dans l'eau potable (OMS-2011) était capable d'induire des effets biologiques mesurables dans le métabolome des rats contaminés et que cet effet augmentait avec le temps. Parallèlement, aucun effet n'était observable au niveau des analyses biochimiques de marqueurs cliniques qui s'avèrent plus adaptés à l'observation de toxicité.

☞ *Il est néanmoins important de noter que si un effet biologique pouvait être observé à de telles doses, aucune nocivité liée à l'exposition de l'organisme par l'uranium n'a pu être identifiée.*

L'analyse de l'évolution temporelle des profils métabolomiques montre selon la dose de contamination employée que les principaux marqueurs métaboliques varient suivant des relations dose-effet non linéaires et que ces relations présentent des seuils de réponse dépendant à la fois de la dose et du temps de contamination. Ces résultats confirment que la réponse biologique aux faibles doses d'uranium suit des profils d'évolution dose-réponse non linéaires comme cela a été constaté pour d'autres polluants environnementaux tels que les perturbateurs endocriniens.

☞ *Sachant que la sensibilité d'un système biologique à une exposition donnée dépend de l'âge de l'individu, le profil de la relation dose-effet observé ne peut pas être uniquement associé à l'uranium, car dans le cas d'une contamination chronique à faible dose, le temps de contamination se confond avec le vieillissement de l'animal. Dans cette étude, les analyses réalisées ont aussi montré que l'amplitude des effets métabolomiques liés au vieillissement était nettement supérieure à ceux liés à l'uranium. Ainsi, malgré une étude réalisée par comparaison avec un groupe de référence, le vieillissement des animaux peut être susceptible d'être lié à des effets de seuils qui peuvent évoluer au cours du temps.*

Les résultats d'analyses métabolomiques des reins et urines de rats contaminés ont montré que l'uranium interférait au niveau de nombreux métabolismes. A la fois observés dans l'urine et le rein, les métabolismes des acides gras insaturés et du nicotinate-nicotinamide ont été identifiés comme les principales cibles métaboliques de l'exposition chronique à l'uranium (Articles I et II).

La voie du nicotinate-nicotinamide est à la fois identifiée dans l'urine et le rein. Cette observation pourrait indiquer l'existence d'un effet biologique de l'uranium sur les cellules rénales mais à ce stade, aucun argument ne permet de savoir si ces effets moléculaires doivent être assimilés à des marqueurs précoces de cytotoxicité rénale ou à la réponse indirecte d'un effet métabolique par activation génique. Cette dernière pourrait être stimulée en réponse à une inhibition directe de l'uranium sur l'activité de certaines enzymes (interférence de l'uranium avec les cofacteurs enzymatiques Zn^{2+} ou Ca^{2+})

☞ *Associé à la voie du nicotinate-nicotinamide, la diminution de la clairance du n-méthylnicotinamide (identifié dans cette étude comme un des principaux marqueurs urinaire de contamination à l'uranium) a déjà été mentionné dans des articles anciens qui s'intéressaient à l'étude de la toxicité rénale à forte dose d'uranium. Ce métabolite a aussi été proposé comme marqueur endogène d'interactions médicamenteuses au niveau des transporteurs membranaire des cellules tubulaires [197, 198]. Etant capable d'interférer au niveau des cofacteurs métalliques de certaines enzymes (Zn^{2+} ou Ca^{2+}), on peut donc penser que l'ion uranyle est capable d'influencer indirectement l'activité de certains gènes pour assurer le maintien de l'homéostasie [167, 168].*

Pour compléter cette étude, l'analyse globale des niveaux d'expression géniques transcriptionnelle et épigénétiques post-transcriptionnelle a partiellement confirmé l'existence d'une activité liée aux voies métaboliques précédemment identifiées au niveau du métabolome. En complément, ces analyses ont aussi mis en évidence une activité génique au niveau de différents processus cellulaires qui peut être associée à des mécanismes de réparation tissulaires, d'activation du système immunitaire et de stress oxydatif (apoptose, prolifération, structuration, processus développementaux et signalisation cellulaire).

Une analyse intégrative multiéchelle de différents systèmes biologiques, réalisée à partir des résultats d'analyse des différents niveaux de régulation moléculaires (métabolomique, expression génique transcriptionnelle et épigénétique post-transcriptionnelle) confirment partiellement l'implication des différents niveaux de régulation moléculaire dans l'aboutissement final de profils métabolomiques ou de fonctions biologiques car, malgré une stratégie expérimentale basée sur l'utilisation d'analyses exhaustives des systèmes biologiques moléculaires (pour accroître la puissance analytique), cette étude se heurte à plusieurs limites méthodologiques. A ce stade, les résultats nécessitent d'être complétés par la réalisation d'études complémentaires pour être confirmés et validés (Article II).

☞ *La première limite est liée aux règles statistiques de correction de p-value imparties aux analyses à tests multiples, pour lesquelles le risque de faire une erreur d'interprétation des résultats augmente avec le nombre de tests réalisés [199]. Or, lorsqu'on mesure des fluctuations de signaux dont les amplitudes sont globalement très proches du bruit de fond homéostatique, un dilemme se pose entre la puissance statistique des résultats obtenus et la sensibilité de l'observation. Ainsi dans le domaine des faibles doses, il s'avère quelquefois nécessaire de faire partiellement abstraction de cette règle de correction de la p-value, pour ne pas perdre la significativité des résultats et pouvoir formuler des hypothèses mécanistiques. Ces résultats qui sont entâchés d'une grande part d'incertitude, devront néanmoins être validés ultérieurement par des analyses plus ciblées et plus spécifiques..*

☞ *La seconde limite, vient du décalage temporel observé au niveau des cinétiques de réactions moléculaires. Ces chaînes de réactions moléculaires se produisent entre le niveau d'expression génique et le niveau métabolique, se déroulent de manières asynchrones et sont de surcroît régulées par des mécanismes de contrôle associés à des effets de seuils. Cette propriété constitue une limite d'observation car elle ne permet pas d'observer l'intégralité des événements moléculaires qui peuvent être impliqués dans la réponse biologique à une exposition, à un instant donné. Cette limite méthodologique implique de réaliser des études de suivi temporel des marqueurs biologiques pour pouvoir appréhender les origines et les mécanismes moléculaires associés à un effet biologique [200-202].*

☞ *Finalement, il n'est pas rare d'observer des effets contradictoires à ce qui était attendu, selon la dose considérée. Ces ambiguïtés mécanistiques peuvent être liées à des effets de seuils qui sont à l'origine des relations dose-effet non linéaires, observables dans le domaine des faibles doses. Cette dernière composante biologique rendant l'interprétation des résultats et la compréhension des effets biologiques complexes. Néanmoins, l'intérêt du travail de cette thèse permet d'en fixer les limites pour, non seulement fournir une première information scientifique dans un des domaines de la radiotoxicologie encore peu exploré mais aussi pour s'armer méthodologiquement dans le cadre de la réalisation de futurs projets.*

D'un point de vue sociétal, il apparaît à présent essentiel, de s'intéresser aux problèmes des susceptibilités génétiques quand on s'intéresse aux effets environnementaux des expositions chroniques à faibles doses. Si la diversité des populations à l'échelle de la planète tend de plus en plus à se réduire (par brassage des populations), la variabilité génétique en un lieu donné tend quant à elle, à augmenter. Cette mixité des populations, dont les origines génétiques sont diverses peut, comme celles attribuables aux identités sexuelles génétiques des individus, avoir des répercussions qualitatives significatives sur les niveaux de réponses biologiques aux expositions environnementales.

☞ *Les résultats de cette étude ont montré que l'uranium n'avait pas le même effet sur le métabolome urinaire des mâles et des femelles alors qu'il présente a contrario plus de similarité au niveau du rein (article II).*

☞ Cette composante génétique a aussi été observée au niveau du système épigénétique. Les analyses des profils de méthylation globale de l'ADN des reins n'a pas permis d'observer de différences notables entre les mâles et femelles contaminés de la première génération (article III). Cependant, ceci ne signifie pour autant pas qu'il n'existe pas de différences notables au niveau des marques épigénétiques portées par certains gènes. Inversement, l'analyse des profils rénaux de micro-ARNs (un autre mécanisme épigénétique) a révélé un très fort dimorphisme moléculaire au niveau de la réponse épigénétique post-transcriptionnelle à l'uranium (résultats présentés en annexes, partie 1).

Les résultats obtenus dans cette première partie de thèse prouvent qu'il existe suffisamment de différences biologiques (au niveau des régulations géniques, métaboliques et physiologiques) entre les animaux mâles et femelles, pour qu'elles soient mieux considérées dans l'évaluation des risques sanitaires applicables en radioprotection ou en politique de santé publique (comme ça l'est déjà dans les secteurs de la médecine et de la pharmacologie).

La deuxième partie de cette thèse s'intéresse aux effets tardifs qui peuvent apparaître des mois voire des années ou dizaines d'années après le début d'une exposition à faible dose d'uranium.

Selon les circonstances d'exposition, ces effets peuvent être soit liés directement à l'exposition des individus soit à un effet biologique « indirect » pouvant affecter les générations à venir. Dans le cadre de cette thèse, un protocole expérimental *in vivo* d'exposition multigénérationnelle de rats à l'uranium a été mis au point pour modéliser ces effets en exposant simultanément trois générations de rats.

Pour réaliser cette exposition multigénérationnelle, une attention particulière sera prêtée aux périodes développementales des animaux, périodes connues pour être particulièrement sensibles aux stress environnementaux. Dans le cadre de ce modèle le choix a été fait de majorer la situation d'exposition environnementale en exposant simultanément les animaux des deux sexes.

☞ Des femelles gestantes ont été exposées durant la période de gestation, pour exposer conjointement la descendance. Durant cette période développementale intra-utérine, les cellules germinales primordiales de la seconde génération (mâles et femelles confondus) seront elles-mêmes exposées et vecteur d'effets biologiques directs sur la troisième et dernière génération.

Les résultats de cette étude ont montré qu'une exposition chronique et multigénérationnelle à l'uranium, pouvait affecter trois générations d'animaux (exposés à des stades développementaux de sensibilité différentes).

