



RÉPUBLIQUE  
FRANÇAISE

*Liberté  
Égalité  
Fraternité*



**IRSN**

INSTITUT DE RADIOPROTECTION  
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

# ETUDES EXPÉRIMENTALES DE LA TOXICOLOGIE DE L'URANIUM LORS D'EXPOSITIONS À DE FAIBLES DOSES

Yann GUEGUEN

Pôle Santé et Environnement

Service de recherche sur les effets biologiques et sanitaires des rayonnements ionisants

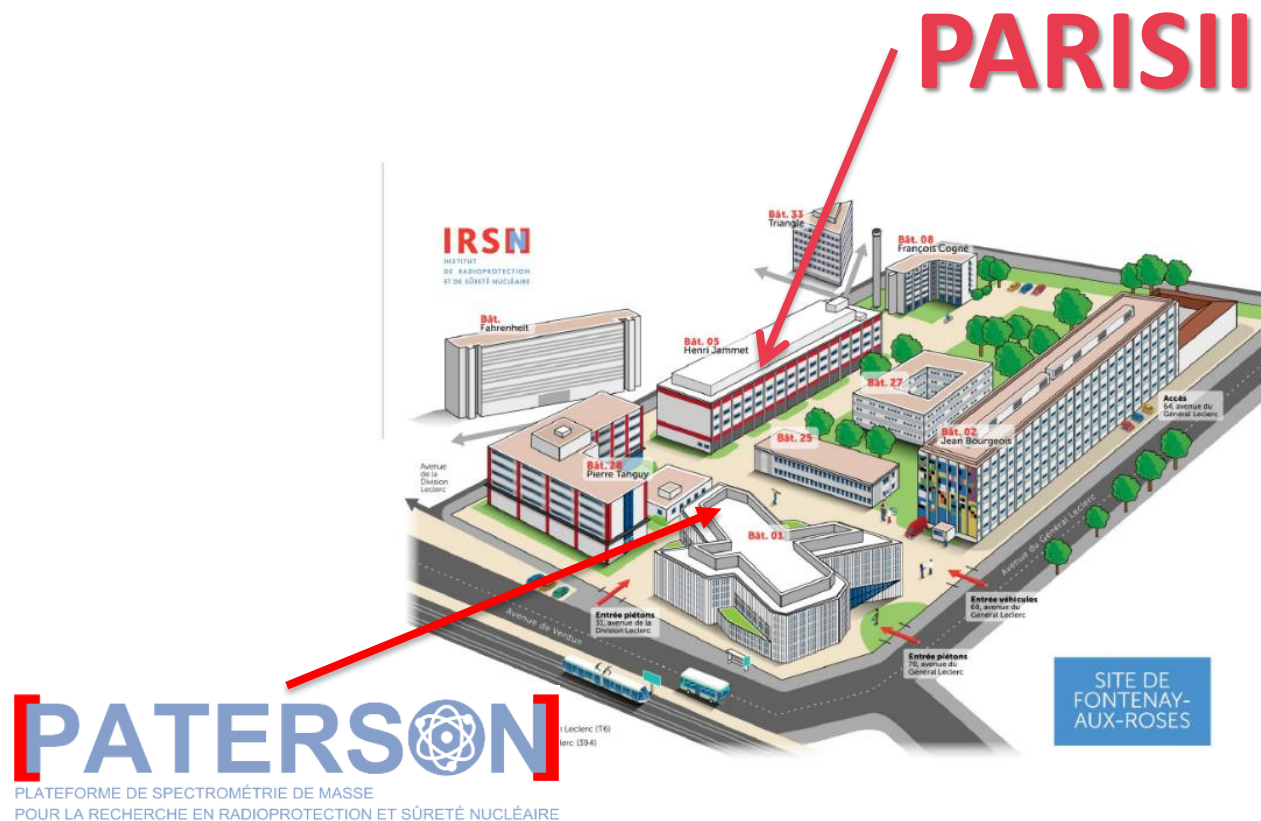
# PARADIS : Plateforme Animale de Radiocontamination et d'Analyse des radionucléides

## INSTALLATION PARISII

- Animalerie rongeurs (rats et souris, IVC)
- Contamination radiologique (par ingestion, inhalation, injection...)
- Plateau technique d'analyses biologiques, cellulaires et moléculaires, comportement...
- Imagerie *in vivo*

## INSTALLATION PATERSON

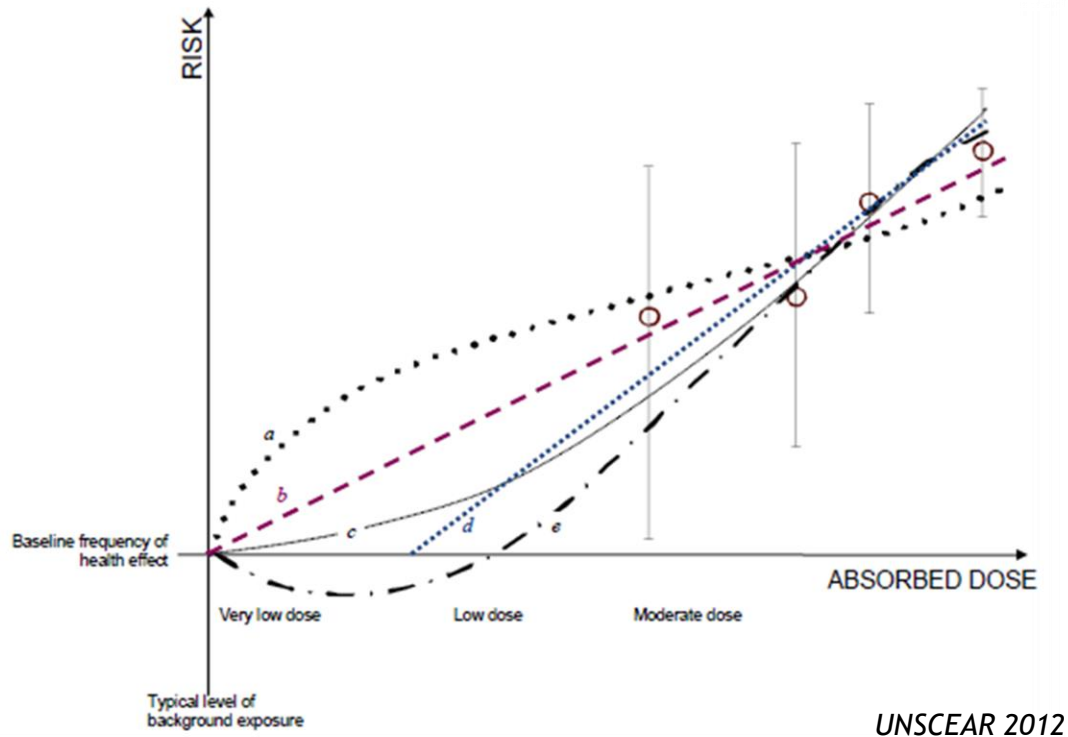
- Plateau Technique d'Analyse par Spectrométrie de Masse
- Analyse Élémentaire et Isotopique
- Imagerie *in-situ* des radionucléides
- Applications aux échantillons biologiques



**PATERSON**  
 PLATEFORME DE SPECTROMÉTRIE DE MASSE  
 POUR LA RECHERCHE EN RADIOPROTECTION ET SÛRETÉ NUCLÉAIRE

# Radiotoxicologie et faibles doses

## ÉTUDE DE LA « NÉPHRO-RADIOTOXICOLOGIE » À FAIBLES DOSES



### Doses de rayonnements ionisants d'après l'UNSCEAR:

- Très faibles doses < 10 mGy
- Faibles doses < 100 mGy
- Doses modérées 0,1 à 1 Gy
- Doses élevées > 1Gy

