

**IRSN**

INSTITUT  
DE RADIOPROTECTION  
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

Faire avancer la sûreté nucléaire

# Impact de l'uranium sur le métabolisme du poisson zèbre, *Danio rerio*

Starrlight Augustine

Thèse co-encadrée par S.A.L.M. Kooijman, B. Gagnaire  
et C. Adam-Guillermin



# Contexte général

## ➤ Evaluation des risques sur l'environnement

### ■ Evaluation de l'impact des rejets liés aux activités humaines sur l'environnement

- Diversité des espèces
- Nombre d'individus appartenant aux différents espèces

### ■ Prédire l'évolution à long terme des écosystèmes

- Services écosystémiques
- Développement durable

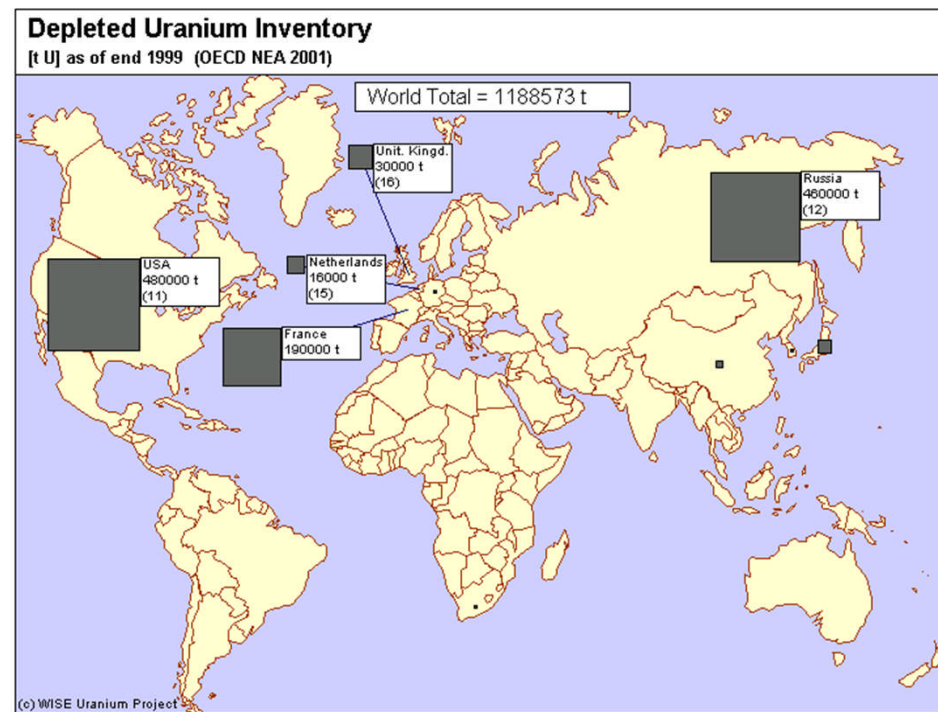
### ■ Santé de l'homme

- Les contaminants se retrouvent dans nos assiettes et dans l'eau de boisson

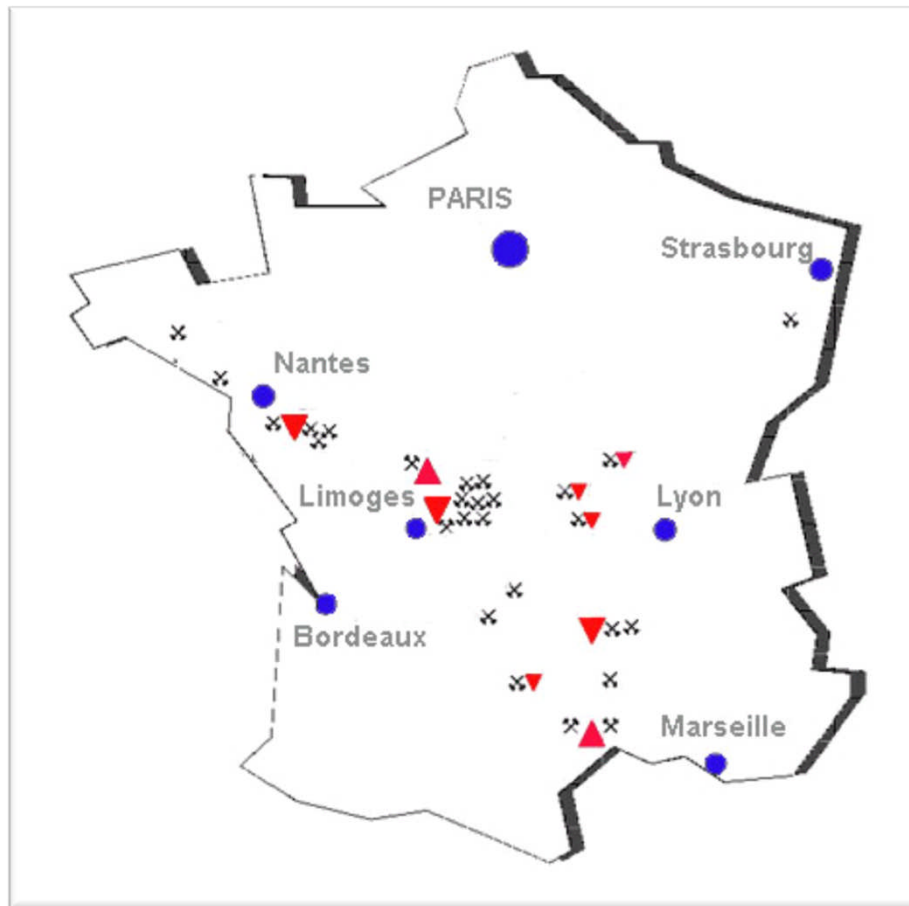
# Contexte générale

## ➤ Programme de recherche IRSN: ENVIRHOM-ECO

Evaluation des effets à long terme sur l'environnement d'une exposition chronique à des radionucléides



# Uranium appauvri



- Grandes villes
- ▲ Site de stockage de résidus miniers encore ouverts en 1989
- ▼ Site de stockage de résidus miniers fermés en 1989

Titre en juin 2008 lorsque j'ai candidaté sur le sujet:

« Impact des radionucléides sur le poisson-zèbre,  
*Danio rerio* : couplage biomarqueurs / traits de vie  
par la modélisation »

**LE SUJET** Traduction du stress induit par la toxicité de l'uranium en termes de budget énergétique de *Danio rerio*  
Etude des liens entre les différents niveaux d'organisation  
Travail sur la base des données acquises au laboratoire

Cellule

- Stress oxydant (S.Barillet)
- Neurotoxicité (S.Barillet)
- Génotoxicité(S.Barillet)
- Profils d'expression génique (A.Lerebours)
- Immunotoxicité (B.Gagnaire)

Individu

- Eclosion
- Développement
- Fécondité (S.Bourrachot)

Population

# Pourquoi le budget énergétique?

## ■ Pouvoir extrapoler entre niveaux d'organisation

Les réponses cellulaires sont pratiques à mesurer car les méthodes de mesure sont très rapides: e.g. dosage biochimique de certaines substances, immunofluorescence ...

Pour que ces « biomarqueurs » nous renseignent sur l'état d'un organisme et des écosystèmes il faut établir le lien entre le biomarqueur et les:

**Réponses individuelles**

**Réponses Populationnelles**

**Réponse au niveau des Ecosystèmes**

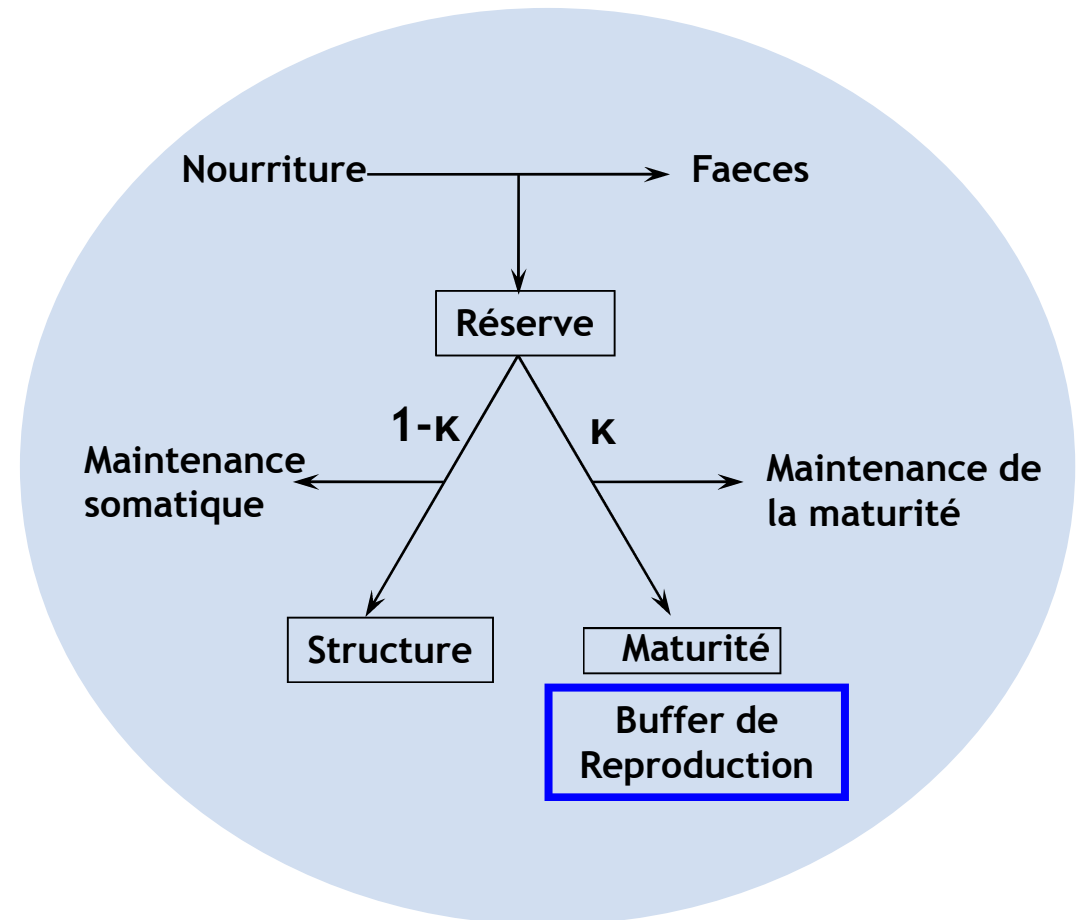
# La Théorie « DEB »

## Théorie des Bilans d'Énergie Dynamique

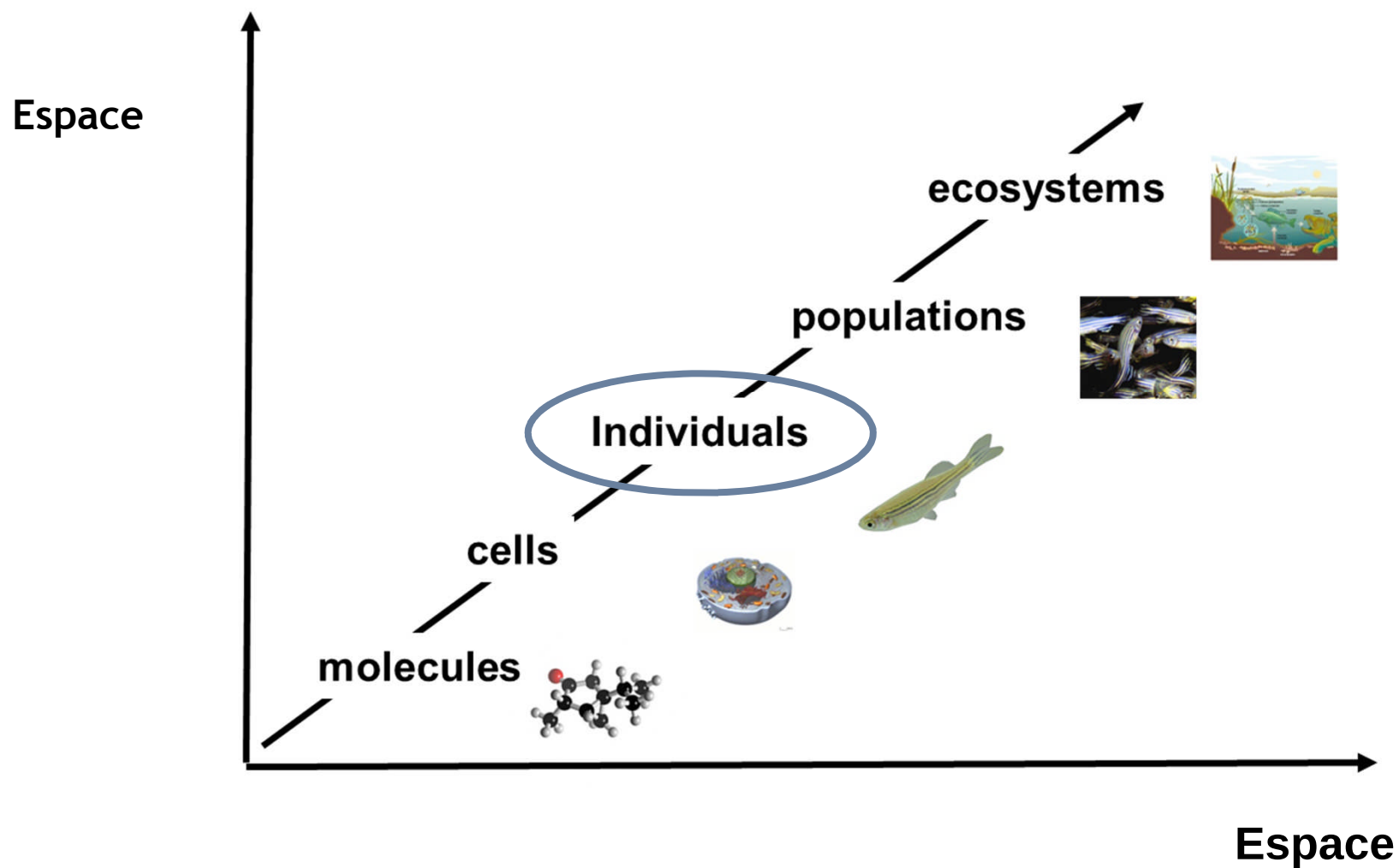
Le modèle DEB « standard » (Kooijman 2010) capture les traits d'histoire de vie de beaucoup d'organismes différents : contribution à la généralité des résultats