Similairement à la première partie de cette thèse, la stratégie expérimentale mise en œuvre a pour but d'étudier les modifications de niveaux moléculaires observables dans différents systèmes de régulation (à l'échelle cellulaire) par l'emploi d'approches analytiques à haut débit de type « omiques ».

La première des observations est réalisée au niveau du phénotype des animaux par l'analyse des paramètres morphométriques des individus, des organes et biochimiques (marqueurs cliniques urinaires). Ces analyses n'ont pas permis d'observer d'effets cliniques majeurs. Cependant, une légère modification statistiquement significative du poids moyen corporel et des reins des animaux contaminés de la seconde et de la troisième génération a pu être observée.

Au niveau de l'expression génique des cellules rénales, l'analyse des profils de méthylation globale de l'ADN n'a révélé aucune modification pour la première génération d'animaux (F0).

☞ Comme expliqué précédemment, l'absence de modification du niveau global de méthylation de l'ADN de la première génération, ne permet pas de conclure à l'absence de modifications spécifiques au niveau de certains gènes.

Les deux générations suivantes présentent des différences significatives de niveau de méthylation dans les reins des animaux contaminés. Une augmentation des niveaux de méthylation globale de l'ADN des reins est exclusivement observable chez les mâles.

☞ *Cette observation montre que le système épigénétique de méthylation de l'ADN des reins est affecté par l'uranium lors d'une exposition in utero, alors qu'il ne semble globalement pas l'être pour des animaux ayant été exposés après la naissance (première génération : F0).*

L'analyse des profils globaux révèle aussi des effets différentiels selon l'identité sexuelle des animaux. Dans cette étude, seuls les reins des animaux mâles présentent un niveau de méthylation de l'ADN accru (hyperméthylation du profil d'ADN) alors que les femelles ne présentent pas de modification (article III).

☞ *Ce constat d'un déséquilibre épigénétique porté par des différences de niveaux de méthylation de l'ADN associables à une diminution d'expression génique, peut laisser penser que les reins des mâles présentent une plus grande sensibilité à l'uranium que ceux des femelles. Cette réponse différentielle à l'uranium, se caractérise par une diminution de la réponse génique basale (répression de l'activité génique) mais elle peut aussi avoir en partie une incidence inverse par répression de l'expression des micro-ARNs et de fait, du niveau de régulation post-transcriptionnel (processus activateur de l'expression génique par rétrocontrôle). A ce niveau de l'étude, aucune des deux hypothèses ne peut être préférée à l'autre, d'autant plus que les deux sont certainement vraies. Seule une observation globale des niveaux de méthylation permet de dire que les reins des mâles semblent réagir plus amplement à l'uranium que les femelles.*

☞ *A contrario, l'analyse des profils épigénétiques post-transcriptionnels des micro-ARNs, a révélé l'existence d'effets épigénétiques associés à un très fort dimorphisme sexuel, dans les reins mâles et femelles des animaux contaminés de la première génération (F0) (résultats présentés en annexes, partie 1).*

Les analyses métabolomiques des reins et des urines des deux dernières générations d'animaux (F1, F2) ont montré l'existence d'un effet de l'uranium dépendant du sexe sur le métabolisme des animaux exposés. On observe aussi comme pour la première génération (F0), que le métabolisme du nicotinate-nicotinamide est ciblé par l'exposition au niveau de la seconde génération (F1) et que cette observation est également valable pour la troisième et dernière génération (F2).

Les profils métabolomiques des urines des animaux des deux dernières générations (F1, F2) présentent des différences importantes liées au sexe. Ceux des reins des animaux de la deuxième génération (F1) présentent aussi un fort dimorphisme sexuel mais ceux de la dernière génération (F2) ne présentent une signature métabolomique d'exposition à l'uranium que chez les mâles.

☞ *Cette dernière observation réalisée à partir des profils métabolomiques de la dernière génération (F2), peut aussi laisser penser que les reins des mâles présentent une plus grande sensibilité à l'uranium que ceux des femelles.*

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude, montre qu'une exposition *in utero* à l'uranium, peut avoir des conséquences biologiques significatives sur le métabolisme global de trois générations de rats. Parmi ces métabolismes, la voie du nicotinate-nicotinamide est à la fois identifiable dans l'urine et les reins et semble être une cible métabolique principale de l'uranium.

Contrairement à la première génération (F0), dont les effets résultent d'une exposition chronique sur une période de 6 et 9 mois (selon la nature des échantillons biologiques analysés), les analyses des deux générations suivantes révèlent des signatures métabolomiques et épigénétiques durables pour la seconde génération (F1), 5 et 8 mois après l'arrêt du protocole de contamination et pour la dernière (F2), exempte de toute contamination directe.

Au niveau de la seconde génération (F1) l'effet mesuré pourrait être attribuable à l'empreinte épigénétique de l'exposition embryonnaire *in utero* alors qu'il résulterait pour la dernière génération (F2) de l'exposition fœtale et néonatale des cellules germinales sexuelles parentales (F1).

☞ *La concentration d'uranium dans les gonades des animaux n'augmente que pour la première génération d'animaux qui sont continuellement contaminés (F0). Pour la seconde génération (F1) aucune différence significative n'a pu être mesurée dans les gonades du groupe d'animaux contaminés par rapport à ceux du groupe témoin. Ce résultat montre d'une part, que l'uranium n'est pas retenu dans les gonades au-delà de la contamination et d'autre part, que les effets biologiques observés au niveau de la dernière génération (F2) découleraient de l'exposition fœtale et néonatale des gonades parentales (F1). Cette observation va dans le sens de l'existence d'un effet mémoire d'origine épigénétique qui a pu s'inscrire durant la vie utérine des animaux par l'acquisition de marques de méthylation de l'ADN, voire de modifications du code histone et dont les effets métaboliques seraient observables à long terme.*

☞ *De plus, le fait que cette exposition gonadique soit limitée à des périodes précoces développementales, permet de supposer qu'elle puisse affecter principalement la reprogrammation épigénétique des cellules sexuelles mâles (qui se déroule bien avant celle des femelles). Cette hypothèse d'une origine paternelle des effets observés sur la dernière génération est néanmoins à confirmer.*

Le principal résultat à retenir dans cette seconde partie, est que l'origine des effets biologiques observés au niveau de la descendance (F1, F2) des animaux exposés est certainement liée à l'effet direct de l'uranium sur les phases critiques de reprogrammation épigénétique des cellules embryonnaires ou germinales sexuelles durant lesquelles les fonctions physiologiques des futures lignées cellulaires différenciées se mettent en place. Ces effets biologiques peuvent être le résultat de processus cellulaires adaptatifs d'origine épigénétique liés au milieu environnemental *in utero*. Cette dernière observation permet de penser que les effets biologiques tardifs mis en évidence par analyse métabolomique et épigénétique (au niveau des profils de méthylation globale de l'ADN) pourraient certainement être d'origine développementale (DOHaD).

Ces résultats montrent également que l'identité sexuelle génétique des individus a une très forte influence sur la qualité de la réponse biologique mais aussi sur le niveau de sensibilité des individus exposés.

Pour conclure, si l'uranium peut avoir à faible dose d'exposition, un effet métabolique direct sur la fonction rénale de la première génération, les résultats obtenus pour les deux générations suivantes sont, quant à eux, certainement d'origine génique et associables à un effet épigénétique précoce survenu *in utero*, au moment de la phase de reprogrammation de marques épigénétiques de méthylation de l'ADN.

Alors qu'aucun effet clinique n'a pu être mis en évidence par ce modèle expérimental, il a été permis d'observer l'effet d'une exposition chronique à faible dose d'uranium au niveau rénal sur trois générations d'animaux.

Cet effet biologique, lié à une exposition directe des cellules à l'uranium, est observable à différents niveaux moléculaires des systèmes de régulation biologiques, capable d'affecter le métabolisme dans sa globalité mais aussi et particulièrement la voie du nicotinate-nicotinamide pour les trois générations étudiées.

Ces effets ne sont pas exclusivement associables à une transmission de marques génétiques (comme pour des effets transgénérationnels) mais peuvent néanmoins avoir une origine épigénétique parentale (F1) liée à l'exposition *in utero* des cellules germinales sexuelles. De tels effets sont observables au niveau de la dernière génération d'animaux (F2) qui présentent des effets épigénétiques et métabolomiques associables à l'uranium dans les urines et les reins en l'absence d'exposition somatique.

Ces résultats montrent aussi qu'il existe des différences significatives d'effets biologiques selon le sexe des animaux contaminés et que les mâles présentent des niveaux de sensibilités supérieurs à ceux observés chez les femelles.

La stratégie analytique utilisée a aussi démontré sa pertinence dans le domaine de la radiotoxicologie des faibles doses, capable de discerner des effets de très faibles amplitudes parmi l'ensemble des systèmes de régulation biologiques. Elle peut aussi proposer des liens mécanistiques pouvant aider à la compréhension et à la prédiction d'éventuelles nocivités ou toxicités par la représentation exhaustive des événements biologiques qui sont capables d'entraîner des effets indésirables (concept d'AOP).

Bien que capable de fournir énormément de données scientifiques, ce modèle expérimental n'est cependant pas parfait mais utile. Comme la plupart des modèles, il présente de nombreuses lacunes qui soulèvent un certain nombre de questions et de perspectives d'études.

La première difficulté tient de la chronicité de la contamination qui nécessite, pour être efficace et pertinente en toxicologie, d'être suffisamment longue voire appliquée sur la vie entière.

Pour cette raison, et dans un souci de potentialisation des effets biologiques, les animaux ont été accouplés tardivement par rapport au pic naturel de fertilité. Ce paramètre a révélé une baisse d'intérêt des mâles pour les femelles mais aussi une baisse d'intérêt des femelles pour leurs progénitures.