### Doses de substances chimiques

- Dose absorbée en mg/kg

### Les effets biologiques à faibles doses sont difficiles à identifier :

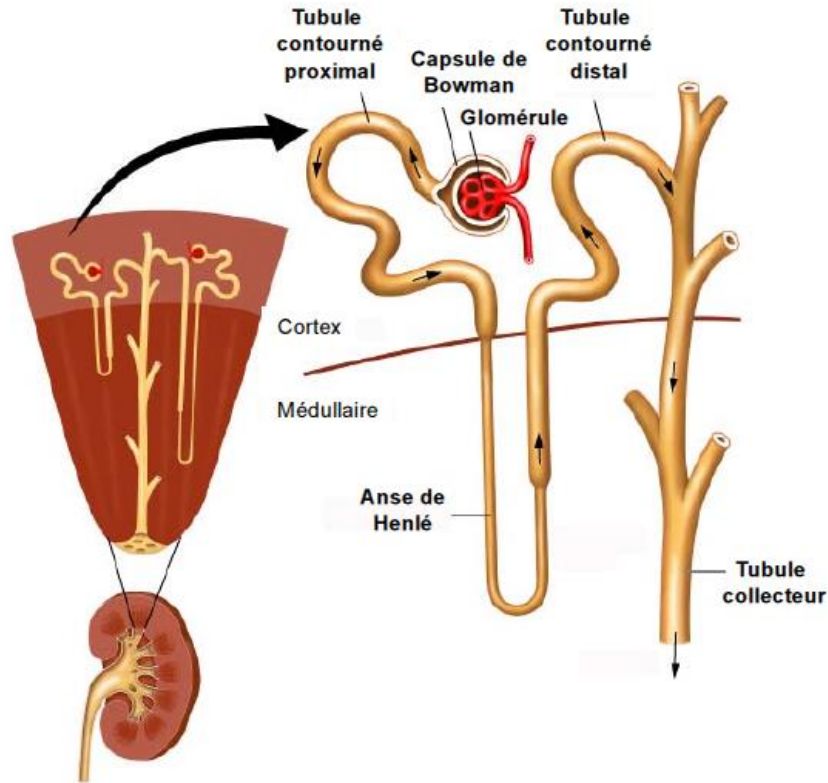
- Rareté des évènements chez l'Homme
- Faible niveau d'amplitude des effets biologiques
- Difficulté à corréliser à une exposition, particulièrement sur le long terme

➤ Extrapolation des fortes doses aux faibles doses et de l'animal à l'Homme



# Radiotoxicologie et faibles doses

## ÉTUDE DE LA « NÉPHRO-RADIOTOXICOLOGIE » À FAIBLES DOSES



### Principales fonctions rénales :

- Maintien de l'équilibre électrolytique et hydrique
- Élimination des substances toxiques endogènes et exogènes
- Biosynthèse d'hormones

### Néphrotoxicité iatrogène ou environnementale :

- Organe le plus irrigué (/g de tissu) donc fortement exposé aux toxines circulantes
- Filtration, réabsorption et sécrétion de toxines
- Concentration de l'urine

➤ Atteintes rénales cancéreuses et non-cancéreuses ?

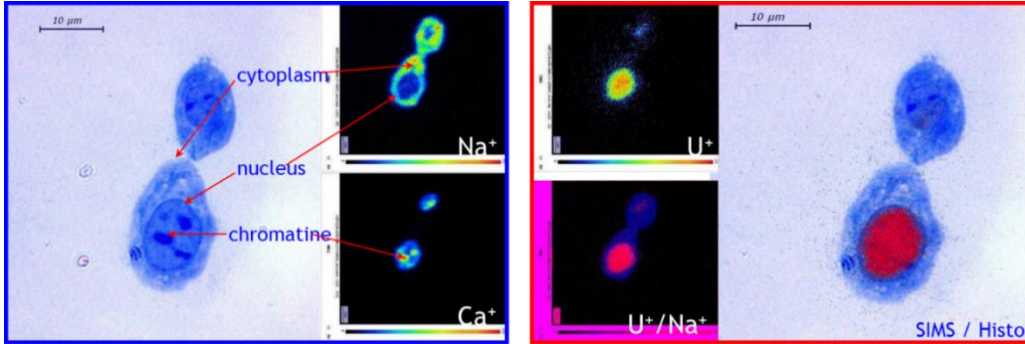
# Biodistribution & bioaccumulation de l'uranium

Thèse C. Rouas  
(2007-10)



## ETUDES IN VITRO

Collaboration interne LRC/SDI (LRSI), LRTOX



Rouas, Bensoussan et al, Chem Res Toxicol 2010

Mise en évidence de la forme « soluble de l'uranium » par SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry)

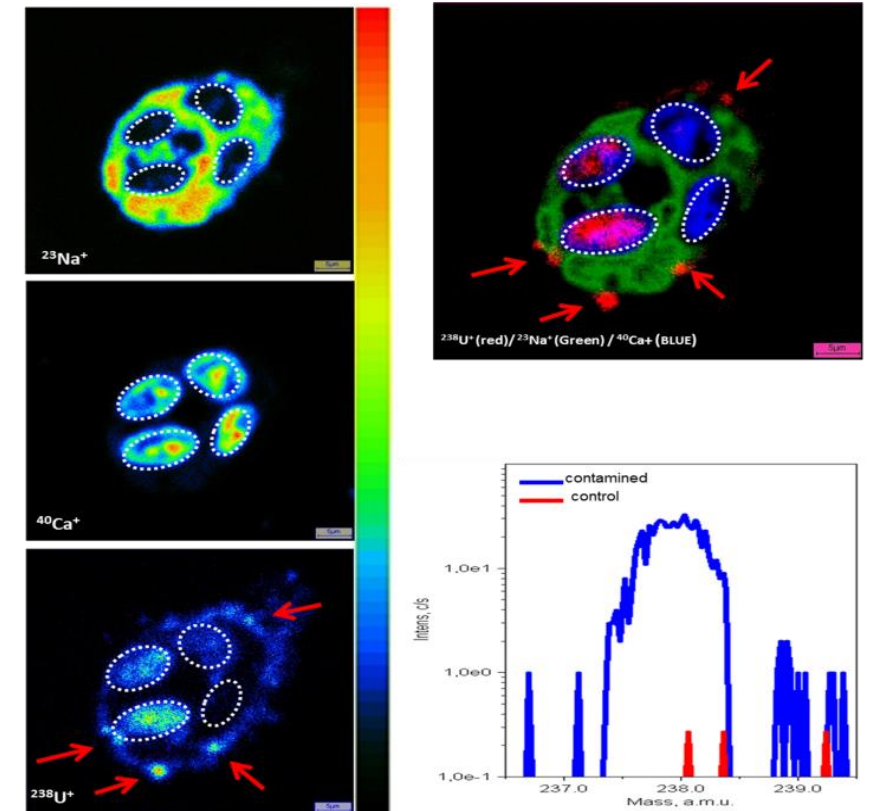
Localisation préférentiellement nucléaire de l'uranium sous forme soluble à faible concentration <100 μM

Formation de précipités extracellulaires (→) et présence nucléaire et cytoplasmique d'uranium soluble

Dépendant de la durée d'exposition, de la concentration en uranium (et de la préparation de l'échantillon)

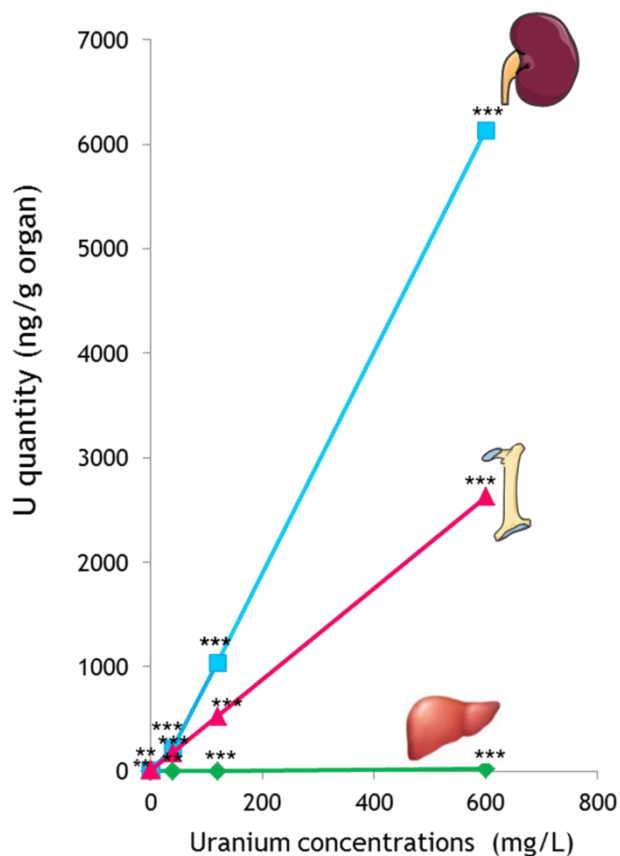
Distribution très hétérogène au sein du tapis cellulaire

