

**Contribution à l'étude de la néphrotoxicité de sels  
d'uranium dans les tubules rénaux proximaux humains  
et murins : apport de la spectroscopie RMN du  $^{13}\text{C}$**

Sophie Renault

► **To cite this version:**

Sophie Renault. Contribution à l'étude de la néphrotoxicité de sels d'uranium dans les tubules rénaux proximaux humains et murins : apport de la spectroscopie RMN du  $^{13}\text{C}$ . Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10197 . tel-02156081

**HAL Id: tel-02156081**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02156081>**

Submitted on 14 Jun 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.

N° d'ordre: 197-2009

2009

THESE

Présentée devant l'

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON1

ECOLE DOCTORALE EDISS

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 Août 2006)

Présentée et soutenue (publiquement) le 12 Novembre 2009

par

RENAULT Sophie

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA NEPHROTOXICITE DE SELS D'URANIUM  
DANS LES TUBULES RENAUX PROXIMAUX HUMAINS ET MURINS : APPORT  
DE LA SPECTROSCOPIE RMN DU <sup>13</sup>C

Directeur de thèse : Mr le Professeur BAVEREL Gabriel

JURY : Mr le Professeur BAUD Laurent

Rapporteur

Mr le Professeur CAMBAR Jean

Rapporteur

Mr le Professeur GUITTON Jérôme

Membre du Jury

Mr le Professeur BAVEREL Gabriel

Directeur de thèse

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire INSERM  
U820 Métabolomique et maladies métaboliques, Faculté de médecine RTH Laënnec, 7-  
11 rue Guillaume Paradin 69372 Lyon Cedex 08.

## RESUME

Au cours de ce travail, nous avons recherché l'effet du nitrate et de l'acétate d'uranyle sur des tubules proximaux isolés de reins de souris et de reins humains métabolisant l'un de ses substrats physiologiques, le lactate. Notre étude montre que le nitrate et l'acétate d'uranyle diminuent la gluconéogenèse et le niveau intracellulaire d'ATP de manière dose-dépendante pour des concentrations de l'ordre du millimolaire. Après l'incubation dans un milieu Krebs dépourvu d'ions phosphate en présence de L-[1-<sup>13</sup>C]-, ou L-[2-<sup>13</sup>C]-, ou L-[3-<sup>13</sup>C]lactate, la consommation du substrat et la formation de produits ont été mesurées par des méthodes enzymatiques et par spectroscopie RMN du <sup>13</sup>C. En combinant les résultats obtenus par chacune de ces méthodes à l'aide d'un modèle mathématique du métabolisme du lactate, il a pu être montré qu'à la concentration de 3 mM, le nitrate d'uranyle exerce un effet inhibiteur sur les flux enzymatiques de la lactate deshydrogénase (LDH) et de 3 enzymes clés de la gluconéogenèse ; chez la souris et l'homme, les flux sont inhibés respectivement de 14% et 20% (LDH), de 32% et 27% (pyruvate carboxylase), de 36% et 35% (phosphoénolpyruvate carboxykinase) et de 45% et 39% (glucose-6-phosphatase). De plus, une diminution de la quantité de glutathion est observée chez la souris (-36%) et chez l'homme (-12%). Contrairement à ce que l'on attendait, car les ions phosphate pourraient faciliter l'entrée de l'uranium dans la cellule, dans les tubules proximaux murins, l'ajout d'ions phosphate au milieu d'incubation ne semble pas accroître l'inhibition de la gluconéogenèse rénale par le nitrate d'uranyle 3 mM.

## **TITLE**

Renal proximal tubule nephrotoxicity of uranium salts in human and mouse : a  $^{13}\text{C}$ -NMR study.

## ABSTRACT

As part of a study on uranium nephrotoxicity, we investigated the effect of uranyl nitrate and acetate in isolated human and mouse kidney cortex tubules metabolizing the physiological substrate lactate. In the millimolar range, uranyl nitrate and acetate reduced gluconeogenesis and the cellular ATP level in a dose-dependent fashion. After incubation in phosphate-free Krebs-Henseleit medium with 5 mM L-[1-<sup>13</sup>C]-, ou L-[2-<sup>13</sup>C]-, ou L-[3-<sup>13</sup>C]lactate, substrate utilization and product formation were measured by enzymatic and NMR spectroscopic methods. In the presence of 3 mM uranyl nitrate, glucose production and the intracellular ATP content were significantly reduced in both human and mouse tubules. Combination of enzymatic and NMR measurements with a mathematical model of lactate metabolism revealed an inhibition of fluxes through lactate dehydrogenase and the gluconeogenic enzymes in the presence of 3 mM uranyl nitrate; in human and mouse tubules, fluxes were reduced by 20% and 14% (lactate dehydrogenase), 27% and 32% (pyruvate carboxylase), 35% and 36% (phosphoenolpyruvate carboxykinase), and 39% and 45% (glucose-6-phosphatase), respectively. These effects were associated with a 12% and 36 % decrease in the cellular content of glutathione in human and mouse tubules, respectively. Contrary to what expected because phosphate was supposed to facilitate the entry of uranium, the addition of phosphate in the medium did not enhance the inhibitory effect of 3 mM uranyl nitrate on gluconeogenesis in isolated mouse tubules.

# **DISCIPLINE**

Toxicologie

## **MOTS CLES**

Néphrotoxicité ; Uranium ; Métabolisme ; Lactate ; Gluconéogenèse ; Homme



## **KEYWORDS**

Nephrotoxicity ; Uranium ; Metabolism ; Lactate ; Gluconeogenesis; Human

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé en partie grâce à une allocation de recherche interorganisme (CEA, INSERM, INRA et CNRS) dans le cadre du programme interorganisme de toxicologie nucléaire environnementale « ToxNuc-E ».

Mes premiers remerciements vont au Professeur Gabriel BAVEREL et au docteur Laurence DUBOURG, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire, au professeur Gabriel BAVEREL et aux docteurs Bernard FERRIER, Guy MARTIN, Marie-Thérèse VANIER et Agnès CONJARD-DUPLANY pour leur encadrement.

Je remercie également l'ensemble des membres du jury, Messieurs les Professeurs BAVEREL Gabriel, BAUD Laurent, CAMBAR Jean et GUITTON Jérôme pour l'honneur et le grand plaisir qu'ils me font de juger mon travail.

Je suis redevable à tous les membres du laboratoire de Métabolomique et Maladies Métaboliques de l'unité INSERM U820 de leur présence et de l'aide qu'ils ont pu m'apporter au cours de ce travail. Mes remerciements vont aussi à Mireille MARTIN pour son implication dans ma formation. Je tiens à remercier également Rudy GADET, Claire MANCUSO, Sylvia CARTELLE, Marjorie RIETTE, Michelle BOGHOSSIAN, Hassan FAIZ et Rémi NAZARET pour leur aide technique et scientifique.

A tous mes collègues, pour les nombreux moments passés ensemble.

Merci à mes parents, pour leur affection, leur soutien et leur gentillesse. Merci à toute ma famille pour son encouragement et son soutien.

## TABLE DES MATIERES

RESUME .....	III
TITLE .....	IV
ABSTRACT.....	V
DISCIPLINE.....	VI
MOTS CLES.....	VII
KEYWORDS .....	VIII
REMERCIEMENTS.....	IX
TABLE DES MATIERES .....	X
ABBREVIATIONS .....	XIV
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES FIGURES .....	XVII
INTRODUCTION .....	1
BIBLIOGRAPHIE.....	3
I. Uranium.....	3
I. 1. Propriétés physicochimiques .....	3
I. 2. Aspects environnementaux.....	4
I.3. Aspects industriels.....	4
I. 4. Seuils d'exposition .....	5
I.5. Toxicité.....	5
II. Biocinétique de l'uranium.....	7
II.1.Voies d'entrée naturelles dans l'organisme .....	7
II.2. Comportement dans le sang .....	9
II.3. Distribution dans l'organisme .....	9

III Néphrotoxicité de l'uranium .....	15
III.1. Généralités .....	15
III.2. Aspects tissulaires.....	17
III.3. Aspects cellulaires .....	23
III.4. Métabolisme rénal.....	28
MATERIEL ET METHODES.....	33
I. Préparation de suspensions de tubules de rein de souris ou de rein humain. ....	33
II. Préparation des milieux d'incubation.....	33
III Incubation des tubules.....	34
III.1. Incubations de tubules en vue de la recherche d'un effet de l'uranium sur le métabolisme du lactate.....	34
III.2. Incubations de tubules pour les études par spectroscopie RMN .....	35
IV. Mesure par spectroscopie RMN du carbone 13.....	35
V. Dosage de l'activité LDH .....	36
VI. Dosage des métabolites.....	36
VII. Calculs et analyse statistique.....	37
VIII. Réactifs.....	38
RESULTATS.....	39
I. Expériences préalables. ....	39
II. Etude dans des tubules rénaux proximaux de souris.....	39
II.1. Etude de l'effet d'une dose croissante d'acétate de sodium ou d'acétate d'uranyle sur la synthèse de glucose à partir du lactate .....	39
II.2. Etude de l'effet d'une dose croissante de nitrate de sodium ou de nitrate d'uranyle sur la synthèse de glucose à partir du lactate.....	41
II.3. Effet du nitrate d'uranyle 3 mM sur la synthèse de glucose à partir du lactate .....	44

II.4. Etude par spectroscopie RMN du carbone 13 de l'effet du nitrate d'uranyle 3 mM chez la souris.....	46
III. Etude dans des tubules rénaux proximaux humains .....	59
III.1.Effet de doses croissantes de nitrate de sodium sur la synthèse de glucose à partir du lactate .....	59
III.2. Effet de doses croissantes de nitrate d'uranyle sur la synthèse de glucose à partir de lactate par des tubules rénaux proximaux humains....	60
III.3. Effet de doses croissantes d'acétate de sodium ou d'acétate d'uranyle sur la synthèse de glucose à partir du lactate par des tubules rénaux proximaux humains.....	61
III.4. Etude par spectroscopie RMN du carbone 13 de l'effet du nitrate d'uranyle 3 mM dans des tubules rénaux proximaux humains.....	62
DISCUSSION .....	72
I. Choix du modèle expérimental.....	72
I.1. Les espèces .....	72
I.2. Les tubules proximaux isolés de rein .....	73
I.3. Absence ou présence de précipité dans le milieu d'incubation .....	74
II. Qualité du modèle expérimental .....	74
II.1. Qualité des tubules proximaux isolés.....	74
II.2. Métabolisme de base .....	75
III. Résumé des résultats et analyse .....	75
III.1. Absence de toxicité cellulaire .....	75
III.2. Effet de l'acétate d'uranyle sur la gluconéogenèse rénale chez l'homme et la souris.....	76
III.3. Le nitrate d'uranyle à 3 mM inhibe des flux enzymatiques de la gluconéogenèse .....	76
III.4. Le nitrate d'uranyle entraîne une diminution de la quantité de glutathion .....	78
III.5. Effet du phosphate et de la solubilité de l'uranyle.....	78

CONCLUSION.....	80
REFERENCES .....	83
APPENDICES .....	95
Devenir du lactate au cours de son métabolisme .....	95
Spectres RMN.....	96
Figure 2A .....	96
Figure 2B .....	97
Articles.....	97

## ABBREVIATIONS

$\alpha$ -CGDH	$\alpha$ -Cétoglutarate deshydrogénase
ALAT	Alanine aminotransférase
CS	Citrate synthase
DFG	Débit de filtration glomérulaire
DL <sub>50</sub>	Dose létale pour 50% des espèces
FBPase	Fructose-1,6-biphosphatase
GLDH	Glutamate deshydrogénase
GLNase	Glutaminase
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
G6PDH	Glucose-6-phosphate deshydrogénase
ICDH	Isocitrate deshydrogénase
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer
LDH	Lactate deshydrogénase
MDA	Malondialdéhyde
MDH	Malate deshydrogénase
PC	Pyruvate carboxylase
PDH	Pyruvate deshydrogénase
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PK	Pyruvate kinase
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SOD	Superoxyde dismutase
TBARS	Thiobarbituric acid reactive species
TP	Tubules proximaux

# LISTE DES TABLEAUX

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

**Tableau 1 :** Composition isotopique de l'uranium naturel.

**Tableau 2 :** Seuils de concentrations environnementales recommandés par divers organismes

**Tableau 3 :** Exemple d'enzymes marqueurs de toxicité cellulaire pouvant être retrouvées dans les urines

**Tableau 4 :** Toxicité de l'uranium dans les mitochondries des cellules rénales.

**Tableau 5 :** Exemples d'enzymes à pouvoir antioxydant et réactions catalysées.

**Tableau 6 :** Effets de l'uranium sur quelques marqueurs de stress oxydant dans les reins de rat

**Tableau 7 :** Effets de l'uranium sur quelques exemples de défenses antioxydantes dans les reins de rat

**Tableau 8 :** Effet d'une exposition à l'uranium sur le métabolisme rénal dans différentes espèces.

## PARTIE RESULTATS

**Tableau 1 :** Effet de l'acétate de sodium 0; 0,625; 1,25; 2,5 et 5 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris.

**Tableau 2 :** Effet de l'acétate d'uranyle 0; 0,625; 1,25; 2,5 et 5 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris.

**Tableau 3 :** Effet du nitrate de sodium 0 ; 1,25 ; 2,5 ; 5 et 10 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris.

**Tableau 4 :** Effet du nitrate d'uranyle 0 ; 1,25 ; 2,5 et 5 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris.

**Tableau 5 :** Effet du nitrate d'uranyle 3 mM sur l'activité LDH intracellulaire et extracellulaire dans les tubules rénaux proximaux de souris.

**Tableau 6 :** Effet de la présence de phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris.



**Tableau 7 :** Effet de la présence de phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris en présence de nitrate d'uranyle 3 mM.

**Tableau 8 :** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du L-lactate 5 mM dans les tubules rénaux proximaux de souris.

**Tableau 9 :** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du  $[1-^{13}\text{C}]$  L-lactate 5 mM dans les tubules rénaux proximaux de souris.

**Tableau 10 :** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du  $[2-^{13}\text{C}]$  L-lactate 5 mM dans les tubules rénaux proximaux de souris.

**Tableau 11 :** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du  $[3-^{13}\text{C}]$  L-lactate 5 mM dans les tubules rénaux proximaux de souris.

**Tableau 12 :** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur les flux enzymatiques au cours du métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris.

**Tableau 13 :** Effet du nitrate de sodium 0 ; 1,25 ; 2,5 ; 5 et 10 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux humains.

**Tableau 14 :** Effet du nitrate d'uranyle 0 ; 0,625 ; 1,25 ; 2,5 et 5 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules proximaux de rein humain.

**Tableau 15 :** Effet de l'acétate de sodium 0 ; 0,625 ; 1,25 ; 2,5 et 5 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules proximaux de rein humain.

**Tableau 16 :** Effet de l'acétate d'uranyle 0 ; 0,625 ; 1,25 ; 2,5 et 5 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules proximaux de rein humain.

**Tableau 17 :** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du lactate 5 mM dans les tubules proximaux de rein humain.

**Tableau 18 :** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du  $[1-^{13}\text{C}]$  L-lactate 3 mM dans les tubes rénaux proximaux de rein humain.

**Tableau 19 :** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du  $[2-^{13}\text{C}]$  L-lactate 3 mM dans les tubes rénaux proximaux de rein humain.

**Tableau 20 :** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du  $[3-^{13}\text{C}]$  L-lactate 3 mM dans les tubes rénaux proximaux de rein humain.

**Tableau 21 :** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur les flux enzymatiques au cours du métabolisme du lactate dans les tubes rénaux proximaux de rein humain.

## LISTE DES FIGURES

### PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

**Figure 1 :** Modifications tubulaires proximales rénales lors d'une intoxication à l'uranium en phase aiguë.

**Figure 2 :** Métabolisme de la cellule rénale proximale.

### APPENDICES

**Figure 1 :** Devenir du lactate au cours de son métabolisme

**Figure 2 :** Spectres RMN au  $^{13}\text{C}$  (125.17 MHz) d'extraits perchloriques neutralisés obtenus à partir de tubules rénaux proximaux isolés de souris incubés 60 minutes avec du  $[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{lactate}$  en l'absence (Figure 2.A) ou en la présence (Figure 2.B) de nitrate d'uranyle.

## INTRODUCTION

Les reins et en particulier les tubules proximaux sont une cible majeure de la toxicité de l'uranium (Leggett 1989). Des expériences *in vivo* chez l'animal ont montré que l'uranium s'accumule dans les reins (Zalups, Gelein et al. 1988; Taulan, Paquet et al. 2004; Linares, Belles et al. 2006; Belles, Linares et al. 2007) Une accumulation de l'uranium dans les cellules tubulaires proximales a pu être mise en évidence *in vitro* (Ghadially, Lalonde et al. 1982; Mirto, Henge-Napoli et al. 1999; Muller, Houpert et al. 2008). Par conséquent, le tube proximal est la cible majeure de la toxicité rénale (Leggett 1989). Des études histopathologiques ont montré des lésions tubulaires telles qu'une vacuolisation cellulaire (Haley 1982; Lim, Lee et al. 1987; McDonald-Taylor, Singh et al. 1997; Martinez, Mandalunis et al. 2003), une perte de la bordure en brosse (Haley, Bulger et al. 1982; McDonald-Taylor, Singh et al. 1997) et des altérations mitochondriales (Mueller and Mason 1956; Blantz 1975; Haley 1982; Lim, Lee et al. 1987; Zhu, Xiang et al. 2008). Les mécanismes de toxicité cellulaire ne sont pas encore complètement élucidés. Certaines études ont révélé des dysfonctionnements mitochondriaux (Thiebault, Carriere et al. 2007), des signes de stress oxydant (Kato, Hishida et al. 1994; Linares, Belles et al. 2006; Thiebault, Carriere et al. 2007; Banday, Priyamvada et al. 2008), une nécrose (Hirsch 1976; Diamond, Morrow et al. 1989; McDonald-Taylor, Singh et al. 1997; Mirto, Henge-Napoli et al. 1999; L'Azou, Henge-Napoli et al. 2002; Martinez, Mandalunis et al. 2003; Thiebault, Carriere et al. 2007) et une apoptose (Sano, Fujigaki et al. 2000; Tolson, Roberts et al. 2005; Thiebault, Carriere et al. 2007). Peu d'études ont été réalisées concernant l'effet de l'uranium sur les voies métaboliques cellulaires dans le tube proximal. Des études de toxicogénomique rénale réalisées après administration de sels d'uranium *in vivo* chez la souris (Taulan, Paquet et al. 2004; Taulan, Paquet et al. 2006) ont permis de mettre en évidence une atteinte de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire. Les éventuelles modifications biochimiques associées à cette variation de l'expression des gènes n'ont pas été explorées. Une autre étude concernant le rat (Fleck, Appenroth et al. 2002) décrit une diminution *in vitro* de la gluconéogenèse rénale après administration *in vivo* de sels d'uranium à l'animal. Une baisse de l'activité de deux enzymes de la

gluconéogenèse, la fructose-1,6-diphosphatase et la glucose-6-phosphatase au niveau rénal a été rapportée chez le rat après l'administration in vivo d'une dose néphrotoxique de nitrate d'uranyle (Banday, Priyamvada et al. 2008). Des études in vitro ont aussi permis d'établir une diminution de la consommation d'oxygène dans des tubules rénaux proximaux isolés de lapin suite à une intoxication aiguë par des sels d'uranium (Brady, Kone et al. 1989). Une diminution de l'activité enzymatique et de la transcription de gènes codant des enzymes du métabolisme cellulaire chez le rat et la souris (Taulan, Paquet et al. 2004; Taulan, Paquet et al. 2006; Banday, Priyamvada et al. 2008) ainsi qu'une diminution in vitro de la gluconéogenèse rénale chez le rat (Fleck, Appenroth et al. 2002) ont été constatées à la suite d'une exposition in vivo. Très peu de données existent chez l'homme (Prat, Berenguer et al. 2005). Prat et al ont établi que la transcription du gène codant la LDH est inhibée dans des cultures cellulaires humaines. Au vu de ces observations, nous avons testé dans un premier temps l'hypothèse selon laquelle la gluconéogenèse rénale est inhibée par le nitrate et l'acétate d'uranyle chez l'homme et la souris. Pour cela, nous avons utilisé comme modèle des suspensions de tubules proximaux incubés en présence de lactate qui est un substrat néoglucogénique majeur utilisé par le rein de l'homme et de la souris, ceci avec des concentrations croissantes de nitrate et d'acétate d'uranyle allant de 0 à 5mM. Ensuite, les tubules rénaux proximaux ont été incubés en présence de lactate marqué au  $^{13}\text{C}$ . La spectroscopie  $^{13}\text{C}$  RMN est une méthode de choix dans l'étude des voies métaboliques pour de nombreux substrats (Baverel, Conjard et al. 2003). Grâce à l'utilisation d'un modèle mathématique pour le métabolisme du lactate, l'exploitation des données permet d'estimer les flux enzymatiques caractéristiques du métabolisme du lactate, ceci en présence de nitrate d'uranyle à la concentration de 3mM.

## BIBLIOGRAPHIE

### I. Uranium

Découvert en 1789 par l'allemand Heinrich Klaproth en Bohême, l'uranium servit initialement de pigment connu sous le nom de terre d'uranium, dans la préparation de certains émaux. Suite à la découverte de sa radioactivité en 1896 par Henri Becquerel, l'essor de l'énergie nucléaire du XX<sup>ème</sup> siècle le fit exploiter à l'échelle industrielle dans la production d'électricité. En France, à titre d'exemple, 78% de l'énergie est actuellement produite à partir des centrales nucléaires. L'uranium est également exploité à des fins militaires dans l'industrie de l'armement. L'uranium exerçant une toxicité aussi bien sur le plan radiologique que sur le plan chimique, une augmentation de sa dispersion dans l'environnement liée à l'activité industrielle et militaire peut avoir des conséquences sanitaires.

#### I. 1. Propriétés physicochimiques

L'uranium est, de la catégorie des actinides, le 92<sup>ème</sup> élément du tableau de Mendeleïev. C'est un des métaux les plus lourds. L'uranium naturel (tableau 1) est constitué de trois isotopes, <sup>238</sup>U, <sup>234</sup>U et <sup>235</sup>U, tous radioactifs. Seul l'isotope <sup>235</sup>U est fissile ce qui justifie son enrichissement de 3 à 5 % dans le combustible nucléaire.

Les degrés d'oxydation de l'uranium varient de +III à +VI en fonction des formes chimiques sous lesquelles il se trouve. Dans l'eau, l'uranium est généralement à son état le plus oxydé (+VI) , dans une moindre mesure à son état d'oxydation +IV (E0 UVI/UIV = 0,27 eV) (Emsley 1989) .