Mécaniste, parcimonieux en termes de paramètres

Même modèle pour l'ensemble du cycle de vie

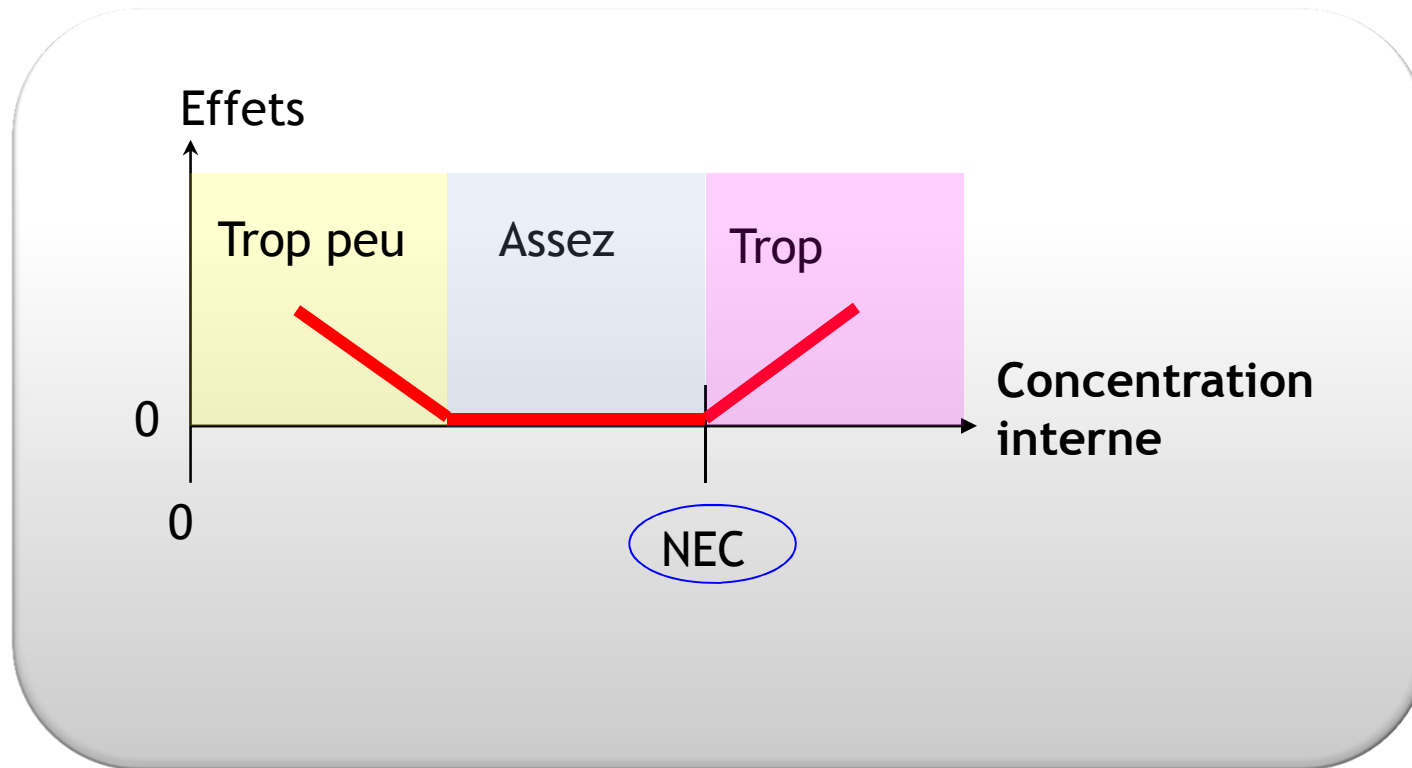


## Liens entre les différents niveaux d'organisation:





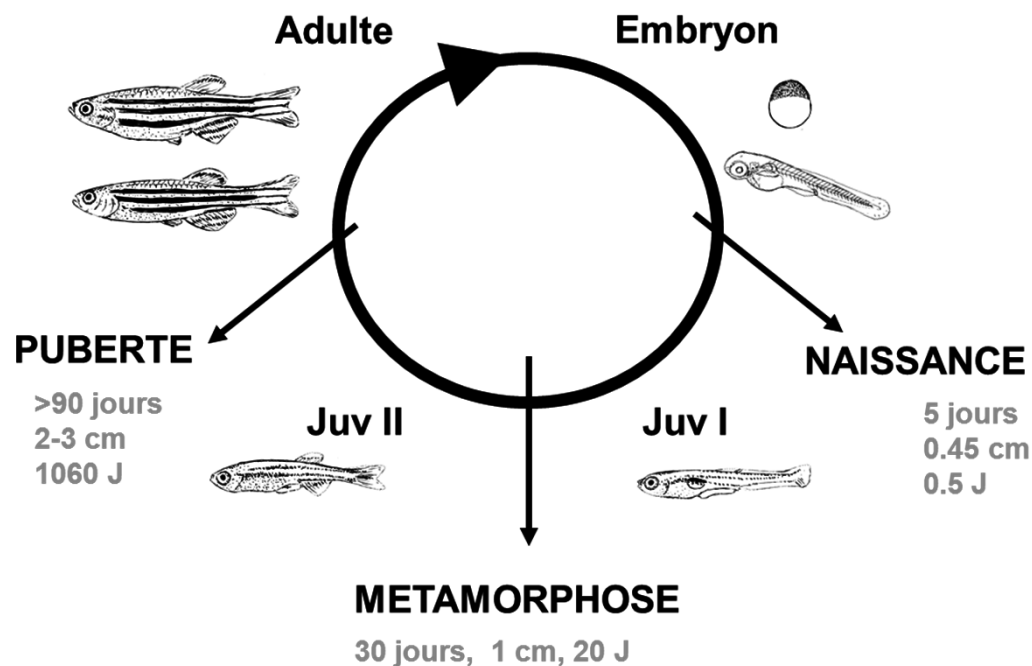
## Comment capturer les effets toxiques dans le cadre de la théorie DEB?



NEC = No effect Internal Concentration

# Organisme Modèle

## ➤ Le poisson zèbre, *Danio rerio*



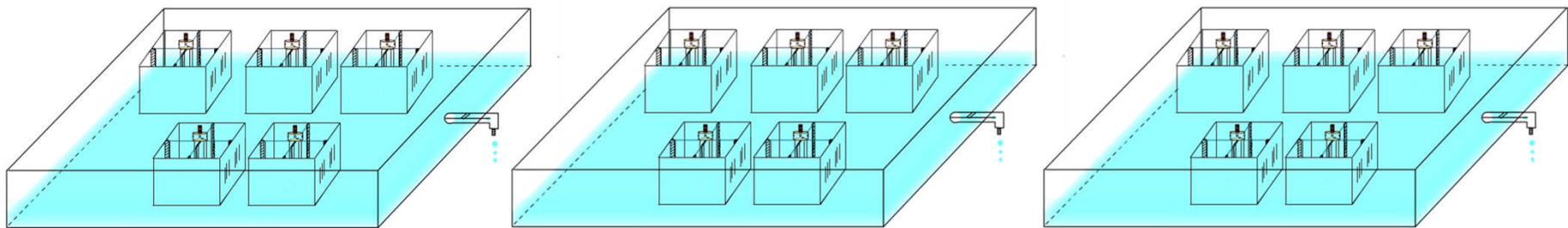
- Œufs transparents
- Taille maximale 5 cm
- Temps de génération rapide (3-4 mois)
- Génome entièrement séquencé
- Organisme OECD

# Plan de la thèse

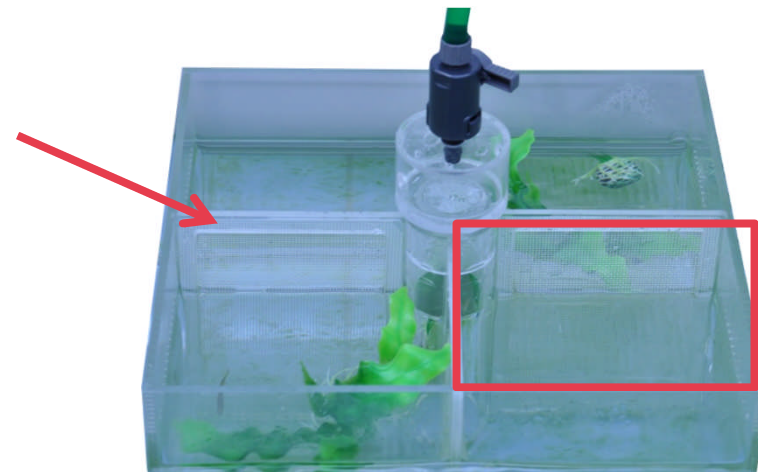
- Caractérisation du métabolisme témoin
  - Synthèse de données dans la littérature
  - Acquisition de données nouvelles
  - Paramétrisation du modèle DEB standard sur le poisson zèbre
  
- Effet de l'uranium sur l'individu
  - Synthèse de données acquises au laboratoire « LRE »
  - Acquisition de données supplémentaires
  - Paramétrisation du modèle DEB sur les données de toxicité
  
- Altération histologiques du paroi du tube digestif

# Expériences

## ➤ Le dispositif expérimental

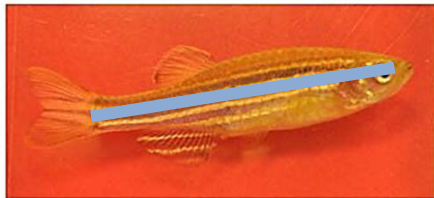


Suivi individuel  
Longueur  
Masse fraîche  
Reproduction

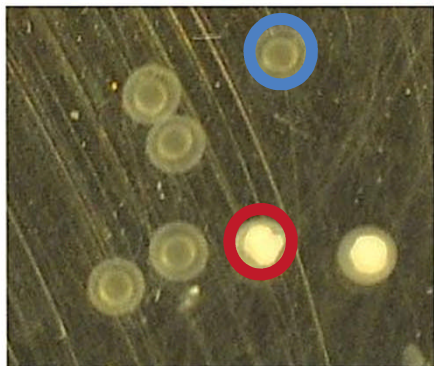


# Expériences

## ➤ Reproduction + Croissance



Longueur



œufs vivants

œufs morts

## ➤ Histologie

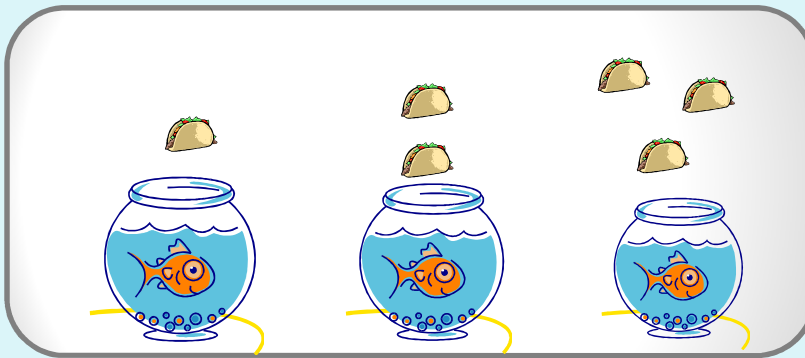
Microscopie optique

Microscopie à transmission  
électronique

Microscopie à  
épifluorescence

# Chap. 1 - 4: Caractérisation du métabolisme témoin

Croissance et Reproduction à trois niveaux de nourriture



+

Données de la littérature

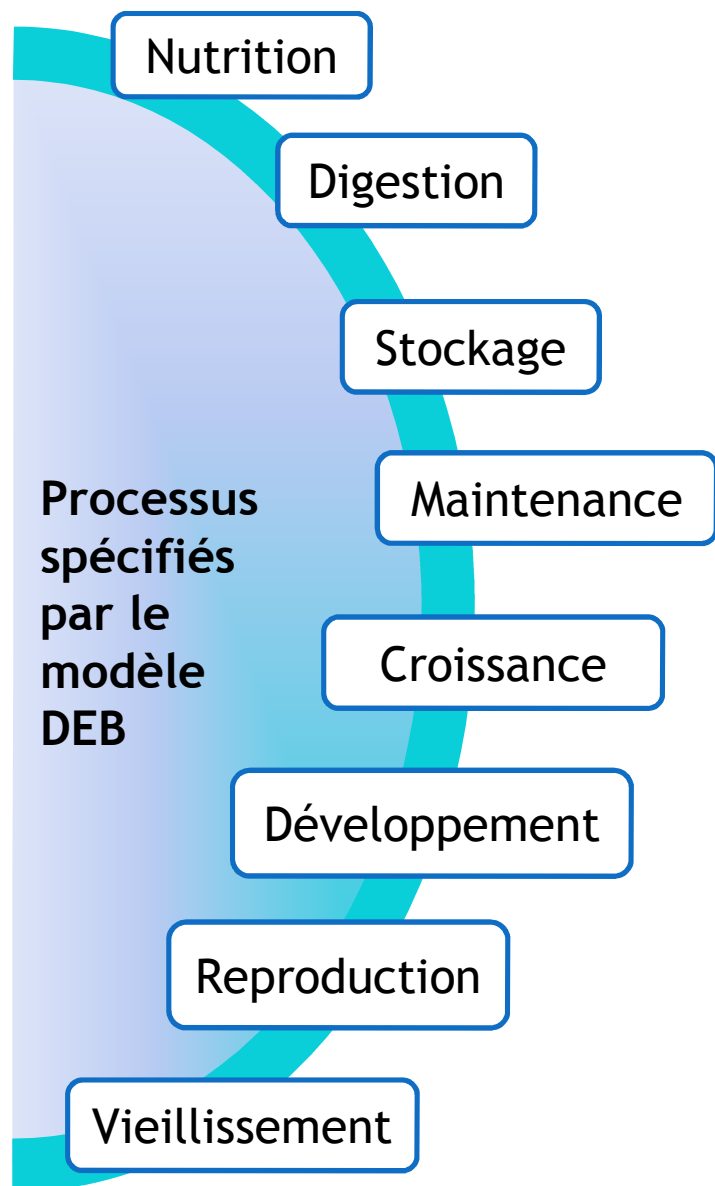


Température

Vieillessement

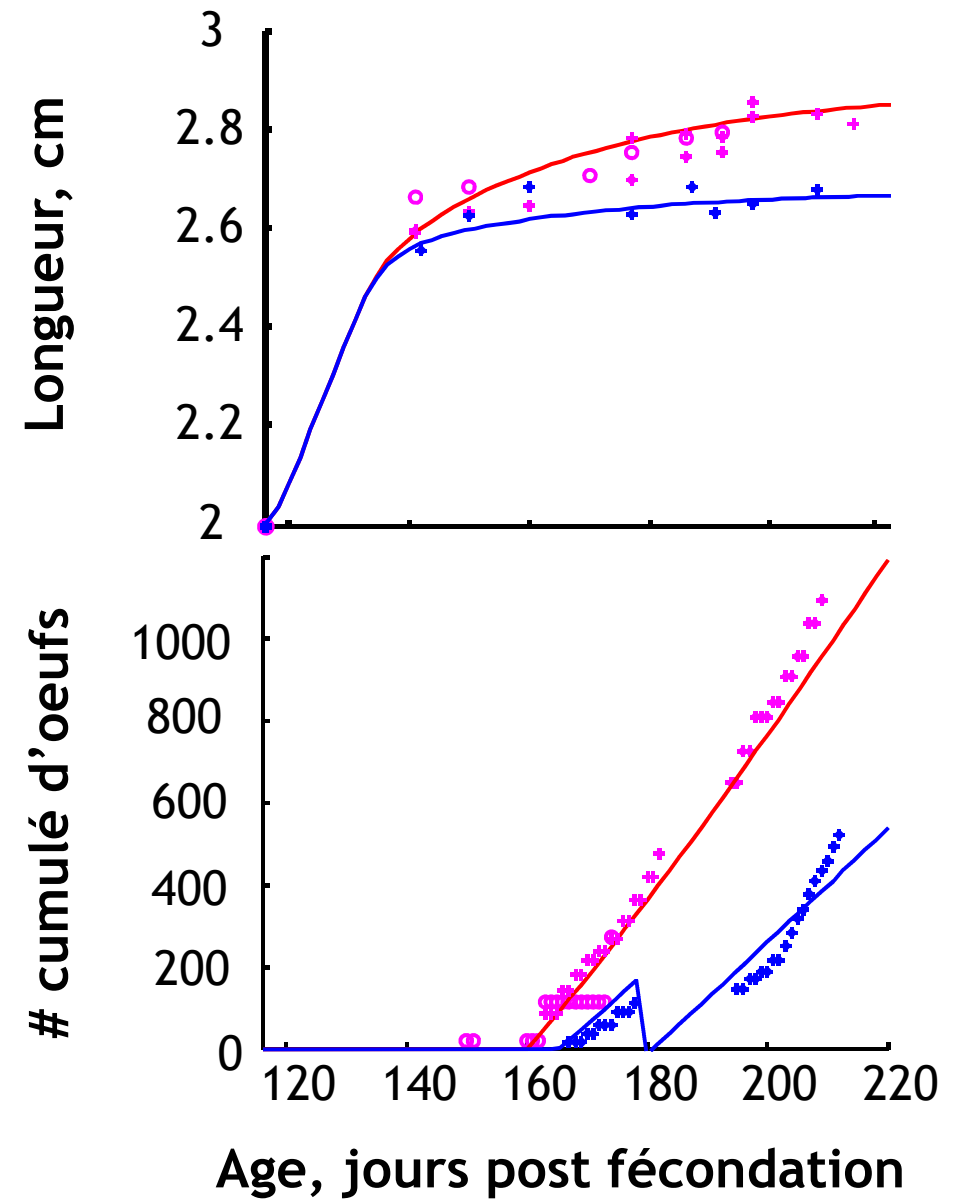
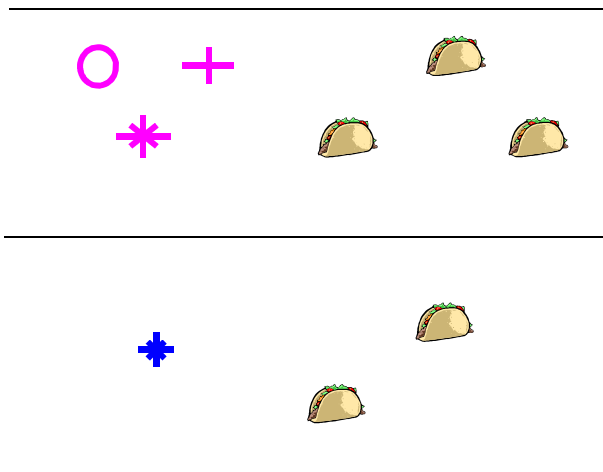
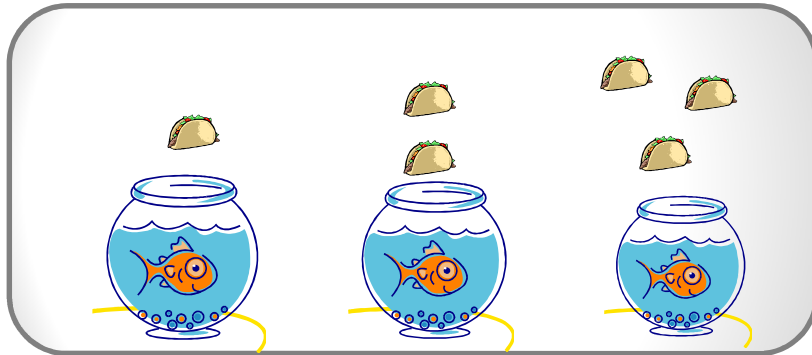
Modèle DEB  
du  
poisson  
zèbre