Guéguen et al, Toxicol In Vitro 2015  
Suhard et al, Microsc Res Tech. 2018

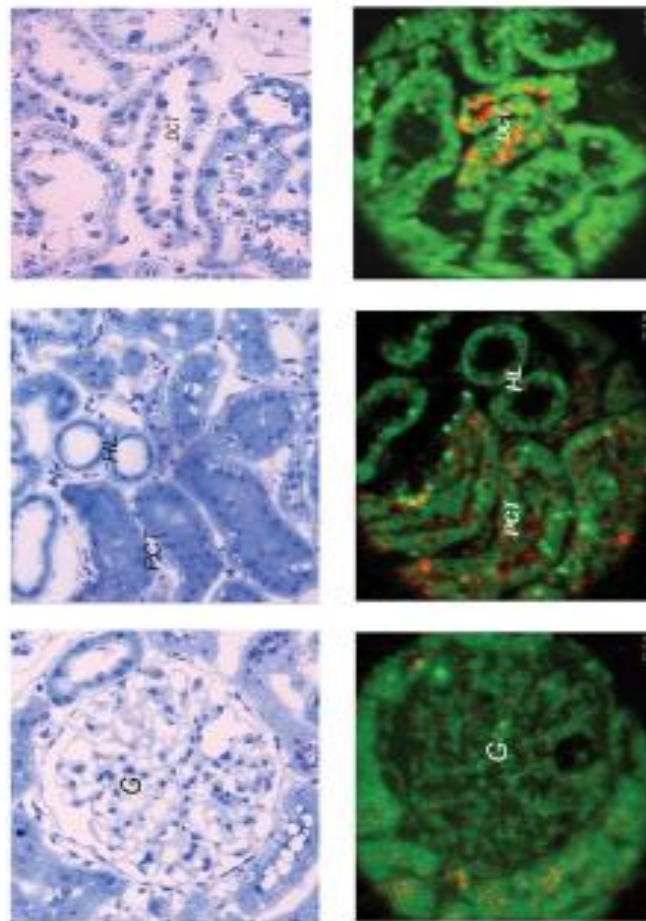


# Biodistribution & bioaccumulation de l'uranium

## ETUDES IN VIVO LORS D'UNE EXPOSITION CHRONIQUE



Poisson et al, Free Rad Res 2014



Tessier et al, Microsc Microanal 2012

- L'uranium s'accumule principalement dans les reins et les os
- L'uranium s'accumule proportionnellement à la quantité administrée via l'eau de boisson
- Le taux rénal atteint  $6 \mu\text{g/g}$  > taux de néphrotoxicité lors d'une exposition aiguë
- Distribution tissulaire très hétérogène dans les reins et principalement localisée dans les TCP (tous les segments du néphron à long-terme)

# Mécanismes d'action de l'uranium sur le rein

## SYSTÈME DE DÉTOXIFICATION DES XÉNOBIOTIQUES

Collaborations Université Châtenay-Malabry, INSERM U993

Oestrogènes  
Progestérone  
Neurostéroïdes  
Stéroïdes surrénaliens

Acides biliaires  
Cholestérol  
Eicosanoïdes  
Cétones  
Vitamine D

Endocrinologie

Métabolisme

### CYTOCHROMES P450

Pharmacologie

Toxicologie  
Environnementale

Thérapeutique  
Polymorphismes  
Interactions médicamenteuses  
Conception de médicaments

Carcinogénèse

Pesticides  
Polluants

Activation mutagène  
Produits naturels  
Procarcinogènes

Guéguen et al, Ann Biol Clin, 2006

## Système de détoxification

Il permet de biotransformer puis d'éliminer de nombreux médicaments, polluants chimiques et autres xénobiotiques

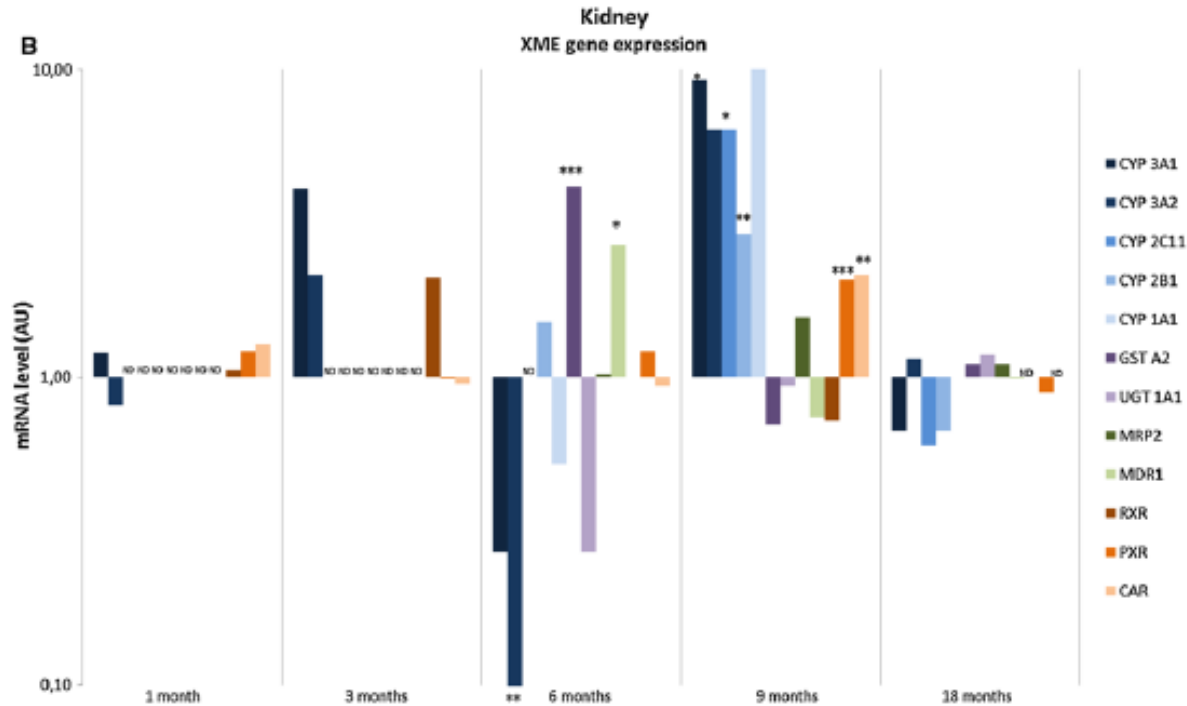
Exposition aiguë à l'uranium modifie :

- Les EMX dont les cytochromes P450
- La pharmacocinétique de xénobiotiques P450-dépendant

- **Objectifs : Etude du métabolisme des xénobiotiques lors d'expositions chroniques**
  - En fonction de la durée et de la dose
  - Lors de co-expositions
  - In vivo et in vitro

# Mécanismes d'action de l'uranium sur le rein

## SYSTÈME DE DÉTOXIFICATION DES XÉNOBIOTIQUES



Guéguen et al, Arch Toxicol, 2014

Exposition chronique et métabolisme des xénobiotiques (EMX) :

Expression modifiée des EMX au niveau hépatique et rénal en fonction du temps (1 à 18 mois) et de la concentration (0,2 à 120 mg/L)

CYP3A est l'enzyme la plus altérée :

- Induction ou répression importante
- Modification de son expression génique, protéique et de son activité enzymatique

Absence d'atteinte rénale délétère (anatomopathologique ou marqueurs biochimiques)