☞ *Des études ont montré qu'une attitude maternelle dégradée pouvait avoir des répercussions épigénétiques sur le cerveau des petits et des conséquences ultérieures sur leur comportement.*

Ensuite, le fait d'avoir fait le choix d'exposer l'ensemble des animaux (mâles et femelles confondus) pour se placer dans une situation environnementale majorante, ne permet plus d'identifier l'origine sexuelle des marques épigénétiques responsables des effets biologiques à venir.

☞ *En effet, pour la dernière génération (F2), l'origine supposée des effets biologiques observés est associable à l'exposition antérieure des cellules germinales sexuelles de parents (F1). Or, ayant exposé les deux sexes, il ne sera pas possible de faire la distinction entre la part épigénétique venant du père et celle venant de la mère même, si des présomptions peuvent être avancées en faveur des pères. Pour répondre à cette question il aurait été souhaitable de croiser des mâles non contaminés avec de femelles contaminées et inversement.*

Par extrapolation, 9 mois d'âge chez le rat peuvent être associés à un âge adulte chez l'homme. Le choix de travailler sur des prélèvements biologiques réalisés sur animal adulte permet de travailler sur un modèle standardisé et relativement simple à étudier (par rapport aux autres). Dans ce modèle, l'effet du vieillissement des organismes est exclu de l'étude alors qu'il peut avoir une grande importance d'un point de vue sociétal en matière de sensibilité individuelle aux expositions.

Chez l'homme, un grand nombre de maladies tardives surviennent vers 50 ans, en deuxième partie de la vie, lorsque les processus de vieillissement se mettent en place, que le système immunitaire est moins efficace et que d'anciennes marques génétiques (instabilité génique) ont par des processus mitotiques, pris suffisamment d'importance pour engendrer des phénotypes délétères et participer à l'apparition des maladies cancéreuses ou non cancéreuses.

Ainsi, il y a tout lieu de penser, que la recherche de nocivités tardives d'une exposition à l'uranium (cancers ou maladies métaboliques) devrait tenir compte des processus de vieillissement de l'organisme qui, à la suite d'une baisse des capacités de réparation tissulaires (sénescence cellulaire) et de protection immunitaire, sont susceptibles d'influer voire de potentialiser l'apparition de processus de vieillissement prématurés des systèmes physiologiques et d'effets délétères.

☞ *Cette problématique est d'autant plus importante d'un point de vue sociétal que les populations tendent à vivre de plus en plus longtemps.*

☞ *Pour aborder cette problématique, la réalisation d'études « vie entière » qui tient compte du vieillissement des populations pourrait permettre de potentialiser et d'approfondir le sujet des risques d'apparition de maladies tardives des expositions environnementales à faibles doses.*

Le dernier point de discussion concerne les limites méthodologiques. L'emploi des techniques d'analyse de données à haut débit dites « omiques », les observations réalisées à partir des données expérimentales de cette étude, n'offrent qu'une vision restreinte de l'ensemble des mécanismes moléculaires qui sont réellement impliqués dans la réponse dynamique d'un organisme vivant à une exposition.

La réalisation des analyses métabolomiques doit se soumettre aux outils analytiques disponibles qui ne permettent pas d'observer l'ensemble des métabolites présents dans un milieu biologique à cause de la diversité des propriétés physicochimiques des molécules organiques considérées. De plus, l'identification des métabolites d'intérêt se heurte aux sensibilités analytiques des appareils, à la qualité des bases de données disponibles (liées à l'hétérogénéité des plateformes analytiques) et à l'offre commerciale restreinte en standards moléculaires.

En transcriptomique, l'analyse des ARNs réalisée sur biopuces présente aussi ses propres limites car la richesse des résultats obtenus dépend étroitement de la spécificité des sondes avec l'espèce animale étudiée. Cette technique se heurte aussi à des limites de sensibilité. Dans le cas des études réalisées sur des effets biologiques de faibles amplitudes, comme observés dans le cadre des effets des expositions à faibles doses, l'analyse est confrontée aux limites des modèles statistiques utilisables pour la réalisation d'analyses de tests multiples dont la rigueur ne permet plus de discerner les effets géniques d'une exposition.

☞ *Il s'avère nécessaire de réaliser des études à caractère exploratoire en faisant parceller abstraction des modèles de corrections statistiques, puis sur la base des résultats putatifs obtenus, réaliser des analyses ciblées et spécifiques des entités moléculaires d'intérêt pour confirmer ou infirmer les hypothèses formulées.*

Finalement, la temporalité cinétique des événements biologiques observés, est un autre facteur limitant dans l'analyse et la compréhension des mécanismes moléculaires qui se mettent en place au niveau de la cellule, en réponse à une exposition donnée.

☞ *Cette dernière composante biologique impose de réaliser des études de suivi temporel associées à l'emploi d'analyses statistiques fonctionnelles pour décrire la réponse mécanistique cellulaire depuis le niveau d'expression génique jusqu'à l'expression du phénotype.*

Les effets biologiques des expositions environnementales à faibles doses étant difficilement prévisibles, l'étude des effets d'une contamination multigénérationnelle à l'uranium sur des systèmes physiologiques autres que ceux associés à la fonction rénale ont aussi été analysés à partir de ce modèle d'étude expérimentale. Les deux principaux systèmes biologiques connus pour être impactés par l'exposition à des pollutions de type environnementales qui sont le système reproducteur et le système nerveux central des animaux, ont été étudiés aux différents niveaux organisationnels biologiques (épigénétique, géniques, métabolomique, histologiques et fonctionnels) pour estimer l'impact sanitaire d'une telle exposition.

☞ *A titre d'information, une partie des travaux réalisés a montré que les gonades des animaux mâles et femelles étaient affectées sur plusieurs générations. Une hyperméthylation de l'ADN testiculaire et d'une hypométhylation des ovaires persistante ont pu être observées sur les trois générations de rats après contamination chronique de la première génération à faible dose d'uranium [203]. Le reste des travaux réalisés sur ces systèmes est en cours d'analyse.*

Pour résumer les principaux résultats de cette thèse sur les effets biologiques multigénérationnels des faibles doses d'uranium naturel, un schéma mécanistique hypothétique peut ainsi être présenté (**Figure 51**).

La toxicité de l'uranium naturel est majoritairement chimique. Bien qu'à faibles niveaux d'exposition aucune toxicité ne puisse être révélée par des marqueurs cliniques classiques, les effets biologiques mesurés après exposition chronique à faible dose d'uranium naturel sont essentiellement liés à ses propriétés chimiques de métal lourd. Les métaux lourds sont connus pour créer du stress oxydatif au niveau des cellules. Dans le cas de l'uranium, ce stress affectera principalement les cellules tubulaires proximales des reins où il s'accumule d'autant plus que sa concentration dans l'organisme augmente. Cette accumulation pouvant être associée à la saturation des transporteurs membranaires (OCT2 et MATE).

Le stress oxydatif est lié à l'apparition d'espèces réactives oxygénées (ROS) qui ont une action chimique négative sur certaines molécules organiques bioactives. Elles peroxydent des lipides, oxydent les protéines et la molécule d'ADN. L'uranium peut aussi affecter l'activité de certaines protéines enzymatiques, par compétition avec certains cofacteurs métalliques (Ca^{2+} , Zn^{2+}).

Ces effets biologiques d'origines chimiques liés à l'oxydation, la peroxydation et la compétition enzymatique de l'uranium et des ROS, peuvent avoir des répercussions directes sur l'ensemble du métabolisme, sur l'intégrité membranaire des cellules et être sources d'instabilité génique qui peut entraîner la mort cellulaire par apoptose. Les effets biologiques observés dans cette étude, vont aussi dans le sens d'une activation des mécanismes de réparation de l'ADN et de maintien de l'homéostasie cellulaire (pour corriger d'éventuelles atteintes tissulaires, cellulaires et métaboliques), par stimulation des mécanismes géniques d'apoptose, de signalisation, de structuration, de prolifération et processus développementaux.

Les résultats de cette étude ont pu révéler des effets sur de nombreux métabolismes par identification de déséquilibres des niveaux moléculaires des stéroïdes, des phospholipides (constituants membranaires), des endocannabinoïdes, des acides gras, de la voie du tryptophane, du nicotinate et nicotinamide et des acides aminés qui sont des indicateurs subtils d'un stress cellulaire observable à faible dose et même pour certains à très faibles doses d'uranium. Ces mécanismes cellulaires sont observables au niveau des profils métabolomiques du rein et des urines et permettent d'établir des relations et de présenter des hypothèses mécanistiques.