Jeûne

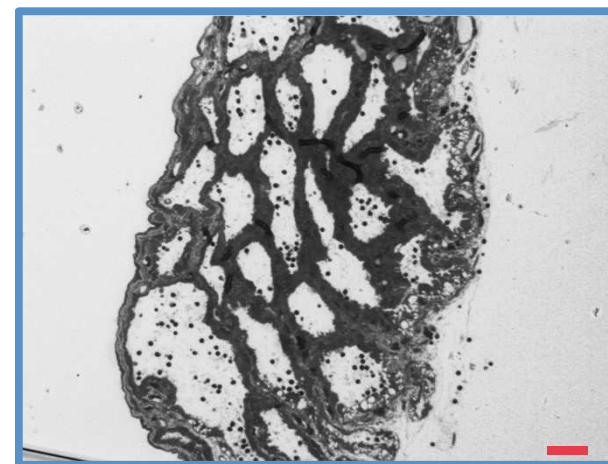
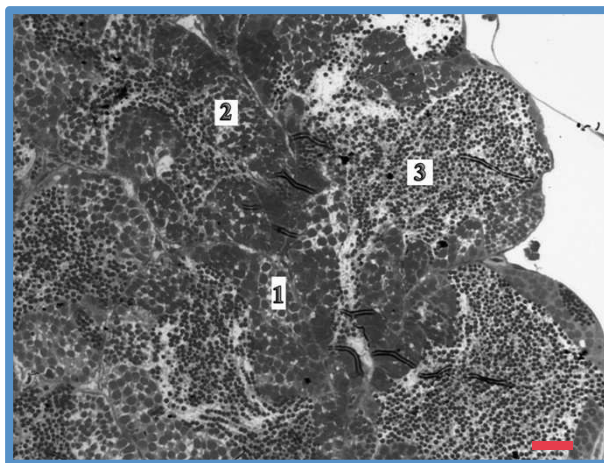
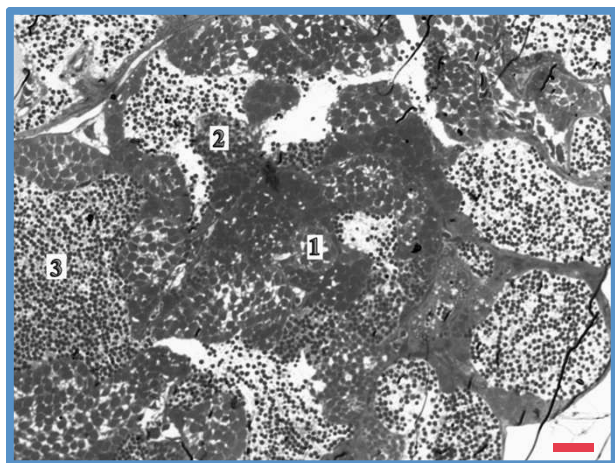
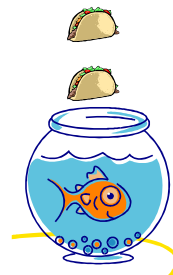


Augustine et al 2011a  
Augustine et al 2011b  
Mueller et al 2012

# Résultats:







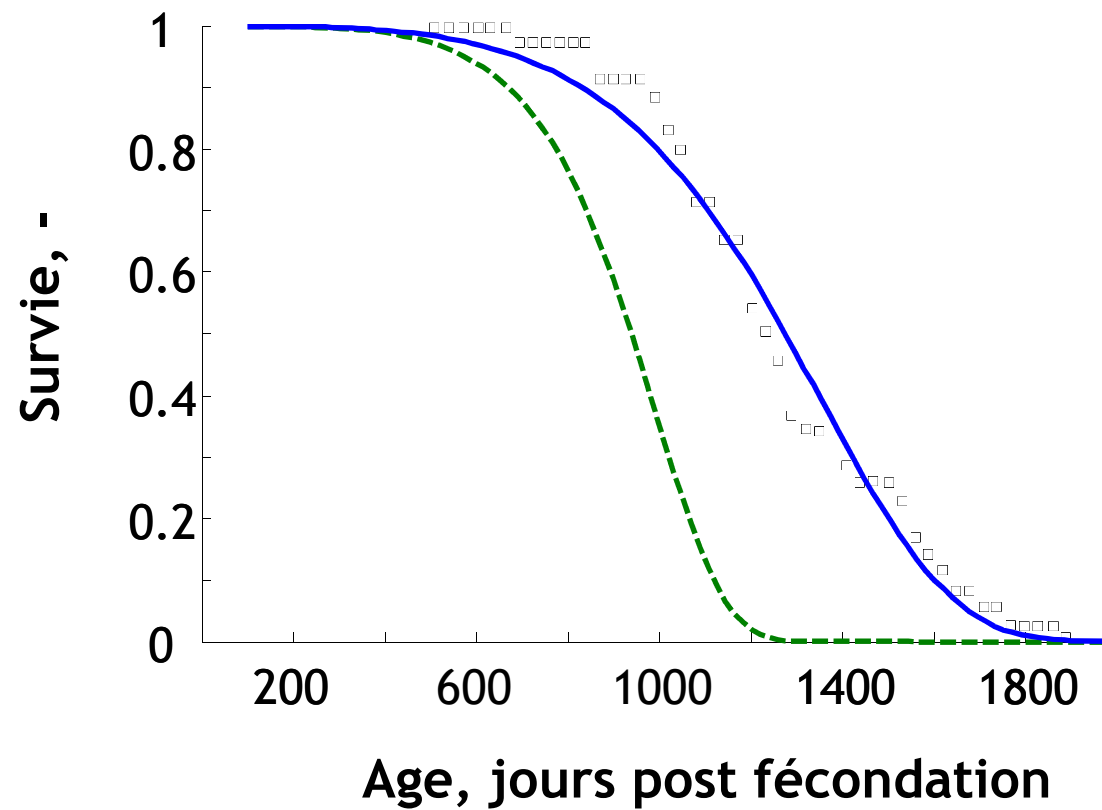
Echelle: 20  $\mu$ m

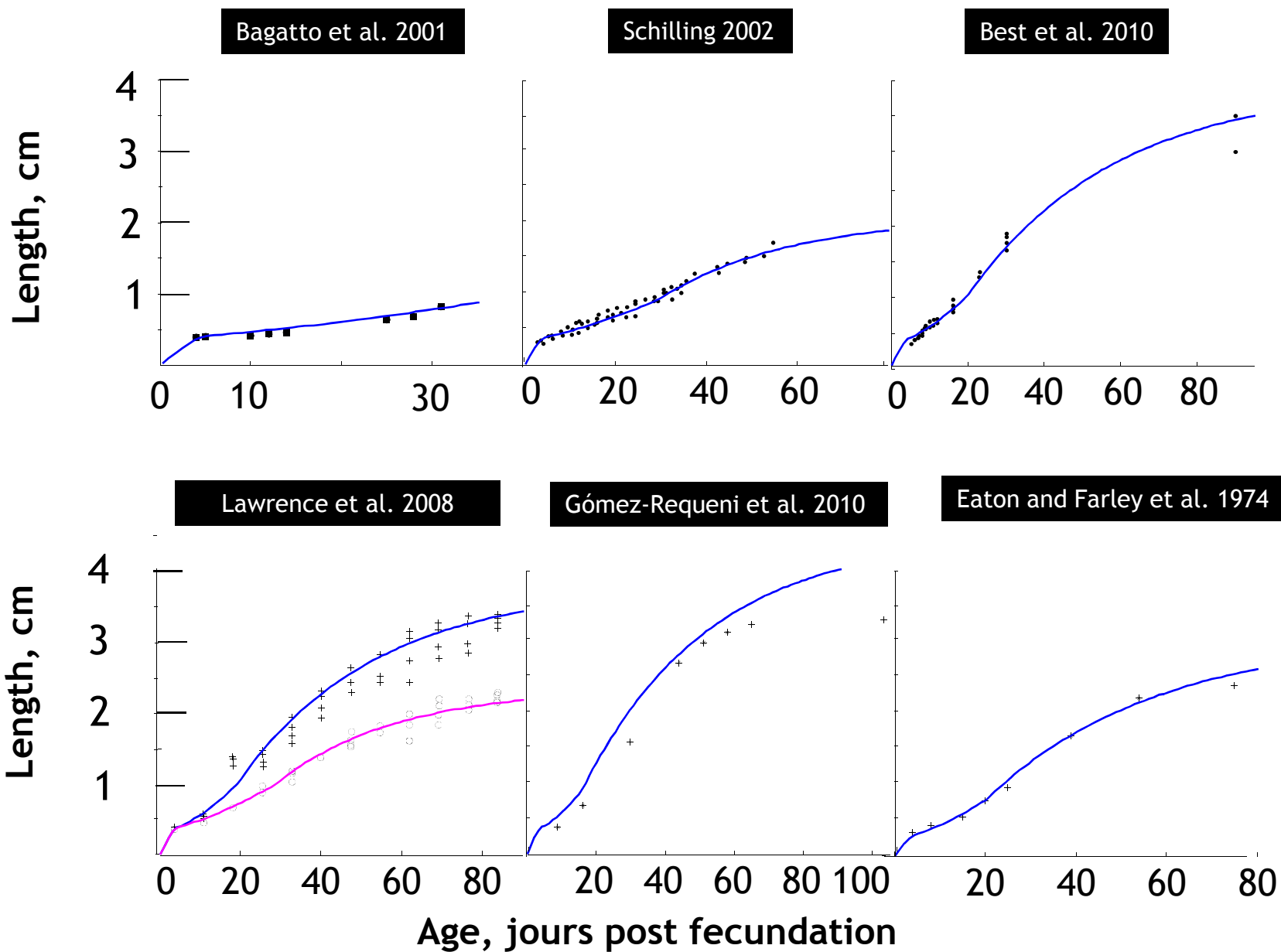
- 1- Cystes avec spermatogonies secondaires
- 2 - Cystes avec spermatorcytes
- 3 - Cystes avec spermatozoïdes

# Résultats

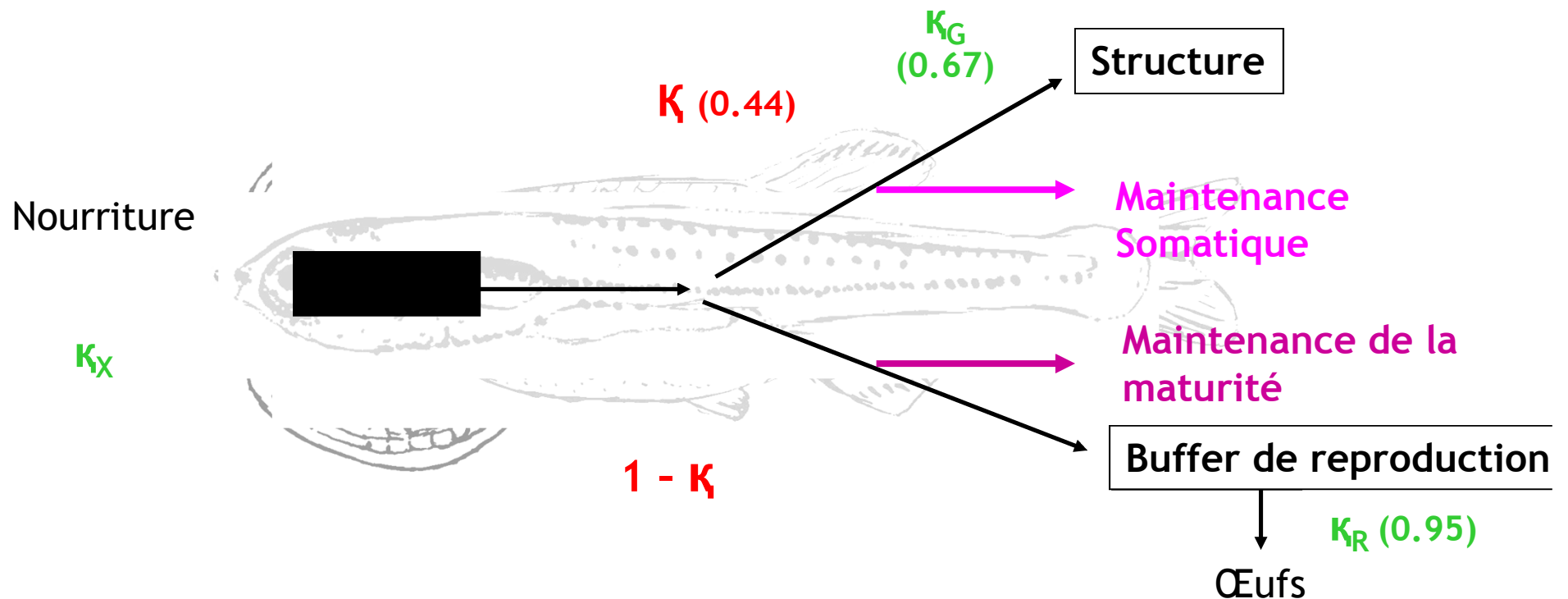
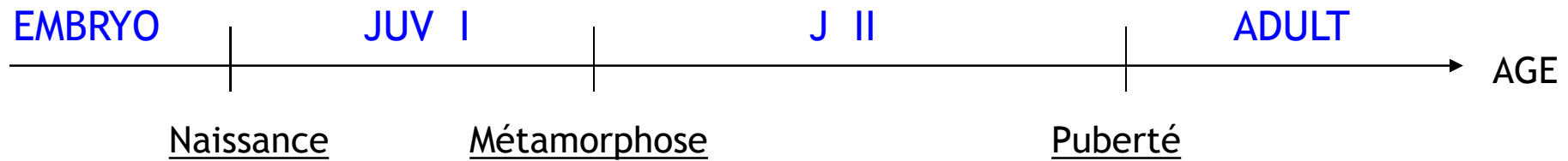
➔ vieillissement