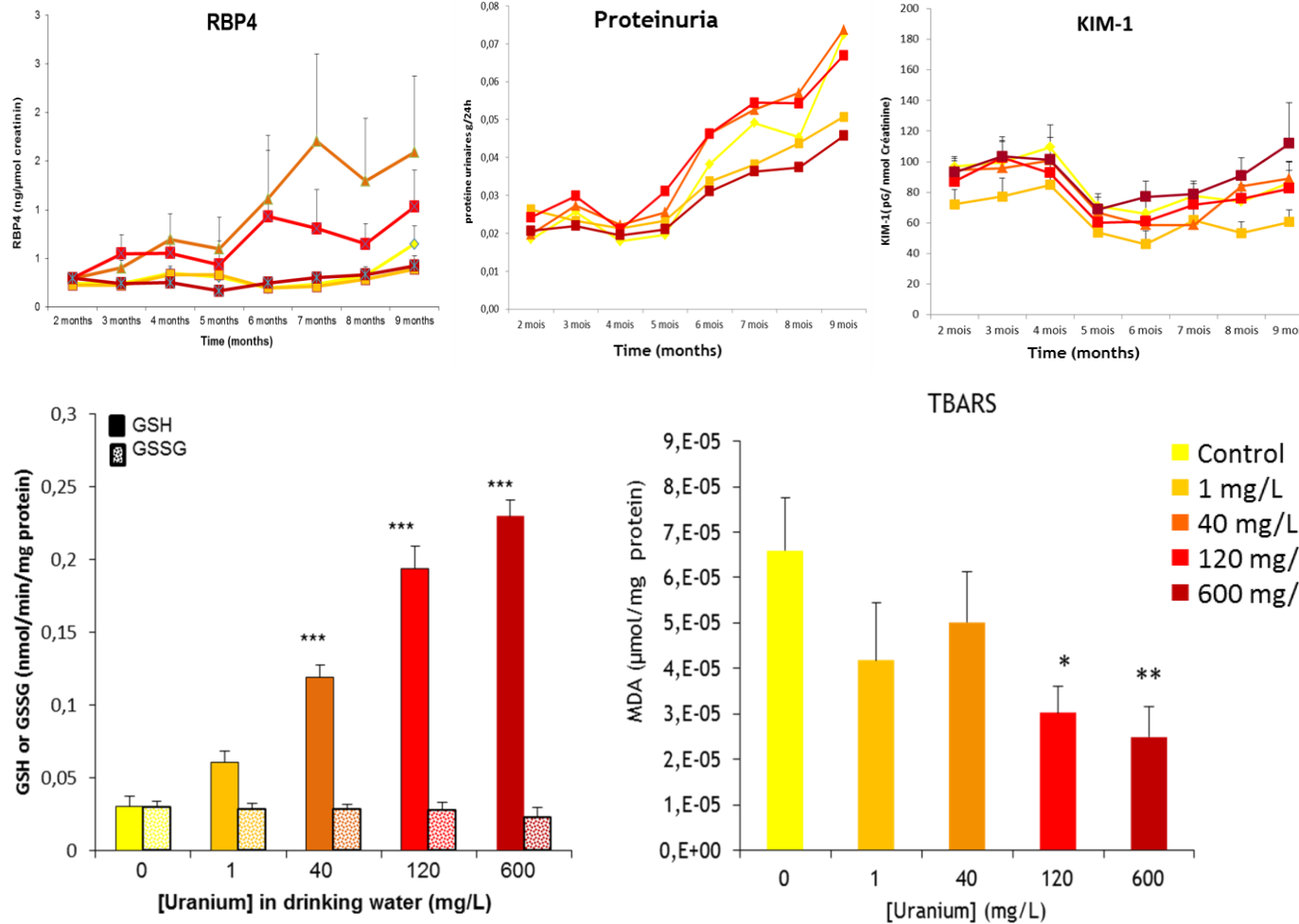
➤ **Modification de métabolismes P450-dépendant et de la sensibilité du rein ?**



# Mécanismes d'action de l'uranium sur le rein

## RÔLE DE L'ÉQUILIBRE REDOX IN VIVO

Thèse C. Poisson  
(2010-13)



Poisson et al, Free Rad Res, 2014

Dose-réponse chronique  
(rat Sprague-Dawley) :

Absence d'induction de néphrotoxicité  
(biomarqueurs KIM-1, RBP, clusterine, GSTa1,  
protéinurie, histopathologie) en fonction

- de la dose administrée (1 à 600 mg/L)
- de la durée d'exposition (1 à 9 mois)

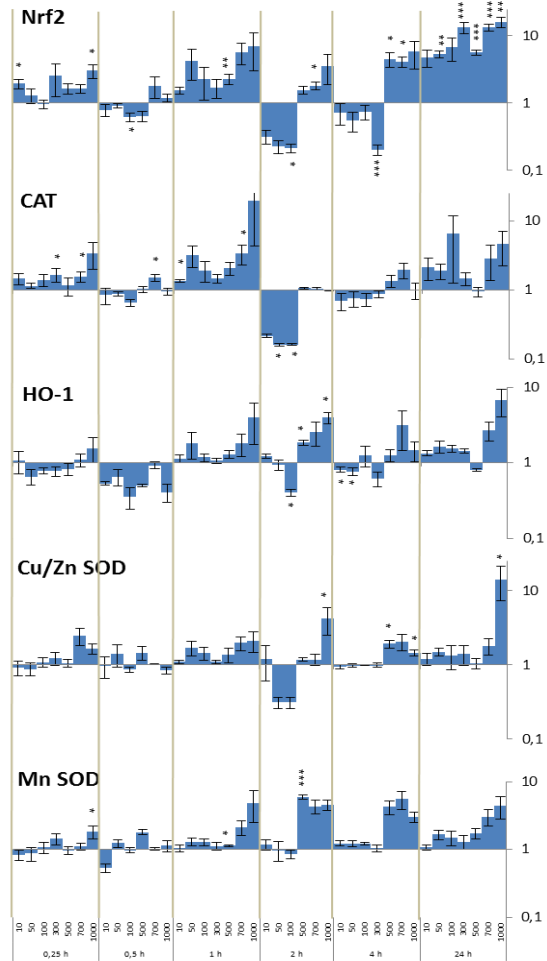
Augmentation du taux rénal de glutathion en  
fonction de la concentration d'uranium

Diminution de la peroxydation lipidique (TBARS)  
rénale

➤ Renforcement du système antioxydant lors d'une  
exposition chronique suggérant la mise en place  
d'un processus adaptatif ?

# Mécanismes d'action de l'uranium sur le rein

## RÔLE DE L'ÉQUILIBRE REDOX IN VITRO

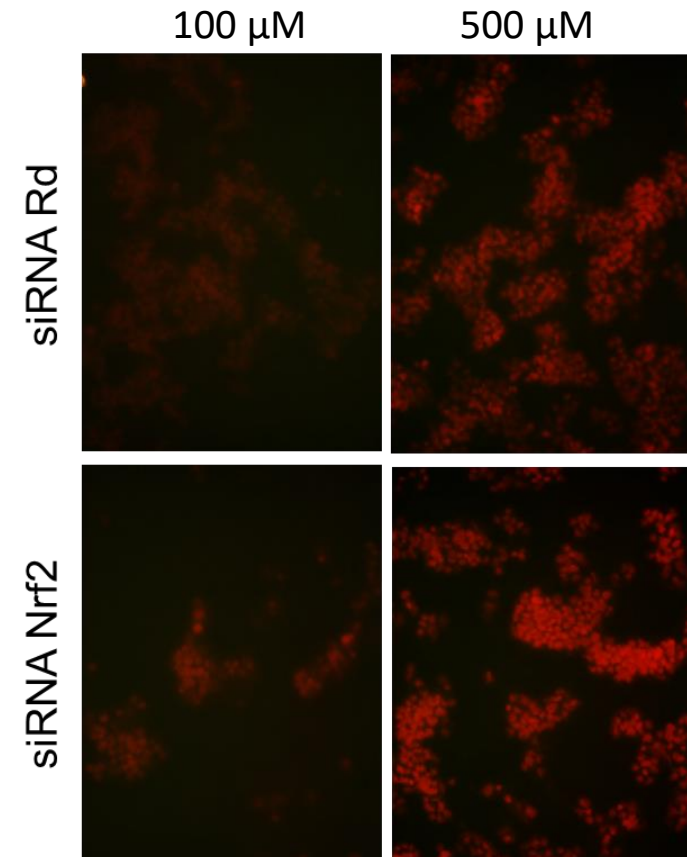


### Cellules HepG2 :

- Effets pro-oxydants à court-terme (1 - 4 heures) et pour des concentrations cytotoxiques (>300 μM)
- A faible concentration (< 300 μM), non cytotoxique, modifications géniques (voies de signalisation, détoxification, antioxydantes...)

### Cellules HepG2 siRNA Nrf2 :

- Augmentation de gènes pro-apoptotiques et production d'anions superoxydes (ERO)
  - Maintien de l'induction des enzymes antioxydantes
- Implication d'autres mécanismes de défense en plus de Nrf2 ?