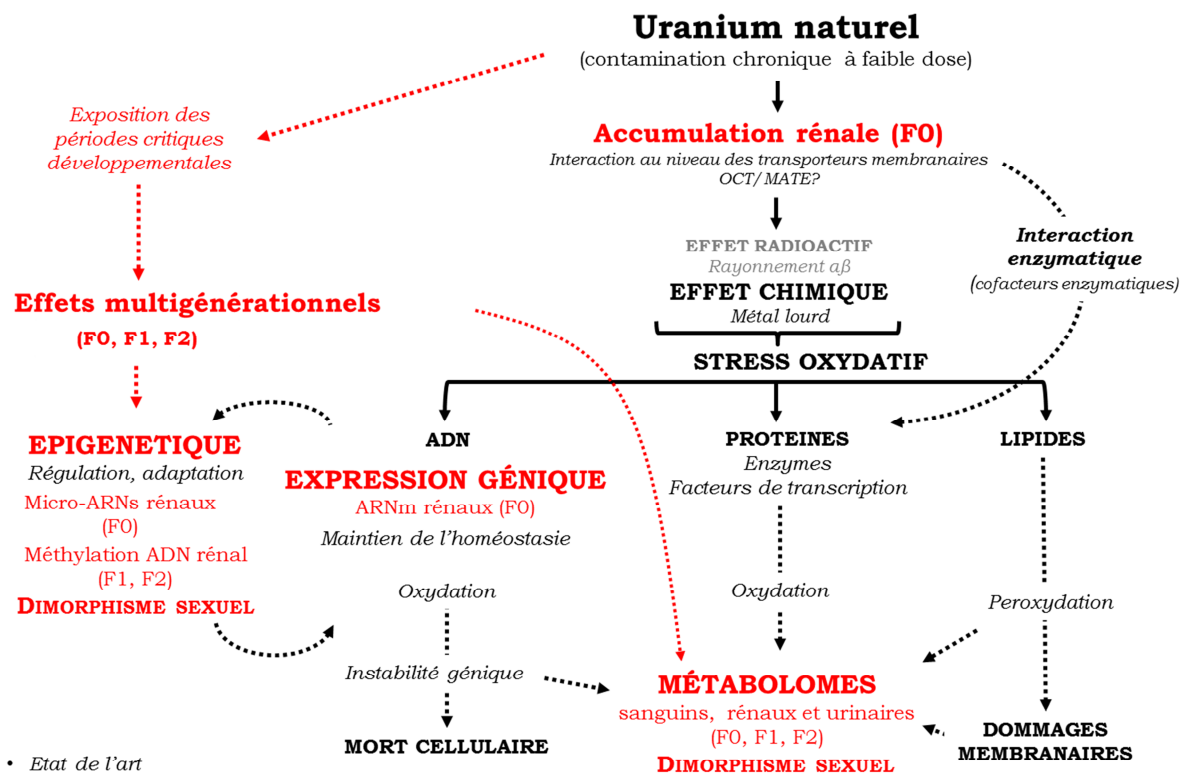
Cette hypothèse mécanistique, permet de comprendre qu'à ces faibles niveaux de dose, une grande part des effets biologiques de l'uranium réside dans la capacité de la cellule à mettre en place des mécanismes de réparation de stimulation des systèmes enzymatiques pour contrebalancer les effets moléculaires néfastes de l'uranium et des espèces réactives produites. Ainsi, plus la quantité (ou dose) d'uranium augmente à un instant donnée, plus il s'accumule au niveau des tubules rénaux et plus les mécanismes cellulaires de réparation peinent à contrebalancer ces effets biologiques, et ceci jusqu'à l'apparition d'un effet nocif voire toxique. A ce stade, on pourra considérer la limite des faibles doses comme atteinte.

Selon ce schéma, l'identité génétique des animaux semble très importante dans la qualité de la réponse cellulaire aux faibles doses. Dans ces travaux, l'ensemble des événements géniques attribuables à un stress fluctue avec l'identité sexuelle chromosomique des animaux. Or, ce dimorphisme génétique influe lui-même sur le niveau d'accumulation tubulaire de l'uranium car le niveau d'expression génique de certains transporteurs membranaires (OCT2) est entre autre, lié au récepteur nucléaire « Ar » (androgen receptor). Comme décrit dans cette thèse par des analyses omiques réalisées au niveau des paramètres épigénétiques, géniques et métabolomiques, le sexe des animaux influe très significativement sur les niveaux de régulation moléculaires et par conséquent, sur le niveau de sensibilité des animaux (ou de toxicité de l'uranium).

Une autre hypothèse formulée sur la qualité de la réponse génique, repose sur l'action des mécanismes épigénétiques qui agissent à plusieurs niveaux de régulation des systèmes moléculaires. D'un point de vue multigénérationnel, la réponse épigénétique observée (au niveau des cellules rénales) dans ces travaux s'est traduite après exposition, par un déséquilibre post-transcriptionnelle de l'activité des micro-ARNs et sans action sur les profils de méthylation de l'ADN.

L'observation des effets d'une exposition intra-utérine des embryons a, quant à elle, révélée une modification des profils de méthylation de l'ADN au niveau des cellules rénales des animaux (d'autant plus si elle survient lors des phases critiques de reprogrammation épigénétiques). L'exposition des fœtus aura des répercussions au niveau des cellules germinales gonadiques qui transmettront par l'intermédiaire des cellules sexuelles des marques épigénétiques de méthylation à la génération suivante. Ces marques, inscrites sur le génome des animaux semblent avoir un effet sur les niveaux de régulation de certains métabolismes (tel qu'observé dans cette étude).

A partir de ce protocole expérimental d'exposition à l'uranium, l'hypothèse mécanistique formulée à propos des effets multigénérationnels d'une exposition chronique à faible dose d'uranium réside dans le fait que, les effets biologiques observés sont essentiellement liés au stress oxydatif. Ce stress agit directement sur l'expression des gènes et sur les molécules organiques des animaux de la première génération. Au niveau des deux générations suivantes, l'effet biologique tiendrait plus d'un effet indirect associé aux empreintes épigénétiques d'une exposition précoce (stress oxydatif intra-utérin), survenue au moment des périodes critiques développementale. Ces empreintes sont capables de modifier l'équilibre des métabolismes durablement et ont un rôle adaptatif dans la réponse cellulaire aux expositions environnementales. Dans certaines conditions, ils peuvent aussi être à l'origine d'effets indésirables lorsque les environnements utérins et adultes sont dissonants.



• *Etat de l'art*

• **Résultats abordés dans la thèse :** Modification de l'épigénome, du transcriptome et du métabolome de la première génération. Les résultats suggèrent un statut inflammatoire infraclinique du rein. Effets métabolomiques multigénérationnels observables sur 3 générations (irréversibles chez les mâles) présentant un dimorphisme sexuel. Effets épigénétiques (reins mâles) pour les deux dernières générations (hyperméthylation globale de l'ADN). Une exposition à l'uranium des périodes critiques développementales pourrait être responsable d'effets biologiques significatifs et persistants à l'âge adulte via des mécanismes de programmation épigénétique (concept d'origine développementale de la santé et des maladies, Wadhwa 2009)

Figure 51 : schéma mécanistique hypothétique des effets multigénérationnels d'une exposition chronique à faible dose d'uranium naturel.

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

La question des effets biologiques et sanitaires des expositions environnementales à faible dose est une des problématiques de santé publique du 21^{ème} siècle. Parmi la multitude des sources d'expositions (naturelles et entropiques), sont les radionucléides dont les dispersions environnementales contribuent à contaminer les écosystèmes et l'homme par contamination des eaux de surfaces, de l'atmosphère et de la chaîne alimentaire. Ce risque de contamination chronique des populations à faible dose, pose un certain nombre de questions en matière de radioprotection mais aussi de toxicologie dans le cas des expositions à l'uranium. Néanmoins, les niveaux d'expositions auxquels sont soumises les populations, sont très faibles et responsables d'effets biologiques peu ou à priori, totalement imperceptibles. Dans tous les cas, l'amplitude des fluctuations des différents marqueurs moléculaires associés aux expositions à faible doses d'uranium sont généralement similaires à celles des autres facteurs environnementaux dont les effets peuvent se confondre ou s'ajouter.

Faute d'observations cliniques attribuables à ces expositions, la radioprotection peine à se satisfaire des normes et mesures mises en place qui, pour l'essentiel, sont en l'absence de données scientifiques précises, bâties sur un principe de précaution. Or, toute mesure de protection a un coût financier, et ce coût qui pèse sur les exploitants mais aussi sur les politiques de santé publiques est de plus en plus difficile à justifier en l'absence de données scientifiques tangibles.

☞ *A savoir que certaines limites de radioprotection définie pour la protection des populations ou même pour les travailleurs, peuvent s'avérer être inférieures au bruit de fond naturel d'exposition auxquelles sont soumises des populations dans certaines régions du monde. Cet exemple montre de lui-même à quel niveau d'ambiguïté sont confrontées les différentes parties prenantes, lorsqu'on s'intéresse aux faibles doses et pour lesquelles les conclusions scientifiques ne sont toujours pas claires.*

Si la raison économique voudrait pouvoir augmenter le niveau actuel des valeurs limites de radioprotection, l'état des connaissances scientifiques sur lesquels s'appuie l'expertise ne permet pas de statuer sur ce sujet. Dans ce domaine, un certain nombre d'études récentes montrent que la problématique des faibles doses est encore trop mal documentée car extrêmement complexe à aborder pour garantir la protection sanitaire des populations.

☞ *Cette difficulté est encore plus réelle lorsqu'on considère les risques d'effets tardifs des expositions pour lesquels il n'existe pas de marqueur prédictifs de toxicité et dont l'origine tient certainement en partie de l'ensemble des expositions auxquelles un individu a été exposé au cours de sa vie (cf. notion d'exposome).*

L'évaluation des risques sanitaires des expositions des populations aux radionucléides implique de pouvoir identifier un risque de nocivité ou de toxicité mais aussi d'en comprendre les mécanismes biologiques (cf. notion d'AOP). Pour une meilleure estimation des effets des faibles doses, il est nécessaire d'estimer les incidences et les interférences attribuables aux différentes composantes environnementales, génétiques et physiopathologiques..., qui peuvent être responsables des variations interindividuelles d'effets biologiques.

Pour observer ces effets biologiques dont les niveaux sont le plus souvent noyés dans le bruit de fond homéostatique des systèmes biologiques. Il est nécessaire de mettre en place des stratégies analytiques complexes et intégratives qui sont capables d'étudier la dynamique multiparamétrique des événements moléculaires analysés.

Ces approches analytiques très sensibles doivent permettre de fournir une lecture aussi complète que précise de l'ensemble des événements et cascades réactionnelles impliquées dans la réponse cellulaire (du gène au métabolite) mais aussi être capables de prendre en compte l'ensemble des métadonnées environnementales associables à l'exposome qui peuvent avoir un effet différent à l'échelle de la vie entière.

☞ *Ce n'est qu'à partir de telles stratégies expérimentales qu'il pourrait éventuellement être possible de donner un sens biologique à l'observation d'effets moléculaires subtils et d'apparences non spécifiques d'une exposition mais qui néanmoins peuvent être à l'origine de déterminismes cliniques tardifs voire de toxicité cancéreuse ou non cancéreuse car leurs influences demeurent significatives.*

Lorsqu'on s'intéresse à la santé des populations, la susceptibilité interindividuelle est une composante significative en toxicologie. Diverses données scientifiques prouvant qu'il existe de grandes différences physiologiques entre des individus de sexe, d'âge et d'origine génétiques différents, la susceptibilité à l'échelle des individus ou des populations ne peut être négligée dans l'évaluation des risques d'exposition.