Isotope	%	émission	Demi-vie
<sup>238</sup> U	99.28	alpha	4.5 10 <sup>9</sup> ans
<sup>235</sup> U	0.714	alpha	7. 10 <sup>8</sup> ans
<sup>234</sup> U	0.006	alpha	2.5 10 <sup>5</sup> ans
Total			

**Tableau 1** : Composition isotopique de l'uranium naturel (données courantes).

## **I. 2. Aspects environnementaux**

L'uranium est présent à l'état de trace dans la croûte terrestre (0,3-11,7 mg /kg), les eaux ( $3 \cdot 10^{-3}$  - 2,1  $\mu\text{g}$  /L) et l'atmosphère ( $2,5 \cdot 10^{-8}$  -  $10^{-7}$  mg /m<sup>3</sup>) (Bleise, Danesi et al. 2003). Il est naturellement concentré dans certains sites géographiques tels que les gisements uranifères, les sols granitiques, les gisements de phosphate et certaines zones volcaniques. Il s'accumule dans certains végétaux comme les mousses et les lichens (Sheppard, Sheppard et al. 2006). L'uranium se dissout en partie dans les eaux de ruissellement qui lessivent ces sols et drainent des particules. En Finlande certains puits sont particulièrement contaminés avec plus de 15 $\mu\text{g}$  /L d'uranium (Vesterbacka, Makelainen et al. 2005).

## **I.3. Aspects industriels**

L'uranium n'existant pas à l'état natif, il est extrait à partir de différents minerais contenant de 1 à 5 kg d'uranium par tonne. Les minerais sont d'abord concassés et broyés finement. La teneur en uranium du minerai est ensuite concentrée par extraction chimique. Il se forme une pâte jaune, le yellow cake, constituée de U<sub>3</sub>O<sub>8</sub>. L'étape suivante est le raffinage au cours duquel sont produits successivement le nitrate d'uranyle, l'UF<sub>4</sub> et éventuellement l'UF<sub>6</sub> (gazeux). Débarrassé de ses impuretés, l'uranium est ensuite enrichi en isotope <sup>235</sup>U soit par ultracentrifugation soit par diffusion gazeuse. L'uranium appauvri en isotope <sup>235</sup>U est un sous produit de l'enrichissement, réutilisable dans l'industrie (secteur aéronaval, militaire et médical). Après l'enrichissement de l'uranium, le combustible est préparé sous forme d'une poudre noire UO<sub>2</sub>, frittée et assemblée dans des fûts. Le combustible utilisé est finalement recyclé dans des usines de retraitement. Les déchets radioactifs résiduels sont stockés selon le type d'émission et leur durée de vie.

## **I. 4. Seuils d'exposition**

23% de l'exposition à la radioactivité (3 mSv /an) est due à la radioactivité artificielle issue des activités industrielles, médicales, nucléaires et militaires. Selon les recommandations de l'OMS, l'exposition à la radioactivité de l'uranium ne doit pas dépasser 1 mSv /an pour le public et 20 mSv /an dans le cadre professionnel. La toxicité radiologique de l'uranium doit être seule prise en compte dans le cas d'une source d'exposition externe à l'organisme. Lors d'une exposition interne, la toxicité varie selon les modes d'entrée de l'uranium dans l'organisme. La toxicité radiologique est prépondérante dans le cas d'inhalation de particules insolubles. Dans les autres cas, c'est la toxicité chimique qui doit être considérée. Les niveaux d'exposition environnementale recommandés par divers organismes (WHO, OSHA, EPA, NIOSH, ATSDR) sont résumés dans le tableau 2. Les recommandations divergent selon les organismes, la solubilité des particules et la durée d'exposition. Dans le rapport annuel de 2001, l'organisation mondiale de la santé fixe un seuil pour l'eau de 2 µg /L, un seuil d'inhalation maximal acceptable de 0,5 µg. kg<sup>-1</sup>. j<sup>-1</sup> (1,75 µg /m<sup>3</sup>) et des seuils d'ingestion de 0,5 µg. kg<sup>-1</sup>. j<sup>-1</sup> pour les particules solubles et de 5 µg kg<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pour les particules insolubles.

	Exposition	
	Aiguë à subchronique	chronique
air	0,4-10 000 µg /m <sup>3</sup>	0,3-600 µg /m <sup>3</sup>
eau	-	2-30 µg/L

**Tableau 2 :** Seuils de concentrations environnementales recommandés par divers organismes (valeurs d'après Brugge et al (Brugge, de Lemos et al. 2005)).

## **I.5. Toxicité**

La toxicité de l'uranium varie selon les espèces (1999; 2001). La dose létale pour 50 % des animaux ou DL<sub>50</sub> varie selon l'espèce, la durée et le mode d'administration de l'uranium. Par exemple la DL<sub>50</sub> à 14 jours de l'acétate d'uranyle chez le rat et la souris est de 204 et 242 mg / kg de poids corporel respectivement lors d'une intoxication par

voie orale dans l'eau de boisson, et elle est de 8,3 et 20,4 mg / kg de poids corporel lorsque le toxique est administré par injection sous-cutanée (Domingo, Llobet et al. 1987). Chez l'homme des études expérimentales et des cas d'accidents ont permis d'estimer la DL<sub>50</sub> à 5 grammes en cas d'ingestion et à 1g en cas d'inhalation (Kathren and Burklin 2008).

L'uranium touche essentiellement les organes où il s'accumule: les reins, les os, et les poumons en cas d'inhalation. Les symptômes les plus courants sont une perte de la fonction rénale, des cancers et oedèmes pulmonaires, ainsi que des leucémies et des perturbations osseuses (Guglielmotti, Ubios et al. 1984; Leggett 1989; Nemery 1990; Taylor and Taylor 1997; Bolton and Foster 2002; Bleise, Danesi et al. 2003; Craft, Abu-Qare et al. 2004; Brugge, de Lemos et al. 2005; Kurttio, Komulainen et al. 2005; Miller and McClain 2007; Canu, Ellis et al. 2008). Bien que l'uranium s'accumule également dans le foie (McClain, Benson et al. 2001; Leggett and Pellmar 2003; Craft, Abu-Qare et al. 2004; Russell and Kathren 2004; Li, Roth et al. 2005), les effets biologiques de celui-ci sont encore peu étudiés. Plusieurs travaux ont permis d'établir une perturbation de l'activité des cytochromes P-450 impliqués dans le métabolisme du cholestérol et les fonctions de détoxification (Pasanen, Lang et al. 1995; Souidi, Gueguen et al. 2005; Gueguen, Souidi et al. 2006). Des perturbations de la glande thyroïde (Malenchenko, Barkun et al. 1978; Gilman, Villeneuve et al. 1998) ont également été mises en évidence. L'intoxication à l'uranium conduit également à un passage et une accumulation du métal dans le cerveau (Lemercier, Millot et al. 2003; Monleau, Bussy et al. 2005; Fitsanakis, Erikson et al. 2006; Ghosh, Kumar et al. 2007; Houpert, Frelon et al. 2007), à des désordres neurologiques avec des déficits neurocognitifs, des pertes de mémoires et une diminution de l'activité neuronale (Pellmar, Keyser et al. 1999; McDiarmid, Keogh et al. 2000; Monleau, Bussy et al. 2005; Houpert, Frelon et al. 2007). L'uranium exerce une toxicité sur le système reproducteur avec une réduction du nombre de spermatozoïdes et des effets tératogènes (Jadon and Mathur 1983; Domingo 1994; Arfsten, Still et al. 2001; Domingo 2001; Linares, Albina et al. 2005) .



## **II. Biocinétique de l'uranium**

Les modes d'entrée de l'uranium dans l'organisme sont l'inhalation, l'ingestion, le transfert cutané, le transfert placentaire de la mère au fœtus (2001), et l'injection dans les modèles expérimentaux. La majeure partie de l'uranium absorbé dans le sang est excrétée dans les urines quelques jours après l'intoxication. Le reste se répartit dans le squelette et les organes cibles tels que les reins et le foie.

Les modèles biocinétiques décrivent le comportement de l'uranium dans l'organisme, depuis son entrée jusqu'à l'excrétion et le stockage.

### **II.1. Voies d'entrée naturelles dans l'organisme**

#### **II.1.1. Inhalation**

##### *II.1.1.1. Dépôt dans les poumons*

L'uranium est inhalé généralement sous forme de gaz tel que l' $UF_6$ , ou sous forme de particules solides remises en suspension par le vent ou projetées dans l'atmosphère à l'occasion d'une explosion.

##### ✓ Gaz

Théoriquement, les gaz entrent en contact avec la totalité de la surface de l'appareil respiratoire. L'absorption dans le sang diffère selon la solubilité des gaz (2001).

Dans une étude sur un accident, le passage de l' $UF_6$  (gaz) dans le sang est estimé à 20 à 40% de la dose inhalée (Leggett 1989).

##### ✓ Particules solides

La déposition des particules dans l'appareil respiratoire (profondeur d'entrée, fraction exhalée) est déterminée par un certain nombre de paramètres physiques dépendants en particulier de leurs taille et de leurs densité (1994). On distingue ainsi les macro-, micro- ou nanoparticules, qui, par leur taille, n'ont pas la même cinétique, ni la même toxicité.

### III.1.1.2. Clairance pulmonaire

L'épuration pulmonaire comprend trois mécanismes : l'excrétion des particules dans les sécrétions nasales ou dans les fécès lorsque les sécrétions sont dégluties, l'absorption dans le sang ou le stockage dans les ganglions lymphatiques par les macrophages alvéolaires (Stradling, Stather et al. 1987; Stradling, Stather et al. 1989; Morris, Khanna et al. 1990; Berry, Zhang et al. 1997). Les voies d'épuration et la rétention pulmonaire dépendent essentiellement du lieu de dépôt des particules et de leur solubilité (Eidson 1994) .

Les particules initialement déposées dans les voies respiratoires supérieures (région du nasopharynx et larynx) sont piégées dans le mucus tapissant l'épithélium. Le passage dans le sang est très faible, l'essentiel étant éliminé dans les sécrétions nasales et les fécès. Dans le cas des particules déposées au niveau des bronches, des bronchioles et des alvéoles, le transfert dans la circulation dépend de la solubilité et de la vitesse de dissolution des particules dans le sang (1994; 2006). Les principaux paramètres d'influence sont la composition chimique et la taille de celles-ci. On distingue par défaut trois classes de particules selon leur vitesse de dissolution dans le sang : les particules à dissolution lente (S), moyenne (M) et rapide (F) (2006).

### II.1.2. Ingestion

La voie d'entrée par ingestion est rare, purement accidentelle. L'uranium ingéré est absorbé essentiellement au niveau du tube digestif et en particulier de l'intestin grêle. Le coefficient d'absorption dans le sang est estimé à 4% chez l'adulte et à 2% chez l'enfant (1996). Ce coefficient augmente à jeûn dans divers modèles animaux dont la souris (Leggett and Harrison 1995) et varie selon la solubilité des sels d'uranyle, les plus solubles comme le nitrate d'uranyle étant plus fortement absorbés (Leggett and Harrison 1995). L'uranium qui n'est pas absorbé est excrété dans les fécès. Chez le rat, une partie s'accumule dans les plaques de Peyer ainsi que dans les ganglions lymphatiques mésentériques (Dublineau, Grison et al. 2006).

### II.1.3. Contact dermique

Le passage à travers la peau est plus ou moins rapide et efficace selon l'espèce considérée. Chez le rat, le transfert cutané est très faible (Petitot, Moreels et al. 2004). Chez le cochon, il est de 30 et 40% en 24h pour le nitrate d'uranyle, soluble (Petitot, Moreels et al. 2004; Brugge, de Lemos et al. 2005).

### II.1.4. Transfert placentaire

Chez l'homme, l'uranium peut passer de la mère au fœtus à travers la barrière placentaire. L'uranium s'accumule essentiellement dans le squelette (80%) et les reins (2%) (2001).

## **II.2. Comportement dans le sang**

Les ions uranyle  $UO_2^{2+}$  sont les plus stables en solution et vraisemblablement la forme ionique majoritaire dans le milieu sanguin (Leggett 1989). Dans la circulation sanguine, l'uranium est complexé à 50-60 % avec les complexes bicarbonate et en partie avec les complexes citrate (Leggett 1989; Sutton and Burastero 2004; Ansoborlo, Prat et al. 2006). Une fraction de l'uranium est liée à l'albumine, à la transferrine - 2  $UO_2^{2+}$  pour une molécule de transferrine- (Leggett 1989; Ansoborlo, Prat et al. 2006; Vidaud, Gourion-Arsiquaud et al. 2007) et probablement à de nombreuses autres protéines sériques (IgG, l'hémopexine, facteurs du complément etc..) comme le montre l'analyse par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer) de complexes formés in vitro (Vidaud, Dedieu et al. 2005). Le reste de l'uranium sanguin est lié aux phospholipides et aux lipoprotéines des globules rouges (Pasquale, Winiski et al. 1986; Galle 1997; Koban and Bernhard 2007). In vitro, le pourcentage de l'uranium sanguin lié aux globules rouges a été estimé à 20% dans des hémolysats de sang humain. In vivo, chez le babouin, ce pourcentage varie au cours du temps (Leggett 1994).

## **II.3. Distribution dans l'organisme**

Malgré le manque de données expérimentales chez l'animal, un modèle de distribution de l'uranium dans l'organisme a pu être établi (Leggett 1994). Selon cette modélisation, les

2/3 de l'uranium sont éliminés du sang au bout de 5 minutes, 95 % au bout de 5h, 99% après 20h et 99,99 % après 5 semaines. Selon ce même modèle biocinétique, la plus grande partie de l'uranium (65%) présent dans le sang est éliminée dans les urines au bout de 24h. Le reste s'accumule dans le squelette par échange avec le calcium des cristaux d'hydroxyapatite (14%), dans les reins (11%) et les autres tissus (8%). Une partie de l'uranium stocké dans l'organisme est éliminée rapidement. La demi-vie courte de l'uranium accumulé dans les reins est de 6 jours, dans le squelette elle est de 20 jours et dans les autres tissus elle est de l'ordre de 6 à 7 jours. Une fraction plus faible est retenue plus longtemps avec une demi-vie de 1500 jours dans les reins, 5000 jours dans le squelette, 3500 jours dans le foie et 1500 jours dans les autres tissus.

### II.3.1. Excrétion fécale

L'excrétion fécale dépend de la solubilité et du mode d'entrée de l'uranium (Stradling, Hodgson et al. 2002). Après ingestion, on peut estimer que 96 à 98% de la dose d'uranium est éliminé dans les fécès (cf paragraphe II.2.2.). L'excrétion fécale représente environ 1% de l'excrétion totale après injection d'uranium chez le singe (Leggett 1994). Selon les modèles biocinétiques déduits de ces expériences en effet, environ 0,5% de l'uranium quittant la circulation est transféré au gros intestin (Leggett 1994). Après inhalation, l'excrétion fécale est liée à la quantité d'uranium directement déglutie. Selon les calculs de Stradling et al., l'excrétion fécale diminue avec le temps de manière importante, en particulier les cinquante premiers jours après une intoxication aiguë. En cas d'exposition chronique, l'excrétion fécale augmente au cours du temps (Stradling, Hodgson et al. 2002).

### II.3.2. Excrétion rénale

#### II.3.2.1. Physiologie rénale

##### ➤ Anatomie

Les reins assurent plusieurs fonctions : la filtration du sang, la production d'urine, le maintien de l'équilibre hydroélectrolytique et acide-base dans le sang, la régulation de la pression artérielle, et la détoxification de certaines substances. Les reins sont divisés en trois régions : la capsule rénale à la surface, le cortex dans la région externe et la

médullaire dans la partie la plus profonde. Le rein est divisé en lobes rénaux dans la médullaire ou pyramides de Malpighi, et en lobules rénaux dans le cortex, ou pyramides de Ferrein. Les reins, qui reçoivent 20% du débit sanguin sont irrigués par l'artère rénale, issue de l'aorte abdominale. Le sang veineux est drainé par la veine rénale. L'artère et la veine rénale entrent et ressortent au niveau du hile. L'urine primitive formée dans le rein est collectée au niveau des pyramides de Ferrein dans les tubes collecteurs. Ceux-ci se jettent dans les tubes de Bellini des pyramides de Malpighi. L'urine est finalement collectée dans les calices puis dans le bassinnet. De celui-ci part l'uretère qui aboutit dans la vessie. Le néphron constitue l'unité de filtration fonctionnelle du rein. On distingue plusieurs types de néphrons selon leur localisation : les néphrons corticaux, dans le cortex rénal, et les néphrons juxtamédullaires, à la jonction avec la médullaire. Le néphron comprend à la fois le glomérule rénal et le système tubulaire : le tube proximal, l'anse de Henlé, le tube distal, le tube collecteur et le tube de Bellini. Les vasa recta constituent le réseau capillaire périrtubulaire. Le glomérule rénal est constitué de l'artériole afférente, du peloton capillaire glomérulaire, de l'artériole efférente et la capsule de Bowman. Les cellules endothéliales fenêtrées des capillaires sanguins, ainsi que des podocytes de la capsule de Bowman et la membrane basale qu'ils élaborent constituent la barrière glomérulaire.

➤ Formation de l'urine

Le débit urinaire est de 1-2 L par jour chez l'homme. La formation de l'urine met en jeu trois mécanismes : la filtration glomérulaire, la réabsorption et la sécrétion.

✓ La filtration glomérulaire

Le plasma est filtré dans le glomérule rénal. L'eau et les solutés de faible poids moléculaire passent librement à travers la barrière de filtration. Celle-ci comprend les cellules endothéliales fenêtrées des capillaires sanguins, ainsi que des podocytes du feuillet viscéral de la capsule de Bowman et la membrane basale qu'ils élaborent. Les cellules et les protéines de plus de 70 kDa sont retenues. La membrane exerce également une sélectivité de charge retenant dans les capillaires les molécules fortement chargées négativement. Le débit de filtration glomérulaire (DFG) (125 ml /minutes chez l'homme) est exprimé en volume de plasma filtré par unité de temps. Il dépend du gradient des pressions hydrostatiques mais aussi inversement du gradient des pressions oncotiques.

✓ Réabsorption

❖ Tube proximal

Une grande partie de l'ultrafiltrat glomérulaire est réabsorbée au niveau du tube proximal : les acides aminés, les polypeptides, les 2/3 du sodium, les ions bicarbonates, le phosphate, la plupart des xénobiotiques et enfin de nombreux métabolites comme le lactate et le glucose. L'eau suit les mouvements du sodium par diffusion.

❖ Anse de Henlé et tube distal

Dans la branche descendante de l'anse de Henlé, perméable à l'eau et aux solutés, un équilibre osmotique se crée concentrant l'urine. La branche ascendante de l'anse de Henlé et le tube distal, perméables au sodium et imperméables à l'eau diluent l'urine primitive.

❖ Tube collecteur

Les tubes collecteurs contrôlent le volume urinaire par réabsorption de l'eau sous le contrôle de l'hormone antidiurétique.

✓ Sécrétion

Un certain nombre de substance peut être excrété dans l'urine comme les ions  $H^+$  et  $NH_4^+$  produits au niveau du tube proximal. D'autres sont sécrétées dans l'urine le long des capillaires péritubulaires.

II.3.2.2. Excrétion rénale de l'uranium

Comme on l'a vu précédemment, l'uranium sanguin est complexé à 60 % avec les complexes bicarbonate et citrate ultrafiltrables (Chevari and Likhner 1968; Stevens, Bruenger et al. 1980; Cooper, Stradling et al. 1982; Leggett 1989; Galle 1997; Sutton and Burastero 2004). Le reste n'est pas filtrable, lié aux hématies et aux protéines essentiellement de haut poids moléculaire, comme la transferrine et l'albumine. Une petite fraction de l'uranium filtré est retenue dans le glomérule (Leggett 1989). Dans la circulation sanguine, les complexes uranium-bicarbonates se dissocient le long du tubule proximal. La diminution progressive de pH libre en effet les ions uranyles qui se fixent à la surface des cellules épithéliales (Leggett 1989). L'uranium réabsorbé par les cellules épithéliales du tube proximal s'accumule dans les lysosomes où il se forme un précipité (Ghadially, Lalonde et al. 1982; Galle 1997). L'analyse par spectroscopie d'absorption aux rayons X du précipité intracellulaire formé indique qu'il contient du phosphate, de l'oxygène et du phosphore (Ghadially, Lalonde et al. 1982; Galle 1997; Carriere, Thiebault et al. 2006; Carriere, Proux et al. 2008). Celui-ci forme des amas denses visibles en microscopie électronique dont voici deux exemples de dimensions : 500 nm de long (Mirto, Henge-Napoli et al. 1999), 1-2  $\mu m$  de diamètre (Carriere, Thiebault et al. 2006; Carriere, Proux et al. 2008). Ces structures peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire (cellules LLC-PK1 et NRK-52E) (Mirto, Henge-Napoli et al. 1999; Carriere, Thiebault et al. 2006). Au stade terminal de la concentration d'uranium dans les cellules rénales, la paroi lysosomale est détruite. Les cristaux d'uranium sont alors déversés dans la lumière tubulaire et emmenés dans le flux urinaire (Galle 1997).

➤ Clairance rénale

L'excrétion rénale est très rapide (cf II.3.) (Neuman 1949; Galle 1997). La clairance est de l'ordre de 5 à 10 volumes plasmatiques par jour (Neuman 1949; Galle 1997). Il a été

montré chez le lapin que l'excrétion rénale d'uranium augmente lorsque les urines sont plus acides (Leggett 1989). Une faible fraction de l'uranium est éliminée plus lentement dans les urines, au fur et à mesure de la libération des organes de stockage (reins, squelette) (Leggett 1994). L'excrétion rénale peut être accélérée par des injections de bicarbonates (Wills 1949) et de mélatonine (Belles, Linares et al. 2007). La valeur recommandée basée sur la toxicité radiologique de l'uranium est de 1,5 µg /L (Brugge, de Lemos et al. 2005). La limite recommandée pour les travailleurs dans le nucléaire est de 10 mBq /L d'urine, ce qui représente 0,39 µg /L d'uranium naturel (1997).