Guéguen et al, *Toxicol In Vitro*, 2015

Poisson C, *Thèse*, 2013

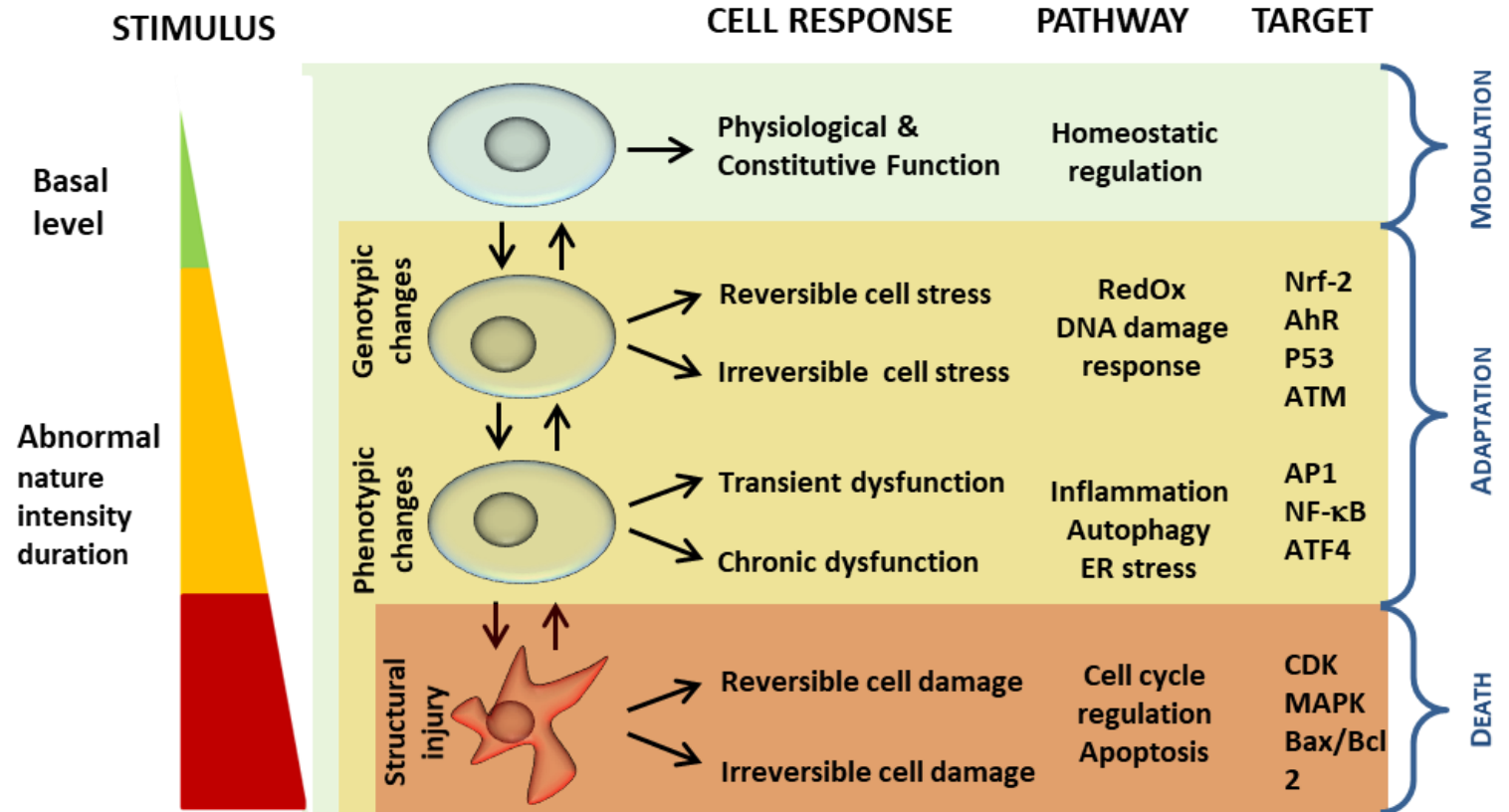
# Mécanismes d'action de l'uranium sur le rein

## ÉTUDE DES MÉCANISMES DE LA RÉPONSE ADAPTATIVE

Collaboration externe (O. Barbier, Cinvestav-IPN, Mexique)

La réponse adaptative implique une réponse coordonnée de plusieurs systèmes de réponse au stress (mécanismes de défense) :

- Equilibre RedOx
- Inflammation
- Autophagie
- Réponse UPR
- Dommages à l'ADN
- Apoptose

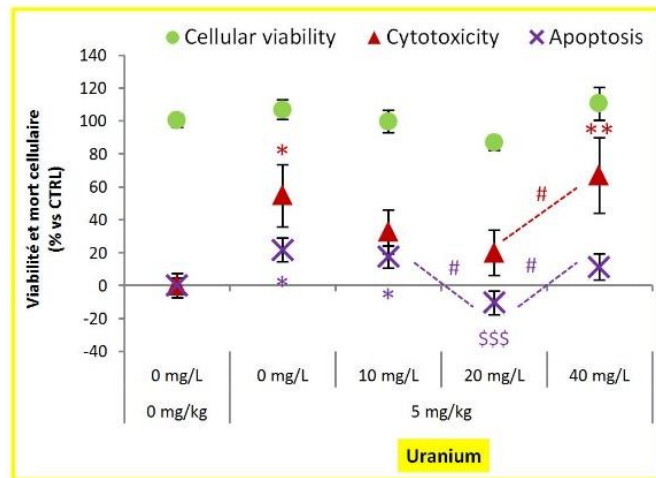
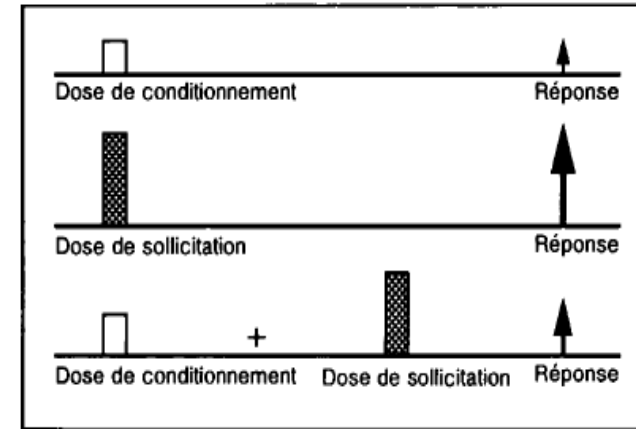
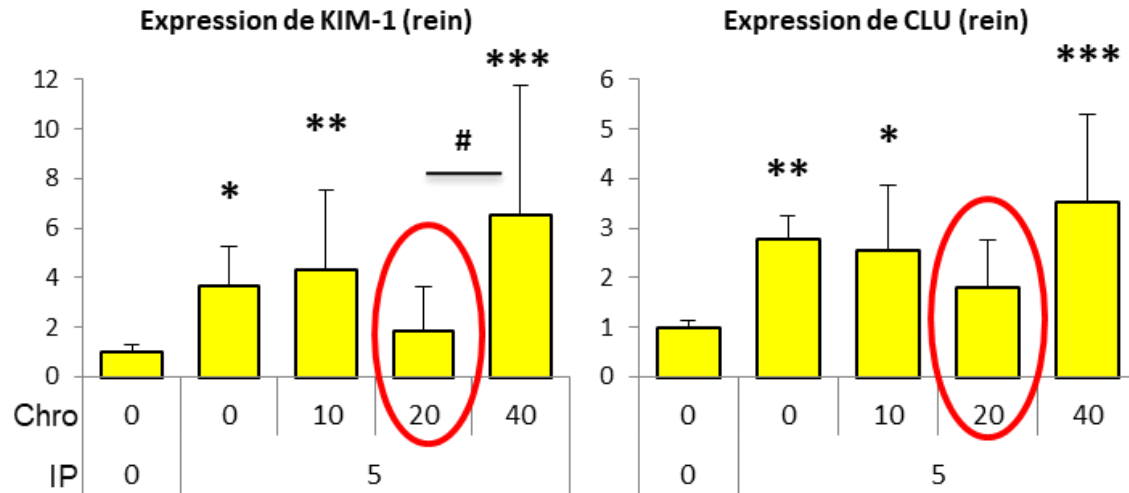


Guéguen et al, CMLS 2019

# Mécanismes d'action de l'uranium sur le rein

## ETUDE IN VIVO DES MÉCANISMES DE LA RÉPONSE ADAPTATIVE

Thèse A. Bontemps  
(2010-13)



Bontemps et al,  
*J Trace Elem Med Biol.* 2021

### Protocole de test challenge - Uranium :

- Biomarqueurs de néphrotoxicité (KIM-1, clusterine) maintenus au niveau des témoins non-exposés à 20 mg/L
- Apoptose (activité caspase 3/7) similaire au groupe témoin non exposé à 20 mg/L
- Nécrose cellulaire (LDH) varie de façon similaire