L'étude de cette sensibilité individuelle aux expositions, implique de s'intéresser, en plus des fenêtres critiques développementales (qui peuvent être la cause de nocivités à long termes), à l'ensemble paramètres endogènes et exogènes qui peuvent aussi avoir une influence sur le niveau de sensibilité d'un individu, d'un système physiologie ou d'une cellule à une exposition donnée. Les paramètres physiopathologiques, génétiques et sociaux culturels peuvent aussi affecter les individus d'une population et sont aussi à prendre en compte.

☞ *Les études toxicologiques ne peuvent à présent plus se baser uniquement sur des protocoles expérimentaux standardisés sur des modèles animaux adultes de sexe mâle pour être représentatives de la diversité de la population. Il est incontournable à présent de mettre en œuvre des protocoles expérimentaux fondés sur l'exposition de populations hétérogènes (de sexe différent, d'âge ou de périodes développementales différentes, souches animales différentes, pathologiques...).*

La qualité de la réponse biologique d'une exposition à faible dose étant une composante multiparamétrique, la toxicologie du futur ne peut plus se contenter de la mise en évidence d'effets néfastes mais doit devenir prédictive et l'estimation d'un risque. En plus de l'arsenal analytique usuellement utilisé en clinique, cette toxicologie d'une nouvelle aire a besoin de s'inscrire dans « le monde des omiques » pour pouvoir réaliser des expertises approfondie à l'échelle des systèmes complexes de régulation biologique et décrire le fonctionnement intégré et subtil d'une réponse biologique multiparamétrique aux expositions à faibles doses.

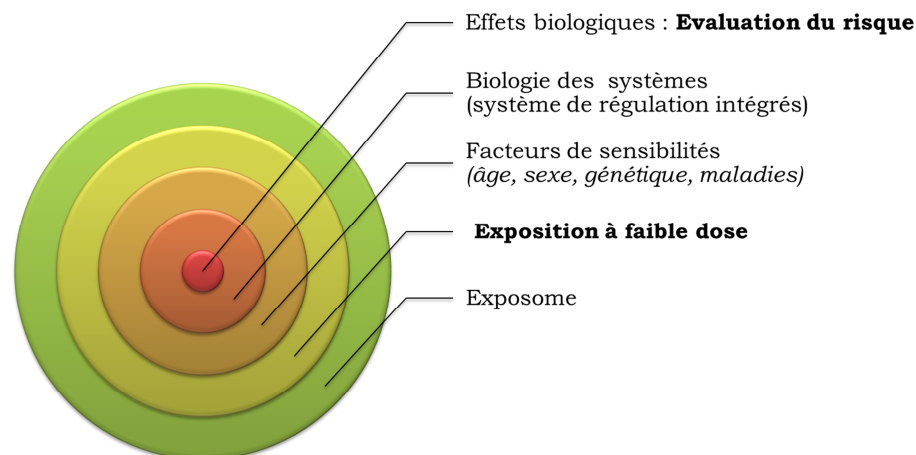


Figure 52 : facteurs influents sur l'observation des effets biologiques des faibles doses

ARTICLES ANNEXES

Ces travaux ont été associés à d'autres études et communications qui ont été soit antérieurs à cette thèse, soit réalisés en parallèle. D'autres études qui s'intéressent aux effets de cette exposition multigénérationnelle à faible dose d'uranium sur le système nerveux et le système reproducteur sont en cours d'analyses.

ETUDE PRINCEPS DES EFFETS METABOLOMIQUES D'UNE CONTAMINATION CHRONIQUE A FAIBLES DOSES D'URANIUM

Grison, S., Fave, G., Maillot, M., Manens, L., Delissen, O., Blanchardon, E., Banzet, N., Defoort, C., Bott, R., Dublineau, I., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Martin, J. C., & Souidi, M. 2013. Metabolomics identifies a biological response to chronic low-dose natural uranium contamination in urine samples. *Metabolomics*, 9: 1168-1180.

EFFET MULTIGENERATIONNEL D'UNE CONTAMINATION SUR LE PROFIL DE METHYLATION GLOBAL DE L'ADN GONADIQUE

Elmhiri, G., Gloaguen, C., **Grison, S.**, Kereselidze, D., Elie, C., Tack, K., Benderitter, M., Lestaevel, P., Legendre, A., & Souidi, M. 2017. DNA methylation and potential multigenerational epigenetic effects linked to uranium chronic low-dose exposure in gonads of males and females rats. *Toxicol Lett*.

INTERET DE LA METABOLOMIQUE EN RADIOTOXICOLOGIE DES FAIBLES DOSES

Grison, S., Favé, G., Maillot, M., Manens, L., Martin, J.-C., M., B., Aigueperse, J., & Souidi, M. 2015. Métabolomique : un nouvel outil au service de la radiotoxicologie des faibles doses *Environnement, Risques & Santé*, 14(6): 502-510.

Grison, S., Favé, G., Maillot, M., Martin, J.-C., Aigueperse, J., Benderitter, M., & Souidi, M. 2014. La métabolomique comme support de la radiotoxicologie des faibles doses. *Spectra analyse*, 299: 46.

Grison, S., & Souidi, M. 2013. Métabolomique : de nouvelles perspectives, *AKTIS l'actualité de la recherche à l'IRSN*, Vol. 15.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Wild, C.P., *The exposome: from concept to utility*. *Int J Epidemiol*, 2012. **41**(1): p. 24-32.
2. Vineis, P., et al., *The exposome in practice: Design of the EXPOsOMICS project*. *Int J Hyg Environ Health*, 2017. **220**(2, Part A): p. 142-151.
3. Emond C and Krzywkowski P, *La problématique des faibles doses en évaluation des risques sanitaires*, in *Bulletin de veille scientifique*2012, ANSES.
4. Hubert, P., *Effects of low doses: Proof and inferences*. *Environnement, Risques & Santé*, 2010. **9**(4): p. 295-302.
5. Sly, P.D., et al., *Health Consequences of Environmental Exposures: Causal Thinking in Global Environmental Epidemiology*. *Ann Glob Health*, 2016. **82**(1): p. 3-9.
6. Oltvai, Z.N. and A.L. Barabasi, *Systems biology. Life's complexity pyramid*. *Science*, 2002. **298**(5594): p. 763-4.
7. Holland, N., *Future of environmental research in the age of epigenomics and exposomics*. *Rev Environ Health*, 2017. **32**(1-2): p. 45-54.
8. Putri, S.P., et al., *Current metabolomics: practical applications*. *J Biosci Bioeng*, 2013. **115**(6): p. 579-89.
9. UNSCEAR, *Sources and Effets of Ionizing Radiation REPORT Vol. I, Annex B, in Exposures from natural radiation sources, U.N. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation , New York, Editor 2000*.
10. Morgan, W.F. and W.J. Bair, *Issues in low dose radiation biology: the controversy continues. A perspective*. *Radiat Res*, 2013. **179**(5): p. 501-10.
11. Delbecq, D., *Le casse-tête des faibles doses de radiations*, in *La recherche*2013. p. 55.
12. Clarke, R.H. and J. Valentin, *The History of ICRP and the Evolution of its Policies*. *Ann ICRP*, 2009. **39**(1): p. 75-110.
13. Christian BATAILLE, D. and S. Henri REVOL, *Les incidences environnementales et sanitaires des essais nucléaires effectués par la France entre 1960 et 1996 et les éléments de comparaison avec les essais des autres puissances nucléaires, O.p.d.é.d.c.s.e. technologiques, Editor 2001, ASSEMBLÉE NATIONALE - SÉNAT*.
14. ICRP, *Publication 103 - The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection*. *Ann ICRP*, 2007. **37**(2-4): p. 1-332.
15. Grison, S., et al., *The metabolomic approach identifies a biological signature of low-dose chronic exposure to cesium 137*. *J Radiat Res*, 2012. **53**(1): p. 33-43.
16. Lestaevel, P., et al., *Césium 137 : propriétés et effets biologiques après contamination interne*. *Médecine Nucléaire*, 2009. **34**: p. 108-118.
17. Bernier, M.O., et al., *Radiation exposure from CT in early childhood: a French large-scale multicentre study*. *Br J Radiol*, 2012. **85**(1009): p. 53-60.
18. MacKenzie, A.B., *Environmental radioactivity: experience from the 20th century--trends and issues for the 21st century*. *Sci Total Environ*, 2000. **249**(1-3): p. 313-29.
19. IRSN, *Fiche information : Les essai atmosphériques*, 2015, IRSN.
20. Valentin, J., *Low-dose extrapolation of radiation-related cancer risk*. *Ann ICRP*, 2005. **35**(4): p. 1-140.
21. Mothersill, C. and C. Seymour, *Implications for human and environmental health of low doses of ionising radiation*. *J Environ Radioact*, 2014. **133**: p. 5-9.
22. Averbek, D., et al., *Progress in low dose health risk research: Novel effects and new concepts in low dose radiobiology*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2018. **776**: p. 46-69.
23. Mothersill, C. and C. Seymour, *Implications for environmental health of multiple stressors*. *J Radiol Prot*, 2009. **29**(2A): p. A21-8.
24. European-Commission, *Report of High Level and Expert Group on European Low Dose Risk Research*, 2009, European-Commission: Luxembourg.
25. Kadhim, M., et al., *Non-targeted effects of ionising radiation--implications for low dose risk*. *Mutat Res*, 2013. **752**(2): p. 84-98.
26. Nomura, T., *Biological consequences and health concerns from low-dose and low-dose-rate radiation in mice and humans*. *Health Phys*, 2011. **100**(3): p. 266-8.
27. Masuda, S., et al., *Time- and dose-dependent effects of total-body ionizing radiation on muscle stem cells*. *Physiological Reports*, 2015. **3**(4): p. e12377.
28. Mak, T.D., et al., *Exposure to ionizing radiation reveals global dose- and time-dependent changes in the urinary metabolome of rat*. *Metabolomics*, 2015. **11**(5): p. 1082-1094.