➤ Rétention rénale

Comme on l'a vu précédemment, il a été établi qu'environ 12% de la dose absorbée dans le sang est retenue dans les reins, avec une demi-vie courte de l'ordre de quelques jours, et une demi-vie longue de quelques mois à plusieurs années (1996; Chen, Meyerhof et al. 2004). La durée de rétention rénale des particules inhalées est augmentée avec la fraction particulaire lentement dissoute. En effet, les particules à dissolution lente (S) sont retenues dans les poumons, d'où elles libèrent de l'uranium de manière continue dans le sang. Selon Chen et al, dix ans peuvent ainsi être nécessaires pour descendre en dessous de 1% de la quantité initialement accumulée dans les reins à la suite d'une inhalation de particules S à dissolution lente (Chen, Meyerhof et al. 2004). En cas d'ingestion chronique, Chen et Meyerhof ont calculé que la quantité d'uranium déposée dans les reins augmente au cours du temps jusqu'à saturation à 6,6 % de la prise journalière au bout de 25 jours (par exemple 2,64 µg pour une consommation quotidienne d'eau de 20 µg /L (Chen, Meyerhof et al. 2004)) . La concentration maximale acceptable dans les reins est estimée à 3 µg /g de reins. En deçà, on observe de simples anomalies de la fonction rénale (Leggett 1989).



## **III Néphrotoxicité de l'uranium**

### **III.1. Généralités**

#### **III.1.1. Description de la néphrotoxicité**

De par ses capacités d'excrétion et de rétention de l'uranium, les reins sont des organes particulièrement exposés à la toxicité de celui-ci. Les premières études expérimentales portant sur la néphrotoxicité de l'uranium datent du début du XX<sup>ème</sup> siècle (Dickson 1910; Dickson 1910). Les lésions rénales dues à l'intoxication sont de type nécrotique. Une étude montre que ces lésions sont d'autant plus sévères que la dose rénale est forte (Diamond, Morrow et al. 1989). La toxicité de l'uranium peut mener à des dysfonctionnements rénaux allant jusqu'à la perte de la fonction rénale ou insuffisance rénale (Flamenbaum, Hamburger et al. 1976; Stein, Lifschitz et al. 1978; Pavlakis, Pollock et al. 1996). Celle-ci peut évoluer vers la restitution ou l'insuffisance rénale chronique (Haley, Bulger et al. 1982; Domingo, Llobet et al. 1987; Fleck, Appenroth et al. 2002). L'intoxication peut conduire à une fibrose interstitielle, caractérisée par une augmentation du tissu conjonctif au détriment du cortex (Haley, Bulger et al. 1982). L'uranium peut également induire une anémie d'origine rénale (Berradi, Bertho et al. 2008). Dans les cas les plus graves et en l'absence de soins, les conséquences de l'insuffisance rénale peuvent être mortelles. La toxicité de l'uranium naturel et appauvri sur les reins est essentiellement due à ses propriétés chimiques. Les tubules rénaux proximaux accumulant l'uranium, ils sont les plus touchés (Haley 1982; Haley, Bulger et al. 1982; Bulger 1986). Par ailleurs, l'uranium ne semble pas particulièrement augmenter l'incidence des cancers rénaux (Boice, Bigbee et al. 2003; Kurttio, Salonen et al. 2006; Boice, Cohen et al. 2007; Boice, Cohen et al. 2008; Marshall 2008)

#### **III.1.2. Paramètres biochimiques**

Des études chez le rat et la souris montrent que lors d'intoxications à des doses importantes, l'uranium peut entraîner une insuffisance rénale caractérisée par la diminution du débit de filtration glomérulaire, une augmentation de la concentration sanguine et une diminution de la concentration urinaire de créatinine et d'urée

(McDermott, Nayman et al. 1968; Haley, Bulger et al. 1982; Domingo, Llobet et al. 1987; Lin and Lin 1988; Kato, Hishida et al. 1994; Sanchez, Belles et al. 2001; Tajima, Soma et al. 2005; Tolson, Roberts et al. 2005; Taulan, Paquet et al. 2006; Banday, Priyamvada et al. 2008). La diminution du débit de filtration glomérulaire est de 53% et de 79% 2h après l'injection à des rats de 15 mg /kg et de 25 mg /kg de nitrate d'uranyle (Blantz 1975). Plusieurs études montrent une augmentation du débit urinaire (Blantz 1975; Domingo, Llobet et al. 1987; Kato, Hishida et al. 1994; Belles, Linares et al. 2007; Banday, Priyamvada et al. 2008) et une excrétion de sodium accrue (Haley, Bulger et al. 1982; Kato, Hishida et al. 1994; Banday, Priyamvada et al. 2008).

De nombreux marqueurs de toxicité peuvent apparaître dans les urines à des concentrations anormalement élevées lors d'une intoxication à l'uranium: les protéines (Blantz 1975; Domingo, Llobet et al. 1987; Zalups, Gelein et al. 1988; Kato, Hishida et al. 1994; Sanchez, Belles et al. 2001; Banday, Priyamvada et al. 2008) , en particulier l'albumine (Mao, Desmeules et al. 1995), le glucose (Wright and Plummer 1974; Zamora, Tracy et al. 1998; Kurttio, Harmoinen et al. 2006; Taulan, Paquet et al. 2006; Banday, Priyamvada et al. 2008), la  $\beta$ -2 microglobuline (Zamora, Tracy et al. 1998; Zhu, Xiang et al. 2008) et certains ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , ions phosphate) (Carafoli, Tiozzo et al. 1971; Haley, Bulger et al. 1982; Stefanovic, Ivic et al. 1987; Kato, Hishida et al. 1994; Kurttio, Auvinen et al. 2002; Banday, Priyamvada et al. 2008).

L'apparition de protéines dans les urines telles que l'albumine témoignent d'une altération de la barrière de filtration glomérulaire. La présence urinaire de glucose ou de  $\beta$ -2 microglobuline est le signe d'altérations des capacités de leur réabsorption dans les tubules proximaux, ces molécules étant entièrement filtrées et réabsorbées en condition normale.

L'augmentation de l'excrétion de calcium et de phosphate peut venir d'une augmentation de leur élimination des os (Kurttio, Auvinen et al. 2002; Kurttio, Komulainen et al. 2005) et/ou d'une diminution de leur réabsorption tubulaire sous contrôle hormonal (Stefanovic, Ivic et al. 1987; Fukuda, Ikeda et al. 2006; Tissandie, Gueguen et al. 2007) .

L'enzymurie permet bien une connaissance non invasive de la cible néphronique d'une part et de la cible intracellulaire tubulaire d'autre part (tableau 3).

	localisation subcellulaire
$\gamma$ -glutamyl transférase (GGT)	bordure en brosse des TP et surface cellulaire
phosphatase alcaline	bordure en brosse des TP et RE
LDH	cytosol
phosphatase acide	lysosome
N-acétyl-b-glucosaminidase	lysosome

**Tableau 3** : Exemple d'enzymes marqueurs de toxicité cellulaire pouvant être retrouvées dans les urines (ce travail).

L'intoxication à l'uranium peut également s'accompagner de l'excrétion urinaire anormale d'un certain nombre d'enzymes cellulaires (la  $\gamma$ -glutamyltransférase, la lactate deshydrogénase, la phosphatase alcaline, la phosphatase acide, la N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase) (Wright and Plummer 1974; Braunlich and Fleck 1981; Zamora, Tracy et al. 1998; Sanchez, Belles et al. 2001; Taulan, Paquet et al. 2006; Banday, Priyamvada et al. 2008).

### III.1.3. Paramètres hémodynamiques

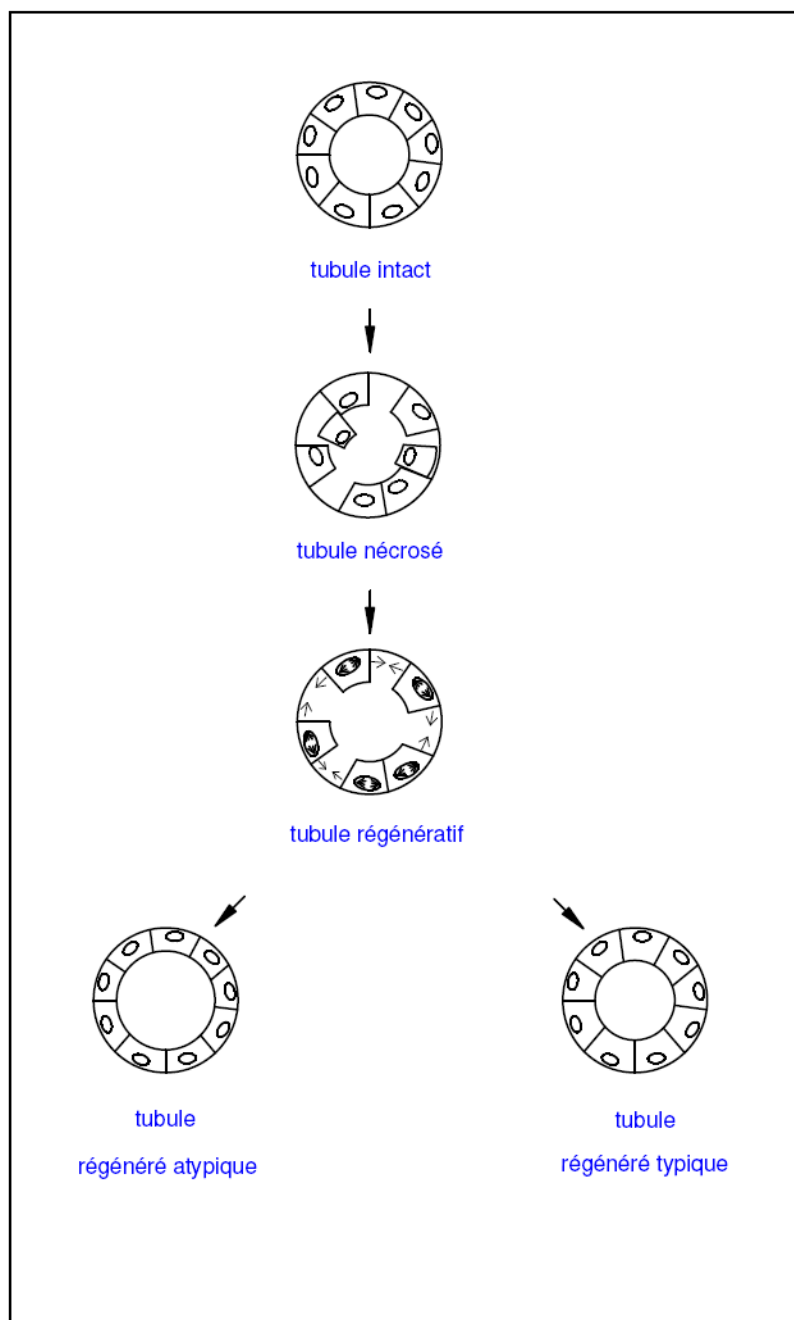
Des études chez l'animal ont montré une diminution transitoire du débit sanguin rénal et une augmentation de la sécrétion rénale de rénine impliquée dans la régulation de la pression artérielle (Kleinman, McNeil et al. 1975; Stein, Gottschall et al. 1975; Stein, Lifschitz et al. 1978). Les paramètres hémodynamiques reviennent à des valeurs normales au bout de 48h chez le chien (Stein, Gottschall et al. 1975). Chez le rat, des modifications persistantes des paramètres hémodynamiques suivis par échographie pelvienne ont été constatées (Fleck, Appenroth et al. 2002).

### III.2. Aspects tissulaires

Les changements tissulaires varient selon la dose et la durée d'exposition. Les différences inter-espèces sont essentiellement d'ordre quantitatif. L'intoxication à l'uranium touche essentiellement le cortex rénal, et plus précisément les tubules proximaux (Barnett and Metcalf 1949; Blantz 1975; Hirsch 1976; Haley 1982; Haley, Bulger et al. 1982; Bulger 1986; Lim, Lee et al. 1987; Diamond, Morrow et al. 1989; Leggett 1989; McDonald-

Taylor, Singh et al. 1997; Gilman, Villeneuve et al. 1998; Martinez, Mandalunis et al. 2003; Fujigaki, Goto et al. 2006; Zhu, Xiang et al. 2008). Ceux-ci subissent des modifications morphologiques et histologiques. La progression des lésions rénales liées à l'intoxication comprend deux phases : une phase aiguë avec dégénération de l'épithélium tubulaire, nécrose et régénération de l'épithélium tubulaire (figure 1) et une phase chronique avec atrophie tubulaire, une augmentation des tissus conjonctifs intertubulaires, une constriction de la capsule glomérulaire et un rétrécissement du cortex (Barnett and Metcalf 1949).

Selon la gravité de l'intoxication, l'une ou les deux phases sont présentes. La description des lésions tissulaires décrites dans ce paragraphe est essentiellement basée sur des observations microscopiques après des intoxications chez l'animal.



**Figure 1:** Modifications tubulaires proximales rénales lors d'une intoxication à l'uranium en phase aiguë (ce travail, d'après les descriptions de Barnett et Metcalf (Barnett and Metcalf 1949)).

### III.2.1. Lésions tubulaires

#### III.2.1.1. Tubules proximaux

Des études histopathologiques montrent que les cellules tubulaires proximales subissent des modifications caractéristiques : vacuolisation du contenu (Haley 1982; McDonald-Taylor, Singh et al. 1997; Sun, Fujigaki et al. 2002; Martinez, Mandalunis et al. 2003), dilatation cytoplasmique (Hirsch 1976; Haley 1982; Gilman, Villeneuve et al. 1998; Sun, Fujigaki et al. 2002), déplacement du noyau au pôle apical, (Gilman, Villeneuve et al. 1998), gonflement des mitochondries et perte des crêtes mitochondriales (Mueller and Mason 1956; Blantz 1975; Haley 1982; Lim, Lee et al. 1987; Zhu, Xiang et al. 2008). La membrane basale des tubules rénaux proximaux s'épaissit (Barnett and Metcalf 1949; McDonald-Taylor, Singh et al. 1997), la bordure en brosse disparaît localement (Haley 1982; McDonald-Taylor, Singh et al. 1997), ceci par exemple dès 1h après une injection à des rats de 10 mg /kg de nitrate d'uranyle (Haley 1982). Finalement les tubules deviennent nécrotiques (Hirsch 1976; Haley 1982; Diamond, Morrow et al. 1989; Leggett 1989; McDonald-Taylor, Singh et al. 1997; Sanchez, Belles et al. 2001; Sun, Fujigaki et al. 2002; Martinez, Mandalunis et al. 2003). L'épithélium perd des cellules par desquamation (Haley, Bulger et al. 1982; Sun, Fujigaki et al. 2002) dénuant de la sorte les membranes basales.

Le détachement de cellules mortes et de débris cellulaires dans la lumière des tubules peut former un bouchon, éventuellement renforcé d'une microcalcification intratubulaire (Sanchez, Belles et al. 2001). La nécrose des tubules rénaux proximaux concerne essentiellement les segments S2 et S3 (Haley 1982; Haley, Bulger et al. 1982; Bulger 1986; Fujigaki, Goto et al. 2006). Une étude montre qu'elle commence au niveau de la jonction corticomédullaire avant de s'étendre au cortex et à la médullaire externe (Sun, Fujigaki et al. 2002).

En phase chronique d'intoxication, on observe la présence de tubules atrophiques avec une membrane basale épaissie (Appenroth, Lupp et al. 2001; Fleck, Appenroth et al. 2002) .

### III.2.1.2. Tubes distaux

Des lésions transitoires modérées ont également pu être mises en évidence dans les tubes distaux rénaux de rats, après une injection de 5 mg /kg d'acétate d'uranyle par voie intraveineuse : dilatation tubulaire, vacuolisation cellulaire et formation de bouchon dans la lumière (Sun, Fujigaki et al. 2002).

### III.2.1.3. Anse de Henlé et tubes collecteurs

L'anse de Henlé et les tubes collecteurs sont généralement peu atteints. Ils peuvent cependant présenter des lésions nécrotiques modérées (Barnett and Metcalf 1949; Diamond, Morrow et al. 1989).

### III.2.1.4. Régénération des tubules proximaux

La régénération tubulaire est le processus par lequel les tubules rénaux endommagés renouvellent les pertes cellulaires et retrouvent une architecture normale. L'évolution du phénomène est actuellement encore mal comprise. De nombreux facteurs de croissance sont impliqués (Toback 1992). Selon des modèles établis pour l'ischémie (Thadhani, Pascual et al. 1996) et sur la base de données in vitro (Bacallao and Fine 1989), la régénération des cellules tubulaires requiert une phase de dédifférenciation et de prolifération cellulaires, et une phase de redifférenciation cellulaire avec une repolarisation de l'épithélium. Les tubules régénérés post-ischémiques sont de deux types : d'abord aplatis puis de forme normale, ceci sous l'influence de facteurs de croissance (Thadhani, Pascual et al. 1996). Plusieurs mécanismes ont été invoqués afin d'expliquer le renouvellement cellulaire: la division cellulaire longitudinale des cellules intactes de la paroi tubulaire partiellement dénudée et la division de cellules souches adultes d'origine rénale ou extrarénale ayant migré dans la zone lésée (Fujigaki, Goto et al. 2006; Humphreys, Duffield et al. 2006; Humphreys and Bonventre 2007; Kim, Lee et al. 2008).

De nombreuses études d'intoxication à l'uranium mettent en évidence une régénération tubulaire (Zalups, Gelein et al. 1988; Diamond, Morrow et al. 1989; Sun, Fujigaki et al. 2000; Sun, Fujigaki et al. 2002; Sun, Fujigaki et al. 2002; Fujimoto, Fujigaki et al. 2003; Fujigaki, Muranaka et al. 2005; Tolson, Roberts et al. 2005; Fujigaki, Goto et al. 2006),

les cellules des tubes régénérés étant de forme arrondie (Zalups, Gelein et al. 1988) ou aplatie (Tolson, Roberts et al. 2005) (figure 4). Des auteurs ont montré que la fonction tubulaire est globalement conservée et que les animaux deviennent plus résistants à de nouvelles intoxications à l'uranium (Tolson, Roberts et al. 2005). La régénération cellulaire commence rapidement, dès 2 à 3 jours après l'exposition chez des rats intoxiqués à l'acétate d'uranyle par injection intraveineuse de doses allant de 0,25 à 5 mg/kg (Fujigaki, Goto et al. 2006). Des marquages *in vivo* des cellules prolifératives au 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) indiquent que celles-ci proviendraient de l'extrémité distale du segment S3 des tubules proximaux et que des myofibroblastes interstitiels pourraient être impliqués (Sun, Fujigaki et al. 2000). D'autres études ont montré que l'accumulation des fibroblastes autour de l'épithélium régénératif semble jouer un rôle dans le processus de régénération (Sun, Fujigaki et al. 2002; Fujimoto, Fujigaki et al. 2003; Fujigaki, Muranaka et al. 2005). La régénération pourrait être initiée par l'effondrement de la production d'EGF au niveau des tubes distaux (Sun, Fujigaki et al. 2002). Le processus régénératif est terminé 35 jours après l'intoxication chez des rats auxquels ont été faites des injections d' $\text{UO}_2\text{F}_2$  par voie intrapéritonéale (Diamond, Morrow et al. 1989).

### III.2.2. Lésions glomérulaires

Il convient de rappeler que l'intoxication à l'uranium peut entraîner une diminution du débit de filtration glomérulaire (Lin and Lin 1988; Tajima, Soma et al. 2005). Grâce à la microperfusion d'inuline marquée suivie d'analyses urinaires et sanguines, il a pu être établi que le débit de filtration glomérulaire néphronique est diminué par l'intoxication à l'uranium (Peterson, Gabbai et al. 1989). Le coefficient de perméabilité glomérulaire  $K_f$  est diminué (Blantz 1975; Stein, Gottschall et al. 1975; Flamenbaum, Hamburger et al. 1976; Sudo, Honda et al. 1977). *In vitro*, l'uranium entraîne une diminution de la surface glomérulaire et la contraction des cellules mésangiales (L'Azou, Henge-Napoli et al. 2002). Chez le rat, l'implantation intramusculaire de fragments d'uranium appauvri induit un gonflement des glomérules avec une infiltration de cellules inflammatoires, une disparition de la chambre glomérulaire et une fibrose douze mois après l'intoxication



(Zhu, Xiang et al. 2008). Une autre étude in vivo chez le rat montre que le diamètre des fenêtres endothéliales des capillaires glomérulaires est réduit (Avasthi, Evan et al. 1980).

### III.2.3 Lésions de l'interstitium

Chez le rat l'injection de 5 mg /kg de nitrate d'uranyle entraîne une fibrose interstitielle 20 jours après l'administration (observations macroscopiques), associée à une infiltration de lymphocytes (observations histologiques). Ces modifications interstitielles sont accompagnées d'une atrophie tubulaire et d'un épaissement de la membrane basale tubulaire (Appenroth, Lupp et al. 2001; Fleck, Appenroth et al. 2002). Des analyses par RT-PCR quantitative montrent que pour cette dose chez le rat, la transcription du gène *EIIIA(+)* codant la fibronectine est augmentée 20 semaines après l'intoxication (Eismann, Sommer et al. 2002). D'autres études montrent également une fibrose interstitielle en phase chronique d'évolution pathologique (Haley, Bulger et al. 1982; McDonald-Taylor, Singh et al. 1997), avec une infiltration de cellules mononuclées (McDonald-Taylor, Singh et al. 1997).

## III.3. Aspects cellulaires

### III.3.1. Entrée dans la cellule

L'uranium peut se fixer aux surfaces membranaires (Koban and Bernhard 2007). Il peut entraîner le détachement des microvilli des tubules rénaux proximaux comme le montrent des observations histologiques ainsi que l'apparition dans les urines d'enzymes spécifiquement localisées sur la bordure en brosse des tubules rénaux proximaux telles que la phosphatase alcaline et la  $\gamma$ -glutamyltransférase (McDonald-Taylor, Singh et al. 1997; Banday, Priyamvada et al. 2008). Les mécanismes de transport de l'uranium dans les cellules rénales sont encore peu connus. Des études ont été menées in vitro sur des cultures de cellules proximales de porc LLCPK1. Il semble que l'uranium entre dans la cellule rénale sous forme soluble (complexé aux bicarbonates) (Mirto, Henge-Napoli et al. 1999). Le transport de l'uranium est surtout lié à l'endocytose (Muller, Houpert et al. 2008). L'internalisation du complexe  $UO_2^{2+}$ - transferrine par le récepteur de la transferrine n'est pas impliquée (Vidaud, Gourion-Arsiquaud et al. 2007). Une fraction de

l'uranium entre dans la cellule grâce au co-transporteur de sodium et de phosphate de type IIa, à la surface apicale (Muller, Houpert et al. 2006; Muller, Houpert et al. 2008). Celui-ci permet habituellement le cotransport de trois ions sodium et de un ion  $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$  à l'intérieur de la cellule proximale (Murer, Hernando et al. 2000). Son rôle dans l'entrée de l'uranium est très faible, comme le montrent des transfections du transporteur de phosphate de type IIa dans les cellules de tube distal de chien MDCK-2 (Muller, Houpert et al. 2008). La présence de citrate dans le milieu de culture augmente la cytotoxicité de l'uranium (Carriere, Avoscan et al. 2004; Carriere, Thiebault et al. 2006) et accélère son accumulation intracellulaire (Carriere, Thiebault et al. 2006).