Gerhard et al. 2002



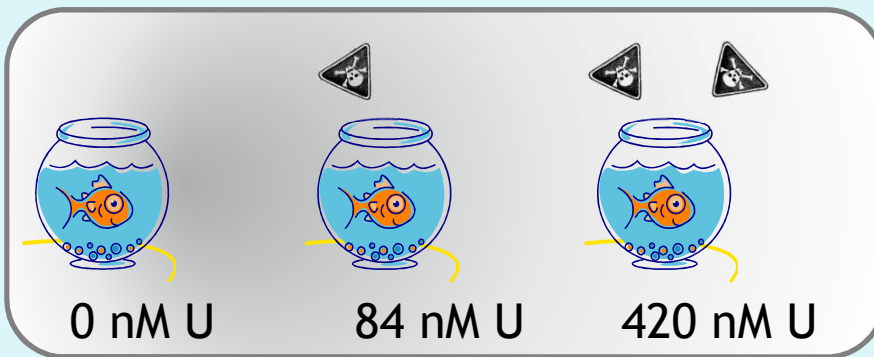


## Résultat: Modèle DEB fonctionnel appliqué au poisson zèbre



# Chap. 5: Effets de l'uranium sur le métabolisme

Croissance et Reproduction à trois niveaux d'uranium

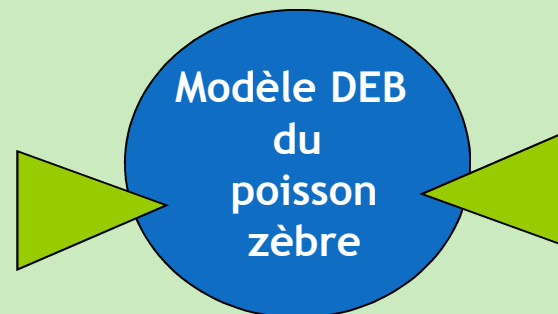


Données de la littérature

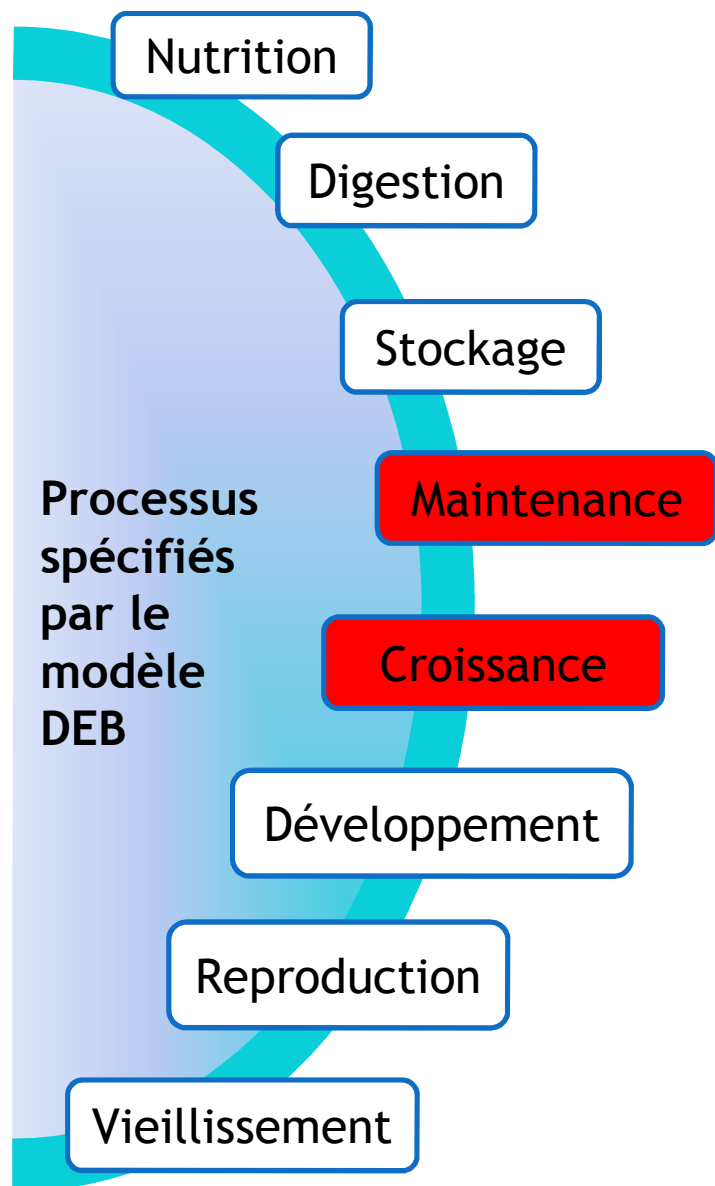


+

Lien entre effet et concentration interne



Toxico-  
cinétique



Uranium induit des effets à de très faibles concentrations environnementales

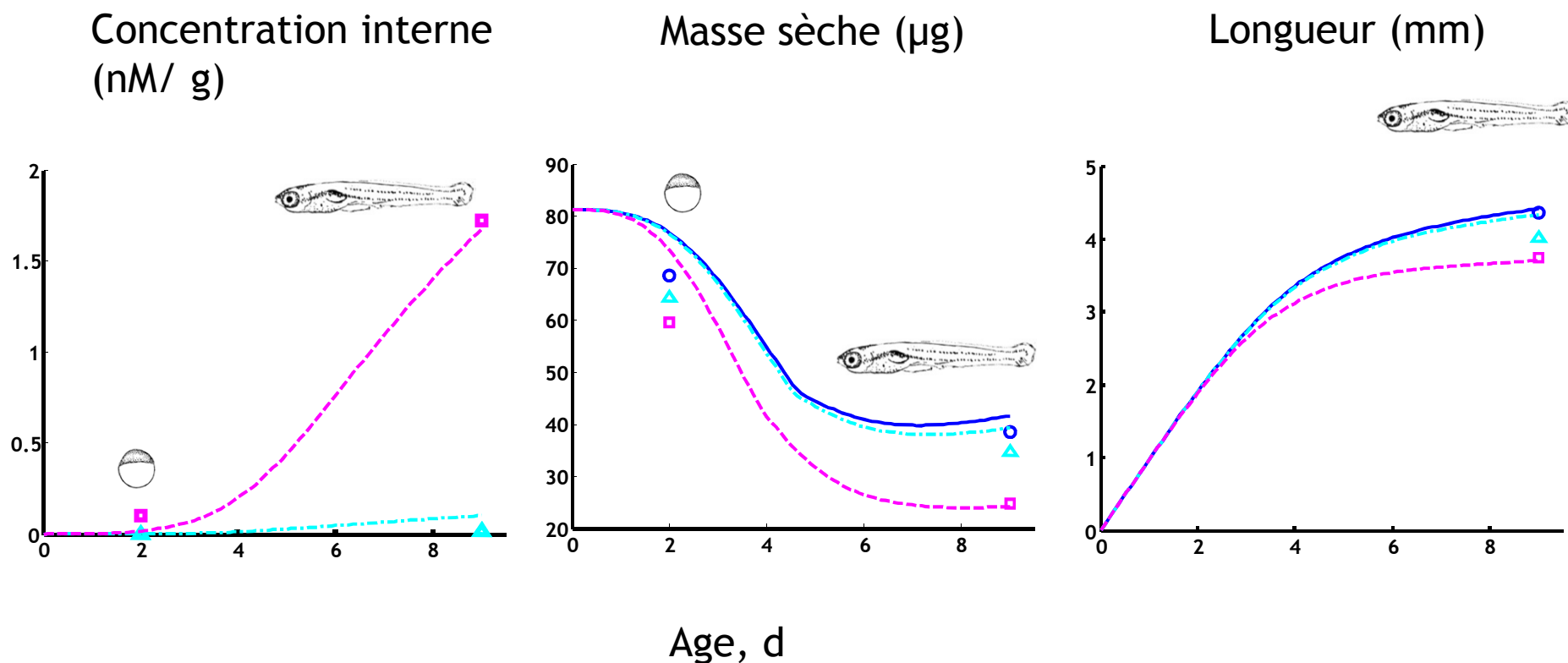
Concentration interne induisant un effet sur la croissance: 28.9 nM par cm<sup>3</sup> de structure => 1.5 nM par litre d'eau

Concentration interne induisant un effet sur la maintenance: 32 nM/ cm<sup>3</sup> de structure => 1.6 nM par litre d'eau

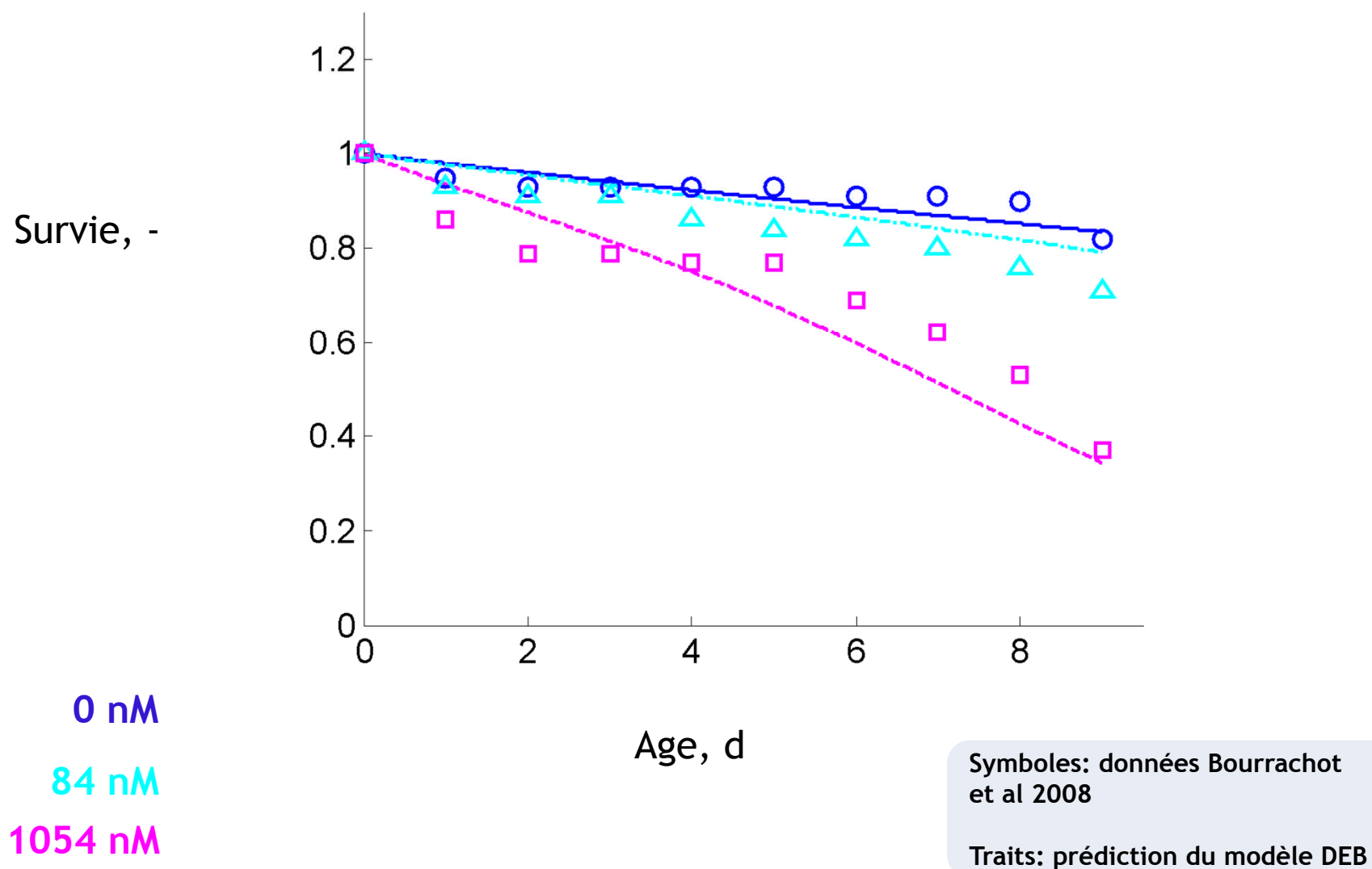
Concentration interne induisant un effet sur la survie: 0 nM/ cm<sup>3</sup> de structure => 0 nM par litre d'eau

Augustine et al 2012

## ➤ Effets sur la croissance pour les embryons et juvéniles

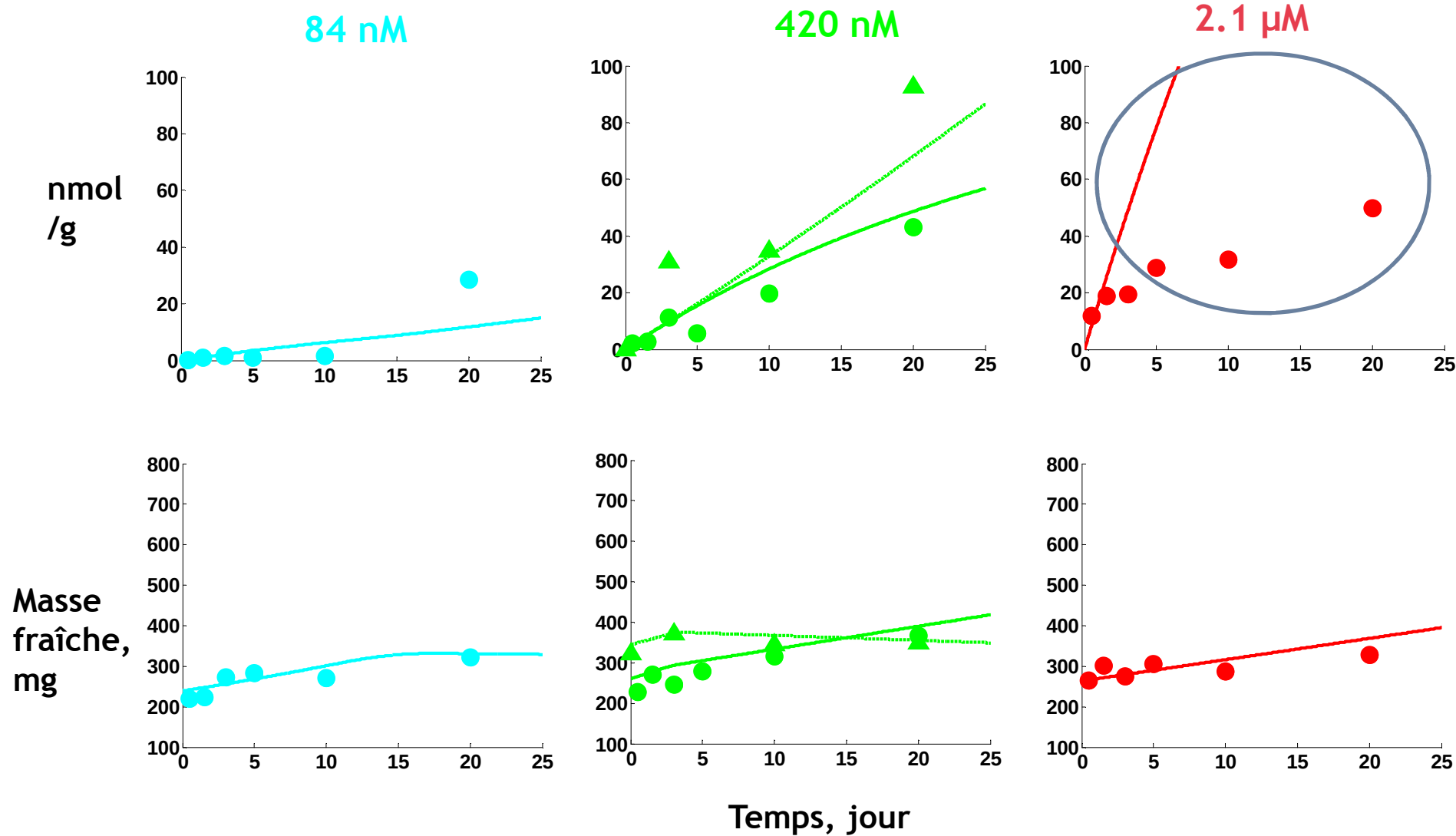


## ➤ Effets sur la survie pour les embryons et juvéniles

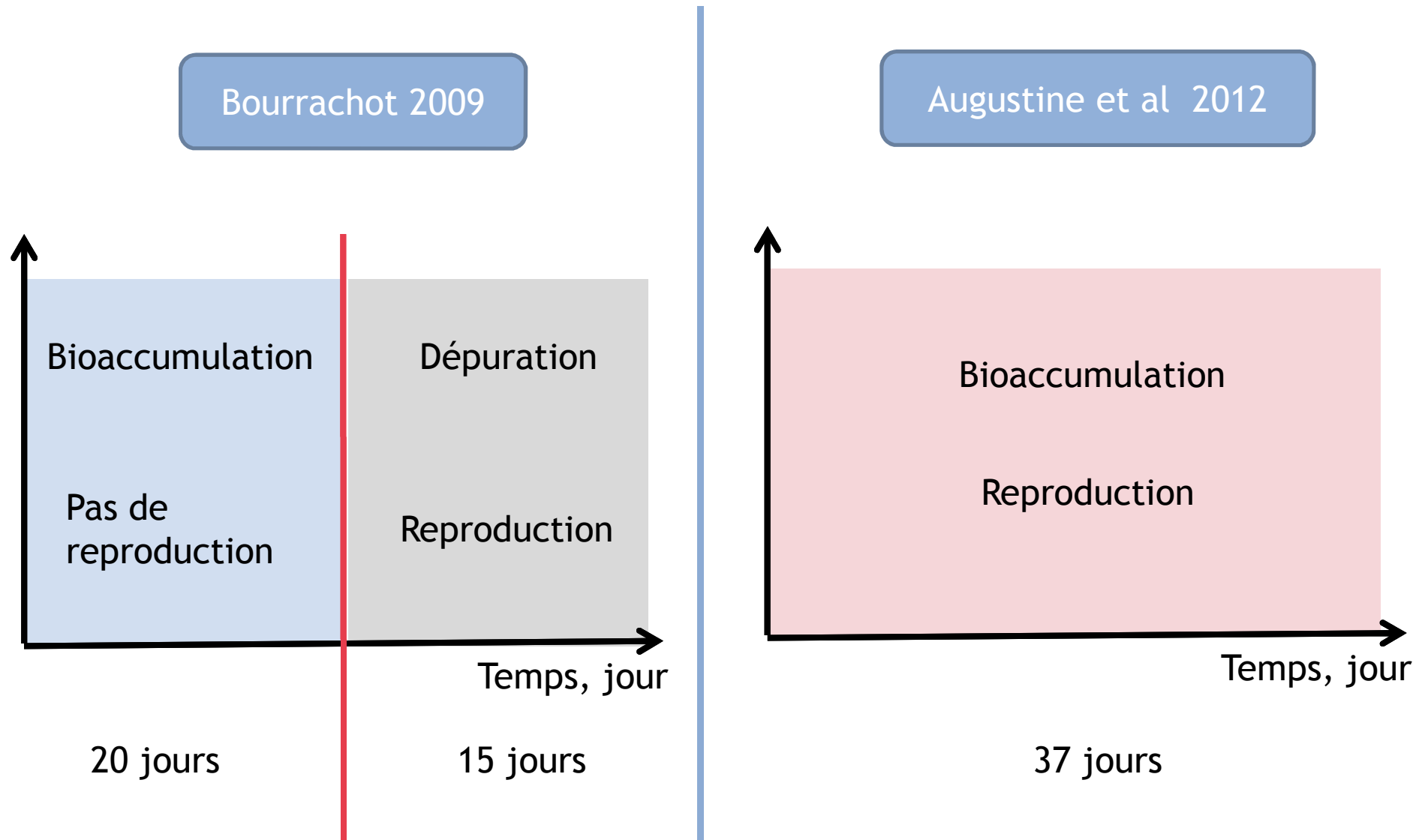




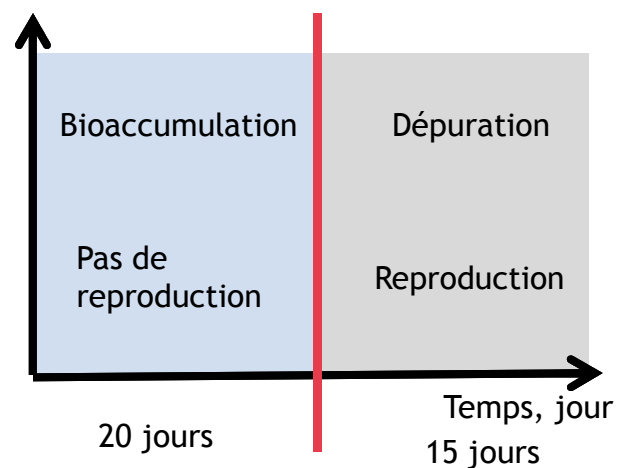
## ➤ Bioaccumulation: données de Sabrina Barillet