29. Jin, Y.W., et al., *Comprehensive analysis of time- and dose-dependent patterns of gene expression in a human mesenchymal stem cell line exposed to low-dose ionizing radiation*. *Oncol Rep*, 2008. **19**(1): p. 135-44.
30. De Santis, M., et al., *Radiation effects on development*. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2007. **81**(3): p. 177-82.
31. Magdo, H.S., et al., *Grand rounds: nephrotoxicity in a young child exposed to uranium from contaminated well water*. *Environ Health Perspect*, 2007. **115**(8): p. 1237-41.
32. Institute of Medicine (US) Committee on Cancer Control in Low- and Middle-Income Countries; Sloan FA, G.H., editors, *Cancer Control Opportunities in Low- and Middle-Income Countries*. *The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health*, ed. W.D.N.A. Press 2007.
33. INSERM, *Cancer et environnement. Rapports d'expertise collective*, 2008(20): p. 889.
34. Gowans, I.D., et al., *Genotype-dependent induction of transmissible chromosomal instability by gamma-radiation and the benzene metabolite hydroquinone*. *Cancer Res*, 2005. **65**(9): p. 3527-30.
35. Grygoryev, D., O. Moskalenko, and J.D. Zimbrick, *Non-linear effects in the formation of DNA damage in medaka fish fibroblast cells caused by combined action of cadmium and ionizing radiation*. *Dose Response*, 2008. **6**(3): p. 283-98.
36. Bagwell, C.E., et al., *Intracellular copper accumulation enhances the growth of Kineococcus radiotolerans during chronic irradiation*. *Appl Environ Microbiol*, 2008. **74**(5): p. 1376-84.
37. Kunes, J., et al., *Epigenetics and a new look on metabolic syndrome*. *Physiol Res*, 2015. **64**(5): p. 611-20.
38. Miller, A.C., M. Stewart, and R. Rivas, *DNA methylation during depleted uranium-induced leukemia*. *Biochimie*, 2009. **91**(10): p. 1328-30.
39. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(11): p. 1148-59.
40. Bommarito, P.A., E. Martin, and R.C. Fry, *Effects of prenatal exposure to endocrine disruptors and toxic metals on the fetal epigenome*. *Epigenomics*, 2017. **9**(3): p. 333-350.
41. Xin, F., M. Susiarjo, and M.S. Bartolomei, *Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation?* *Semin Cell Dev Biol*, 2015. **43**: p. 66-75.
42. Fenichel, P., F. Brucker-Davis, and N. Chevalier, *The history of Distilbene(R) (Diethylstilbestrol) told to grandchildren--the transgenerational effect*. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2015. **76**(3): p. 253-9.
43. Mackenzie Ross, S.J., et al., *Neuropsychological and psychiatric functioning in sheep farmers exposed to low levels of organophosphate pesticides*. *Neurotoxicol Teratol*, 2010. **32**(4): p. 452-9.
44. Bouchard, M.F., et al., *Attention-deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides*. *Pediatrics*, 2010. **125**(6): p. e1270-7.
45. Middlemore-Risher, M.L., J.J. Buccafusco, and A.V. Terry, Jr., *Repeated exposures to low-level chlorpyrifos results in impairments in sustained attention and increased impulsivity in rats*. *Neurotoxicol Teratol*, 2010. **32**(4): p. 415-24.
46. Lancet, *Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants*. *Lancet*, 2016. **387**(10026): p. 1377-96.
47. Ansoborlo, E., L. Lebaron-Jacobs, and O. Prat, *Uranium in drinking-water: A unique case of guideline value increases and discrepancies between chemical and radiochemical guidelines*. *Environ Int*, 2015. **77C**: p. 1-4.
48. Lanphear, B.P., *Low-level toxicity of chemicals: No acceptable levels?* *PLoS Biology*, 2017. **15**(12): p. e2003066.
49. Marano, F., *DOSES-RÉPONSES NON MONOTONES : UN ENJEU POUR L'ÉVALUATION DES RISQUES*, in *YearBook Santé et environnement 2017*. p. 229-34.
50. Marano, F. and R. Barouki, *La toxicologie prédictive : quel apport pour l'évaluation des risques en santé environnementale ?* *Environ Risque Santé*, 2011. **10**: p. 404-11.
51. Felsenfeld, G., *A Brief History of Epigenetics*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2014. **6**(1): p. a018200.
52. Cosgrove, M.S., J.D. Boeke, and C. Wolberger, *Regulated nucleosome mobility and the histone code*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(11): p. 1037-43.

53. Rudnizky, S., et al., Nucleosome mobility and the regulation of gene expression: Insights from single-molecule studies. *Protein Sci*, 2017. **26**(7): p. 1266-1277.
54. Jones, P.A., Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 2012. **13**(7): p. 484-92.
55. Lyko, F., The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet*, 2018. **19**(2): p. 81-92.
56. Gombeau, K., Pertinence de la prise en compte des réponses épigénétiques chez des organismes chroniquement exposés à de faibles niveaux de substances radioactives, 2015.
57. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(Database issue): p. 30.
58. Lamoril, J., P. Bouizegarène, and M. Bogard, Le monde complexe et mouvant des ARN. Seconde partie : les microARNs. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 2010. **25**(5): p. 219-240.
59. Herceg, Z. and P. Hainaut, Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Molecular Oncology*, 2007. **1**(1): p. 26-41.
60. Baulande, S., A. Criqui, and M. Duthieuw, [Circulating miRNAs as a new class of biomedical markers]. *Med Sci*, 2014. **30**(3): p. 289-96.
61. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(4): p. 259-69.
62. Fraga, M.F., et al., Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(30): p. 10604-9.
63. Painter, R.C., et al., Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG*, 2008. **115**(10): p. 1243-9.
64. Sen, A., et al., Multigenerational epigenetic inheritance in humans: DNA methylation changes associated with maternal exposure to lead can be transmitted to the grandchildren. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 14466.
65. Charles, M.-A., M.-A. and C. Junien, C., Les origines développementales de la santé (DOHaD) et l'épigénétique : une révolution pour la prévention des maladies chroniques de l'adulte. *Questions de santé publique*, 2012(18): p. 1-4.
66. Weaver, I.C.G., et al., Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience*, 2004. **7**: p. 847.
67. McGowan, P.O., et al., Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci*, 2009. **12**(3): p. 342-8.
68. Souidi, M., et al., In vivo exposure to uranium induces reversible and irreversible effects on gene expression and epigenetics in adult male rats. *Toxicol Lett*, 2016. **259**: p. S171.
69. Booth, L.N. and A. Brunet, The Aging Epigenome. *Molecular cell*, 2016. **62**(5): p. 728-744.
70. Menezo, Y.J., et al., Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. *Reprod Biomed Online*, 2016. **33**(6): p. 668-683.
71. Baverstock, K. and A.V. Karotki, Towards a unifying theory of late stochastic effects of ionizing radiation. *Mutat Res*, 2011. **718**(1-2): p. 1-9.
72. Ryu, H.-W., et al., Influence of Toxicologically Relevant Metals on Human Epigenetic Regulation. *Toxicological Research*, 2015. **31**(1): p. 1-9.
73. Merrifield, M. and O. Kovalchuk, Epigenetics in radiation biology: a new research frontier. *Frontiers in Genetics*, 2013. **4**: p. 40.
74. Gilad, S., et al., Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*, 2008. **3**(9): p. 0003148.
75. Filkowski, J.N., et al., Hypomethylation and genome instability in the germline of exposed parents and their progeny is associated with altered miRNA expression. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(6): p. 1110-5.
76. Gochfeld, M., Sex Differences in Human and Animal Toxicology. *Toxicol Pathol*, 2017. **45**(1): p. 172-189.
77. Junien, C., A. Gabory, and L. Attig, [Sexual dimorphism in the XXI(st) century]. *Med Sci (Paris)*, 2012. **28**(2): p. 185-92.
78. Yang, X., et al., Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res*, 2006. **16**(8): p. 995-1004.
79. Cahill, L., Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, 2006. **7**(6): p. 477-84.

80. Kobayashi, S., et al., Comparison of gene expression in male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the X-linked gene, *Rhox5/Pem*, at preimplantation stages. *Curr Biol*, 2006. **16**(2): p. 166-72.
81. Waxman, D.J. and M.G. Holloway, Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol Pharmacol*, 2009. **76**(2): p. 215-28.
82. van Nas, A., et al., Elucidating the role of gonadal hormones in sexually dimorphic gene coexpression networks. *Endocrinology*, 2009. **150**(3): p. 1235-49.
83. McCarthy, M.M. and A.P. Arnold, Reframing sexual differentiation of the brain. *Nat Neurosci*, 2011. **14**(6): p. 677-83.
84. Gabory, A., et al., Maternal diets trigger sex-specific divergent trajectories of gene expression and epigenetic systems in mouse placenta. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. 5.
85. Moore, C.L. and K.L. Power, Variation in maternal care and individual differences in play, exploration, and grooming of juvenile Norway rat offspring. *Dev Psychobiol*, 1992. **25**(3): p. 165-82.
86. Dunn, G.A., C.P. Morgan, and T.L. Bale, Sex-specificity in transgenerational epigenetic programming. *Horm Behav*, 2011. **59**(3): p. 290-5.
87. Gapp, K. and J. Bohacek, Epigenetic germline inheritance in mammals: looking to the past to understand the future. *Genes Brain Behav*, 2017.
88. Gabory, A., L. Attig, and C. Junien, Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. *Mol Cell Endocrinol*, 2009. **304**(1-2): p. 8-18.
89. Fauquier, L., [When the father's environment influences gene expression in the child]: *Med Sci (Paris)*. 2011 May;27(5):453-5. doi: 10.1051/medsci/2011275002. Epub 2011 May 25.
90. Grison, S., et al., Low dose of uranium induces multigenerational epigenetic effects in rat kidney. *Int J Radiat Biol*, 2018. **15**: p. 1-10.
91. Anway, M.D., et al., Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 2005. **308**(5727): p. 1466-9.
92. Zeybel, M., et al., Multigenerational epigenetic adaptation of the hepatic wound-healing response. *Nat Med*, 2012. **18**(9): p. 1369-77.
93. Hackett, J.A. and M.A. Surani, DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013. **368**(1609): p. 20110328.
94. Trasler, J.M., Gamete imprinting: setting epigenetic patterns for the next generation. *Reprod Fertil Dev*, 2006. **18**(1-2): p. 63-9.
95. Northstone, K., et al., Prepubertal start of father's smoking and increased body fat in his sons: further characterisation of paternal transgenerational responses. *European Journal of Human Genetics*, 2014. **22**(12): p. 1382-1386.
96. Day, J., et al., Influence of paternal preconception exposures on their offspring: through epigenetics to phenotype. *Am J Stem Cells*, 2016. **5**(1): p. 11-8.
97. Merlot, E., D. Couret, and W. Otten, Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. *Brain Behav Immun*, 2008. **22**(1): p. 42-51.
98. Zucchi, F.C.R., et al., Maternal Stress Induces Epigenetic Signatures of Psychiatric and Neurological Diseases in the Offspring. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56967.
99. McEwen, B.S., et al., Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology*, 2012. **62**(1): p. 3-12.
100. Ravelli, G.P., Z.A. Stein, and M.W. Susser, Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*, 1976. **295**(7): p. 349-53.
101. Anderson, O.S., K.E. Sant, and D.C. Dolinoy, Nutrition and epigenetics: An interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism, and DNA methylation. *J Nutr Biochem*, 2012. **23**(8): p. 853-859.
102. Sinclair, K.D., et al., DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(49): p. 19351-6.
103. Ladd-Acosta, C., et al., Presence of an epigenetic signature of prenatal cigarette smoke exposure in childhood(). *Environmental research*, 2016. **144**(Pt A): p. 139-148.
104. Perera, F. and J. Herbstman, Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod Toxicol*, 2011. **31**(3): p. 363-73.
105. Lupien, S.J., et al., Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*, 2009. **10**(6): p. 434-45.