## Projets de recherche expérimentaux sur l'uranium

**UKCAN**

Uranium Kidney  
CANcerous effect in mice

Collaboration IGR, KB  
Co-financement Orano

**ARMOR**

Etude AOP d'un  
Radionucléide à l'aide d'un  
Modèle Organoïde Rénal

Collaboration INSERM-  
IRMETIST

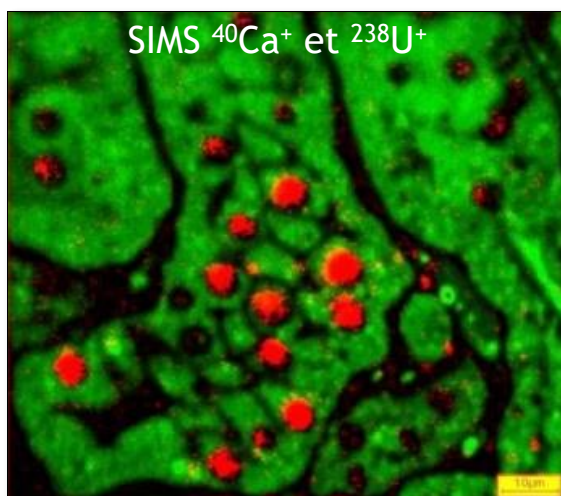
**BIOCUBK**

Biochemical Cycle of  
Uranium in Bone and  
Kidney

Collaborations  
UCA/CEA/CNRS, Univ Lyon  
Co-financement ANR22-  
CE44

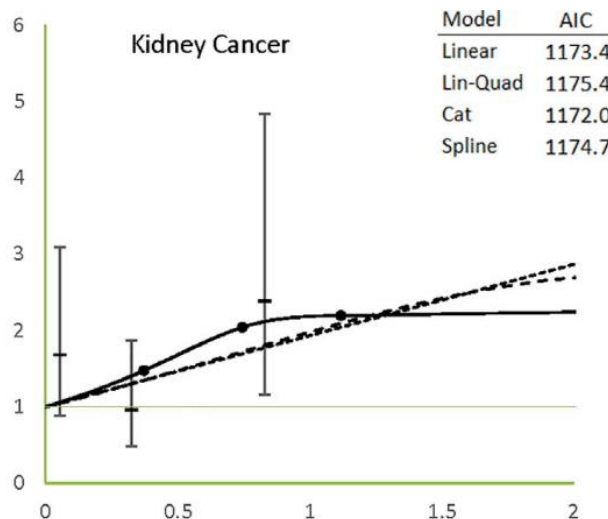
# Projet UKCAN

ETUDE DES EFFETS POTENTIELLEMENT CANCERIGENES DE L'URANIUM AU NIVEAU RENAL ASSOCIES A UNE DISTRIBUTION HETEROGENE DE LA DOSE



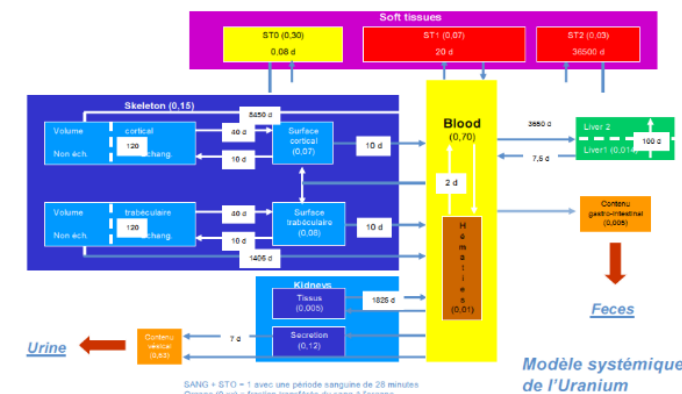
Tropisme rénal et néphrotoxicité de l'uranium

Poisson et al, Free Rad Res 2014



Suspicion de risque de cancer rénal associé à l'uranium

Yin et al, Am j Ind Med 2018



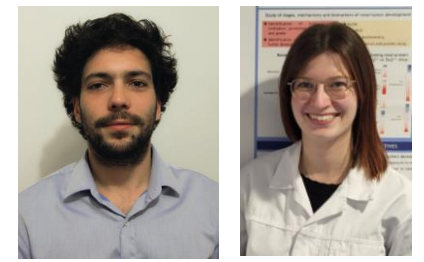
Contribution à la révision du modèle de la CIPR

- Objectif : Une exposition à l'uranium peut-elle entraîner une augmentation de l'incidence de cancers rénaux en lien avec à sa distribution tissulaire ?

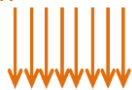
# Projet UKCAN

## Procédures expérimentales sur souris OGM

Post-Doc O. Claude (2020-22)  
Thèse L. De Castro (2022-25)



Exposition répétée  
par instillation  
(8 jours)



Souris transgéniques prédisposées

TSC2<sup>+/-</sup>



PAX8-CRE/VHL/PBRM1

Développement de lésions  
rénales bénignes et  
malignes

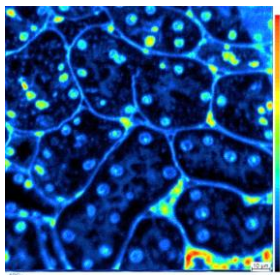
Spécifique de la  
carcinogénèse de type  
ccRCC

Âge (mois) 3 3,5 6 8 10 12

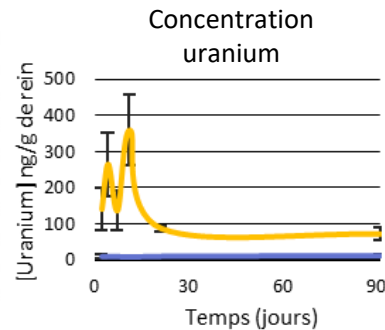
MÉTROLOGIE ET BIODISTRIBUTION

SUIVI LONGITUDINAL NON-INVASIF

ANALYSES POST-MORTEM

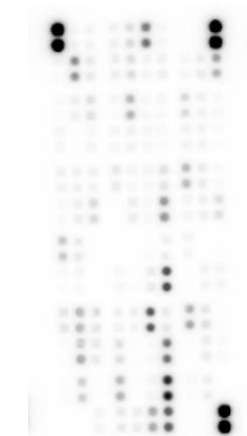
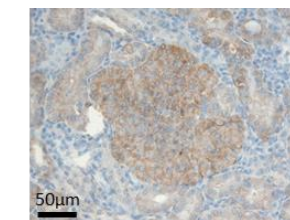
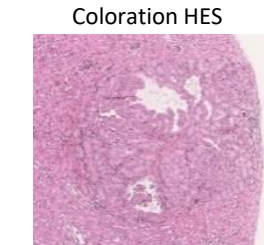
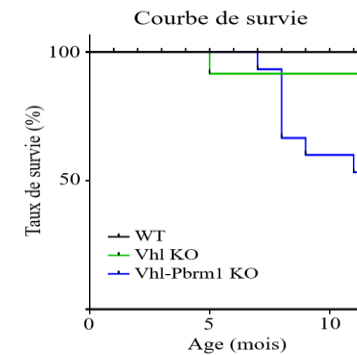


SIMS



Echographie

Génotype	Diurèse (mL/16h)
WT	0,37 ± 0,23
Vhl KO	3,22 ± 1,29 ***
Vhl-Pbrm1 KO	5,42 ± 2,09 *** ##



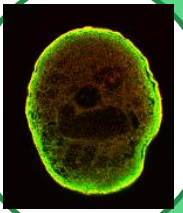
- Quantification tissulaire
- Localisation et distribution tissulaire

- Echographie haute-résolution
- Doppler
- Cage à métabolisme

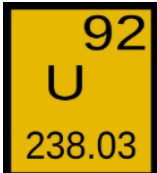
- Evaluation de l'incidence des tumeurs (nbre, volume, type)
- Etude des stades de cancérogénèse et mécanismes tumoraux
- Etude des biomarqueurs de tumorigénération rénale

# Projet ARMOR

Etude AOP (Adverse Outcome Pathway) de la toxicité rénale d'un Radioélément à l'aide d'un **Modèle Organoïde Rénal**



Développement et utilisation d'un modèle rénal alternatif et complémentaire : les organoïdes



Approfondissement des connaissances sur la réponse cellulaire et tissulaire à l'uranium



Construction d'un réseau AOP

- AOP (*Adverse Outcome Pathway*) : caractérisation détaillée des voies de toxicité conduisant à des effets délétères\*
- Rayonnements ionisants et AOP (Chauhan et al. 2019) : toxicité rénale induite par l'uranium identifiée comme prioritaire par le groupe d'experts Rad/Chem
- Néphrotoxicité de l'uranium est décrite aussi bien expérimentalement que chez l'Homme mais son AOP (*Adverse Outcome Pathway*) est incomplet
- **Identifier les liens entre les événements moléculaires initiateurs liés à la contamination à l'uranium et les effets néfastes de l'uranium sur le rein**