### III.3.2. Toxicité lysosomale et mitochondriale

Une fois dans la cellule rénale, l'uranium est accumulé dans les lysosomes où il forme un précipité composé de phosphate et d'uranyle, ceci sous l'effet des phosphatases acides (Ghadially, Lalonde et al. 1982; Berry 1996). Lorsque les quantités d'uranium accumulées dans le lysosome sont importantes, la membrane lysosomale est détruite, comme le montre l'excrétion urinaire d'enzymes lysosomales telles que la phosphatase acide et la N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase (Wright and Plummer 1974; Sanchez, Belles et al. 2001; Banday, Priyamvada et al. 2008). Des dépôts d'uranium se forment également à la surface et dans les mitochondries (Leggett 1989). Le tableau 6 donne une vue d'ensemble de plusieurs études montrant des altérations mitochondriales. Des modifications du métabolisme cellulaire ont également été observées (cf partie III.4.).

<b>Altérations mitochondriales</b>	<b>modèle expérimental</b>	<b>référence</b>
Gonflement et pertes des crêtes mitochondriales	Tubules rénaux de rats	(Blantz 1975; Haley 1982; Lim, Lee et al. 1987; Zhu, Xiang et al. 2008)
Altération de la masse mitochondriale	TP isolés de lapins	(McDonald-Taylor, Singh et al. 1997)
Diminution dose-dépendante du potentiel mitochondrial membranaire	cellules de TP NRK-52-E	(Thiebault, Carriere et al. 2007)
Accumulation de calcium et de phosphate dans les mitochondries	cellules de TP LLC-PK1	(Carafoli, Tiozzo et al. 1971)

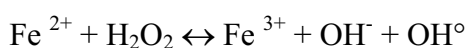
**Tableau 4** : Toxicité de l'uranium dans les mitochondries des cellules rénales (ce travail).

### III.3.3. Stress oxydant

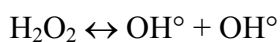
#### III.3.3.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant est la génération « en cascade » de radicaux libres à l'origine d'un endommagement de la cellule pouvant conduire celle-ci à l'apoptose ou à la nécrose. La présence de métaux est une cause courante de ce phénomène (Stohs and Bagchi 1995; Leonard, Harris et al. 2004). Quelques-unes des réactions à l'origine de l'apparition de radicaux libres dans la cellule sont listées ci-dessous :

- La réaction de Fenton



- La rupture homolytique de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sous l'effet de radiations ionisantes



- La production de l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\circ-}$ 
  - par la NADPH oxydase dans les neutrophiles. La NADPH oxydase membranaire dans les cellules endothéliales est activée par les métaux lourds.
  - par la NADH oxydase mitochondriale (activée par les métaux lourds).
- La formation de thiols radicaux libres par action directe des métaux

Comme on vient de le voir, les mitochondries génèrent une production constitutive d'espèces dérivées de l'oxygène. Celle-ci peut être considérablement augmentée dans certaines situations pathologiques, en particulier lors d'altérations de la chaîne respiratoire (Newmeyer and Ferguson-Miller 2003).

A partir des radicaux libres primaires formés, une succession de réactions de ceux-ci sur les composés chimiques de la cellule conduit à la production d'autres radicaux libres, « secondaires » (comme les radicaux  $\text{ROO}^\circ$ ), plus réactifs.

Les principales conséquences de la formation des radicaux libres sont l'oxydation des protéines, de l'ADN et la peroxydation lipidique. Les protéines oxydées peuvent perdre leur fonction (enzymatique, de récepteur, de facteur de transcription...) et deviennent alors plus sensibles à l'action du protéasome. Les lésions de l'ADN peuvent causer des mutations à la base d'une carcinogénèse. L'attaque des lipides altère les propriétés des membranes. L'ensemble des altérations induites par la formation de radicaux libres

conduit à une perte de l'intégrité membranaire, des problèmes d'équilibre ionique dans la cellule, avec en particulier une augmentation de la concentration intracellulaire et intramitochondriale de calcium (Miller 2006), un stress du réticulum endoplasmique (Malhotra and Kaufman 2007) et des dysfonctionnements mitochondriaux comme l'ouverture du pore mitochondrial membranaire et la libération de cytochrome C (Halestrap 2005). Il a également été établi que le stress oxydant interfère avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire comme la voie des MAP kinases (Finkel 2000; Leonard, Harris et al. 2004). Les conséquences cellulaires du stress oxydant sont variées selon la dose et le type de cellule, allant de l'activation de la prolifération cellulaire, à la sénescence (Finkel and Holbrook 2000), ou à la mort par nécrose ou apoptose (Halestrap 2005; Miller 2006).

La cellule dispose d'un arsenal d'enzymes et de molécules de défense contre le stress oxydant tel que le glutathion (GSH à l'état réduit et GSSG à l'état oxydé) (tableau 5). L'ensemble de ces molécules est regroupé sous le nom d'antioxydants.

catalase	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$
glutathion peroxydase	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$
SOD	$2 \text{O}_2^{\cdot -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

**Tableau 5 :** Exemples d'enzymes à pouvoir antioxydant et réactions catalysées (ce travail).

### III.3.3.2. Uranium et stress oxydant

Le rôle des radicaux libres dans l'insuffisance rénale aiguë ou chronique liée à l'uranium n'est pas encore très clair. Les tableaux 6 et 7 donnent une vue d'ensemble de plusieurs études portant sur le stress oxydant induit par l'intoxication à l'uranium au niveau rénal. Des lésions de l'ADN ont également été constatées dans des cellules de rat NRK-52E (Thiebault, Carriere et al. 2007). Le stress oxydant généré pourrait s'expliquer par l'accumulation de fer dans la cellule rénale (Donnadieu-Claraz, Bonnehogne et al. 2007; Berradi, Bertho et al. 2008) et la réduction de la forme oxydée U(VI) de l'uranium par le glutathion (Pourahmad, Ghashang et al. 2006). Les altérations de l'activité de la NADH oxydase n'ont cependant encore jamais été prouvées dans le cas de l'uranium.

	<b>Effet</b>	<b>Références</b>
Contenu cortical en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	(Guidet and Shah 1989)
Peroxydation lipidique :		
<i>Contenu en TBARS</i>	+	(Linares, Belles et al. 2006; Belles, Linares et al. 2007; Thiebault, Carriere et al. 2007)
<i>Contenu en MDA</i>	#	(Guidet and Shah 1989; Kato, Hishida et al. 1994)
	+	(Banday, Priyamvada et al. 2008)

**Tableau 6:** Effets de l'uranium sur quelques marqueurs de stress oxydant dans les reins de rat (ce travail). +, augmentation ; #, aucune variation

	<b>Effet</b>	<b>Références</b>
Contenu en thiols totaux	-	(Banday, Priyamvada et al. 2008)
Taux de GSH	#	(Linares, Belles et al. 2006; Belles, Linares et al. 2007)
Taux de GSSG	+	(Linares, Belles et al. 2006)
	#	(Belles, Linares et al. 2007)
Glutathion peroxydase :		
<i>Activité</i>	+	(Banday, Priyamvada et al. 2008)
<i>Transcription</i>	+	(Taulan, Paquet et al. 2004; Taulan, Paquet et al. 2006)
Activité SOD	+	(Linares, Belles et al. 2006; Belles, Linares et al. 2007)
Activité catalase	#	(Belles, Linares et al. 2007; Thiebault, Carriere et al. 2007)
	-	(Banday, Priyamvada et al. 2008)

**Tableau 7:** Effets de l'uranium sur quelques exemples de défenses antioxydantes dans les reins de rat (ce travail). +, augmentation ; #, aucune variation ; -, diminution

### III.3.3.3. Mort cellulaire

Les observations histologiques (paragraphe III.2.1.1.), la libération dans les urines d'enzymes intracellulaires (la LDH, la phosphatase acide et la N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase) (Wright and Plummer 1974; Sanchez, Belles et al. 2001; Banday, Priyamvada et al. 2008), et les tests de viabilité effectués in vitro sur des lignées

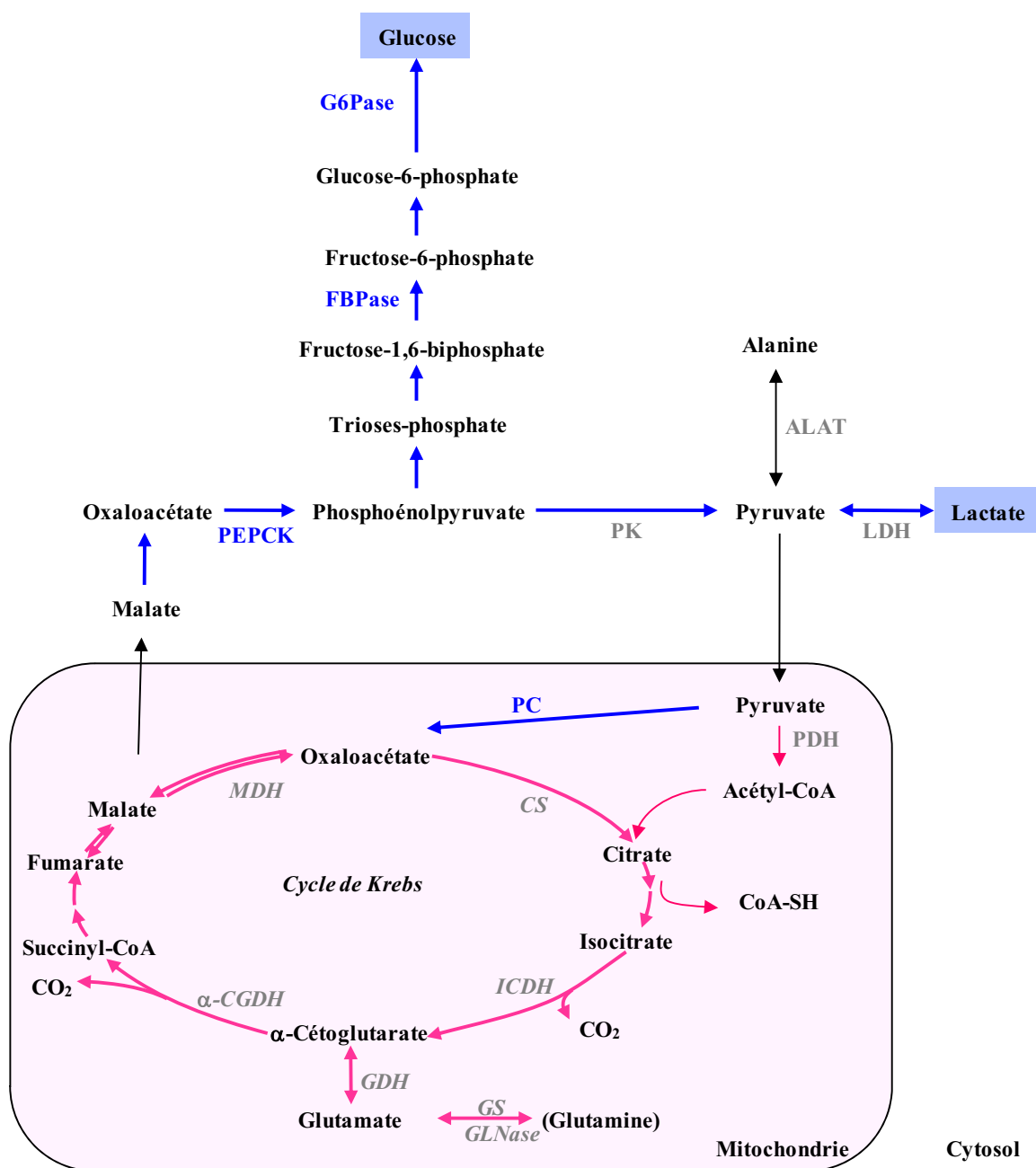
cellulaires rénales LLC-PK1 et NRK-52E (Mirto, Henge-Napoli et al. 1999; L'Azou, Henge-Napoli et al. 2002; Thiebault, Carriere et al. 2007) indiquent une nécrose cellulaire. La nécrose est caractérisée par une rupture de la membrane plasmique, une caryolyse du noyau, une fragmentation du cytoplasme et un effondrement de la quantité d'ATP intracellulaire. La mort par apoptose est caractérisée par la fragmentation de l'ADN, du noyau et du cytosquelette, et la formation de corps apoptotiques. Le processus requiert de l'ATP. Des études *in vitro* (Thiebault, Carriere et al. 2007) et *in vivo* (Sano, Fujigaki et al. 2000; Tolson, Roberts et al. 2005) indiquent que l'intoxication à l'uranium peut également déclencher la mort de la cellule proximale par apoptose. La mesure de la viabilité cellulaire et la détermination du pourcentage d'apoptose par mesure de l'activité caspase 3 dans des cellules NRK-52E du tube proximal montre que la mort par nécrose ou apoptose dépend de la dose d'intoxication (Thiebault, Carriere et al. 2007).

### **III.4. Métabolisme rénal**

#### **III.4.1. Description du métabolisme cellulaire rénal**

Le rein, comme le foie est un organe capable de produire du glucose (Krebs 1963) (figure 2). De nombreux substrats sont néoglucogéniques : le citrate, la glutamine, le glutamate, l' $\alpha$ -cétoglutarate, le succinate, le malate, le pyruvate, le lactate, le fructose, le glycérol (Krebs and Yoshida 1963; Krebs, Speake et al. 1965; Goodman, Fuisz et al. 1966; Goorno, Rector et al. 1967; Adler and Preuss 1972; Simpson 1972; Baverel, Bonnard et al. 1978; Baverel, Bonnard et al. 1978). Cependant *in vivo* les principaux substrats néoglucogéniques sont le lactate, la glutamine et le glycérol (Squires, Hall et al. 1976; Kida, Nishio et al. 1982; Stumvoll, Meyer et al. 1997). L'utilisation de tranches de reins a permis d'établir que la gluconéogenèse se produit dans le cortex rénal (Benoy and Elliott 1937; Teng 1954; Landau 1960; Krebs, Bennett et al. 1963; Krebs and Yoshida 1963) et que la glycolyse a lieu dans les structures médullaires (Lee, Vance et al. 1962; Cohen 1979). Cependant le cortex rénal n'est pas dépourvu d'enzymes glycolytiques. Les activités enzymatiques de la glycolyse sont même supérieures à l'utilisation réelle du glucose, ce qui suggère un contrôle métabolique dans la cellule intacte (Guder and Schmidt 1976; Schmid, Mall et al. 1980). La distribution de l'activité enzymatique dans

les néphrons est hétérogène selon les différents segments (Guder and Ross 1984). Les enzymes clés de la glycolyse, l'hexokinase (EC 2.7.1.1.), la phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) et la pyruvate kinase (EC 2.7.1.40) ont une activité enzymatique forte dans le tubule distal et faible dans le tubule proximal (Vandewalle, Wirthensohn et al. 1981; Ruegg and Mandel 1990). Les enzymes clés de la gluconéogenèse, la phosphoénolpyruvate carboxykinase, la fructose-1,6-diphosphatase, la glucose-6-phosphatase et la pyruvate carboxylase ont une activité exclusivement localisée dans le tube proximal (Curthoys and Lowry 1973; Guder and Schmidt 1974; Burch, Narins et al. 1978; Vandewalle, Wirthensohn et al. 1981; Cole, Boylan et al. 1988; Wright and Knepper 1990; Salto, Oliver et al. 1991). La glutaminase est présente tout le long du néphron (Curthoys and Lowry 1973; Wright and Knepper 1990). Dans des conditions de stimulation de la gluconéogenèse rénale, (jeûne, acidose), il y a une augmentation des activités des enzymes de la gluconéogenèse sans variation de celles de la glycolyse (Schmid, Mall et al. 1980).



**Figure 2 : Métabolisme de la cellule rénale proximale (ce travail).**  $\alpha$ -CGDH,  $\alpha$ -cétoglutarate deshydrogénase; ALAT, alanine aminotransférase ; CS, citrate synthase ; GDH, glutamate deshydrogénase; G6Pase, glucose-6-phosphatase; GLNase, glutaminase ; GS, glutamine synthetase; ICDH, isocitrate deshydrogénase; LDH, lactate deshydrogénase; MDH, malate deshydrogénase; PC, pyruvate carboxylase; PDH, pyruvate deshydrogénase; PEPCK, phosphoénolpyruvate carboxykinase; PK, pyruvate kinase. Il convient de remarquer que la GS est absente dans les tubules rénaux humains



### III.3.4.2 Effets de l'uranium sur le métabolisme rénal

L'incubation de tubules rénaux proximaux de lapins en présence de concentrations croissantes de 0 à 10 mM de nitrate d'uranyle a permis d'établir une diminution dose dépendante de la consommation d'oxygène et une réduction de l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Brady, Kone et al. 1989). Cette réduction est de 24% dans les tubules rénaux proximaux de rats ayant reçu une injection de 0,5 mg / kg de nitrate d'uranyle (Bandy, Priyamvada et al. 2008). Ces observations suggèrent un ralentissement du métabolisme rénal. Des signes d'altération de la chaîne de phosphorylation oxydative ont pu être établis dans les tubules proximaux de reins chez le lapin (Brady, Kone et al. 1989). Grâce à des dosages biochimiques et à différentes techniques d'analyse de l'activité transcriptionnelle, l'analyse SAGE et les puces à ADN, il a été établi que l'activité de certaines enzymes du métabolisme est modifiée chez le rat après une intoxication in vivo à l'uranium ainsi que l'expression de gènes correspondants (tableau 8). Chez la souris, les variations biochimiques associées aux modifications de l'expression des gènes n'ont pas été explorées (tableau 8). Différentes voies métaboliques semblent affectées : le métabolisme du lactate, qui est un substrat physiologique majeur, le cycle de Krebs, la gluconéogenèse, mais aussi la voie des pentoses et la glycolyse (tableau 8). L'incubation en présence de pyruvate à la concentration de 10 mM de tranches de reins issues de rats ayant reçu une injection de nitrate d'uranyle (5 mg/kg) montre une diminution de la production de glucose 10 semaines après l'injection (Fleck, Appenroth et al. 2002). Très peu de données existent chez l'homme concernant l'impact d'une intoxication à l'uranium sur le métabolisme rénal (Prat, Berenguer et al. 2005). Prat et al ont établi une diminution de la quantité intracellulaire d'ATP ainsi que de la transcription du gène codant la LDH des cultures cellulaires humaines. Au vu de ces observations, nous avons étudié l'effet du nitrate et de l'acétate d'uranyle sur le métabolisme des cellules rénales proximales les principales cellules cibles de l'action toxique de l'uranium, ceci chez l'homme et la souris.

Paramètre mesuré	Activation (+) ou diminution (-)	Espèce, type d'exposition	Etude
<b>Consommation d'oxygène</b>	(-)	lapin, in vitro	(Brady, Kone et al. 1989)
<b>Production de glucose</b>	(-)	rat, in vivo	(Fleck, Appenroth et al. 2002)
<b>ATP intracellulaire</b>	(-)	homme, in vitro	(Prat, Berenguer et al. 2005)
<b>Activité enzymatique :</b>			
- <i>cycle de Krebs</i>			
- ICDH, MDH, SDH	(-)	rat in vivo	
- <i>Gluconéogenèse</i>			
- G6Pase, FBPase	(-)	rat, in vivo	(Banday, Priyamvada et al. 2008)
- <i>Voie des pentoses</i>			
- G6PDH	(-)	rat, in vivo	
- <i>Autres</i>			
- Enzyme malique	(+)	rat, in vivo	
<b>Expression de gènes codant des enzymes du métabolisme des chaînes hydrocarbonées</b>			
- <i>Métabolisme du lactate</i>			
- LDH-B	(-)	souris, in vivo	(Taulan, Paquet et al. 2004; Taulan, Paquet et al. 2006)
- LDH-A	(-)	homme, in vitro	(Prat, Berenguer et al. 2005)
- LDH-A	(+)	souris, in vivo	(Taulan, Paquet et al. 2004)
- <i>Cycle de Krebs</i>			
- GDH1	(+)	souris, in vivo	(Taulan, Paquet et al. 2004; Taulan, Paquet et al. 2006)
- ICDH, MDH	(+)	souris, in vivo	(Taulan, Paquet et al. 2004)
- PDH-E1 $\alpha$	(-)	souris, in vivo	(Taulan, Paquet et al. 2006)
- <i>Gluconéogenèse</i>			
- FBPase	(-)	souris, in vivo	(Taulan, Paquet et al. 2006)
- <i>Glycolyse</i>			
- GPI	(+)	souris, in vivo	(Taulan, Paquet et al. 2006)
- PGK1	(+)	souris, in vivo	(Taulan, Paquet et al. 2004)
- <i>Voie des pentoses</i>			
- TALDO1	(+)	souris, in vivo	(Taulan, Paquet et al. 2004)

**Tableau 8:** Effet d'une exposition à l'uranium sur le métabolisme rénal dans différentes espèces (ce travail). Abréviations: LDH, lactate deshydrogénase; LDH-A, lactate deshydrogénase, chaîne A; LDH-B, lactate deshydrogénase, chaîne B; ICDH, isocitrate deshydrogénase; MDH, malate deshydrogénase; SDH, succinate deshydrogénase; FBPase, fructose bisphosphatase; G6Pase, glucose-6-phosphatase; G6PDH, glucose-6-phosphate deshydrogénase; PDH-E1 $\alpha$ , pyruvate deshydrogénase, sous unité E1 $\alpha$ ; GDH, glutamate deshydrogénase 1; GPI, glucose phosphate isomérase I complex; PGK1, phosphoglycérate kinase 1; TALDO1, transaldolase 1.