## ➤ Evaluer la toxicité sur la Physiologie Reproductive



# Résultats:



○ Données S. Bourrachot

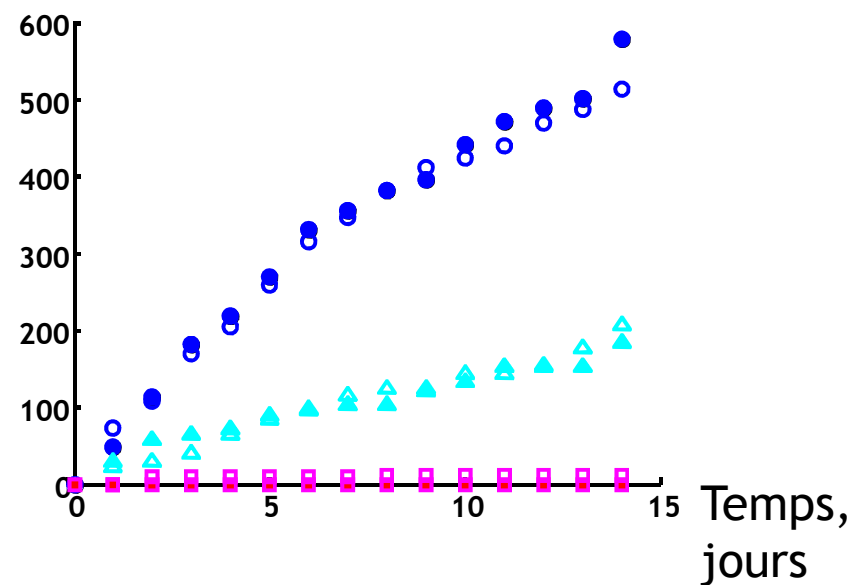
● Modèle DEB

0 nM

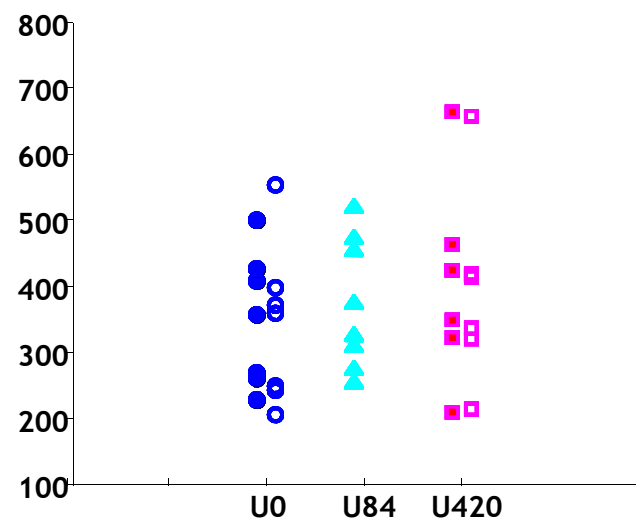
84 nM

1054 nM

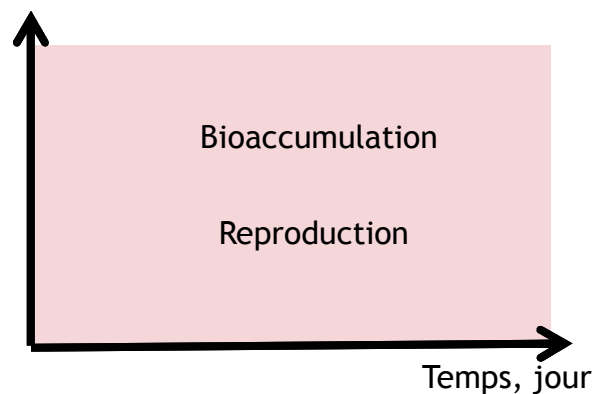
#,  
cumulé  
œufs



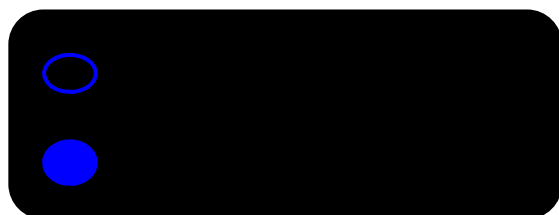
Masse  
fraîche  
finale



# Résultats:



37 jours



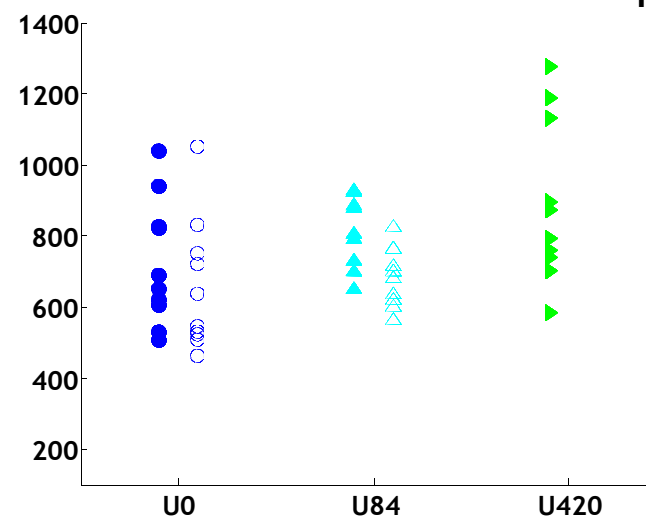
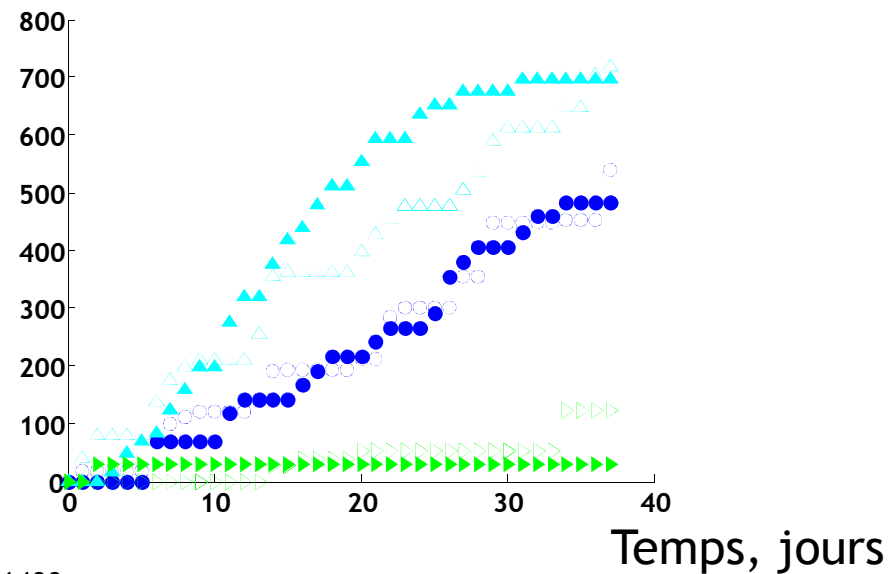
0 nM

84 nM

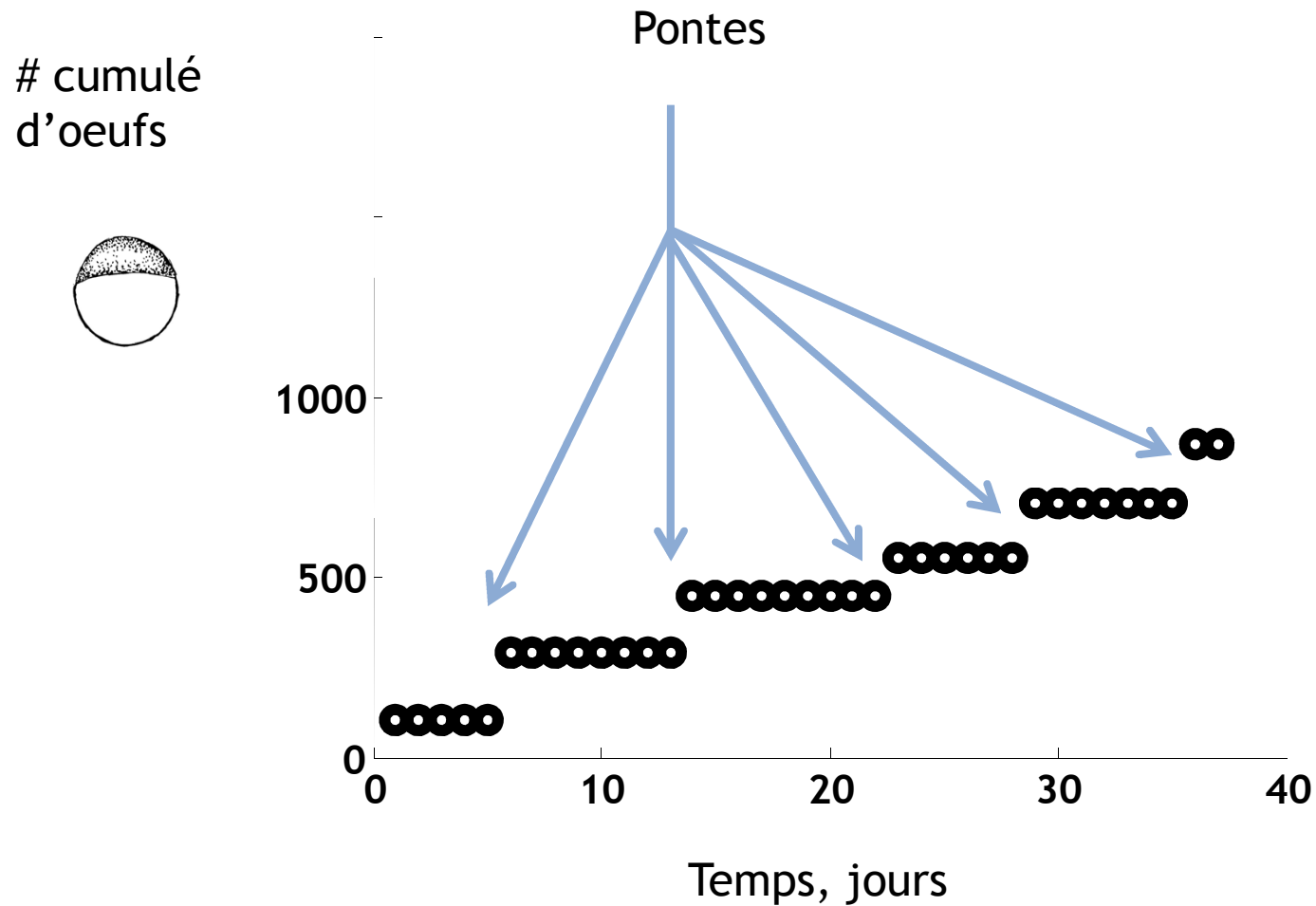
420 nM

#,  
cumulé  
œufs

Masse  
fraîche  
finale

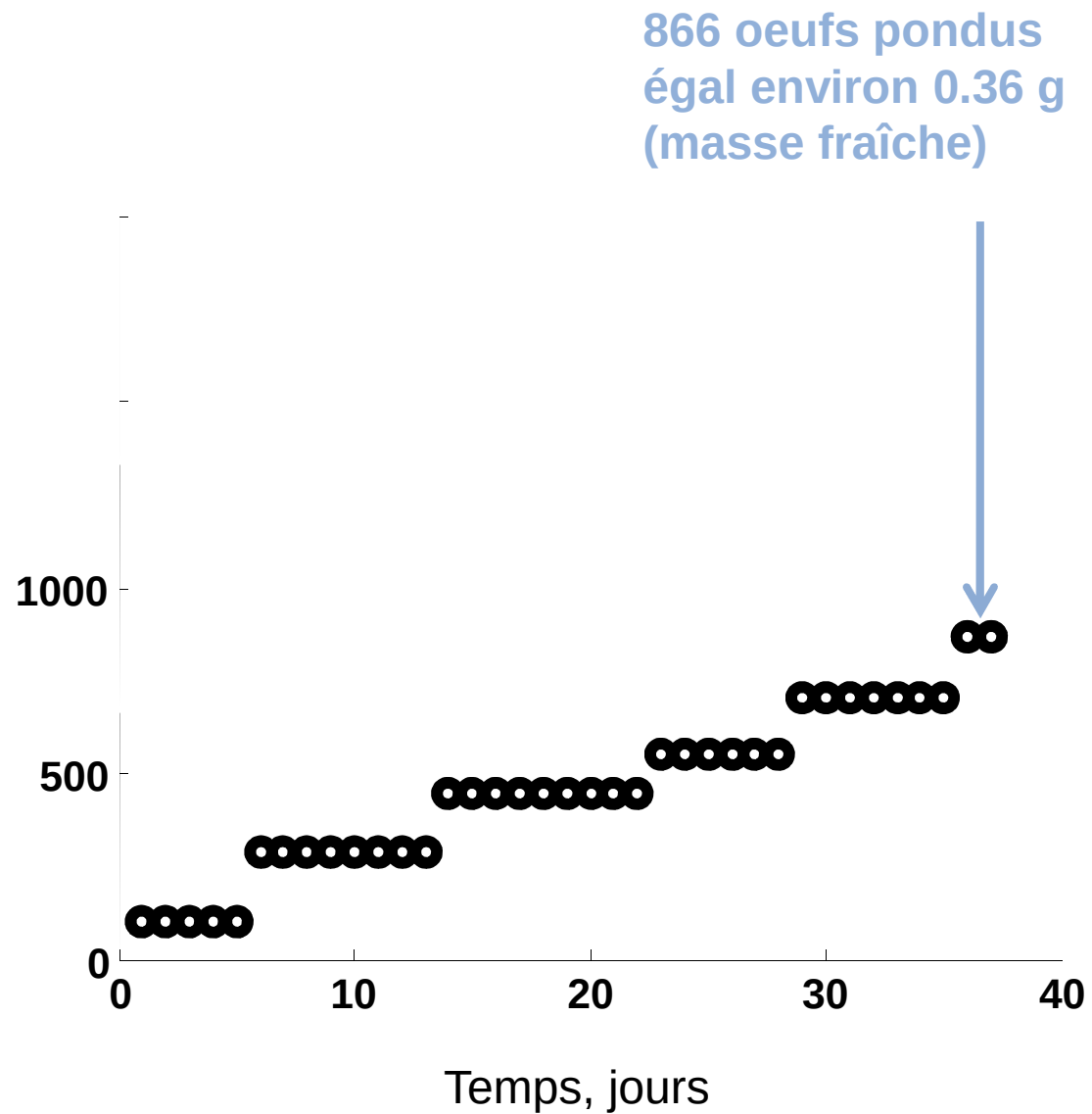


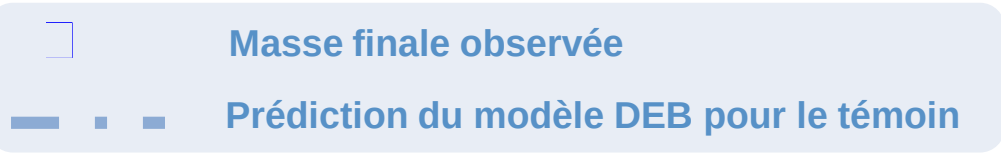
## Femelle exposée à 84 nM U pendant 37 jours