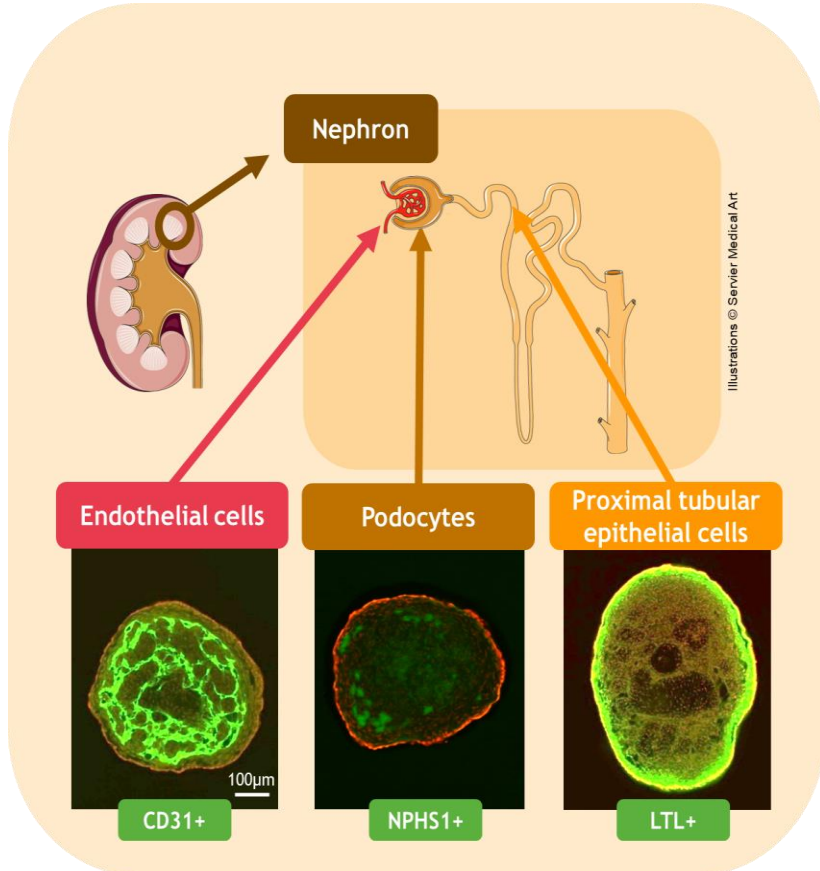
\* Effets néfastes ou délétères : événements occasionnant une dysfonction d'organes ou de tissus où l'homéostasie de l'organisme ne peut être maintenue



# Projet ARMOR

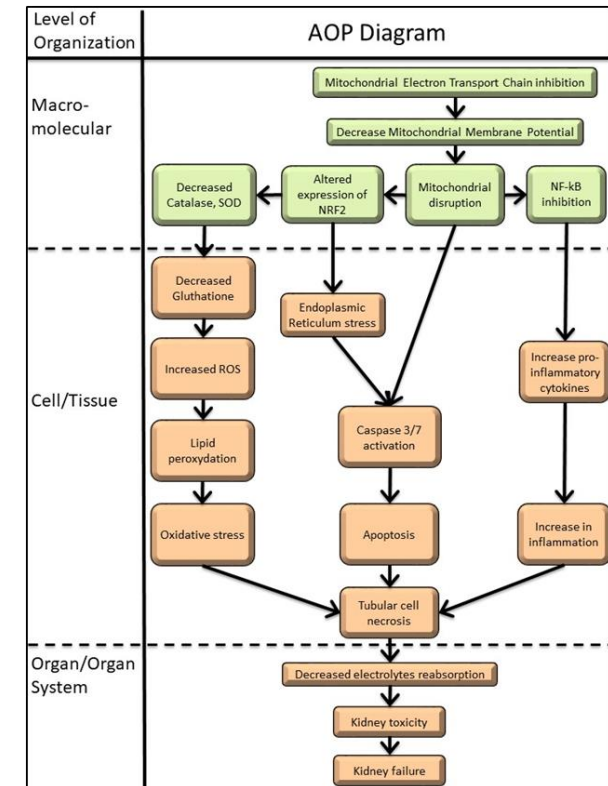
Modèle 3D « Organ like » qui reproduit la complexité du phénotype humain

Thèse M. Frerejacques (2022-25)



- **Génération** à partir de cellules souches reprogrammées (IPS)
- **Caractérisation des populations cellulaires** par immunomarquages
- **Caractérisation de la structure et morphologie** par coloration HES et microscopie électronique à transmission
- **Caractérisation de la fonctionnalité** par test d'endocytose et expression de transporteurs

**AOP447:** Insuffisance rénale induite par l'inhibition de la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale par les voies de l'apoptose, de l'inflammation et du stress oxydatif

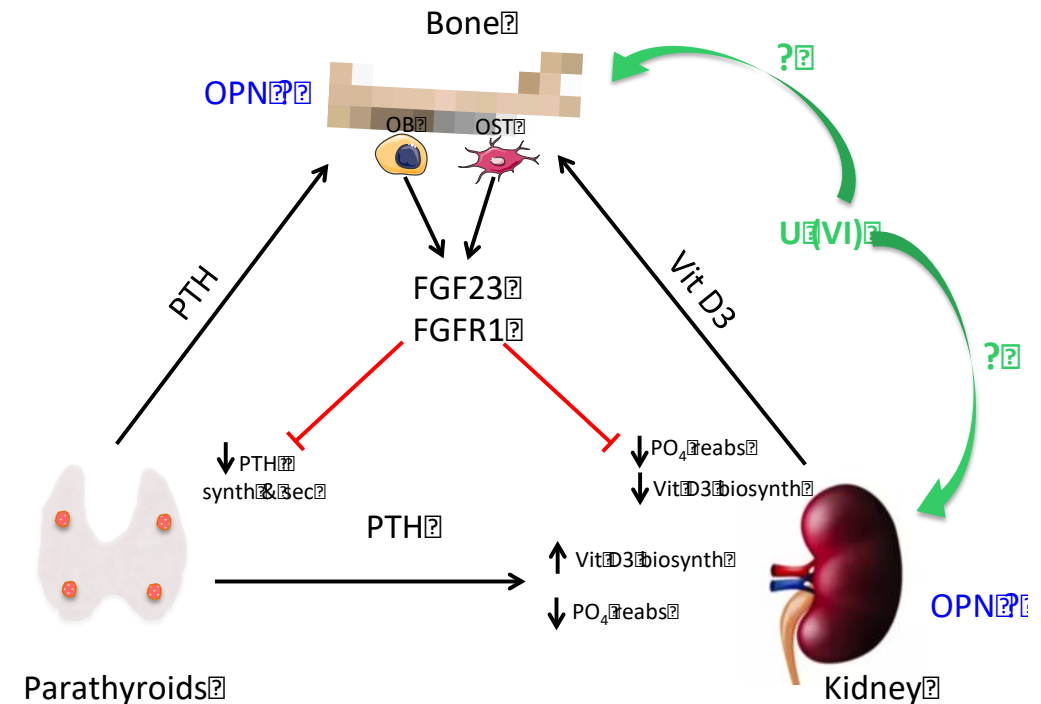


Guéguen & Frerejacques, *IJMS* (2022)  
[AOP-Wiki \(aopwiki.org\)](http://AOP-Wiki(aopwiki.org))

# Projet BioCUBK : Biochemical Cycle of Uranium in Bone and Kidney

## Objectifs et hypothèses de recherche

- L'exposition environnementale ou professionnelle à l'uranium peut avoir de multiples effets néfastes
- Environnement physiologique  $UO_2^{2+}$  ou U(VI) : ion uranyle hexavalent
- L'os et le rein sont les principaux organes cibles de l'uranium :
  - Tropisme rénal et osseux (40-80% de la quantité absorbée)
  - Néphropathies induites par une exposition aiguë à l'uranium
  - Altération de la formation osseuse lors d'exposition aiguë ou chronique in vivo
- Lacunes de connaissances
  - sur les mécanismes de (chimio-)toxicité dans ces 2 organes, particulièrement à faible dose
  - sur les interactions biologiques entre os et rein (régulation hormonale et électrolytique)