106. Weaver, I.C., et al., Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci*, 2005. **25**(47): p. 11045-54.
107. Vlaanderen, J., et al., Application of OMICS technologies in occupational and environmental health research; current status and projections. *Occup Environ Med*, 2010. **67**(2): p. 136-43.
108. Hu, Z.Z., et al., Omics-based molecular target and biomarker identification. *Methods Mol Biol*, 2011. **719**: p. 547-71.
109. Patti, G.J., O. Yanes, and G. Siuzdak, Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(4): p. 263-9.
110. Oziolor, E.M., J.W. Bickham, and C.W. Matson, Evolutionary toxicology in an omics world. *Evolutionary Applications*, 2017. **10**(8): p. 752-761.
111. Haring, R. and H. Wallaschofski, Diving through the "-omics": the case for deep phenotyping and systems epidemiology. *OMICS*, 2012. **16**(5): p. 231-4.
112. Dudka, I., et al., Metabonomic analysis of serum of workers occupationally exposed to arsenic, cadmium and lead for biomarker research: A preliminary study. *Environ Int*, 2014. **68C**: p. 71-81.
113. Yugi, K. and S. Kuroda, Metabolism-Centric Trans-Omics. *Cell Syst*, 2017. **4**(1): p. 19-20.
114. French, B., et al., Development and evaluation of multi-marker risk scores for clinical prognosis. *Stat Methods Med Res*, 2016. **25**(1): p. 255-71.
115. Xia, J., et al., Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics*, 2013. **9**(2): p. 280-299.
116. Bloszies, C.S. and O. Fiehn, Using untargeted metabolomics for detecting exposome compounds. *Current Opinion in Toxicology*, 2018. **8**: p. 87-92.
117. Poore, K.R., et al., Avoidable early life environmental exposures. *The Lancet Planetary Health*, 2017. **1**(5): p. e172-e173.
118. Heijne, W.H., et al., Systems toxicology: applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology. *Expert Rev Proteomics*, 2005. **2**(5): p. 767-80.
119. Martos, S.N., W.Y. Tang, and Z. Wang, Elusive inheritance: Transgenerational effects and epigenetic inheritance in human environmental disease. *Prog Biophys Mol Biol*, 2015. **118**(1-2): p. 44-54.
120. Oliver, S.G., et al., Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*, 1998. **16**(9): p. 373-8.
121. Tweeddale, H., L. Notley-McRobb, and T. Ferenci, Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis. *J Bacteriol*, 1998. **180**(19): p. 5109-16.
122. Bouatra, S., et al., The human urine metabolome. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e73076.
123. Psychogios, N., et al., The human serum metabolome. *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e16957.
124. Wishart, D.S., et al., HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(Database issue): p. D521-6.
125. Nicholson, J.K., J.C. Lindon, and E. Holmes, 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 1999. **29**(11): p. 1181-9.
126. Cornish-Bowden, A. and M.L. Cardenas, From genome to cellular phenotype--a role for metabolic flux analysis? *Nat Biotechnol*, 2000. **18**(3): p. 267-8.
127. Beger, R.D., J. Sun, and L.K. Schnackenberg, Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010. **243**(2): p. 154-66.
128. Pandey, B.N., et al., Radiobiological basis in management of accidental radiation exposure. *Int J Radiat Biol*, 2010. **86**(8): p. 613-35.
129. Bonvallot, N., et al., Metabolomics tools for describing complex pesticide exposure in pregnant women in Brittany (France). *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e64433.
130. Ganna, A., et al., Large-scale Metabolomic Profiling Identifies Novel Biomarkers for Incident Coronary Heart Disease. *PLoS Genet*, 2014. **10**(12): p. e1004801.
131. Hollywood, K., D.R. Brison, and R. Goodacre, Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics*, 2006. **6**(17): p. 4716-23.

132. Pastrello, C., et al., *Integration, visualization and analysis of human interactome. Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **445**(4): p. 757-773.
133. Brindle, J.T., et al., *Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using 1H-NMR-based metabolomics. Nat Med*, 2002. **8**(12): p. 1439-44.
134. Nicholson, J.K., et al., *Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. Nat Rev Drug Discov*, 2002. **1**(2): p. 153-61.
135. Menon, S.S., et al., *Radiation Metabolomics: Current Status and Future Directions. Front Oncol*, 2016. **6**: p. 20.
136. Lanz, C., et al., *Radiation metabolomics. 3. Biomarker discovery in the urine of gamma-irradiated rats using a simplified metabolomics protocol of gas chromatography-mass spectrometry combined with random forests machine learning algorithm. Radiat Res*, 2009. **172**(2): p. 198-212.
137. Grison, S., et al., *Metabolomics identifies a biological response to chronic low-dose natural uranium contamination in urine samples. Metabolomics*, 2013. **9**: p. 1168-1180.
138. Cook, J.A., et al., *Mass Spectrometry-Based Metabolomics Identifies Longitudinal Urinary Metabolite Profiles Predictive of Radiation-Induced Cancer. Cancer Res*, 2016.
139. van Ravenzwaay, B., et al., *The individual and combined metabolite profiles (metabolomics) of dibutylphthalate and di(2-ethylhexyl)phthalate following a 28-day dietary exposure in rats. Toxicol Lett*, 2010. **198**(2): p. 159-70.
140. Lowe, R., et al., *Transcriptomics technologies. PLoS Comput Biol*, 2017. **13**(5): p. e1005457.
141. Govindarajan, R., et al., *Microarray and its applications. Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 2012. **4**(Suppl 2): p. S310-S312.
142. Bumgarner, R., *DNA microarrays: Types, Applications and their future. Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, 2013. **0 22**: p. Unit-22.1.
143. Alizadeh, A.A., et al., *Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature*, 2000. **403**(6769): p. 503-11.
144. van 't Veer, L.J., et al., *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature*, 2002. **415**(6871): p. 530-6.
145. Garber, M.E., et al., *Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(24): p. 13784-9.
146. Beer, D.G., et al., *Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. Nat Med*, 2002. **8**(8): p. 816-24.
147. Michna, A., et al., *Transcriptomic analyses of the radiation response in head and neck squamous cell carcinoma subclones with different radiation sensitivity: time-course gene expression profiles and gene association networks. Radiation Oncology (London, England)*, 2016. **11**: p. 94.
148. Wahba, A., S.L. Lehman, and P.J. Tofilon, *Radiation-induced translational control of gene expression. Translation*, 2017. **5**(1): p. e1265703.
149. Chiani, F., et al., *Radiation Genes: a database devoted to microarrays screenings revealing transcriptome alterations induced by ionizing radiation in mammalian cells. Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2009. **2009**: p. bap007.
150. Ghandhi, S.A., et al., *Radiation dose-rate effects on gene expression for human biodosimetry. BMC Medical Genomics*, 2015. **8**: p. 22.
151. Moral, R., et al., *Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. J Endocrinol*, 2008. **196**(1): p. 101-12.
152. Lawson, C., et al., *Gene expression in the fetal mouse ovary is altered by exposure to low doses of bisphenol A. Biol Reprod*, 2011. **84**(1): p. 79-86.
153. Yuan, X., et al., *Finding maximal transcriptome differences between reprotoxic and non-reprotoxic phthalate responses in rat testis. J Appl Toxicol*, 2011. **31**(5): p. 421-30.
154. Berger, S.L., et al., *An operational definition of epigenetics. Genes Dev*, 2009. **23**(7): p. 781-3.
155. Waddington, C.H., *The epigenotype. 1942. Int J Epidemiol*, 2012. **41**(1): p. 10-3.
156. Ebrahim, A., et al., *Multi-omic data integration enables discovery of hidden biological regularities. Nat Commun*, 2016. **7**(13091).