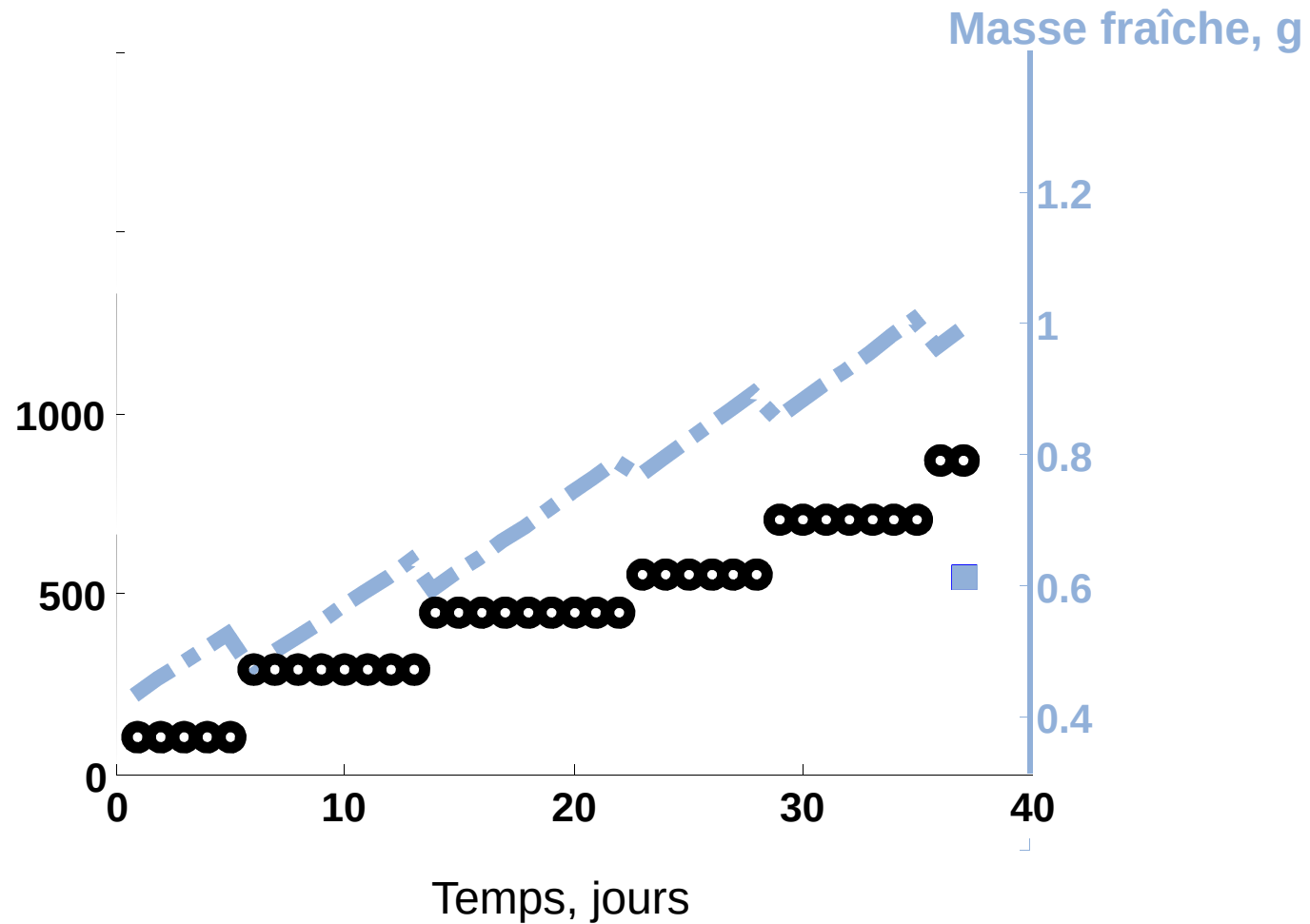
Augustine et al 2012

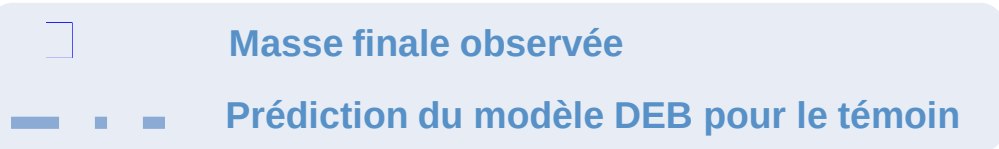
# cumulé  
d'oeufs



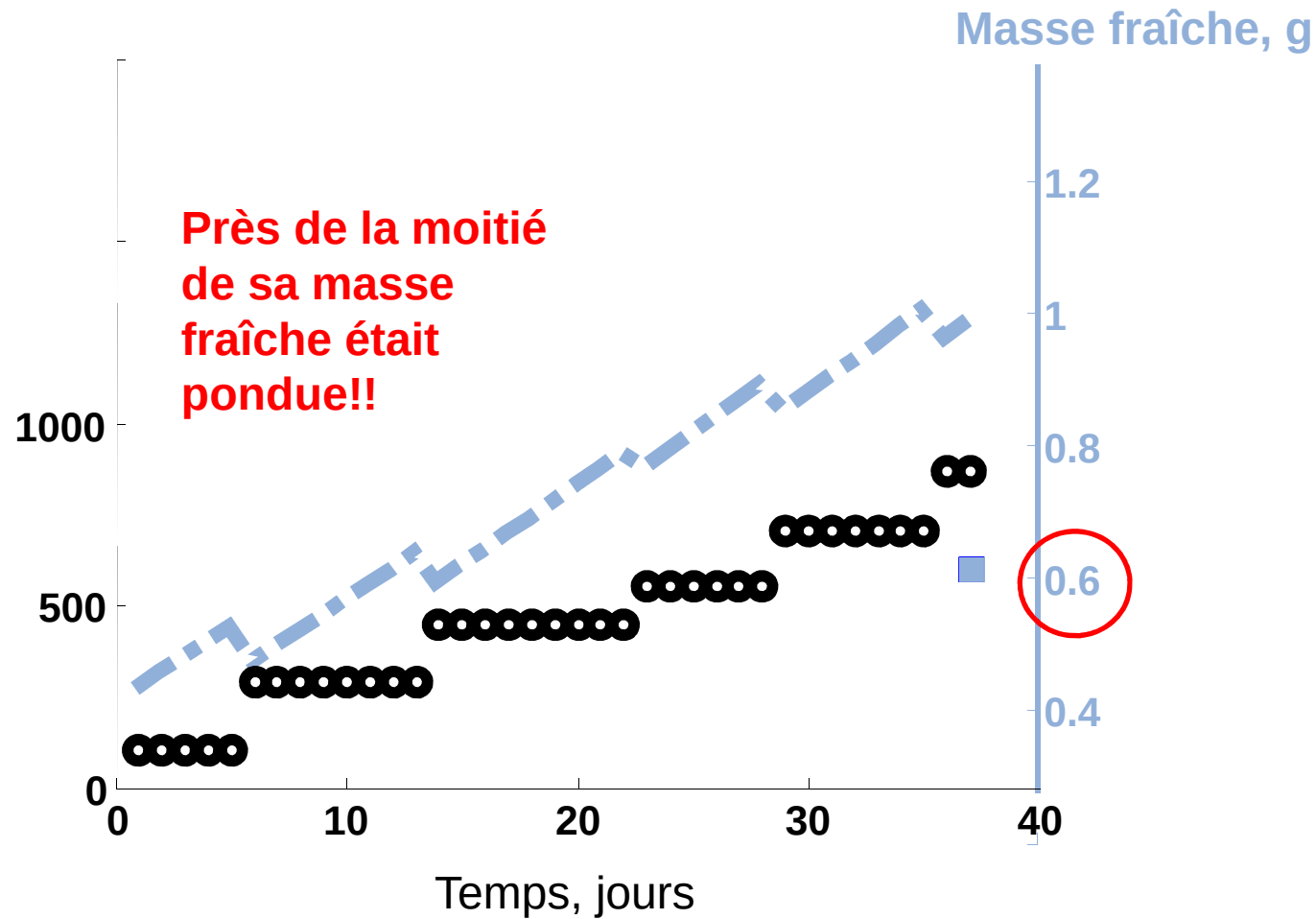


# cumulé  
d'oeufs

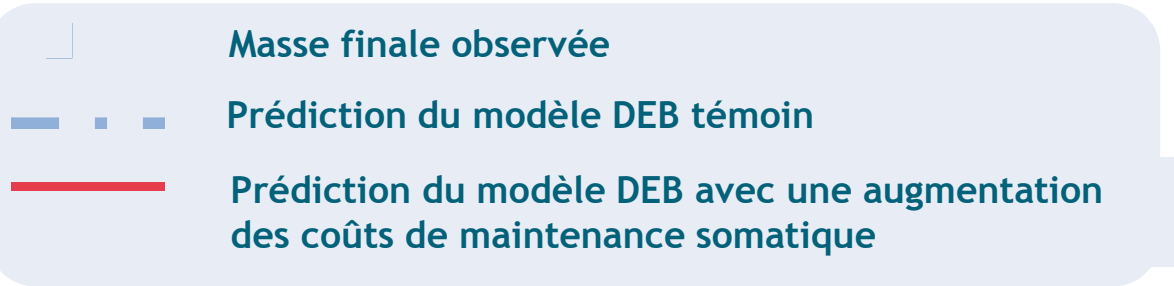




# cumulé d'oeufs

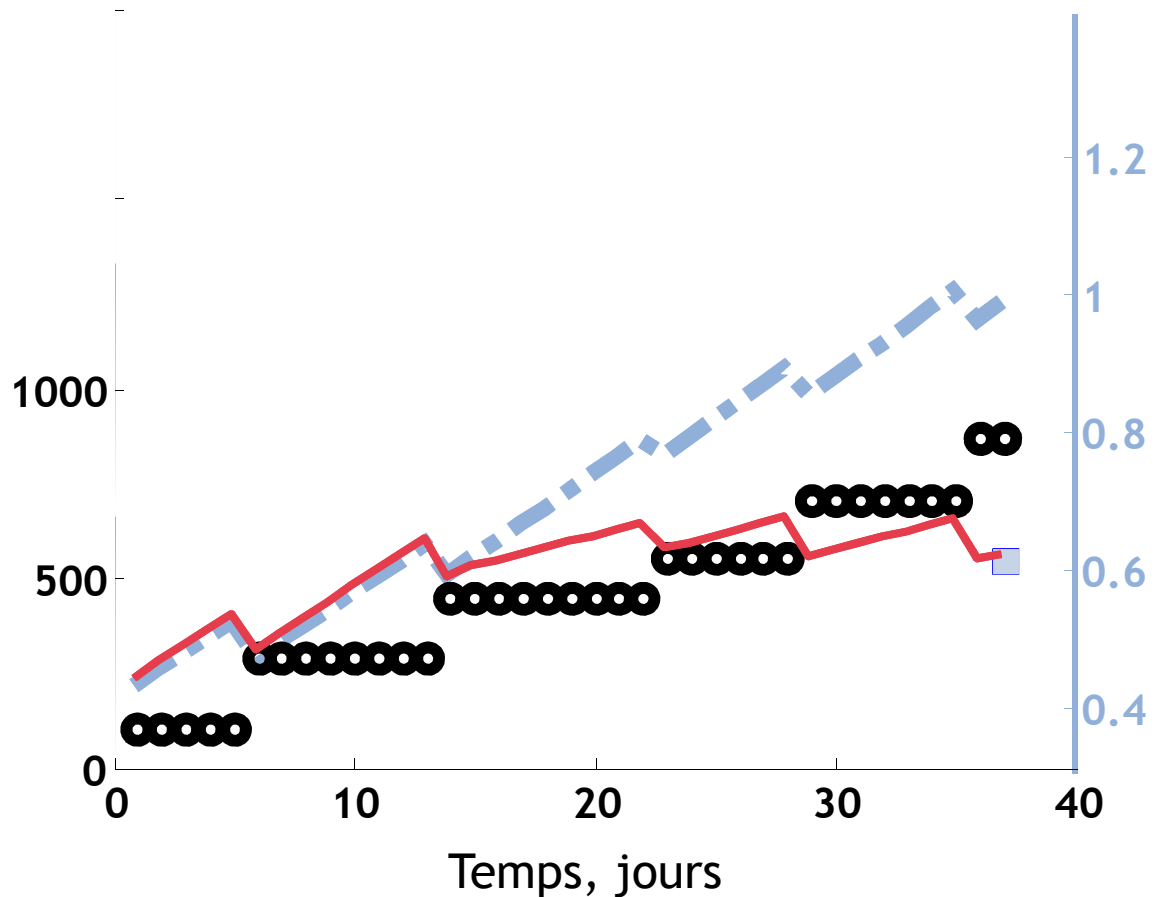






Masse fraîche, g

# cumulé d'oeufs

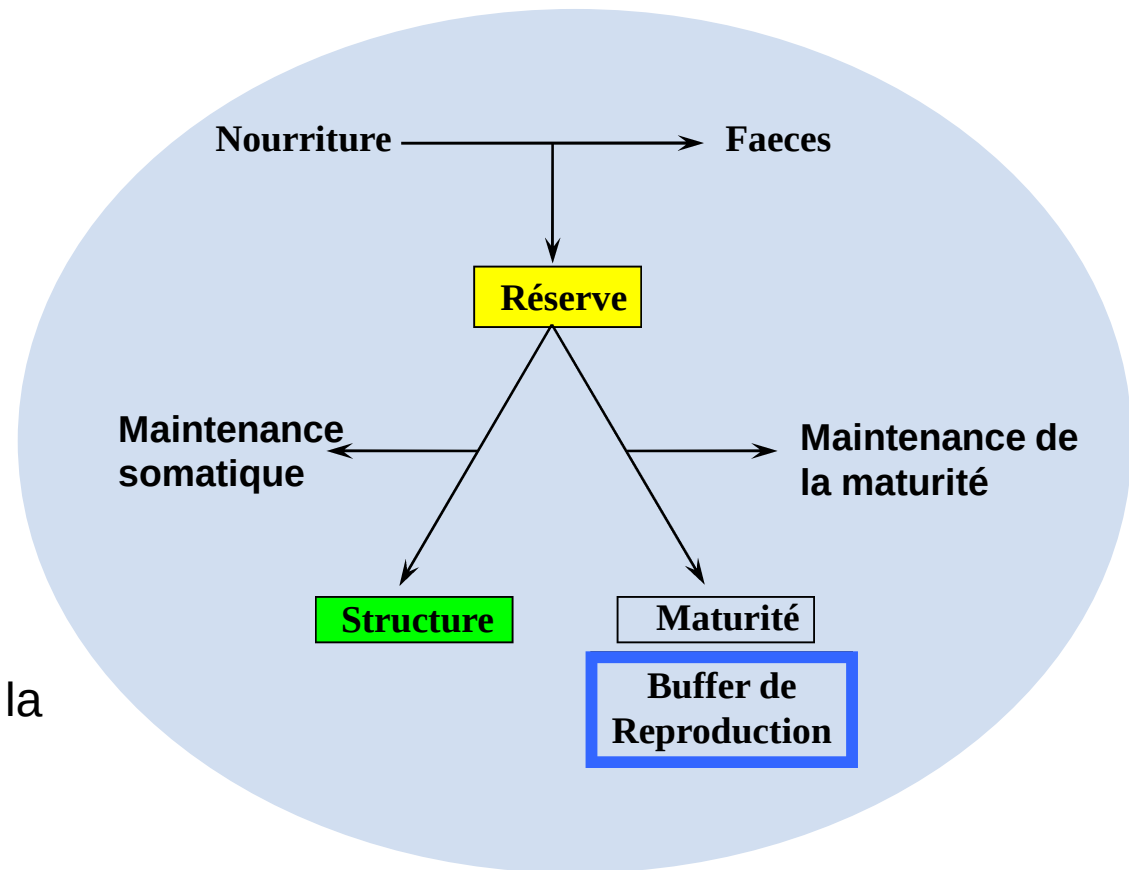


# Discussion

La maintenance prend toujours la priorité sur la croissance !