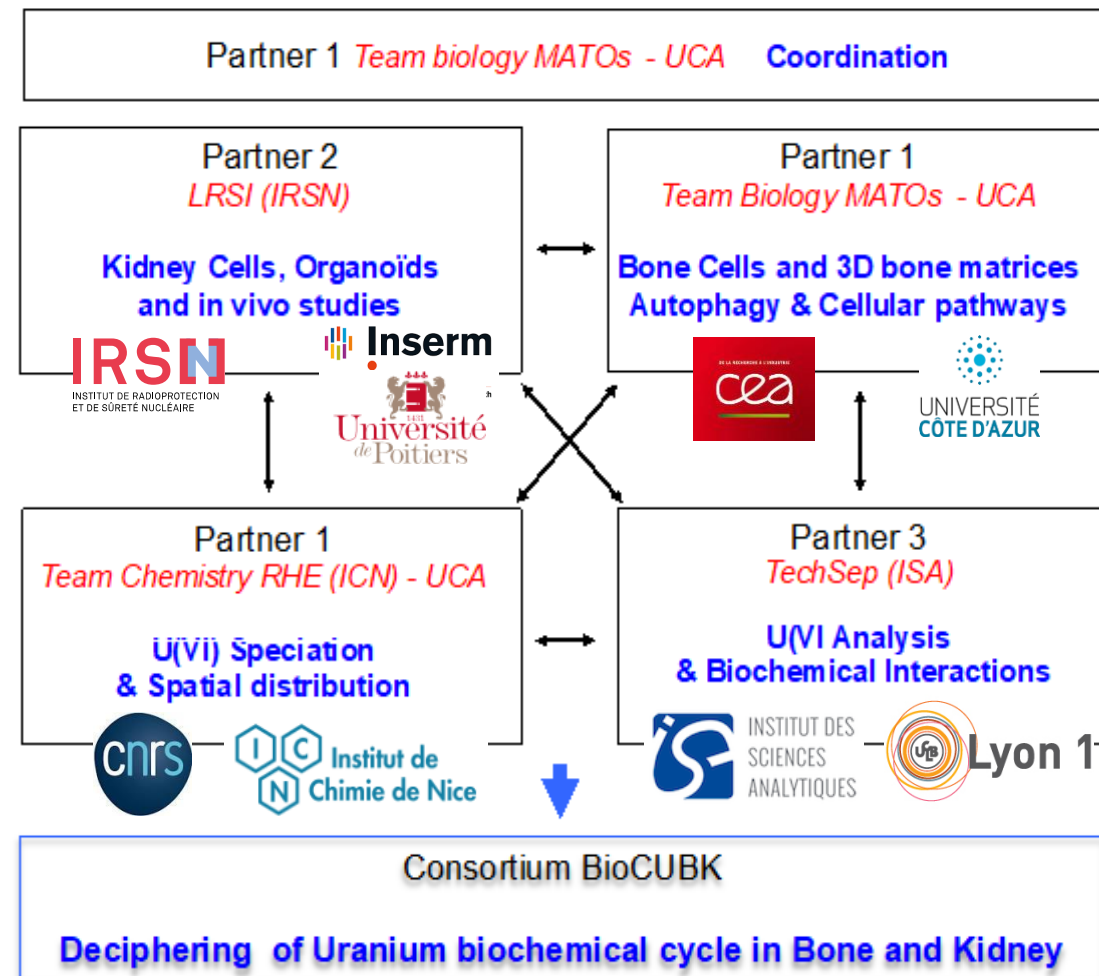
Adapted from Han et al., 2018

Figure 1. Endocrine crosstalk between kidney and bone

- **OBJECTIF : DÉCRYPTER LE COMPORTEMENT DE L'URANIUM ET LES RÉPONSES CELLULAIRES QUI ONT ÉTÉ PRÉALABLEMENT IDENTIFIÉES AU NIVEAU RÉNAL ET OSSEUX À FAIBLE DOSE**

# Organisation du projet BioCUBK

- Financement ANR-22—CE44-0027
- Consortium multi-équipe spécialiste de l'uranium
- Stratégie de recherche interdisciplinaire (radiochimie, biochimie et radiotoxicologie)
  - MATOs, Mécanismes des altérations du tissu osseux
  - RHE, Radiochimie humaine et environnementale
  - TechSep, Techniques de séparation
  - LRSI, Mécanismes néphrotoxicologiques
  - IRMETIST, Ischémie-reperfusion en transplantation



# Remerciements

## IRSN

**Radiotoxicologie, cancérologie,  
imagerie du petit animal**

LRSI :

Marie Frerejacques, PhD

Laurie De Castro, PhD

Olivier Claude, Post-Doc

Clara Gillot, Master

David Suhard

Annabelle Manoury

LRTOX :

Caroline Rouas, PhD

Clémentine Poisson, PhD

Alice Bontemps, PhD

Chrystelle Ibanez

Virginie Monceau

GSEA:

Delphine Denais-Lalieve

Amandine Sache

Frédéric Voyer

LEDI:

Estelle Davesne



**Génétique des cancers du rein**

Sophie Gad-Lapiteau

Flore Renaud

Sophie Couvé



**Anatomopathologie clinique**

Sophie Ferlicot



**Tissu osseux & mécanismes cellulaires**

Georges Carle

Sabine Santucci



**MTA souris Pax8-cre/Vhl/Pbrm1**

James Brugarolas



Cinvestav Olivier Barbier



Marc Pallardy

Saadia Kerdine-Römer



**Anatomopathologie vétérinaire**



**Génotypage des animaux**



Co-financement EMX



Co-financement UKCAN

Orano  
Donnera toute sa valeur au nucléaire



Co-financement BioCUBK



# ETUDES EXPÉRIMENTALES DE LA TOXICOLOGIE DE L'URANIUM LORS D'EXPOSITIONS À DE FAIBLES DOSES

Yann GUEGUEN

Pôle Santé et Environnement

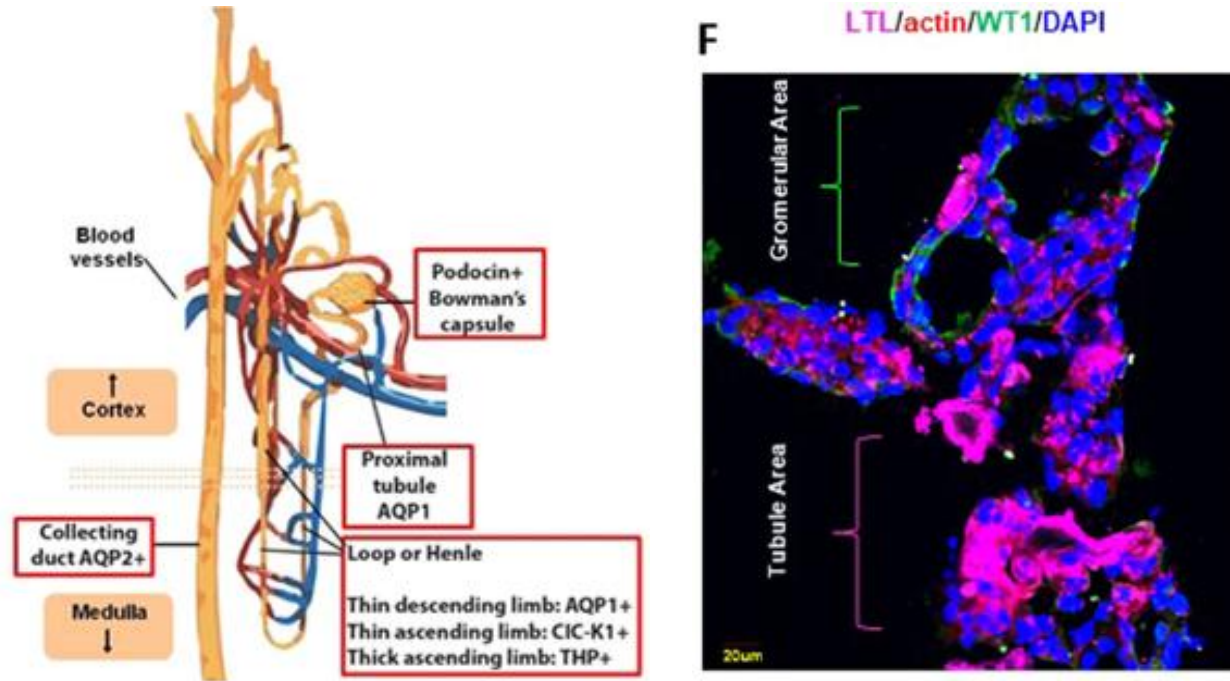
Service de recherche sur les effets biologiques et sanitaires des rayonnements ionisants



# Projet ARMOR

## ETUDE AOP DE LA TOXICITÉ RÉNALE D'UN RADIONUCLÉIDE À L'AIDE D'UN MODÈLE ORGANOÏDE RÉNAL

Grassi et al., 2019



Un organoïde rénal reproduit :

- La structure (présence de tubules proximaux, distaux, glomérules et anses de Henlé)
- La fonctionnalité (capacité d'endocytose, expression de transporteurs fonctionnels...)

Steichen et al., 2019