## MATERIEL ET METHODES

### **I. Préparation de suspensions de tubules de rein de souris ou de rein humain.**

Les souris femelles OF1 proviennent de chez Charles River (Saint Germain sur l'Arbresle, France). Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale et les reins aussitôt utilisés pour préparer une suspension de tubules rénaux proximaux à partir du cortex rénal, selon la méthode décrite par Conjard et al. (Conjard, Brun et al. 2002)

Le cortex rénal servant à la préparation de tubules de rein humain est prélevé sur la partie saine d'un rein suite à une néphrectomie réalisée pour cause de tumeur chez des patients à jeun depuis 18h. Ces expériences sont réalisées avec le consentement éclairé des patients. Les suspensions de tubules rénaux proximaux humains sont réalisées selon une méthode déjà décrite. (Baverel, Bonnard et al. 1978)

### **II. Préparation des milieux d'incubation.**

Avant que ne soient réalisées les expériences faisant appel à la RMN, plusieurs vérifications ont été réalisées. Un préalable à la réalisation de ces vérifications a été d'obtenir un milieu d'incubation Krebs-Henseleit au bon pH et conservant son pouvoir tampon après l'addition de sels d'uranium. L'addition de sels d'uranium de 2 à 10 mM final dans du tampon Krebs Henseleit acidifie le milieu de sorte que l'anion  $\text{HCO}_3^-$  disparaît en  $\text{CO}_2$ . Pour contourner cette difficulté, nous avons dissout les sels d'uranium dans du NaCl 0,154 M servant à la préparation du milieu Krebs-Henseleit. Le pH a été amené à 7,4 par addition de soude 2M, ce qui entraîne une précipitation partielle des sels d'uranium qui sont solubilisés par addition progressive de  $\text{NaHCO}_3$  servant à la préparation de Krebs-Henseleit en ajustant le pH à 7,4. Les volumes adéquats de solutions de KCl-MgSO<sub>4</sub> et CaCl<sub>2</sub> sont ajoutés et la solution est saturée en O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> en y faisant barboter à froid un mélange gazeux de 95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub> de façon à obtenir une solution mère de nitrate d'uranyle 6 mM dans un milieu tampon Krebs-Henseleit sans

phosphate (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,18 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 24,9 mM NaHCO<sub>3</sub> et 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O). On obtient par dilutions successives dans du Krebs-Henseleit sans phosphate les solutions ayant la concentration recherchée en sels d'uranium. L'absence de phosphate dans le milieu d'incubation permet d'éviter l'apparition d'un précipité en présence des ions uranyle. Dans quelques expériences de contrôle du KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18mM final est rajouté extemporanément au tampon d'incubation.

### **III Incubation des tubules**

#### **III.1. Incubations de tubules en vue de la recherche d'un effet de l'uranium sur le métabolisme du lactate**

Pour chaque expérience, une suspension tubulaire est obtenue à partir de plusieurs reins chez la souris et d'un fragment de rein chez l'homme. Celle-ci est ensuite répartie dans des fioles Erlenmeyer siliconées de 10 ml. Chaque fiole contient 200 µl de suspension tubulaire et 1 ml de milieu Krebs-Henseleit additionné de lactate. La concentration finale de lactate est de 5 mM. De l'acétate de sodium ou de l'acétate d'uranyle sont présents en concentrations croissantes (0 - 1,25 - 2,5 et 5mM ) dans une série de quatre et six expériences respectivement chez la souris et dans deux séries de trois expériences chez l'homme. Dans deux expériences chez la souris et une chez l'homme, du nitrate de sodium est présent en concentrations croissantes : (0 -1,25-2,5 – 5 et 10mM). Dans d'autres séries expérimentales, nous avons testé l'effet du nitrate d'uranyle pour les concentrations de (0 -0,2-0,4-0,6-0,8 mM) et (0-1,25 -2,5 et 5mM) chez la souris et de (0-0,625-1,25 -2,5 et 5mM) chez l'homme. La plupart des expériences ont été réalisées dans un milieu d'incubation ne contenant pas de phosphate. Après addition des tubules les fioles sont remplies d'un mélange gazeux O<sub>2</sub> :CO<sub>2</sub> (95% : 5%) et bouchées .Elles sont mise à incuber pendant une heure à 37 °C avec une agitation modérée de 40 cycles par minute. A la fin de l'incubation, le métabolisme est arrêté par addition d'acide perchlorique à la concentration finale de 4%. Les protéines précipitées sont séparées de la phase liquide par centrifugation, le surnageant obtenu est ramené à un pH proche de 7 (indicateur coloré) par addition d'une solution de KOH à 20%,

additionnée de  $H_3PO_4$  à 1%, ce dernier jouant le rôle de tampon. Dans chaque expérience, trois fioles sont mises à incuber pour chacune des concentrations utilisées d'uranium. Dans toutes les expériences, des incubations dites « temps zéro » sont réalisées par addition d'acide perchlorique avant l'ajout des tubules. La mesure du poids sec de deux prises d'essai de 200 $\mu$ l de la suspension tubulaire est effectuée pour chacune des expériences.

### **III.2. Incubations de tubules pour les études par spectroscopie RMN .**

Dans l'étude par spectroscopie RMN, cinq expériences ont été réalisées avec du rein humain et six expériences ont été réalisées avec des reins de souris afin de déterminer les flux enzymatiques impliqués dans le métabolisme du lactate. A chacune des expériences, une même suspension tubulaire est répartie dans plusieurs fioles de 100 ml siliconées. Chaque fiole contient 1 millilitre de suspensions de tubules et 8 ml de Krebs-Henseleit auquel est ajouté du lactate  $^{13}C$  marqué soit sur le premier (C-1), le deuxième (C-2) ou le troisième (C-3) carbone de la molécule à la concentration finale de 5 mM. L'incubation est réalisée pendant 1h en l'absence ou en présence de nitrate d'uranyle à la concentration de 3 mM. Juste avant l'arrêt de l'incubation du milieu un volume de 100  $\mu$ l est prélevé afin de pouvoir déterminer l'activité de la lactate déshydrogénase libérée dans le milieu. Après l'arrêt de l'incubation par addition d' $HClO_4$  4% final et neutralisation du surnageant comme précédemment décrit, une fraction aliquote de 9 ml est réservée pour les mesures par spectroscopie de RMN. Le restant est utilisé pour les dosages enzymatiques des métabolites.

### **IV. Mesure par spectroscopie RMN du carbone 13**

A 9 ml de surnageant conservé après incubation des tubules, nous rajoutons 40  $\mu$ moles de C-2 glycine qui vont servir de standard interne. Après évaporation sous vide, le culot est repris par 600  $\mu$ l de  $D_2O$  afin de pouvoir effectuer des mesures par RMN. Les mesures ont été effectuées comme déjà décrit (Chauvin, Megnin-Chanet et al. 1994; Chauvin, Megnin-Chanet et al. 1997; Vittorelli, Gauthier et al. 2005) à 125,75 MHz sur un spectromètre Bruker AM-500WB à l'aide d'une sonde de haute fréquence de 5 mm

maintenue à  $8 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . L'homogénéité du champ magnétique est maintenue par ajustement du signal donné par le deutérium. Les paramètres d'acquisition du spectromètre sont les suivants : largeur spectrale 25000Hz, angle d'inclinaison,  $90^{\circ}\text{C}$ . taille des données informatiques 32K; intervalle entre deux pulses, 50s ou 80s ; nombre de scans, 420. Une séquence pulse standard (Waltz-16) est utilisée pour découpler les protons (Shaka, Keeler et al. 1983) L'amélioration Overhauser n'a pas été utilisée durant le découplage des protons afin d'éviter l'utilisation des facteurs de correction correspondants. La fréquence de résonance de chaque carbone est comparée à celle du tétramethylsilane. L'écart de fréquence exprimé en p. p. m. (partie pour million) permet d'identifier les molécules selon des données déjà publiées (Horthwarth and Lilley 1978; Canioni, Alger et al. 1983). Sur les spectres RMN, les surfaces de pics sont converties en quantité de métabolites grâce à l'utilisation du standard interne de  $[2-^{13}\text{C}]$  glycine.

## **V. Dosage de l'activité LDH**

La libération de l'enzyme dans le milieu extracellulaire est déterminée dans le milieu d'incubation et comparée à l'activité LDH totale (intracellulaire et extracellulaire). L'activité LDH est déterminée selon la méthode décrite par Bergmeyer et Bernt (Bergmeyer and Bernt 1974).

## **VI. Dosage des métabolites**

Le glucose, le lactate, la glutamine, le glutamate, l'alanine, le pyruvate, l'aspartate, le malate, le citrate et l'ATP sont mesurés par des techniques enzymatiques au spectrophotomètre ou au fluorimètre selon les méthodes de Passonneau et Lowry (Passonneau and Lowry 1993). Le CoA et la somme (acétyl-CoA + CoA) sont déterminés selon la méthode décrite par Michal et Bergmeyer (Michal and Bergmeyer 1985). Le glutathion est dosé selon la méthode mise au point par Griffith (Griffith 1985). Les dosages sont basés sur les réactions d'oxydoréduction des couples de coenzymes NAD/NADH ou NADP/NADPH.

Au spectrophotomètre, la formation ou la disparition de NADH ou de NADPH, mesurée par l'augmentation ou la diminution de l'absorbance à 340 nm, est proportionnelle à la quantité de métabolite à doser.

Les concentrations d'ATP, de pyruvate, d' $\alpha$ -cétoglutarate et de glutathion sont déterminées au fluorimètre par mesure de l'intensité de fluorescence du NADPH ou du NADH : une gamme étalon traitée comme l'échantillon sert de référence.

## **VII. Calculs et analyse statistique**

L'utilisation nette des substrats et la formation des produits sont calculées par la différence entre les quantités totales contenues dans les fioles au départ et en fin d'incubation. Les résultats, exprimés en  $\mu$ mole par g de poids sec et par heure, sont sous forme de moyennes  $\pm$  l'écart type à la moyenne (S.E.M). L'utilisation de formules déjà décrites permet de calculer le transfert du marquage  $^{13}\text{C}$  en une position donnée d'un métabolite à partir du substrat lactate initialement marqué en position C-1, C-2 ou C-3 (Chauvin, Megnin-Chanet et al. 1994; Chauvin, Megnin-Chanet et al. 1997; Vittorelli, Gauthier et al. 2005). Les données sont interprétées grâce à un modèle mathématique déjà publié pour l'alanine (Fouque, Dugelay et al. 1996; Dugelay, Chauvin et al. 1999) . Dans cette étude où le lactate sert de substrat, l'utilisation du lactate par la lactate deshydrogénase remplace celle de l'alanine par l'alanine aminotransférase. L'incorporation du  $^{13}\text{C}$  au sein des métabolites en différentes positions permet de calculer la vitesse de nombreuses réactions : l'utilisation du lactate, le cycle des acides tricarboxyliques, la gluconéogenèse, l'activité de certaines transaminases ainsi que de la pyruvate kinase, la pyruvate deshydrogénase et la pyruvate carboxylase (se référer à la figure 5 de la partie bibliographie pour plus d'informations sur le métabolisme du lactate). En guise d'estimation de l'oxydation du lactate, le bilan carboné est calculé à partir des résultats des dosages enzymatiques en soustrayant de la consommation de lactate, la production d'alanine, de pyruvate, d'aspartate, ainsi que deux fois la production de citrate, d' $\alpha$ -cétoglutarate, de malate, de glutamine, de glutamate et de glucose. La formation de  $^{13}\text{CO}_2$  est la différence entre la consommation de [1- $^{13}\text{C}$ ]-, [2- $^{13}\text{C}$ ]- ou [3- $^{13}\text{C}$ ]lactate et la somme des produits marqués non volatiles calculés à partir

des spectres RMN du [ $^{13}\text{C}$ ]. Les différences statistiques entre les valeurs obtenues en l'absence ou en présence de nitrate d'uranyle 3 mM sont analysées par le test t de Student pour données appariées. Un test ANOVA pour mesures répétées suivi du test de Student-Newman-Keuls permet de mettre en évidence des effets significatifs des concentrations croissantes de nitrate, d'acétate d'uranyle ou de nitrate ou acétate de sodium. Le seuil de significativité est fixé à une valeur de  $P < 0,05$ .

### **VIII. Réactifs**

Les enzymes et les coenzymes proviennent de chez Roche Molecular Biochemicals (Meyland, France). Le lactate L-[1- $^{13}\text{C}$ ], L-[2- $^{13}\text{C}$ ] et L-[3- $^{13}\text{C}$ ] vient de chez Eutiso-Top (St. Aubin, France). Le nitrate d'uranyle hexahydrate provient de chez Fluka Chemie (Buchs, Allemagne). Les autres réactifs utilisés dans cette étude ont été achetés chez Sigma Chemicals (St. Louis, MO U.S.A.).



## RESULTATS

La figure 5 de la partie bibliographie donne une vision d'ensemble du métabolisme du lactate dans les tubes rénaux proximaux humains et murins.

### **I. Expériences préalables.**

La présence de sels d'uranium dès la concentration de 0,6 mM entraîne la formation d'un précipité si du  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  est présent dans le tampon Krebs Henseleit. Des vérifications préalables ont montré que la consommation de lactate et la production de glucose sont inchangées dans les tubules rénaux proximaux de souris métabolisant du lactate 5 mM en présence ou en absence de phosphate dans le milieu d'incubation (n= 6). Des expériences ont ensuite été réalisées avec les concentrations de nitrate d'uranyle suivantes : 0-0,2-0,4-0,6-0,8 mM en absence (n=2) ou en présence (n=2) de phosphate dans le milieu d'incubation. Dans ce cas il n'apparaît pas de précipité excepté pour les concentrations de 0,6 et 0,8 mM en présence de phosphate. Ni la consommation de lactate ni la production de glucose ou la quantité tissulaire d'ATP ne sont modifiées. Cela nous permet de conclure que ces concentrations de nitrate d'uranyle sont insuffisantes pour exercer un effet sur le métabolisme du glucose. Nous devons donc utiliser des concentrations plus élevées de sels d'uranium, soit de l'acétate d'uranyle soit du nitrate d'uranyle. Pour mettre en évidence un rôle éventuel de l'acétate ou du nitrate, des expériences sont menées en parallèle avec de l'acétate de sodium ou du nitrate de sodium. II. Etude dans des tubules rénaux proximaux de souris

### **II. Etude dans des tubules rénaux proximaux de souris**

#### **II.1. Etude de l'effet d'une dose croissante d'acétate de sodium ou d'acétate d'uranyle sur la synthèse de glucose à partir du lactate**

On sait que les acides gras (dont l'acétate) stimulent la gluconéogenèse rénale (Krebs, Speake et al. 1965) c'est pourquoi des expériences préalables ont été réalisées avec de

l'acétate de sodium en comparaison à de l'acétate d'uranyle, afin de distinguer l'effet métabolique éventuel de chacun des ions de l'acétate d'uranyle. Le tableau 1 montre que l'acétate de sodium augmente significativement la production de glucose (+ 44% dès 1,25mM). La consommation de lactate et la quantité tissulaire d'ATP sont inchangées.

[Ac Na <sup>+</sup> ]	Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ )		Quantité intracellulaire ( $\mu\text{mole g}^{-1} \text{ poids sec}$ )
	Lactate	Glucose	ATP
0 mM	-683,2 $\pm$ 111,7	98,0 $\pm$ 20,5	7,1 $\pm$ 1,5
0,625 mM	-761,7 $\pm$ 156,1	122,0 $\pm$ 27,7	7,8 $\pm$ 1,4
1,25 mM	-714,8 $\pm$ 144,8	140,7 $\pm$ 32,7*	7,1 $\pm$ 0,9
2,5 mM	-646,3 $\pm$ 116,1	149,3 $\pm$ 31,6*	7,8 $\pm$ 1,1
5 mM	-663,8 $\pm$ 139,7	141,6 $\pm$ 27,8*	6,9 $\pm$ 1,2

**Tableau 1.** Effet de l'acétate de sodium (Ac Na<sup>+</sup>) 0; 0,625; 1,25; 2,5 et 5 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris. Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes" en présence de lactate 5 mM. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole. g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de quatre expériences. L'analyse de variance (ANOVA répétée) suivie du test de Newman-Keuls est employée pour comparer l'effet des différentes concentrations d'acétate de sodium. (\*  $P < 0,05$ )

Le tableau 2 montre que la production de glucose est augmentée de 23% en présence d'acétate d'uranyle 0,625 mM. Elle est ensuite diminuée de 20 à 49% pour les concentrations d'acétate d'uranyle de 2,5 mM et 5 mM. Une diminution significative de la consommation de lactate est constatée, allant de 36%, en présence d'acétate d'uranyle 1,25 mM à 46% avec l'acétate d'uranyle 5mM. La production d'alanine est inchangée. Les quantités accumulées de pyruvate diminuent de 18% à 49% aux concentrations respectives d'acétate d'uranyle de 2,5 et 5 mM. Le bilan carboné et le pourcentage d'oxydation évalués pour chaque concentration d'acétate d'uranyle montre que celui-ci entraîne une diminution significative de l'oxydation complète du lactate aux concentrations étudiées. La diminution de la consommation du lactate y contribue en grande partie. Dès la dose de 0,625 mM d'acétate d'uranyle, une diminution de la quantité d'ATP est constatée. Celle-ci va de 19% à 55% pour les concentrations croissantes de 0,625 à 5 mM d'acétate d'uranyle. Celui-ci induit également un

effondrement de la quantité de glutathion, de 39% à 58% pour les concentrations précitées d'acétate d'uranyle.

[AU]	Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole g}^{-1}$ poids sec. $\text{h}^{-1}$ )						Quantité intracellulaire ( $\mu\text{mole g}^{-1}$ poids sec)	
	Lactate	Glucose	Alanine	Pyruvate	Bilan carboné	% oxydé	ATP	Glutathion
0 mM	-790,2 $\pm 60,6$	110,0 $\pm 5,8$	24,4 $\pm 5,3$	46,0 $\pm 5,2$	499,8 $\pm 53,6$	63,2	7,3 $\pm 0,7$	6,9 $\pm 1,7$
0,625 mM	-596,0 $\pm 90,3$	134,9 $\pm 12,8^*$	22,8 $\pm 4,3$	50,0 $\pm 4,7$	253,4 $\pm 69,3^*$	42,5	5,9 $\pm 1,0^*$	4,2 $\pm 1,3^*$
1,25 mM	-504,8 $\pm 74,9^*$	117,5 $\pm 11,3$	22,5 $\pm 4,8$	44,3 $\pm 6,0$	203,0 $\pm 56,7^*$	40,2	4,0 $\pm 1,0^*$	4,2 $\pm 1,2^*$
2,5 mM	-495,7 $\pm 78,9^*$	88,2 $\pm 9,8^*$	23,6 $\pm 4,9$	37,8 $\pm 4,5^*$	257,9 $\pm 64,8^*$	52,0	3,3 $\pm 1,0^*$	3,5 $\pm 0,9^*$
5 mM	-423,5 $\pm 63,3^*$	56,6 $\pm 5,4^*$	18,7 $\pm 2,6$	23,4 $\pm 2,7^*$	268,3 $\pm 58,1^*$	63,3	3,3 $\pm 0,9^*$	2,9 $\pm 0,7^*$

**Tableau 2.** Effet de l'acétate d'uranyle (AU) 0; 0,625; 1,25; 2,5 et 5 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris. Les tubules rénaux proximaux sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes" en présence de lactate 5 mM. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de six expériences. L'analyse de variance (ANOVA répétée) suivie du test de Newman-Keuls est employée pour comparer l'effet des différentes concentrations d'acétate d'uranyle (\*  $P < 0,05$ )

## **II.2. Etude de l'effet d'une dose croissante de nitrate de sodium ou de nitrate d'uranyle sur la synthèse de glucose à partir du lactate**

Afin de distinguer les effets de chacun des ions du nitrate d'uranyle, des expériences préalables ont été réalisées avec du nitrate de sodium.

Les résultats du tableau 3 montrent que la présence d'ions nitrate n'exerce d'effet significatif ni sur la consommation rénale de lactate, ni sur la production de glucose, ni sur la quantité tissulaire d'ATP.

[Nit Na <sup>+</sup> ]	Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ )		Quantité intracellulaire ( $\mu\text{mole g}^{-1} \text{ poids sec}$ )
	Lactate	Glucose	ATP
0 mM	-857,7 $\pm$ 37,7	160,0 $\pm$ 1,0	9,3
1,25 mM	-828,3 $\pm$ 79,3	163,0 $\pm$ 4,0	9,1
2,5 mM	-822,5 $\pm$ 32,5	155,5 $\pm$ 3,5	8,9
5 mM	-815,7 $\pm$ 43,7	156,0 $\pm$ 2,0	9,0
10 mM	-815,0 $\pm$ 61,0	149,5 $\pm$ 0,5	8,5

**Tableau 3.** Effet du nitrate de sodium (Nit Na<sup>+</sup>) 0 ; 1,25 ; 2,5 ; 5 et 10 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris. Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes" en présence de lactate 5 mM. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole. g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de deux expériences. L'analyse de variance (ANOVA répétée) suivie du test de Newman-Keuls est employée pour comparer l'effet des différentes concentrations de nitrate de sodium. Pas d'effet significatif.

Il convient de rappeler (cf I) que la production de glucose et la consommation de lactate sont inchangées en présence de 0,625 mM de nitrate d'uranyle (n=4). Le tableau 4 présente les résultats des expériences réalisées en présence de concentrations de nitrate d'uranyle : 0 ; 1,25 ; 2,5 et 5 mM dans le tampon Krebs Henseleit sans phosphate. La consommation de lactate est significativement inhibée de 8% et 24% par rapport à la condition témoin pour les concentrations respectives de 2,5 mM et 5 mM de nitrate d'uranyle. Le nitrate d'uranyle inhibe la production de glucose de façon dose-dépendante, de 6%, 25% et 53% pour les concentrations de 1,25 mM, 2,5 mM et 5 mM respectivement. Pour ces mêmes concentrations la quantité d'ATP dans les tubules chute de 32%, 51% et 72% par rapport à la valeur témoin. Dès la concentration de 1,25 mM, le nitrate d'uranyle augmente de manière significative la production d'alanine (21% d'augmentation). L'accumulation d' $\alpha$ -cétoglutarate est stimulée de façon forte et significative pour les concentrations de 2,5 mM et 5 mM. L'accumulation de citrate et de pyruvate est inchangée. Le bilan carboné et le pourcentage d'oxydation évalués pour chaque concentration de nitrate d'uranyle montrent que celui-ci n'entraîne pas de variation notable de l'oxydation complète du lactate aux concentrations étudiées. Les quantités de CoA, d'acétylCoA et de glutathion diminuent de façon importante en fonction des doses croissantes de nitrate d'uranyle. Ces diminutions vont de 26% à 61%

pour le CoA, de 18% à 53% pour l'acétylCoA et de 32% à 54% pour le glutathion quand les concentrations en nitrate d'uranyle vont de 1,25 mM à 5 mM. Les valeurs obtenues en présence de phosphate dans le milieu sont du même ordre de grandeur que précédemment pour chaque métabolite et chacune des concentrations de nitrate d'uranyle testées (n=2).

Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ )								
[NU]	Lactate	Glucose	Alanine	Pyruvate	$\alpha$ -Céto-glutarate	Glutamate	Glutamine	Citrate
0 mM	-716,3 $\pm 46,7$	107,7 $\pm 5,0$	22,5 $\pm 2,0$	24,6 $\pm 3,9$	5,6 $\pm 1,3$	9,9 $\pm 1,2$	31,9 $\pm 2,7$	9,06 $\pm 1,57$
1,25 mM	-713,2 $\pm 35,6$	101,0 $\pm 3,9^*$	27,2 $\pm 2,7^*$	24,6 $\pm 4,0$	9,5 $\pm 1,5$	11,1 $\pm 1,9$	19,2 $\pm 3,5^*$	9,46 $\pm 1,24$
2,5 mM	-655,5 $\pm 37,5^*$	80,8 $\pm 3,5^*$	28,7 $\pm 2,7^*$	21,8 $\pm 3,7$	14,0 $\pm 2,0^*$	10,7 $\pm 1,4$	13,8 $\pm 2,9^*$	9,24 $\pm 1,39$
5 mM	-543,3 $\pm 38,0^*$	50,6 $\pm 3,4^*$	28,5 $\pm 3,0^*$	19,4 $\pm 3,9$	21,8 $\pm 2,6^*$	7,8 $\pm 1,5^*$	5,3 $\pm 1,5^*$	8,68 $\pm 1,26$
Quantité intracellulaire ( $\mu\text{mole g}^{-1} \text{ poids sec}$ )								
[NU]	Bilan carboné	% oxydé	ATP	Glutathion	CoA	Acétyl-CoA		
0 mM	340,6 $\pm 36$	47,5	10,0 $\pm 0,4$	10,0 $\pm 0,4$	0,234 $\pm 0,022$	0,111 $\pm 0,010$		
1,25 mM	356,2 $\pm 29$	49,9	6,8 $\pm 0,5^*$	6,8 $\pm 0,2^*$	0,172 $\pm 0,016^*$	0,091 $\pm 0,006^*$		
2,5 mM	343,5 $\pm 26,5$	52,4	4,9 $\pm 0,4^*$	6,2 $\pm 0,2^*$	0,153 $\pm 0,012^*$	0,072 $\pm 0,005^*$		
5 mM	307,1 $\pm 27,1$	56,5	2,8 $\pm 0,2^*$	4,6 $\pm 0,2^*$	0,091 $\pm 0,007^*$	0,052 $\pm 0,006^*$		

**Tableau 4.** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 0 ; 1,25 ; 2,5 et 5 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris. Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes" en présence de lactate 5 mM. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole. g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de dix expériences. L'analyse de variance (ANOVA répétée) suivie du test de Newman-Keuls est employée pour comparer l'effet des différentes concentrations de nitrate d'uranyle (\*  $P < 0,05$ ).

### **II.3. Effet du nitrate d'uranyle 3 mM sur la synthèse de glucose à partir du lactate**

Ayant choisi d'utiliser du nitrate d'uranyle à la concentration de 3mM pour l'étude par spectroscopie de RMN, nous avons réalisé quelques vérifications supplémentaires.

Au cours d'expériences préalables (n=4), les tubules rénaux proximaux de souris sont incubés pendant 60 minutes en l'absence ou en présence de nitrate d'uranyle 3 mM. La libération de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu extracellulaire consécutive à une rupture de la membrane plasmique est mesurée en fin d'incubation afin d'estimer le degré de mort cellulaire par nécrose. Dans les conditions testées, les fuites de LDH étant négligeables (elles représentent 5% de l'activité totale, ceci en présence comme en l'absence de nitrate d'uranyle dans le milieu), nous considérons que les cellules des tubules rénaux proximaux restent intactes (tableau 5).

[NU]	activité LDH	
	intracellulaire	extracellulaire
0 mM	634,6 ± 26,2	31,8 ± 4,8
3 mM	607,1 ± 39,6	30,3 ± 4,7

**Tableau 5 :** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur l'activité LDH intracellulaire et extracellulaire dans les tubules rénaux proximaux de souris. Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes" en présence de lactate 5 mM. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole pyruvate formé. g}^{-1} \text{ poids sec. min}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de quatre expériences. Les différences statistiques entre les valeurs en fonction des concentrations de nitrate d'uranyle sont mesurées par le test t de Student pour données paires. (\*  $P < 0,05$ )

Une série de quatre expériences a été réalisée pour s'assurer que l'absence de phosphate dans le tampon d'incubation ne risquait pas de masquer les effets perturbateurs du nitrate d'uranyle. L'incubation des tubules est réalisée dans un tampon Krebs-Henseleit en l'absence ou en présence de nitrate d'uranyle à la concentration de 3 mM, avec ou sans phosphate pour chacune des conditions, cela représente donc quatre séries de résultats apparaissant dans les tableaux 6 et 7. L'absence de phosphate dans le milieu d'incubation ne modifie, ni la synthèse de glucose ni la consommation de lactate (tableau 6), comme

nous l'avons déjà signalé dans la partie I. Il en est de même pour l'accumulation d'alanine, de pyruvate, de glutamine, de glutamate et d' $\alpha$ -cétoglutarate. L'accumulation de citrate est diminuée de 21%. En présence de 3 mM de nitrate d'uranyle, l'addition de phosphate dans le milieu entraîne une précipitation ainsi qu'une augmentation de la consommation de lactate de 9%, de la production de glucose de 21%, tandis que la quantité intracellulaire d'ATP est inchangée (tableau 7). Le nitrate d'uranyle entraîne une diminution significative de la production de glucose, de glutamine, de la consommation de lactate et de la quantité intracellulaire de CoA et d'ATP que ce soit en absence ou en présence de phosphate. Les accumulations de pyruvate et de citrate sont inchangées. En absence de phosphate dans le milieu d'incubation seulement, le nitrate d'uranyle entraîne une variation significative de la quantité de glutathion (-34%), ainsi que de la production d'alanine (+29%), de l'accumulation de glutamate (+33%) et d' $\alpha$ -cétoglutarate (+193%). Aucune de ces variations n'est significative en présence de phosphate.

Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole g}^{-1}$ poids sec. $\text{h}^{-1}$ )								
	Lactate	Glucose	Alanine	Pyruvate	Glutamine	Glutamate	$\alpha$ -Céto-- glutarate	Citrate
<b>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>-698,5</b>	<b>98,6</b>	<b>23,7</b>	<b>15,9</b>	<b>35,3</b>	<b>6,6</b>	<b>4,1</b>	<b>6,8</b>
	$\pm 42,2$	$\pm 7,3$	$\pm 2,0$	$\pm 4,0$	$\pm 1,2$	$\pm 0,9$	$\pm 0,7$	$\pm 2,1$
<b>+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>-713,3</b>	<b>107,7</b>	<b>27,0</b>	<b>17,2</b>	<b>31,9</b>	<b>6,1</b>	<b>1,3</b>	<b>5,4</b>
	$\pm 31,9$	$\pm 8,6$	$\pm 3,4$	$\pm 6,8$	$\pm 3,0$	$\pm 1,1$	$\pm 1,3$	$\pm 1,8^*$
						Quantité intracellulaire ( $\mu\text{mole g}^{-1}$ poids sec)		
	Bilan carboné	% oxydé				ATP	CoA + Acétyl- CoA	Glutathion
<b>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>356,2</b>	<b>50,7</b>				<b>9,7</b>	<b>0,37</b>	<b>11,7</b>
	$\pm 38,0$	$\pm 3,0$				$\pm 0,9$	$\pm 0,04$	$\pm 2,3$
<b>+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>364,2</b>	<b>52,5</b>				<b>10,0</b>	<b>0,39</b>	<b>11,8</b>
	$\pm 24,6$	$\pm 2,1$				$\pm 0,5$	$\pm 0,02$	$\pm 3,2$

**Tableau 6.** Effet de la présence de phosphate KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris. Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes" en présence de lactate 5 mM avec ou sans phosphate dans le milieu. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de quatre expériences. Les différences statistiques entre les valeurs des différents métabolites sont mesurées par le test t de Student pour données paires. (\*  $P < 0,05$ ).

Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole g}^{-1}$ poids sec. $\text{h}^{-1}$ )								
	Lactate	Glucose	Alanine	Pyruvate	Glutamine	Glutamate	$\alpha$ -Céto-glutarate	Citrate
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	-561,6 $\pm 27,7$	62,3 $\pm 6,1$	30,6 $\pm 2,5$	14,2 $\pm 3,3$	19,0 $\pm 1,2$	8,8 $\pm 1,3$	12,0 $\pm 1,7$	8,3 $\pm 1,3$
+ $\text{KH}_2\text{PO}_4$	-612,8 $\pm 23,4^*$	75,4 $\pm 7,2^*$	29,3 $\pm 2,6$	16,4 $\pm 4,4$	20,7 $\pm 1,7$	7,9 $\pm 0,9$	5,0 $\pm 1,1^*$	7,0 $\pm 1,3^*$

		Quantité intracellulaire ( $\mu\text{mole g}^{-1}$ poids sec)			
	Bilan carboné	% oxydé	ATP	CoA + Acétyl-CoA	Glutathion
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	295,8 $\pm 24,7$	50,9 $\pm 1,6$	4,7 $\pm 0,6$	0,220 $\pm 0,038$	7,7 $\pm 1,8$
+ $\text{KH}_2\text{PO}_4$	335,1 $\pm 22,4^*$	54,6 $\pm 2,2^*$	3,7 $\pm 0,2$	0,183 $\pm 0,014$	8,1 $\pm 1,8$

**Tableau 7.** Effet de la présence de phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris en présence de nitrate d'uranyle 3 mM. Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes" en présence de lactate 5 mM avec ou sans phosphate dans le milieu. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de quatre expériences. Les différences statistiques entre les valeurs des différents métabolites sont mesurées par le test t de Student pour données paires (\*  $P < 0,05$ ).

## **II.4. Etude par spectroscopie RMN du carbone 13 de l'effet du nitrate d'uranyle 3 mM chez la souris**

Compte tenu des résultats précédents, une série de six expériences est réalisée à partir de préparations de tubules rénaux proximaux incubés dans un tampon Krebs-Henseleit dépourvu de phosphate. Les tubules sont incubés avec du  $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{-L-lactate}$ , du  $[2\text{-}^{13}\text{C}]\text{-L-lactate}$  ou du  $[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{-L-lactate}$ , en absence ou en présence de nitrate d'uranyle à la concentration de 3 mM afin de déterminer les effets de celui-ci sur les voies métaboliques. La figure 2 donnée en annexe offre une vision du suivi des marquages des différents carbones du lactate au cours de son métabolisme dans les tubules rénaux proximaux humains et murins. Les données de spectroscopie RMN sont combinées avec celles des dosages enzymatiques, ces deux méthodes permettant de quantifier les métabolites. La



consommation de lactate, les productions ou accumulations de métabolites ainsi que les concentrations tissulaires d'ATP et des dérivés du CoA sont rapportées dans le tableau 8. En présence de nitrate d'uranyle, la consommation de lactate diminue de 14%. Les productions de glucose et de glutamine diminuent de 45% et 46% et la concentration intracellulaire d'ATP de 52%. Il y a aussi une diminution significative de l'accumulation de citrate (-28%). Les accumulations d'alanine, d' $\alpha$ -cétoglutarate et de glutamate sont accrues respectivement de 16%, 319% et 42%. Les niveaux intracellulaires de l'acétyl-CoA et du CoA sont diminués de 47% et 58% respectivement.

Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec. $\text{h}^{-1}$ )								
[NU]	Lactate	Glucose	Alanine	Glutamate	Glutamine	Pyruvate	$\alpha$ -Céto-glutarate	Citrate
<b>0 mM</b>	<b>-714,2</b> $\pm 59,9$	<b>90,1</b> $\pm 9,6$	<b>28,7</b> $\pm 3,0$	<b>7,7</b> $\pm 2,0$	<b>26,3</b> $\pm 6,7$	<b>15,7</b> $\pm 3,5$	<b>1,6</b> $\pm 2,3$	<b>11,2</b> $\pm 2,1$
<b>3 mM</b>	<b>-617,0</b> $\pm 46,6^*$	<b>49,7</b> $\pm 4,5^*$	<b>33,4</b> $\pm 2,9^*$	<b>10,9</b> $\pm 3,1^*$	<b>14,3</b> $\pm 5,5^*$	<b>14,0</b> $\pm 3,0$	<b>6,7</b> $\pm 4,2^*$	<b>8,1</b> $\pm 1,9^*$
Quantité intracellulaire ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec)								
[NU]	Bilan carboné	ATP		Glutathion		Acétyl-CoA	CoA	
<b>0 mM</b>	<b>395,9</b> $\pm 36,6$	<b>5,8</b> $\pm 0,6$	<b>9,4</b> $\pm 2,2$	<b>0,15</b> $\pm 0,02$	<b>0,12</b> $\pm 0,02$			
<b>3 mM</b>	<b>390,2</b> $\pm 33,1$	<b>2,8</b> $\pm 0,5^*$	<b>6,0</b> $\pm 1,6^*$	<b>0,08</b> $\pm 0,01^*$	<b>0,05</b> $\pm 0,01^*$			

**Tableau 8.** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du L-lactate 5 mM dans les tubules rénaux proximaux de souris.

Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes". Le poids sec est de  $43,2 \pm 2,4$  mg pour chaque condition d'incubation. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de six expériences. L'analyse statistique entre les deux conditions, absence ou présence de nitrate d'uranyle, est faite avec le test t de Student pour données paires (\*  $P < 0,05$ ). Les données obtenues par spectroscopie RMN du carbone 13 sont dans les tableaux 9 à 12.

Les molécules observées sur les spectres RMN sont le lactate, le glucose, l'alanine, le glutamate, la glutamine, le citrate et l'aspartate (figure 3 en annexe). Le devenir du  $[1-^{13}\text{C}]$ ,  $[2-^{13}\text{C}]$  ou  $[3-^{13}\text{C}]$  lactate au cours de son métabolisme dans les tubules rénaux proximaux de souris est présenté dans la figure 2 en annexe. Après l'action de la lactate

deshydrogénase une partie du [1-<sup>13</sup>C], [2-<sup>13</sup>C] ou [3-<sup>13</sup>C] lactate donne de l'alanine marquée via l'alanine aminotransférase. Une autre partie emprunte la pyruvate deshydrogénase. Il se forme alors de l'acétyl CoA marqué ou non, lequel peut ensuite entrer dans le cycle de Krebs et marquer ou non ses intermédiaires ainsi que le glutamate et la glutamine. Le passage du lactate marqué par la pyruvate carboxylase conduit au marquage de l'oxaloacétate sur l'un de ses trois premiers carbones. Il s'ensuit soit une redistribution de ces marquages sur la molécule d'oxaloacétate, soit un marquage du citrate via la citrate synthase puis un marquage des intermédiaires du cycle de Krebs, de la glutamate et de la glutamine, soit un marquage du PEP via la PEPCK. L'aldolase requérant une molécule de phosphoglyceraldéhyde et une molécule de dihydroxyacétone phosphate disposées symétriquement pour la formation de fructose 1-6-diphosphate, le marquage du PEP sur le carbone 1 conduira, par les voies de la gluconéogenèse à la formation de glucose marqué sur son carbone 4 ou son carbone 3. Pour la même raison, le marquage du PEP sur le carbone 2 conduira à un marquage des carbones 5 ou 2 du glucose. Enfin, le marquage du PEP sur son carbone 3 mène à du glucose marqué sur son carbone 6 ou 1.

Les résultats quantitatifs obtenus par RMN en l'absence ou en la présence de nitrate d'uranyle 3 mM sont présentés dans les tableaux 9, 10 et 11 pour six expériences.

Le tableau 9 donne les valeurs calculées à partir des spectres <sup>13</sup>C RMN obtenus lorsque le substrat est le [1-<sup>13</sup>C] lactate. La consommation de [1-<sup>13</sup>C] lactate est en accord avec les résultats obtenus des mesures enzymatiques et est diminuée de 14% par la présence de nitrate d'uranyle 3 mM. Lorsque le [1-<sup>13</sup>C] lactate (5 mM) est le substrat, le glucose est marqué sur son carbone 3 ( $9,3 \pm 2,15 \mu\text{mole g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ ) et sur son carbone 4 ( $14,7 \pm 2,2 \mu\text{mole. g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ ) en l'absence de nitrate d'uranyle. Les marquages sur ces carbones caractérisent le passage du [1-<sup>13</sup>C] lactate au niveau de pyruvate carboxylase. Le marquage du glucose sur les carbones 3 et 4 est significativement diminué en présence de nitrate d'uranyle (inhibition de 78% et de 67 % respectivement). Le passage par la pyruvate deshydrogénase conduisant à la perte du marquage sous forme de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, les autres carbones du glucose ne sont pas marqués. Les marquages du glutamate et de la glutamine sur leur carbone 1 caractérisent le passage du lactate par la pyruvate

carboxylase puis par la malate déshydrogénase et la citrate synthase. Le marquage de la glutamine sur son carbone C-1 diminue de 44% en présence de nitrate d'uranyle 3 mM. Ceci, en accord avec les résultats obtenus par mesures enzymatiques (tableau 8) indique une baisse du flux des enzymes impliquées. En l'absence et en présence de nitrate d'uranyle 3 mM respectivement, 93 et 89% de l'alanine produite est marqué sur son carbone 1 (tableaux 8 et 9). La production de C-1 alanine indique le passage du [1-<sup>13</sup>C] lactate par la LDH puis l'alanine aminotransférase.

Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec. h <sup>-1</sup> )					
[NU]	Lactate		Glucose		
	enz.	C-1	C-3	C-4	
<b>0 mM</b>	<b>-729,8</b> ± 55,8	<b>-734,8</b> ± 52,2	<b>9,3</b> ± 2,2	<b>14,7</b> ± 2,2	
<b>3 mM</b>	<b>-627,8</b> ± 41,8*	<b>-629,6</b> ± 35,3*	<b>2,0</b> ± 0,7*	<b>4,8</b> ± 0,8*	
[NU]	Alanine	Glutamate	Glutamine	Pyruvate (calculé)	<sup>13</sup> CO <sub>2</sub>
	C-1	C-1	C-1	C-1	
<b>0 mM</b>	<b>26,7</b> ± 3,6	<b>1,9</b> ± 0,5	<b>3,4</b> ± 0,5	<b>12,8</b> ± 2,9	<b>666,0</b> ± 52,8
<b>3 mM</b>	<b>29,6</b> ± 2,4*	<b>2,0</b> ± 0,5	<b>1,9</b> ± 0,4*	<b>11,7</b> ± 2,7*	<b>577,6</b> ± 36,2*

**Tableau 9.** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du [1-<sup>13</sup>C] L-lactate 5 mM dans les tubules rénaux proximaux de souris.

Les tubes sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes". Le poids sec est de  $43,2 \pm 2,4$  mg pour chaque condition d'incubation. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec. h<sup>-1</sup>) sont les moyennes ± S.E.M. de six expériences. L'analyse statistique entre les deux conditions, absence ou présence de nitrate d'uranyle, est faite avec le test t de Student pour données paires. (\*  $P < 0,05$ ). Les résultats des dosages enzymatiques pour les différents métabolites sont dans le tableau 8.

Le tableau 10 donne les valeurs calculées à partir des spectres <sup>13</sup>C RMN obtenus lorsque le substrat est le [2-<sup>13</sup>C] lactate. La consommation de [2-<sup>13</sup>C] lactate mesurée par spectroscopie RMN est en accord avec les résultats des dosages enzymatiques. Le fait que la consommation de [2-<sup>13</sup>C] lactate excède la consommation nette va de pair avec les

productions constatées de [1-<sup>13</sup>C] lactate et de [3-<sup>13</sup>C] lactate. Le nitrate d'uranyle diminue de manière significative la consommation de lactate marqué de 11% et la consommation nette de 15% (tableau 10).

Lorsque le [2-<sup>13</sup>C] lactate (5 mM) est le substrat, le glucose est marqué sur tous ses carbones (tableau 10). Les quantités de glucose marqué sur son carbone 2 et 5 sont équivalentes ainsi que celles de glucose marqué sur son carbone 1 et 6. Ceci est en accord avec le mode de fonctionnement de l'aldolase, car elle assemble de manière symétrique deux trioses phosphate interconvertibles, le phosphoglyceraldéhyde et le dihydroxyacétone phosphate, pour former le fructose 1-6 diphosphate. Le nitrate d'uranyle diminue tous les marquages du glucose, ce qui est en accord avec la diminution de la production totale de glucose constatée par les mesures enzymatiques (tableau 8). La somme des marquages sur les carbones 2 et 5 est de 42 et 18,3  $\mu\text{mole g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$  en l'absence et en la présence de nitrate d'uranyle respectivement et celle des marquages sur les carbones 1 et 6 du glucose est de 32,9 et 18,5  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$  en l'absence et en la présence de nitrate d'uranyle respectivement. Les marquages des carbones 2 et 5 ou 1 et 6 résultent respectivement de la formation de [2-<sup>13</sup>C] oxaloacétate ou de [3-<sup>13</sup>C] oxaloacétate. Ceci a lieu lorsque le [2-<sup>13</sup>C] lactate passe par la pyruvate carboxylase (et la malate deshydrogénase dans le cas du [3-<sup>13</sup>C] oxaloacétate) ou lorsque le [2-<sup>13</sup>C] lactate passe par la pyruvate deshydrogénase suivie de l'entrée du [1-<sup>13</sup>C] acétyl CoA formé dans le cycle de Krebs. La somme des marquages du glucose sur les carbones 3 et 4 est de 28,6 et 15,2  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ , en l'absence et en la présence de nitrate d'uranyle respectivement. Ce marquage du glucose en position 3 et 4 indique un flux important de pyruvate deshydrogénase. En effet, il provient de la gluconéogenèse à partir de [1-<sup>13</sup>C] oxaloacétate, qui peut être formé par exemple après le passage [2-<sup>13</sup>C] lactate par la pyruvate deshydrogénase et un tour de cycle de Krebs. Plus indirectement, une formation de [1-<sup>13</sup>C] oxaloacétate peut aussi avoir lieu par le passage du [2-<sup>13</sup>C] lactate par la pyruvate carboxylase, la malate deshydrogénase et le recyclage du [3-<sup>13</sup>C] oxaloacétate formé dans le cycle de Krebs. Une production d'alanine marquée sur le carbone 2 est constatée. Elle résulte du passage du [2-<sup>13</sup>C] lactate par la LDH et l'alanine aminotransférase. En absence ou en présence de nitrate d'uranyle le marquage sur le

carbone 2 concerne respectivement, 98% ou 97% de l'alanine produite (tableaux 8 et 10) et utilise 4 ou 5% du [2-<sup>13</sup>C] lactate consommé (tableau 10).