157. Fernandes, M. and H. Husi, Establishment of a integrative multi-omics expression database CKDdb in the context of chronic kidney disease (CKD). *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 40367.
158. Lucarelli, G., M. Ferro, and M. Battaglia, Multi-omics approach reveals the secrets of metabolism of clear cell-renal cell carcinoma: *Transl Androl Urol*. 2016 Oct;5(5):801-803. doi: 10.21037/tau.2016.06.12.
159. Souidi, M., et al., [Uranium: properties and biological effects after internal contamination]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2009. **67**(1): p. 23-38.
160. Paquet, F., *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine*, ed. Tec&Doc2009, 09-2009.
161. Priest, N.D., Toxicity of depleted uranium. *Lancet*, 2001. **357**(9252): p. 244-6.
162. Kathren, R.L. and R.K. Burklin, Acute chemical toxicity of uranium. *Health Phys*, 2008. **94**(2): p. 170-9.
163. Konietzka, R., Gastrointestinal absorption of uranium compounds--a review. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2015. **71**(1): p. 125-33.
164. Domingo, J.L., et al., Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1987. **39**(1): p. 168-74.
165. Zhu, G., et al., Accumulation and distribution of uranium in rats after implantation with depleted uranium fragments. *J Radiat Res*, 2009. **50**(3): p. 183-92.
166. Homma-Takeda, S., et al., Uranium dynamics and developmental sensitivity in rat kidney. *J Appl Toxicol*, 2013. **33**(7): p. 685-94.
167. Hartsock, W.J., J.D. Cohen, and D.J. Segal, Uranyl acetate as a direct inhibitor of DNA-binding proteins. *Chem Res Toxicol*, 2007. **20**(5): p. 784-9.
168. Pible, O., et al., Predicting the disruption by UO₂(2+) of a protein-ligand interaction. *Protein Sci*, 2010. **19**(11): p. 2219-30.
169. Prat, O., et al., Alterations in gene expression in cultured human cells after acute exposure to uranium salt: Involvement of a mineralization regulator. *Toxicol In Vitro*, 2010. **24**(1): p. 160-8.
170. Kleinman, J.G., J.A. Wesson, and J. Hughes, Osteopontin and calcium stone formation. *Nephron Physiol*, 2004. **98**(2): p. 43-7.
171. Qi, L., et al., Characterization of UO₂(2+) binding to osteopontin, a highly phosphorylated protein: insights into potential mechanisms of uranyl accumulation in bones. *Metallomics*, 2014. **6**(1): p. 166-76.
172. Diamond, G.L., et al., Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam Appl Toxicol*, 1989. **13**(1): p. 65-78.
173. Mao, Y., et al., Inorganic components of drinking water and microalbuminuria. *Environ Res*, 1995. **71**(2): p. 135-40.
174. Zamora, M.L., et al., Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol Sci*, 1998. **43**(1): p. 68-77.
175. Kurttio, P., et al., Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect*, 2002. **110**(4): p. 337-42.
176. Kurttio, P., et al., Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *Am J Kidney Dis*, 2006. **47**(6): p. 972-82.
177. Leggett, R.W. and J.D. Harrison, Fractional absorption of ingested uranium in humans. *Health Phys*, 1995. **68**(4): p. 484-98.
178. Solhaug, M.J., P.M. Bolger, and P.A. Jose, The developing kidney and environmental toxins. *Pediatrics*, 2004. **113**(4 Suppl): p. 1084-91.
179. Gilman, A.P., et al., Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci*, 1998. **41**(1): p. 117-28.
180. Miller, A.C., et al., Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints. *Radiat Prot Dosimetry*, 2002. **99**(1-4): p. 275-8.
181. Miller, A.C., et al., Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *J Inorg Biochem*, 2002. **91**(1): p. 246-52.
182. Pellmar, T.C., et al., Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci*, 1999. **49**(1): p. 29-39.
183. Zhu, G., et al., Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats. *Arch Toxicol*, 2009. **83**(1): p. 37-46.

184. Houpert, P., et al., Parental exposure to enriched uranium induced delayed hyperactivity in rat offspring. *Neurotoxicology*, 2007. **28**(1): p. 108-13.
185. Lestaevel, P., et al., Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicol Teratol*, 2005. **27**(6): p. 835-40.
186. Legendre, A., et al., Endocrine effects of lifelong exposure to low-dose depleted uranium on testicular functions in adult rat. *Toxicology*, 2016. **369**: p. 58-68.
187. Wade-Gueye, N.M., et al., Chronic exposure to natural uranium via drinking water affects bone in growing rats. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **7**(7): p. 28.
188. Souidi, M., I. Dublineau, and P. Lestaevel, Uranium appauvri : perturbateur métabolique ? . *Environnement, Risques & Santé*, 2011. **10**(6).
189. Grison, S., et al., Métabolomique : un nouvel outil au service de la radiotoxicologie des faibles doses *Environnement, Risques & Santé*, 2015. **14**(6): p. 502-10.
190. Grison, S., et al., La métabolomique comme support de la radiotoxicologie des faibles doses. *Spectra analyse*, 2014. **299**: p. 46.
191. Frisbie, S.H., E.J. Mitchell, and B. Sarkar, World Health Organization increases its drinking-water guideline for uranium. *Environ Sci Process Impacts*, 2013. **15**(10): p. 1817-23.
192. Preston, R.J., Children as a sensitive subpopulation for the risk assessment process. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004. **199**(2): p. 132-41.
193. Wang, Q., et al., Metabolic profiling of pregnancy: cross-sectional and longitudinal evidence. *BMC Med*, 2016. **14**(1): p. 205.
194. Neiger, R., Long-Term Effects of Pregnancy Complications on Maternal Health: A Review. *J Clin Med*, 2017. **6**(8).
195. Grison, S., et al., Metabolomics reveals dose effects of low-dose chronic exposure to uranium in rats: identification of candidate biomarkers in urine samples. *Metabolomics*, 2016. **12**(10): p. 154.
196. Auwinen, A., et al., Uranium and other natural radionuclides in drinking water and risk of leukemia: a case-cohort study in Finland. *Cancer Causes Control*, 2002. **13**(9): p. 825-9.
197. Shim, C.K., et al., Estimation of renal secretory function for organic cations by endogenous N1-methylnicotinamide in rats with experimental renal failure. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1984. **12**(1): p. 23-42.
198. Ito, S., et al., N-methylnicotinamide is an endogenous probe for evaluation of drug-drug interactions involving multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K). *Clin Pharmacol Ther*, 2012. **92**(5): p. 635-41.
199. Colquhoun, D., An investigation of the false discovery rate and the misinterpretation of p-values. *Royal Society Open Science*, 2014. **1**(3): p. 140216.
200. Sriyudthsak, K., F. Shiraishi, and M.Y. Hirai, Mathematical Modeling and Dynamic Simulation of Metabolic Reaction Systems Using Metabolome Time Series Data. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2016. **3**(15).
201. Nägele, T., et al., A Strategy for Functional Interpretation of Metabolomic Time Series Data in Context of Metabolic Network Information. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2016. **3**(6).
202. Takahashi, H., et al., Dynamics of time-lagged gene-to-metabolite networks of *Escherichia coli* elucidated by integrative omics approach. *OMICS*, 2011. **15**(1-2): p. 15-23.
203. Elmhiri, G., et al., DNA methylation and potential multigenerational epigenetic effects linked to uranium chronic low-dose exposure in gonads of males and females rats. *Toxicol Lett*, 2017.

ETUDE DES EFFETS MULTIGENERATIONNELS D'UNE EXPOSITION CHRONIQUE A FAIBLE DOSE D'URANIUM PAR ANALYSES OMIQUES

Mots-clés : uranium, métabolomique, transcriptomique, épigénomique, effets multigénérationnels

Les contaminations chroniques par les radionucléides contribuent à l'ensemble des expositions environnementales à faibles doses de rayonnements ionisants. A l'exception des zones géographiques fortement contaminées par une catastrophe nucléaire, aucun risque sanitaire n'est observable à un faible niveau d'exposition. Néanmoins, un manque de connaissances scientifiques demeure dans ce domaine pour répondre au questionnement sociétal concernant la définition des seuils d'effets biologiques et des risques de troubles métaboliques qui peuvent avoir des conséquences sur la descendance. Pour fournir de nouvelles données et enrichir l'état des connaissances sur ce sujet, deux modèles *in vivo* d'exposition chronique ont été réalisés par contamination de rats à doses non toxiques d'uranium. Le premier modèle a permis de valider la méthode par le suivi d'une relation dose-effet analysée à différents temps. Le second a quant à lui, permis de suivre l'impact biologique d'une exposition directe à l'uranium sur trois générations de rats (F0, F1 et F2). Les effets cliniques et biologiques ont été étudiés à différents niveaux des systèmes moléculaires de régulation. Dans cette étude, des analyses métabolomiques, transcriptomiques et épigénomiques ont été réalisées à partir d'échantillons de sang, d'urine et de rein prélevés sur les animaux des trois générations.

Aucun effet clinique n'a globalement été observé après contamination chronique à l'uranium, à l'exception de la dernière génération (F2) pour laquelle une diminution du poids des reins et du poids corporels des rats mâles a pu être observée. Au niveau épigénétique, bien que le rein soit l'une des principales cibles de la toxicité de l'uranium, le profil de méthylation de l'ADN n'a pas été affecté pour la première génération (F0). Néanmoins, on peut y observer des modifications d'expression géniques (ARNm et microARN) ainsi qu'un déséquilibre du métabolome. Un dimorphisme sexuel associé à des déséquilibres métabolomiques et biochimiques a aussi été mis en évidence dans le sang et les urines de ces mêmes animaux. Pour les deux générations suivantes (F1 et F2), on observe un effet multigénérationnel spécifique du sexe des animaux, au niveau des profils métabolomiques urinaires et rénaux ainsi qu'au niveau des profils de méthylation de l'ADN des reins.

En conclusion, une contamination chronique à faible dose d'uranium entraîne des effets biologiques observables sur plusieurs générations. Les travaux de cette thèse apportent des données scientifiques nouvelles pour mieux comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents des faibles doses d'exposition à l'uranium. Ces données pourraient aussi être utiles à l'identification des risques de nocivités ou de toxicité à long termes. Dans le domaine de l'évaluation des effets biologiques des expositions environnementales tout comme dans celui de la radioprotection, l'évaluation des risques des expositions à faibles doses, implique de mieux considérer les différences de sensibilités liées au sexe des individus mais aussi les conséquences biologiques de telles expositions sur les générations à venir par des mécanismes multigénérationnels et transgénérationnels.