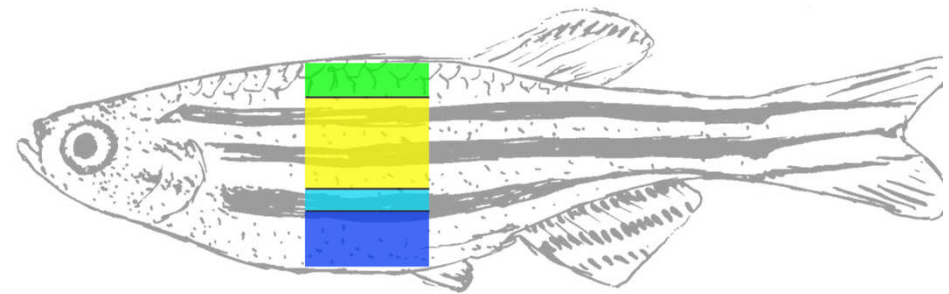
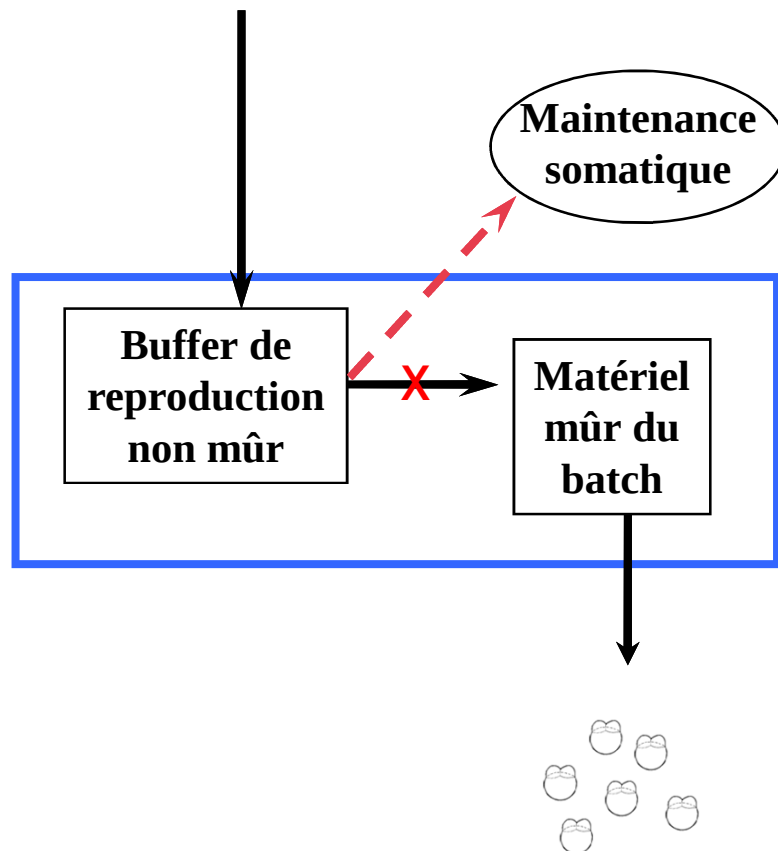
La maintenance somatique est proportionnelle à la structure

La structure est proportionnelle à la longueur observée



- + l'organisme tend vers sa taille maximale
- + il doit payer de coûts de maintenance somatique
- + le niveau d'ingestion minimal pour payer les coûts de maintenance somatique est élevé

# Discussion: « règles pour pondre »



Structure

Reserve

Matériel Batch mûr

Matériel Reproduction non mûr

# Conclusions:

Les effets sur le métabolisme apparaissent à partir de 1.5 - 1.7 nmol U par litre d'eau mais à partir de 28,9 - 32 nmol U par cm<sup>3</sup> de structure.

Le poisson zèbre = machine à pondre avec 56% de l'énergie de la réserve qui est mobilisée vers la branche reproduction et maintenance de la maturité

Le matériel investi dans la reproduction peut-être résorbé pour « payer » les coûts de maintenance somatique

Préparation des « batch » cesse lorsque l'énergie est prise pour payer les coûts de maintenance somatique

# Conclusions:

De grands progrès dans la réalisation d'analyses de données de reproduction qui sont très variables

Possible de distinguer entre:

Energie/ masse cumulée  
investie dans la  
reproduction sur une  
période donnée



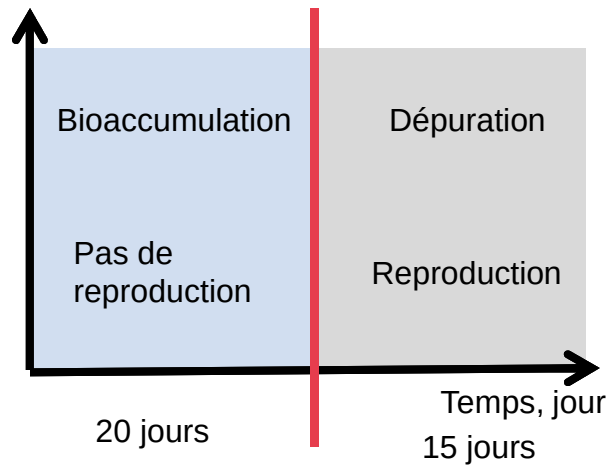
Perturbation du métabolisme

Energie/ masse cumulée  
pondue

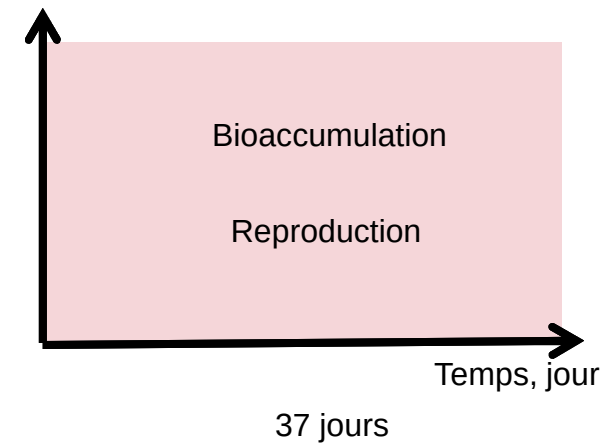


- Ovulation « initiation de la préparation des batch »
- Comportement de ponte

Bourrachot 2009



Augustine et al 2012



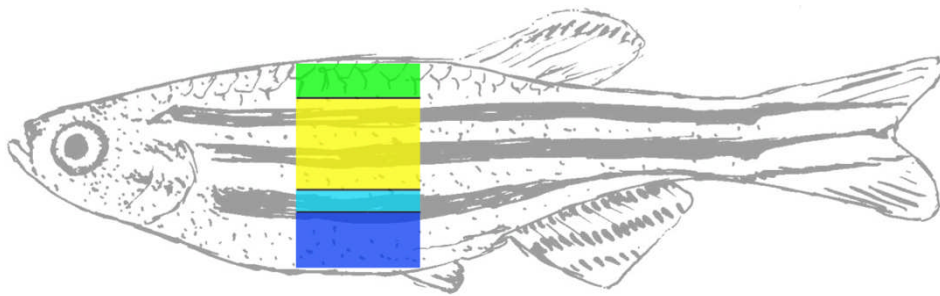
Deux classes de longueurs différentes !!

Le niveau d'ingestion minimal pour payer le coûts de maintenance somatique est inférieur pour Bourrachot 2009

**A l'avenir: c'est mieux de travailler avec des poissons plus petits**

# Discussion

## ➤ Problème des conditions initiales



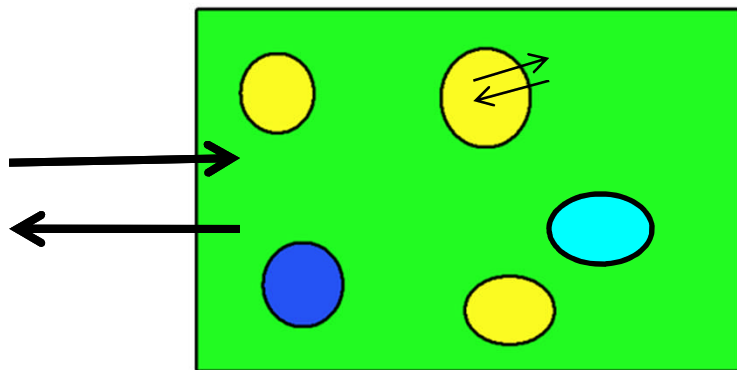
Les proportions relatives de batch mûr et matériel de reproduction non mûr varie entre chaque individu au début de l'expérience

Les conditions initiales conditionnent les effets

L'absence de la valeur initiale de la masse fraîche pour chaque femelle dans les expériences confère l'incertitude sur les conditions initiales

# Discussion

## ➤ Toxico-cinétique



Modèle toxico-cinétique à 1 compartiment avec des coefficients qui varient dans le temps

Accumulation et élimination au travers de la structure

Partitionnement instantané entre la réserve et la structure

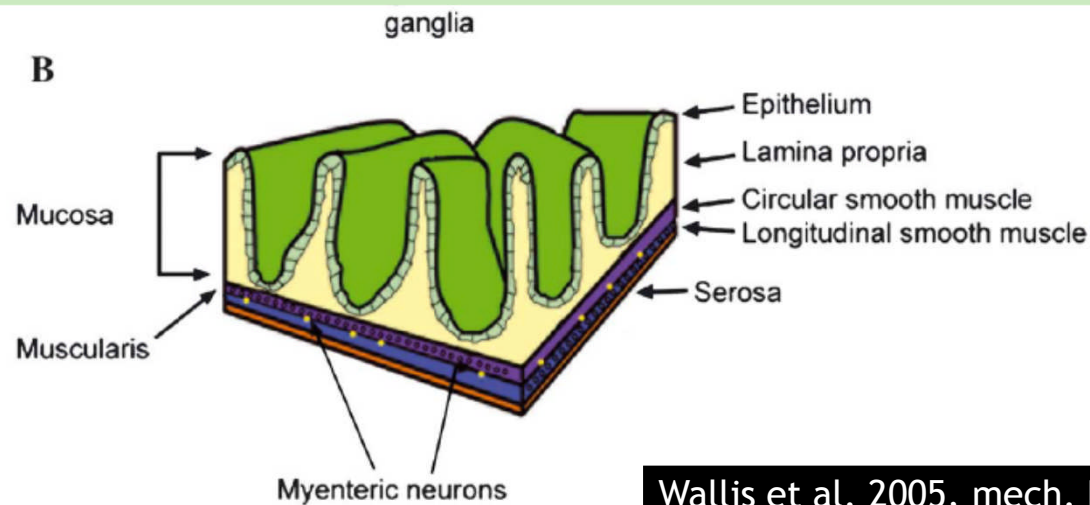
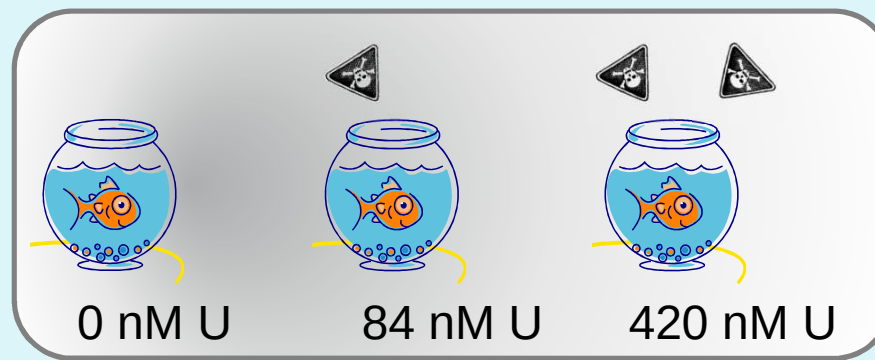
Élimination par la reproduction lors des pontes

Le modèle explique une partie des données de bioaccumulation, mais pas toutes

Je n'ai pas trouvé les mêmes paramètres toxico-cinétique pour le cycle de vie entier

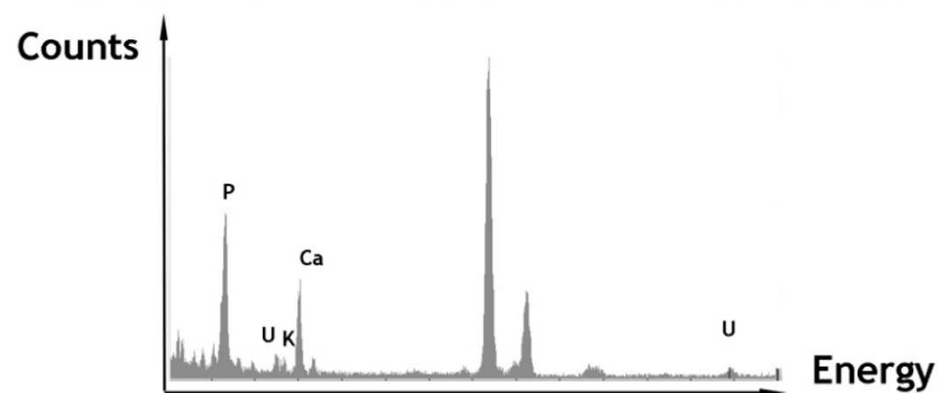
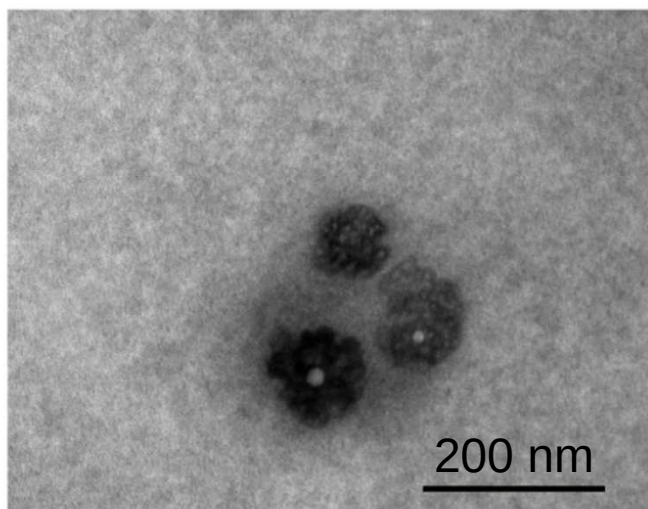
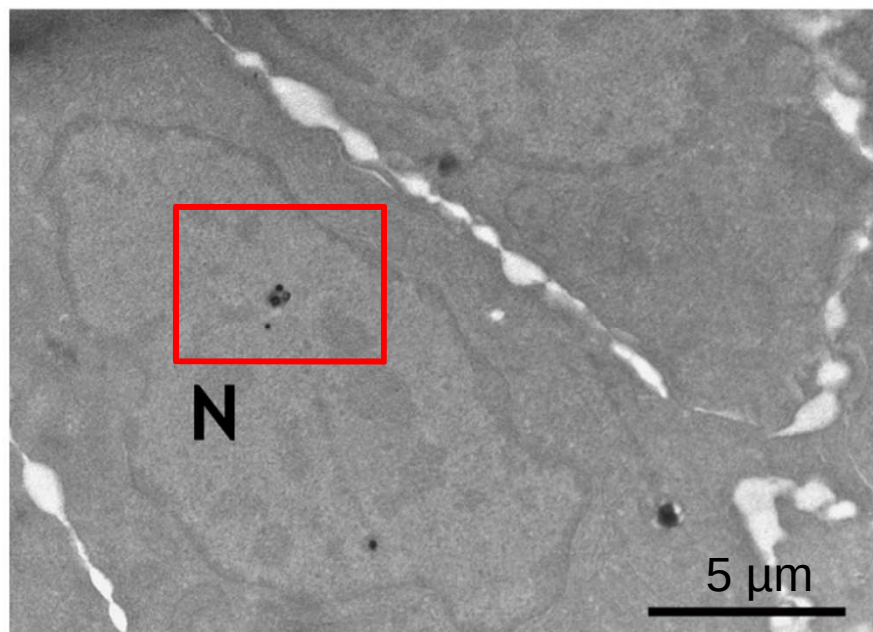
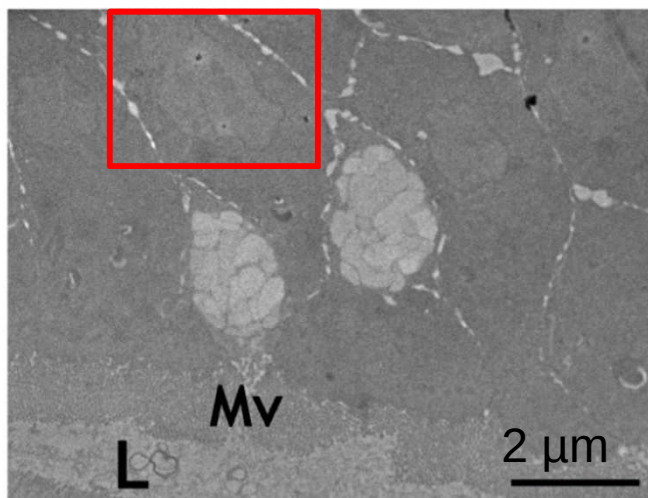


## Chap. 6: Altération du tube digestif:



Wallis et al. 2005, mech. Dev.