Le pyruvate étant une molécule instable, aucun marquage n'est détecté par spectroscopie RMN, car cette molécule est perdue lors de la préparation des échantillons. Le marquage du pyruvate sur chaque carbone est donc recalculé à partir de l'alanine, par exemple pour le carbone 1 de la manière suivante :

[ [1-<sup>13</sup>C] pyruvate] = [ [1-<sup>13</sup>C] alanine] x ([pyruvate] / [alanine]). La répartition du marquage suit celle de l'alanine.

En l'absence comme en présence de nitrate d'uranyle, la glutamine est marquée sur tous ses carbones, principalement sur son carbone 5 (41 et 44% du marquage total), puis plus faiblement sur son carbone 1 (16 et 28% du marquage total), 3 (26 et 19% du marquage total) et 2 (18% et 8% du marquage total). Le marquage sur le carbone 4 est négligeable. Comme la glutamine, le glutamate est marqué sur tous ses carbones. Le marquage du glutamate sur ses carbones 5, 1, 3 et 2 représente 46%, 21%, 19% et 14% du marquage total en l'absence de nitrate d'uranyle. En présence de nitrate d'uranyle ces proportions sont de 50%, 23%, 17% et 10%. Le marquage du carbone 4 est négligeable. Les marquages de la glutamine et du glutamate sur le carbone 5 caractérisent le passage du [2-<sup>13</sup>C] lactate au niveau de pyruvate déshydrogénase alors que celui des carbones 2 et 3 et 4 résulte du passage par la pyruvate carboxylase. La forte proportion de marquage du glutamate et de la glutamine sur les carbones 2 et 3 indique un flux important de pyruvate carboxylase. Le marquage sur le carbone 1 du glutamate et de la glutamine est obtenu à partir du [4-<sup>13</sup>C] oxaloacétate. Celui-ci provient essentiellement du [5-<sup>13</sup>C] α-cétoglutarate et dans une moindre du [2-<sup>13</sup>C] α-cétoglutarate formés après le passage du [2-<sup>13</sup>C] lactate au niveau de pyruvate déshydrogénase puis de la citrate synthase ou de la pyruvate carboxylase puis de la malate deshydrogénase respectivement. Le nitrate d'uranyle diminue de manière significative la somme des marquages de la glutamine (-52%), ce qui est en accord avec la diminution de la production de glutamine mesurée par les dosages enzymatiques (tableau 8).

L'α-cétoglutarate étant une molécule instable, celui-ci est perdu lors de la préparation des échantillons si bien qu'aucun marquage n'est détecté par spectroscopie RMN. Le

marquage de chaque carbone est donc recalculé à partir du glutamate, par exemple pour le carbone 1 de la manière suivante :  $[[1-^{13}\text{C}] \alpha\text{-cétoglutarate}] = [[1-^{13}\text{C}] \text{ glutamate}] \times ([\alpha\text{-cétoglutarate}] / [\text{glutamate}])$ . La répartition des marquages suit celle de la glutamine. En l'absence comme en la présence de nitrate d'uranyle, une production d'aspartate marqué sur le carbone 2 est observée. Celui-ci provient de l'activité de l'aspartate aminotransférase qui transforme une molécule de  $[2-^{13}\text{C}]$  oxaloacétate en  $[2-^{13}\text{C}]$  aspartate tandis que le glutamate est transformé en  $\alpha$ -cétoglutarate.

Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec. $\text{h}^{-1}$ )											
[NU]	Lactate				Glucose						
	enz	C-2	C-1	C-3	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	
<b>0 mM</b>	<b>-689,7</b>	<b>-706,9</b>	<b>9,5</b>	<b>6,9</b>	<b>17,0</b>	<b>18,8</b>	<b>12,3</b>	<b>16,3</b>	<b>23,2</b>	<b>15,9</b>	
	$\pm 71,6$	$\pm 77,2$	$\pm 2,4$	$\pm 3,4$	$\pm 2,8$	$\pm 2,1$	$\pm 1,8$	$\pm 1,7$	$\pm 4,7$	$\pm 1,8$	
<b>3 mM</b>	<b>-588,4</b>	<b>-630,4</b>	<b>8,0</b>	<b>6,0</b>	<b>7,4</b>	<b>8,8</b>	<b>6,6</b>	<b>8,6</b>	<b>9,5</b>	<b>11,1</b>	
	$\pm 66,1^*$	$\pm 66,7^*$	$\pm 0,7$	$\pm 2,4$	$\pm 1,4^*$	$\pm 1,6^*$	$\pm 1,4^*$	$\pm 1,3^*$	$\pm 1,7^*$	$\pm 2,4^*$	
[NU]	Alanine		Glutamate								
	C-2	C-3	C-1	C-2	C-3	C-5					
<b>0 mM</b>	<b>28,1</b>	<b>0,5</b>	<b>4,2</b>	<b>2,8</b>	<b>3,9</b>	<b>9,4</b>					
	$\pm 4,6$	$\pm 0,3$	$\pm 0,4$	$\pm 0,3$	$\pm 0,3$	$\pm 1,2$					
<b>3 mM</b>	<b>32,5</b>	<b>0,1</b>	<b>5,5</b>	<b>2,5</b>	<b>4,1</b>	<b>12,3</b>					
	$\pm 2,8$	$\pm 0,1$	$\pm 0,7$	$\pm 0,8$	$\pm 0,5$	$\pm 1,2$					
[NU]	Glutamine				Pyruvate (calculé)						
	C-1	C-2	C-3	C-5	C-2	C-3					
<b>0 mM</b>	<b>5,1</b>	<b>5,8</b>	<b>8,3</b>	<b>13,1</b>	<b>13,4</b>	<b>0,11</b>					
	$\pm 0,6$	$\pm 0,8$	$\pm 1,0$	$\pm 2,0$	$\pm 3,2$	$\pm 0,07$					
<b>3 mM</b>	<b>4,7</b>	<b>1,4</b>	<b>3,2</b>	<b>7,2</b>	<b>12,7</b>	<b>0,05</b>					
	$\pm 0,9$	$\pm 1,0^*$	$\pm 1,0^*$	$\pm 1,9^*$	$\pm 2,9$	$\pm 0,05$					
[NU]	$\alpha$ -Cétoglutarate (calculé)				Asp	Cit	$^{13}\text{CO}_2$				
	C-1	C-2	C-3	C-5	C-2	C-3					
<b>0 mM</b>	<b>1,57</b>	<b>0,93</b>	<b>1,87</b>	<b>3,27</b>	<b>0,8</b>	<b>505,0</b>					
	$\pm 0,39$	$\pm 0,15$	$\pm 0,29$	$\pm 0,62$	$\pm 0,5$	$\pm 70,4$					
<b>3 mM</b>	<b>2,86</b>	<b>1,16</b>	<b>2,16</b>	<b>6,73</b>	<b>0,4</b>	<b>490,5</b>					
	$\pm 0,67$	$\pm 0,42$	$\pm 0,47^*$	$\pm 1,63^*$	$\pm 0,4$	$\pm 57,9$					

**Tableau 10.** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du  $[2\text{-}^{13}\text{C}]$  L-lactate 5 mM dans les tubules rénaux proximaux de souris.

Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes". Le poids sec est de  $43,2 \pm 2,4$  mg pour chaque condition d'incubation. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de six expériences. L'analyse statistique entre les deux conditions, absence ou présence de nitrate d'uranyle, est faite avec le test t de Student pour données paires. (\*  $P < 0,05$ ). Les résultats des dosages enzymatiques pour les différents métabolites sont dans le tableau 8.

Le tableau 11 donne les valeurs calculées à partir des spectres  $^{13}\text{C}$  RMN obtenus lorsque le substrat est le  $[3-^{13}\text{C}]$  lactate. La consommation de  $[3-^{13}\text{C}]$  lactate est en accord avec les résultats des dosages enzymatiques. Une production de  $[2-^{13}\text{C}]$  lactate et de  $[1-^{13}\text{C}]$  lactate est constatée. Le nitrate d'uranyle diminue de manière significative la consommation de  $[3-^{13}\text{C}]$  lactate de 13% et la consommation nette de 12%.

Lorsque le  $[3-^{13}\text{C}]$  lactate (5 mM) est le substrat, le glucose est marqué sur tous ses carbones (tableau 11). Les quantités de glucose marqué sur son carbone 2 et 5 sont équivalentes ainsi que celles de glucose marqué sur son carbone 1 et 6. Ceci vient de la symétrie d'assemblage par l'aldolase du phosphoglyceraldéhyde et du dihydroxyacétone phosphate au cours de la formation du fructose 1-6 diphosphate. Le marquage du glucose sur les carbones 1, 6, 2 et 5 est diminué de manière significative par rapport aux conditions contrôles par le nitrate d'uranyle de 47%, 53%, 57% et 48% respectivement ce qui est en accord avec la chute de la production de glucose de 45% mesurée par la méthode enzymatique. En l'absence comme en la présence de nitrate d'uranyle, la somme des marquages du glucose sur les carbones 1 et 6 (total de  $72,9 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1} \text{ poids sec} \cdot \text{h}^{-1}$  et de  $36,3 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1} \text{ poids sec} \cdot \text{h}^{-1}$ ) est prépondérante devant la somme des marquages sur les carbones 2 et 5 (total de  $58,2 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1} \text{ poids sec} \cdot \text{h}^{-1}$  et de  $27,7 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1} \text{ poids sec} \cdot \text{h}^{-1}$ ), la somme des marquages sur le carbone 3 et le carbone 4 étant la plus faible (total de  $18 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1} \text{ poids sec} \cdot \text{h}^{-1}$  et de  $8,6 \mu\text{mole} \cdot \text{g}^{-1} \text{ poids sec} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Les marquages des carbones 1 et 6 ou 2 et 5 résultent respectivement résultent de la formation de  $[3-^{13}\text{C}]$  oxaloacétate ou de  $[2-^{13}\text{C}]$  oxaloacétate. Ceci a lieu lorsque le  $[3-^{13}\text{C}]$  lactate passe par la pyruvate carboxylase (et la malate deshydrogénase dans le cas du  $[2-^{13}\text{C}]$  oxaloacétate) ou lorsque le  $[3-^{13}\text{C}]$  lactate passe par la pyruvate deshydrogénase suivie de l'entrée du  $[2-^{13}\text{C}]$  acétyl CoA formé dans le cycle de Krebs. Le marquage du glucose en position 3 et 4 indique le fonctionnement des enzymes du cycle de Krebs. En effet il provient de la gluconéogenèse à partir de  $[1-^{13}\text{C}]$  oxaloacétate, qui peut être formé par exemple après le passage  $[3-^{13}\text{C}]$  lactate par la pyruvate deshydrogénase et deux tours de cycle de Krebs. Une formation de  $[1-^{13}\text{C}]$  oxaloacétate peut aussi avoir lieu par le passage du  $[3-^{13}\text{C}]$  lactate par la pyruvate carboxylase et le recyclage du  $[3-^{13}\text{C}]$  oxaloacétate formé dans le cycle de Krebs.



En absence ou en présence de nitrate d'uranyle, l'alanine est essentiellement marquée sur le carbone 3 (27,9 et 34,3  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ ), dans une moindre mesure sur le carbone 2 (0,672 et 0,980  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ ) et très faiblement ou pas du tout sur le carbone 1 (0,091 et 0  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ ). Le marquage sur le carbone 3 résulte du passage du  $[3\text{-}^{13}\text{C}]$  lactate par la LDH et l'alanine aminotransférase. En absence ou en présence de nitrate d'uranyle, la production d'alanine marquée utilise respectivement 4 ou 6% du  $[3\text{-}^{13}\text{C}]$  lactate consommé. Le marquage sur les carbones 2 et 1 provient de la formation de  $[2\text{-}^{13}\text{C}]$  pyruvate et de  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$  pyruvate. Le marquage du pyruvate est recalculé à partir de l'alanine et sa répartition suit celle de l'alanine. En l'absence comme en présence de nitrate d'uranyle, la glutamine est marquée sur ses carbones 1, 2, 3 et 4, principalement sur son carbone 4 (32 et 38% du marquage total), puis plus faiblement sur son carbone 2 (28 et 32% du marquage total) et 3 (32 et 26% du marquage total), et encore plus faiblement sur son carbone 1 (8% et 4% du marquage total). Le glutamate est marqué dans les mêmes proportions que la glutamine sur ses différents carbones. Le marquage du glutamate sur les carbones 4, 2, 3 et 1 représente 39%, 25%, 24% et 13% du marquage total en l'absence de nitrate d'uranyle. En présence de nitrate d'uranyle ces proportions sont de 40%, 25%, 22% et 11%. Les marquages de la glutamine et du glutamate sur le carbone 4 caractérisent le passage du  $[3\text{-}^{13}\text{C}]$  lactate au niveau de la pyruvate déshydrogénase et indiquent que celui-ci est important. Le marquage des carbones 2 et 3 résulte du passage par la pyruvate carboxylase. Le marquage du carbone 1 et la perte de marquage peuvent impliquer les deux enzymes. Le nitrate d'uranyle diminue de manière significative la quantité de carbones marqués sur la glutamine (-52%) tandis que le marquage des carbones du glutamate est inchangé. Ceci est en accord avec la diminution de la production de glutamine de 46% mesurée par les dosages enzymatiques (tableau 8). Le marquage de l' $\alpha$ -cétoglutarate est recalculé à partir du glutamate. La répartition des marquages suit celle du glutamate. En l'absence comme en la présence de nitrate d'uranyle, une production d'aspartate marqué sur le carbone 3 est observée. Celui-ci provient de l'activité de l'aspartate aminotransférase qui transforme une molécule de  $[3\text{-}^{13}\text{C}]$  oxaloacétate en  $[3\text{-}^{13}\text{C}]$  aspartate tandis que le glutamate est transformé en  $\alpha$ -cétoglutarate.

Utilisation (-) ou accumulation de métabolites ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec. $\text{h}^{-1}$ )										
[NU]	Lactate				Glucose					
	enz	C-3	C-1	C-2	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
0 mM	-723,2 $\pm 56,5$	-706,6 $\pm 55,3$	5,3 $\pm 1,5$	24,6 $\pm 4,4$	31,0 $\pm 4,7$	28,6 $\pm 4,0$	8,0 $\pm 1,6$	10,0 $\pm 2,1$	29,6 $\pm 4,5$	41,9 $\pm 6,5$
3 mM	-634,8 $\pm 39,4^*$	-616,9 $\pm 43,1^*$	7,8 $\pm 2,9^*$	15,7 $\pm 4,3$	16,5 $\pm 3,1^*$	12,3 $\pm 2,2^*$	4,1 $\pm 1,3$	4,5 $\pm 0,6$	15,4 $\pm 2,2^*$	19,8 $\pm 2,9^*$
[NU]	Alanine			Glutamate						
	C-1	C-2	C-3	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5		
0 mM	0,1 $\pm 0,1$	0,7 $\pm 0,5$	27,9 $\pm 3,8$	2,5 $\pm 0,7$	5,0 $\pm 0,6$	4,7 $\pm 1,3$	7,7 $\pm 1,2$	-		
3 mM	-	1,0 $\pm 0,5$	34,3 $\pm 3,2^*$	3,0 $\pm 0,4$	7,0 $\pm 1,6$	6,2 $\pm 1,0$	11,0 $\pm 1,5$	0,4 $\pm 0,2$		
[NU]	Glutamine				Pyruvate (calculé)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-2	C-3				
0 mM	2,7 $\pm 0,2$	9,6 $\pm 1,0$	10,9 $\pm 1,2$	11,1 $\pm 1,4$	0,08 $\pm 0,00$	13,7 $\pm 3,6$				
3 mM	0,7 $\pm 0,5^*$	5,2 $\pm 1,5^*$	4,2 $\pm 1,7^*$	6,1 $\pm 2,2$	0,17 $\pm 0,39^*$	13,3 $\pm 3,0$				
[NU]	$\alpha$ -Cétoglutarate (calculé)				Aspartate		Citrate		$^{13}\text{CO}_2$	
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-2	C-3	C-2	C-3		
0 mM	0,82 $\pm 0,29$	1,83 $\pm 0,46$	1,73 $\pm 0,47$	2,96 $\pm 0,81$	0,2 $\pm 0,2$	0,4 $\pm 0,2$	1,0 $\pm 1,0$	-	444,1 $\pm 63,3$	
3 mM	1,72 $\pm 0,49^*$	3,45 $\pm 0,83$	3,17 $\pm 0,69$	6,04 $\pm 1,41^*$		0,4 $\pm 0,2$	0,2 $\pm 0,2$	0,4 $\pm 0,4$	441,3 $\pm 38,1$	

**Tableau 11.** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du  $[3-^{13}\text{C}]$  L-lactate 5 mM dans les tubules rénaux proximaux de souris.

Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes". Le poids sec est de  $43,2 \pm 2,4$  mg pour chaque condition d'incubation. Les résultats reportés du tableau (en  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de six expériences. L'analyse statistique entre les deux conditions, absence ou présence de nitrate d'uranyle, est faite avec le test t de Student pour données paires. (\*  $P < 0,05$ ). Les résultats des dosages enzymatiques pour les différents métabolites sont dans le tableau 8.

Le tableau 12 montre les valeurs absolues des flux enzymatiques impliqués dans le métabolisme du lactate. Ces valeurs sont issues des résultats obtenus par méthode enzymatique et par spectroscopie RMN combinés, les calculs étant réalisés à l'aide du modèle mathématique déjà décrit pour l'alanine (Dugelay, Chauvin et al. 1999)

Conformément à la diminution de la production de glucose constatée (tableau 8), le nitrate d'uranyle à la concentration de 3 mM entraîne une réduction des flux de trois enzymes clés de la gluconéogenèse (tableau 12) : la pyruvate carboxylase (-32%), la phosphoénolpyruvate-carboxykinase (-36%) et la glucose-6-phosphatase (-45%). Une diminution du flux de la LDH est également constatée (-14%). Les flux de pyruvate deshydrogénase, alanine aminotransférase, pyruvate kinase et ceux des enzymes du cycle de Krebs sont inchangés en présence de nitrate d'uranyle 3 mM. Le flux de pyruvate deshydrogénase est élevé tandis que le rapport pyruvate carboxylase sur pyruvate deshydrogénase est faible. Ceci vient de ce que les tubules rénaux proximaux sont préparés à partir de souris à jeûn. Le fait que le flux de citrate synthase est plus élevé que celui de pyruvate deshydrogénase indique qu'une fraction importante de l'acétyl-CoA requis pour la production de citrate vient de source endogène. Il convient également de souligner que la diminution de la synthèse de glutamine va de pair avec l'augmentation de la quantité accumulée d' $\alpha$ -cétoglutarate.

[NU]	Flux ( $\mu\text{mole d'unité équivalente en C3. g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ )						
	LDH	G6Pase	PDH	PC	PC /PDH	CS	$\alpha$ -CGDH
<b>0 mM</b>	<b>-714,2</b> $\pm 59,9$	<b>180,3</b> $\pm 19,1$	<b>443,3</b> $\pm 42,0$	<b>280,9</b> $\pm 20,6$	<b>0,7</b> $\pm 0,1$	<b>707,9</b> $\pm 67,9$	<b>661,1</b> $\pm 58,3$
<b>3 mM</b>	<b>-617,0</b> $\pm 46,6^*$	<b>99,5</b> $\pm 9,0^*$	<b>431,1</b> $\pm 37,0$	<b>190,1</b> $\pm 14,4^*$	<b>0,5</b> $\pm 0,1^*$	<b>689,9</b> $\pm 75,5$	<b>650,0</b> $\pm 67,4$

[NU]	Flux ( $\mu\text{mole d'unité équivalente en C3. g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ )					
	ICDH	PK	ALAT	PEPCK	MDH	Acétyl-CoA Endogène
<b>0 mM</b>	<b>696,8</b> $\pm 66,8$	<b>53,8</b> $\pm 9,9$	<b>28,2</b> $\pm 4,2$	<b>234,1</b> $\pm 14,9$	<b>661,1</b> $\pm 58,3$	<b>264,7</b> $\pm 55,6$
<b>3 mM</b>	<b>681,8</b> $\pm 74,4$	<b>50,7</b> $\pm 10,5$	<b>32,5</b> $\pm 2,8$	<b>150,1</b> $\pm 9,4^*$	<b>650,0</b> $\pm 67,4$	<b>258,9</b> $\pm 73,8$

**Tableau 12.** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur les flux enzymatiques au cours du métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris.

Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes". Le poids sec est de  $43,2 \pm 2,4$  mg pour chaque condition d'incubation. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole d'unité équivalente en C3. g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de six expériences. L'analyse statistique entre les deux conditions, absence ou présence de nitrate d'uranyle, est faite avec le test t de Student pour données paires. (\*  $P < 0,05$ ) Les résultats des dosages enzymatiques pour les différents métabolites sont dans le tableau 8.  $\alpha$ -KGDH,  $\alpha$ -cétoglutarate deshydrogénase; ALAT, alanine aminotransférase ; CS, citrate synthase ; G6Pase, glucose-6-phosphatase; ICDH, isocitrate deshydrogénase; LDH, lactate deshydrogénase; MDH, malate deshydrogénase; PC, pyruvate carboxylase; PDH, pyruvate deshydrogénase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PK, pyruvate kinase.

### III. Etude dans des tubules rénaux proximaux humains

#### III.1.Effet de doses croissantes de nitrate de sodium sur la synthèse de glucose à partir du lactate

Nous avons réalisé une expérience, elle nous montre qu'il n'y a pas de variation de la consommation de lactate en présence de concentrations croissantes de nitrate de sodium allant de 1,25 à 10 mM. Il en est de même pour la production de glucose et la quantité d'ATP intracellulaire.

[Nit Na <sup>+</sup> ]	Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec. h <sup>-1</sup> )		Quantité intracellulaire ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec)
	Lactate	Glucose	ATP
0 mM	-202,6	54,9	5,5
1,25 mM	-161,2	55,5	6,1
2,5 mM	-189,8	53,7	5,5
5 mM	-127,4	57,9	6,3
10 mM	-168,2	57,3	6,1

**Tableau 13.** Effet du nitrate de sodium (Nit Na<sup>+</sup>) 0 ; 1,25 ; 2,5; 5 et 10 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules proximaux de rein humain. Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes" en présence de lactate 5 mM. Les résultats sont exprimés en ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec. h<sup>-1</sup>).