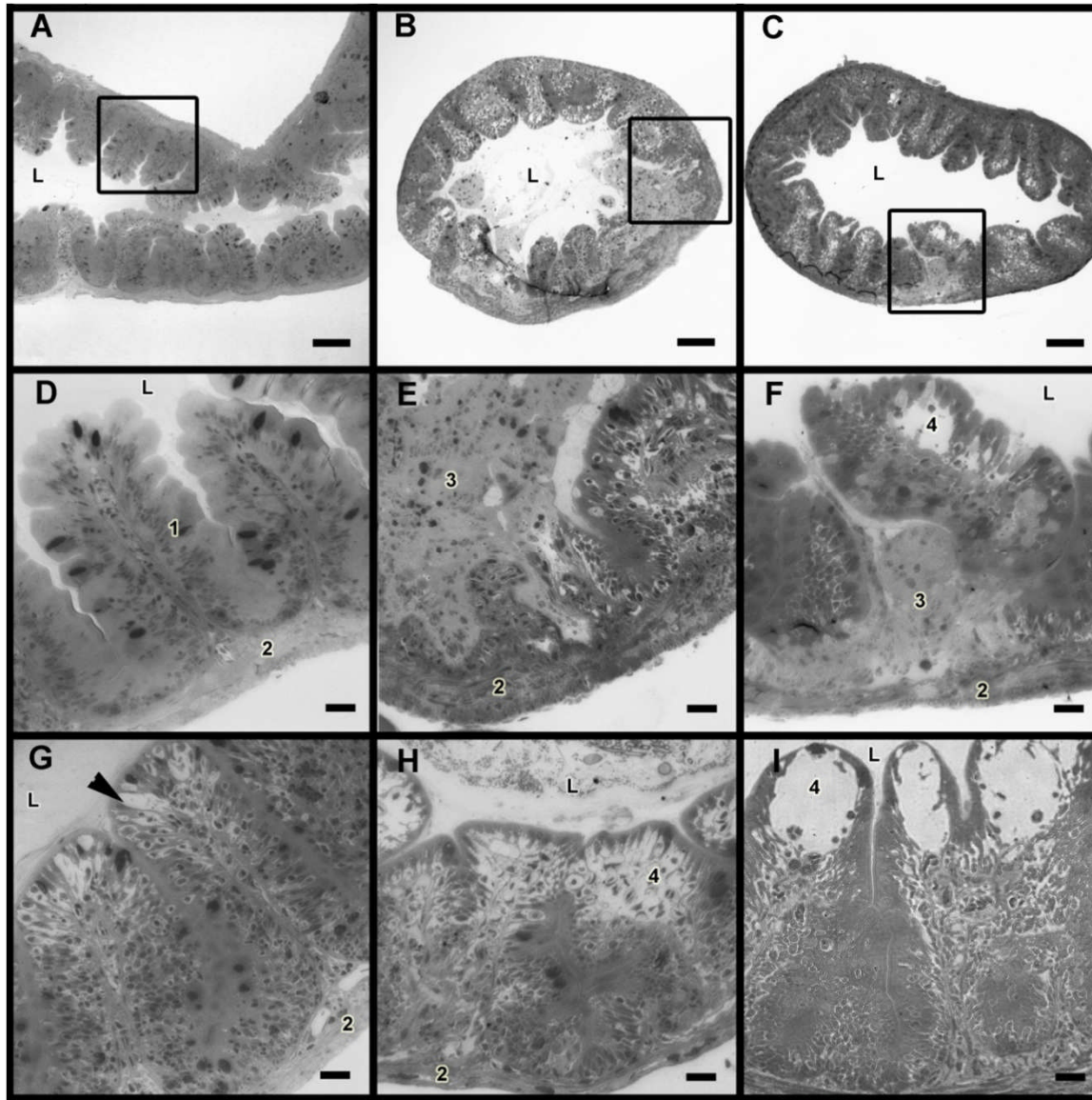
# Internalisation de l'uranium



0 nM

84 nM

420 nM

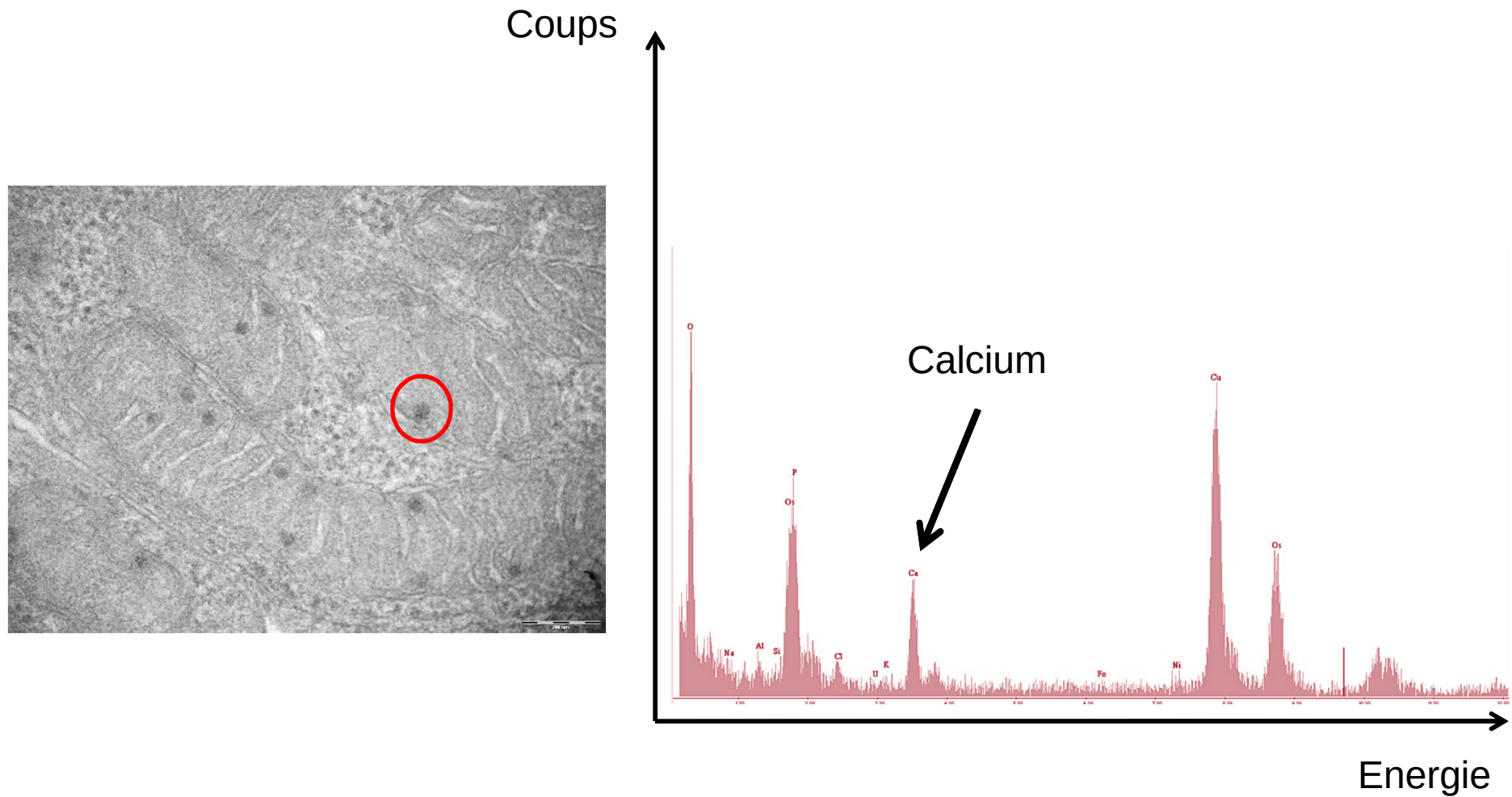


Barre d'échelle: 200  $\mu$ m

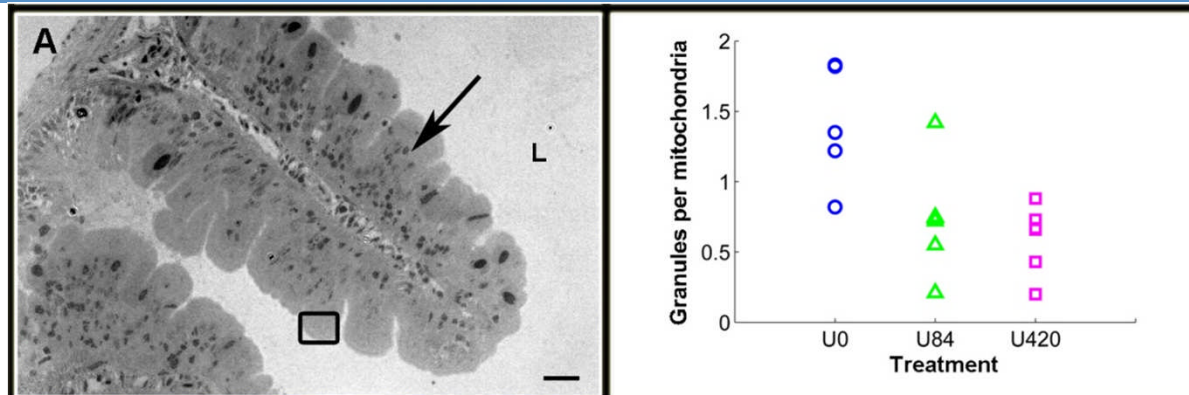
Barre d'échelle: 20  $\mu$ m

Barre d'échelle: 20  $\mu$ m

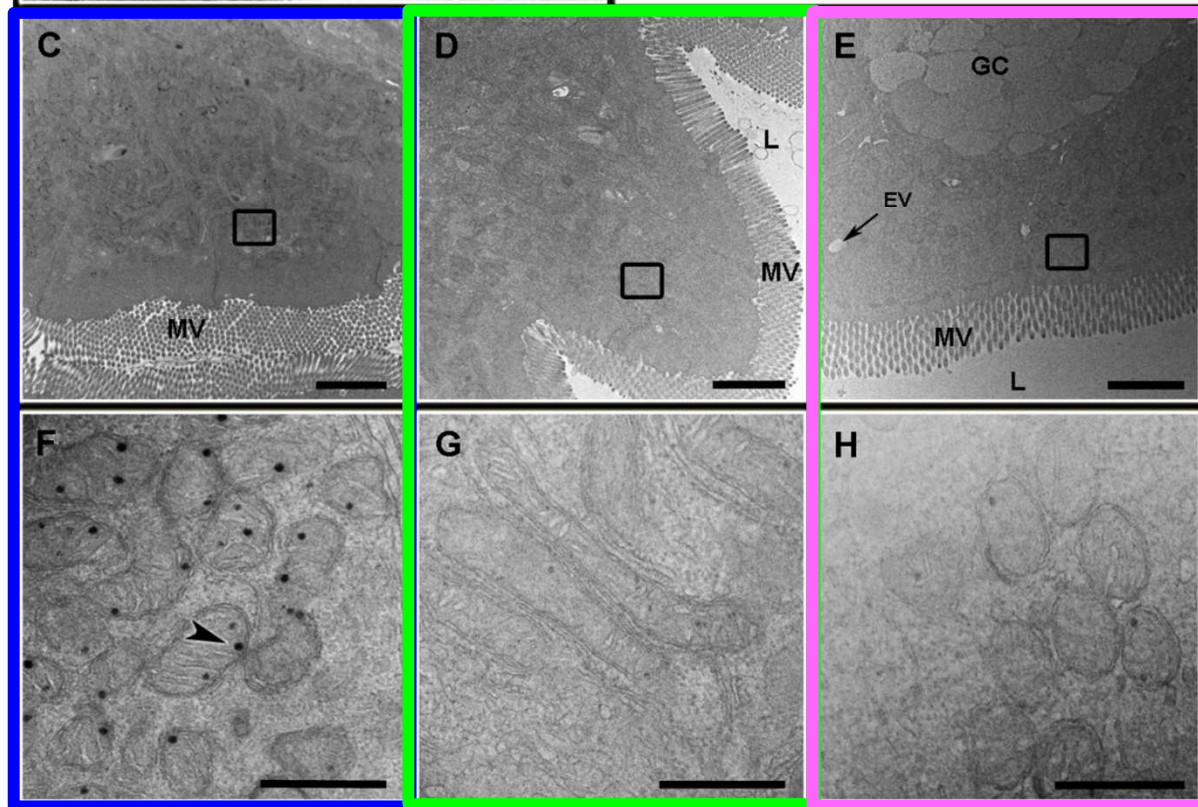
# Granules intra-mitochondriaux denses aux électrons







Barre d'échelle: 20  $\mu$ m



Barre d'échelle: 2  $\mu$ m

Barre d'échelle: 500 nm

0 nM

84 nM

420 nM

# Discussion

## Altération du métabolisme mitochondrial?

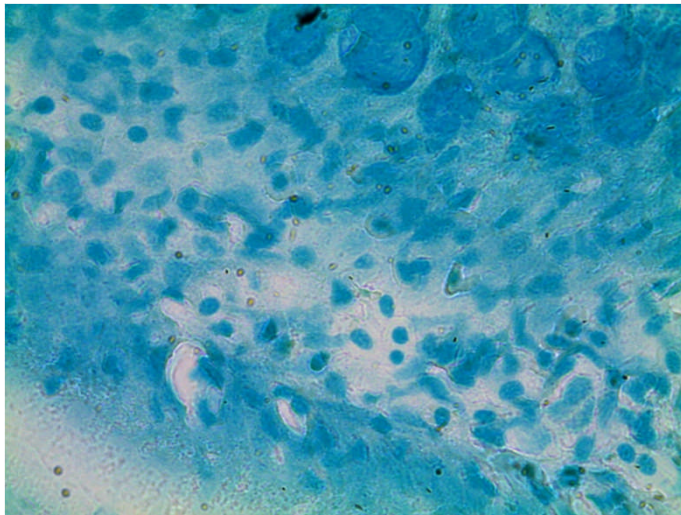
Le calcium est impliqué dans l'apoptose: mort cellulaire programmée

Une diminution de ces granules témoigne-t-elle d'une libération de calcium dans le cytosol et donc de vagues accrues d'apoptose au sein du tissu?

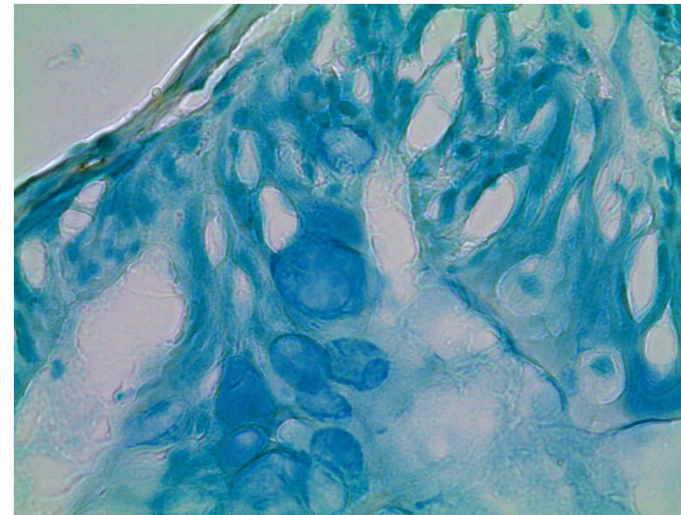
Est-ce cette apoptose qui explique les grandes régions dégradées de la paroi intestinale?

# Perspectives: marquage de l'apoptose

Apoptag© : marquer l'ADN clivé suite à l'amorçage de l'apoptose ...



0 nM



84 nM

Comptage de noyaux apoptotiques en cours ...

# Chap. 7: Conclusions Générales



Validation du modèle: les paramètres obtenus dans la première partie ont bien décrit la reproduction des contrôles dans 2 expériences ultérieures distinctes avec deux protocoles bien différents.

Etude intégrée des effets qui s'affranchit des conditions expérimentales

A l'avenir des expériences plus courtes pourront être utilisées pour cibler le mode d'action et la concentration interne sans effet

Il ne faut plus travailler avec les données moyennées

Il vaut mieux faire les expériences de reproduction avec des femelles matures d'environ 3 cm susceptibles de grandir pendant l'expérience

Il faut à minima connaître la longueur et la masse fraîche initiale et finale de chaque individu échantillonné

Les effets de tout type de stress (chimique, radiologique) peuvent être étudiés avec le modèle

Selon les applications (étude terrain) il faut détailler le module toxicocinétique

Possible d'utiliser le modèle pour analyser des données embryonnaires et larvaires

Possible de d'utiliser le modèle pour analyser des données de comportement

# Perspectives

Vers les effets au niveau des populations ...

Vers les effets au niveau des cellules...

# Remerciements:

**Claudine Van Crasbeck** : soutien logistique à la recherche

**Nkosi Mente** : design des aquariums

**Sandrine Pereira**: immunohistochimie, apprentissage de techniques

**Magali Floriani**: MET et optique

**Virginie Camilleri**: MET et optique, ICP-AES, design de la pression de contamination

**Sylvie Pierirsnard**: ILC

**Fred Coppin**: Spectromètres, lecteur UV, apprentissage en chimie

**Alban Carlat**: Aide à la collecte de données

Une très grand merci chaleureux à tout le « LRE », bien trop nombreux à énumérer ...