### **III.2. Effet de doses croissantes de nitrate d'uranyle sur la synthèse de glucose à partir de lactate par des tubules rénaux proximaux humains.**

Les tubules sont incubés en présence de lactate 5 mM et de concentrations croissantes de nitrate d'uranyle (0,625; 1,25; 2,5 et 5 mM). La consommation de lactate est modifiée de façon significative par le nitrate d'uranyle à la concentration de 5 mM (inhibition de 28%). Aux concentrations de 2,5 et 5 mM, la production de glucose est diminuée de 13% et 37%. Le nitrate d'uranyle induit de façon significative et dose dépendante une baisse de la quantité intracellulaire d'ATP allant de 35%, pour 1,25mM de nitrate d'uranyle à 57% pour la concentration de 5mM.

[NU]	Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec. $\text{h}^{-1}$ )				Quantité intracellulaire ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec)
	Lactate	Glucose	Alanine	Pyruvate	ATP
0 mM	-354,1 ± 17,0	79,9 ± 10,3	99,9 ± 11,9	65,0 ± 13,3	8,3 ± 1,3
0,625 mM	-337,0 ± 35,8	76,5 ± 8,4	105,2 ± 13,5	65,6 ± 15,4	8,0 ± 0,8
1,25 mM	-389,7 ± 21,9	80,0 ± 10,7	106,7 ± 14,1	64,1 ± 13,7	5,4 ± 0,6*
2,5 mM	-290,1 ± 46,9	69,9 ± 9,2*	100,2 ± 12,7	64,3 ± 14,8	4,8 ± 1,0*
5 mM	-253,4 ± 25,9*	50,7 ± 5,9*	66,1 ± 19,1	59,0 ± 12,6	3,6 ± 1,2*

**Tableau 14.** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 0 ; 0,625 ; 1,25 ; 2,5 et 5 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules proximaux de rein humain. Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes" en présence de lactate 5 mM. Les résultats reportés dans le tableau (en  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ ) sont les moyennes ± S.E.M. de quatre expériences. L'analyse de variance (ANOVA répétée) suivie du test de Student-Newman-Keuls est employée pour comparer l'effet des différentes concentrations de nitrate d'uranyle (\*  $P < 0,05$ )

### **III.3. Effet de doses croissantes d'acétate de sodium ou d'acétate d'uranyle sur la synthèse de glucose à partir du lactate par des tubules rénaux proximaux humains.**

Les tubules sont incubés en présence de lactate 5 mM et de concentrations croissantes d'acétate de sodium ou d'acétate d'uranyle (0,625; 1,25; 2,5 et 5 mM). Le tableau 15 montre que la présence d'acétate de sodium n'affecte ni la consommation de lactate, ni la production de glucose ni la quantité intracellulaire d'ATP. Le tableau 16 concerne les résultats obtenus en présence d'acétate d'uranyle. Ce dernier, à la concentration de 5mM, entraîne une diminution de 41% de la production de glucose tandis que quelles que soient les concentrations utilisées, la consommation de lactate est inchangée. Une inhibition significative de la production d'alanine est constatée à partir de la concentration 1,25 mM d'acétate d'uranyle. Cette inhibition est de 8%, 13% et 34% pour les concentrations de 1,25 ; 2,5 et 5 mM. La quantité intracellulaire d'ATP diminue aussi en fonction des concentrations d'acétate d'uranyle. Cette inhibition est de 39%, 49% et 61% pour les concentrations de 1,25 mM, 2,5 mM et 5 mM.

[Ac Na <sup>+</sup> ]	Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole. g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ )		Quantité intracellulaire ( $\mu\text{mole. g}^{-1} \text{ poids sec}$ )
	Lactate	Glucose	ATP
0 mM	-583,2 $\pm$ 212,9	75,8 $\pm$ 25,7	8,3 $\pm$ 0,3
0,625 mM	-683,4 $\pm$ 298,3	84,0 $\pm$ 33,1	9,0 $\pm$ 0,8
1,25 mM	-645,9 $\pm$ 290,0	84,4 $\pm$ 33,6	10,3 $\pm$ 1,0
2,5 mM	-479,6 $\pm$ 197,2	81,9 $\pm$ 33,1	9,9 $\pm$ 0,7
5 mM	-672,6 $\pm$ 286,1	86,3 $\pm$ 32,7	8,7 $\pm$ 1,0

**Tableau 15.** Effet de l'acétate de sodium (Ac Na<sup>+</sup>) 0; 0,625; 1,25; 2,5 et 5 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules proximaux de rein humain. Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes" en présence de lactate 5 mM. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole. g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de trois expériences. L'analyse de variance (ANOVA répétée) suivie du test de Student-Newman-Keuls est employée pour comparer l'effet des différentes concentrations d'acétate de sodium. (\*  $P < 0,05$ ).

[AU]	Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec. $\text{h}^{-1}$ )					Quantité intracellulaire ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec)
	Lactate	Glucose	Alanine	Pyruvate	ATP	
0 mM	-482,5 ± 232,0	93,4 ± 30,0	105,7 ± 13,7	62,1 ± 15,7	9,2 ± 1,2	
0,625 mM	-433,5 ± 211,3	88,1 ± 31,2	97,0 ± 12,4	57,9 ± 14,6	7,5 ± 1,4	
1,25 mM	-514,3 ± 298,6	84,9 ± 31,2	97,7 ± 15,1*	58,3 ± 15,0	5,6 ± 1,9*	
2,5 mM	-416,0 ± 242,2	78,4 ± 27,7	92,2 ± 14,2*	56,2 ± 14,8	4,7 ± 1,7*	
5 mM	-402,1 ± 227,8	55,1 ± 19,5*	69,9 ± 10,8*	47,4 ± 13,5*	3,6 ± 1,3*	

**Tableau 16.** Effet de l'acétate d'uranyle (AU) 0; 0,625; 1,25; 2,5 et 5 mM sur le métabolisme du lactate dans les tubules proximaux de rein humain. Les tubules rénaux proximaux sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes" en présence de lactate 5 mM. Les résultats reportés dans le tableau (en  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de trois expériences. L'analyse de variance (ANOVA répétée) suivie du test de Student-Newman-Keuls est employée pour comparer l'effet des différentes concentrations d'acétate d'uranyle (\*  $P < 0,05$ )

### **III.4. Etude par spectroscopie RMN du carbone 13 de l'effet du nitrate d'uranyle 3 mM dans des tubules rénaux proximaux humains**

Les tubules sont incubés soit avec du  $[1-^{13}\text{C}]$ -L-lactate, du  $[2-^{13}\text{C}]$ -L-lactate ou du  $[3-^{13}\text{C}]$ -L-lactate, dans un milieu Krebs-Henseleit dépourvu de phosphate en absence ou en présence de nitrate d'uranyle à la concentration de 3 mM afin de déterminer les effets de celui-ci sur les voies métaboliques. Le tableau 17 montre que la présence de nitrate d'uranyle génère une baisse de 21% de la consommation de lactate et de 39% de la production de glucose. Les accumulations respectives de pyruvate, alanine, aspartate, glutamate, malate et citrate ne sont pas modifiées. L'accumulation d' $\alpha$ -cétoglutarate est augmentée de 42%. On peut voir que les quantités intracellulaires d'ATP, de CoA et de



ses dérivés diminuent. Le bilan carboné pour chaque concentration de nitrate d'uranyle montre que celui-ci n'entraîne pas de variation notable de l'oxydation complète du lactate aux concentrations étudiées.

Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec. $\text{h}^{-1}$ )								
[NU]	Lactate	Glucose	Alanine	Glutamate	Pyruvate	$\alpha$ -Céto-glutarate	Aspartate	Citrate
<b>0 mM</b>	<b>-519,6</b> $\pm 47,4$	<b>104,9</b> $\pm 10,3$	<b>133,0</b> $\pm 21,2$	<b>57,0</b> $\pm 5,9$	<b>19,1</b> $\pm 3,1$	<b>3,6</b> $\pm 0,7$	<b>7,6</b> $\pm 1,6$	<b>23,5</b> $\pm 3,8$
<b>3 mM</b>	<b>-407,9</b> $\pm 34,1^*$	<b>63,6</b> $\pm 4,0^*$	<b>134,1</b> $\pm 21,2$	<b>55,9</b> $\pm 5,3$	<b>19,7</b> $\pm 2,8$	<b>5,1</b> $\pm 0,9^*$	<b>6,3</b> $\pm 1,1$	<b>22,3</b> $\pm 2,5$
Quantité intracellulaire ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec)								
[NU]	Malate	Bilan Carboné	ATP	Glutathion	Acetyl-CoA	CoA		
<b>0 mM</b>	<b>1,8</b> $\pm 1,2$	<b>-21,7</b> $\pm 31,9$	<b>5,7</b> $\pm 0,6$	<b>5,9</b> $\pm 1,2$	<b>0,07</b> $\pm 0,01$	<b>0,09</b> $\pm 0,01$		
<b>3 mM</b>	<b>1,6</b> $\pm 1,0$	<b>-49,2</b> $\pm 34,7$	<b>2,2</b> $\pm 0,4^*$	<b>5,2</b> $\pm 1,1^*$	<b>0,04</b> $\pm 0,01^*$	<b>0,05</b> $\pm 0,01^*$		

**Tableau 17.** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du lactate 5 mM dans les tubules proximaux de rein humain. Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes". Le poids sec est de  $61,4 \pm 4,7$  mg pour chaque condition d'incubation. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de cinq expériences. L'analyse statistique entre les deux conditions, absence ou présence de nitrate d'uranyle, est faite avec le test t de Student pour données paires. (\*  $P < 0,05$ ) Les résultats correspondants obtenus par spectroscopie RMN du carbone 13 sont dans les tableaux 18 à 20.

Les molécules observées sur les spectres RMN sont le lactate, le glucose, l'alanine, le glutamate, le citrate, l'aspartate alors que d'autres produits tels que le l' $\alpha$ -céto-glutarate et le pyruvate ne sont pas observés sur ces spectres RMN. Les quantifications des pics obtenus par RMN en l'absence ou en présence de nitrate d'uranyle 3 mM sont exposées dans les tableaux 18, 19 et 20 pour cinq expériences.

Le tableau 18 donne les valeurs calculées à partir des spectres  $^{13}\text{C}$  RMN obtenus lorsque le substrat est le  $[1-^{13}\text{C}]$  lactate. La consommation de  $[1-^{13}\text{C}]$  lactate est en accord avec les résultats obtenus par la méthode enzymatique et est diminuée de 20% par la présence de nitrate d'uranyle 3 mM.

Lorsque le [1-<sup>13</sup>C] lactate (5 mM) est le substrat, le marquage du glucose sur son carbone 3 et 4 caractérise le passage du [1-<sup>13</sup>C] lactate au niveau de la pyruvate carboxylase. La somme des marquages est significativement diminuée en présence de nitrate d'uranyle (inhibition de 43%), ce qui est en accord avec la diminution de glucose observée par la méthode enzymatique. Le passage par la pyruvate déshydrogénase conduisant à la perte du marquage sous forme de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, les autres carbone du glucose ne sont pas marqués. Le marquage du glutamate sur le carbone 1 caractérise le passage du lactate par la pyruvate carboxylase puis par la MDH et la citrate synthase. Ce marquage est inchangé par le nitrate d'uranyle 3 mM, tout comme la production de glutamate, tels que le montrent les résultats obtenus par la méthode enzymatique. En absence ou en présence de nitrate d'uranyle 3 mM, le marquage de l'alanine produite sur son carbone 1 montre le passage du [1-<sup>13</sup>C] lactate par l'alanine aminotransférase.

Utilisation (-) ou accumulation de métabolite (µmole. g <sup>-1</sup> poids sec. h <sup>-1</sup> )					
[NU]	Lactate		Glucose		
	enz	C-1	C-3	C-4	
<b>0 mM</b>	<b>-506,4</b> ± 46,8	<b>-564,6</b> ± 61,1	<b>7,6</b> ± 2,0	<b>13,4</b> ± 1,2	
<b>3 mM</b>	<b>-394,1</b> ± 35,3*	<b>-452,1</b> ± 54,8*	<b>3,9</b> ± 1,0	<b>5,1</b> ± 0,7*	
[NU]	Alanine C-1	Glutamate C-1	Pyruvate (calculé) C-1	α-Céto- glutarate C-1	<sup>13</sup> CO <sub>2</sub>
<b>0 mM</b>	<b>98,0</b> ± 23,2	<b>12,4</b> ± 8,4	<b>13,8</b> ± 2,8	<b>0,5</b> ± 0,5	<b>432,7</b> ± 55,8
<b>3 mM</b>	<b>74,5</b> ± 19,0	<b>11,4</b> ± 8,4	<b>11,2</b> ± 2,9	<b>0,7</b> ± 0,4	<b>356,5</b> ± 55,4

**Tableau 18.** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du [1-<sup>13</sup>C] L-lactate 3 mM dans les tubules proximaux de rein humain.

Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes". Le poids sec est de 61,4 ± 4,7 mg pour chaque condition d'incubation. Les résultats du tableau (en µmole. g<sup>-1</sup> poids sec. h<sup>-1</sup>) sont les moyennes ± S.E.M. de cinq expériences. L'analyse statistique entre les deux conditions, absence ou présence de nitrate d'uranyle, est faite avec le test t de Student pour données paires. (\* *P* < 0,05) Les résultats des dosages enzymatiques pour les différents métabolites sont dans le tableau 17.

Le tableau 19 donne les valeurs calculées à partir des spectres  $^{13}\text{C}$  RMN obtenus lorsque le substrat est le  $[2-^{13}\text{C}]$  lactate. La consommation de  $[2-^{13}\text{C}]$  lactate est en accord avec les résultats des dosages enzymatiques. Le fait que la consommation de  $[2-^{13}\text{C}]$  lactate excède la consommation nette va de pair avec la production constatée de  $[1-^{13}\text{C}]$  lactate et de  $[3-^{13}\text{C}]$  lactate. Le nitrate d'uranyle diminue de manière significative la consommation de lactate marqué de 19% et la consommation nette de 21%.

Lorsque le  $[2-^{13}\text{C}]$  lactate (5 mM) est le substrat, le glucose est marqué sur tous ses carbones. En raison de l'activité de l'aldolase, l'une des enzymes de la gluconéogenèse, les marquages du glucose sur les carbones 1 et 6 sont équivalents, tout comme ceux des carbones 2 et 5 ou encore des carbones 3 et 4. En absence de nitrate d'uranyle, le glucose est principalement marqué sur son carbone 5 et 2, la somme des marquages étant de 38,7  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$  et sur son carbone 1 et 6 (31,4  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$  au total). Le glucose est plus faiblement marqué sur les carbones 3 et 4 (13,8  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$  au total), ceci en absence de nitrate d'uranyle. Le marquage du glucose en position 3 et 4 montre l'activité de la citrate synthase et de toutes les enzymes du cycle de Krebs et de la gluconéogenèse. Le bien moindre marquage en position 3 et 4 suggère que le flux de la pyruvate deshydrogénase est limité car le marquage des autres carbones ne nécessite pas forcément l'entrée du lactate dans le cycle de Krebs. Le nitrate d'uranyle ne modifie pas la répartition des marquages, il entraîne une diminution significative du marquage des carbones 1, 6, 2 et 5 (inhibition de 48%, 51%, 51% et 47%).

Le marquage de l'alanine montre l'activité de l'alanine aminotransférase. Conformément aux résultats des dosages enzymatiques, le nitrate d'uranyle n'exerce pas d'effet significatif sur le marquage de l'alanine. Le marquage du pyruvate, recalculé à partir de l'alanine marquée, suit la même répartition que pour celle-ci, le nitrate d'uranyle n'ayant également aucun effet.

En l'absence comme en présence de celui-ci, le glutamate est marqué sur tous ses carbones. Le marquage du glutamate sur ses carbones 5, 3, 2 et 1 représente 45%, 22%, 19% et 12% du marquage total en l'absence de nitrate d'uranyle. Le marquage du carbone 4 est négligeable. Le marquage du glutamate sur le carbone 5 caractérise le passage du  $[2-^{13}\text{C}]$  lactate au niveau de la pyruvate déshydrogénase, la formation de  $[1-^{13}\text{C}]$  acétyl CoA puis le passage de celui-ci par la citrate synthase. Le  $[5-^{13}\text{C}]$  glutamate

représente seulement 30% du glutamate mesuré par la méthode enzymatique, ce qui indique une production d'acétylCoA d'origine endogène. Les marquages des autres carbones du glutamate impliquent celui de l'oxaloacétate puis le passage de l'oxaloacétate marqué par la citrate synthase. En présence de nitrate d'uranyle, la quantité de marquage et leur distribution sont inchangées, ce qui confirme l'absence d'effet du toxique sur la production de glutamate constatée par la méthode enzymatique. Le marquage de l' $\alpha$ -cétoglutarate est recalculé à partir de celui du glutamate et suit la même distribution. Il augmente de manière significative en présence de nitrate d'uranyle, ceci conformément aux résultats des dosages enzymatiques.

L'apparition sur le spectre RMN de [3- $^{13}\text{C}$ ] citrate caractérise le passage du [2- $^{13}\text{C}$ ] lactate par la pyruvate carboxylase. Le nitrate d'uranyle 3 mM entraîne une diminution significative de ce marquage (-51%) alors que la quantité totale de citrate est inchangée.

La présence d'aspartate marqué sur le carbone 2 provient de l'activité de l'aspartate aminotransférase qui transforme une molécule de [2- $^{13}\text{C}$ ] oxaloacétate en [2- $^{13}\text{C}$ ] aspartate tandis que le glutamate est transformé en  $\alpha$ -cétoglutarate. Le nitrate d'uranyle n'exerce aucun effet significatif sur ce marquage ni sur la quantité totale d'aspartate mesurée par la méthode enzymatique.

Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec. $\text{h}^{-1}$ )											
[NU]	Lactate				Glucose						
	enz	C-2	C-1	C-3	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	
<b>0 mM</b>	<b>-517,8</b>	<b>-562,2</b>	<b>2,1</b>	<b>5,8</b>	<b>14,7</b>	<b>19,0</b>	<b>6,7</b>	<b>7,1</b>	<b>19,7</b>	<b>16,7</b>	
	$\pm 47,5$	$\pm 30,3$	$\pm 0,8$	$\pm 2,0$	$\pm 1,9$	$\pm 2,7$	$\pm 0,8$	$\pm 1,0$	$\pm 2,5$	$\pm 2,1$	
<b>3 mM</b>	<b>-411,5</b>	<b>-454,0</b>	<b>3,9</b>	<b>3,6</b>	<b>7,7</b>	<b>9,3</b>	<b>4,1</b>	<b>5,9</b>	<b>10,4</b>	<b>8,1</b>	
	$\pm 32,1^*$	$\pm 26,8^*$	$\pm 1,2$	$\pm 0,9$	$\pm 1,0^*$	$\pm 1,1^*$	$\pm 0,3$	$\pm 0,1$	$\pm 1,2^*$	$\pm 1,0^*$	
[NU]	Alanine		Glutamate								
	C-2	C-3	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5				
<b>0 mM</b>	<b>96,7</b>	<b>2,4</b>	<b>4,6</b>	<b>7,1</b>	<b>8,2</b>	<b>0,5</b>	<b>17,0</b>				
	$\pm 22,0$	$\pm 0,7$	$\pm 0,4$	$\pm 0,9$	$\pm 0,9$	$\pm 0,2$	$\pm 1,9$				
<b>3 mM</b>	<b>108,0</b>	<b>2,8</b>	<b>5,2</b>	<b>5,6</b>	<b>6,6</b>	<b>0,4</b>	<b>17,9</b>				
	$\pm 22,3$	$\pm 0,3$	$\pm 1,6$	$\pm 0,5$	$\pm 0,6$	$\pm 0,3$	$\pm 1,3$				
[NU]	Pyruvate (calculé)		$\alpha$ -Cétoglutarate (calculé)								
	C-2	C-3	C-1	C-2	C-3	C-5					
<b>0 mM</b>	<b>13,7</b>	<b>0,32</b>	<b>0,30</b>	<b>0,48</b>	<b>0,55</b>	<b>1,13</b>					
	$\pm 2,7$	$\pm 0,10$	$\pm 0,06$	$\pm 0,11$	$\pm 0,13$	$\pm 0,26$					
<b>3 mM</b>	<b>15,7</b>	<b>0,42</b>	<b>0,49</b>	<b>0,49</b>	<b>0,56</b>	<b>1,55</b>					
	$\pm 2,9$	$\pm 0,05$	$\pm 0,17$	$\pm 0,07$	$\pm 0,07$	$\pm 0,22^*$					
[NU]	Asp	Cit	$^{13}\text{CO}_2$								
	C-2	C-3									
<b>0 mM</b>	<b>1,3</b>	<b>1,8</b>	<b>330,8</b>								
	$\pm 0,7$	$\pm 0,3$	$\pm 40,5$								
<b>3 mM</b>	<b>0,2</b>	<b>0,9</b>	<b>253,4</b>								
	$\pm 0,2$	$\pm 0,4^*$	$\pm 28,4$								

**Tableau 19.** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du  $[2\text{-}^{13}\text{C}]$  L-lactate 3 mM dans les tubules proximaux de rein humain.

Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes". Le poids sec est de  $61,4 \pm 4,7$  mg pour chaque condition d'incubation. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de cinq expériences. L'analyse statistique entre les deux conditions, absence ou présence de nitrate d'uranyle, est faite avec le test t de Student pour données paires. (\*  $P < 0,05$ ) Les résultats des dosages enzymatiques pour les différents métabolites sont dans le tableau 17. Asp = Aspartate, Cit = Citrate.

Le tableau 20 donne les valeurs calculées à partir des spectres  $^{13}\text{C}$  RMN obtenus lorsque le substrat est le  $[3-^{13}\text{C}]$  lactate. La consommation de  $[3-^{13}\text{C}]$  lactate mesurée par spectroscopie RMN est en accord avec les résultats des dosages enzymatiques. Une production de  $[2-^{13}\text{C}]$  lactate et de  $[1-^{13}\text{C}]$  lactate est constatée. Le nitrate d'uranyle diminue de manière significative la consommation de lactate marqué sur le carbone 3 (-24%) et la consommation nette (-22%) ainsi que la production de  $[2-^{13}\text{C}]$  lactate (-35%). Lorsque le  $[3-^{13}\text{C}]$  lactate (5 mM) est le substrat, le glucose est marqué sur tous ses carbones. Comme précédemment, les marquages du glucose sur les carbones 1 et 6 sont équivalents, tout comme ceux des carbones 2 et 5. De même, le moindre marquage en position 3 et 4 suggère que le flux de la pyruvate deshydrogénase est limité. Le marquage du glucose sur les carbones 1, 6, 2 et 5 est diminué de manière significative par rapport aux conditions contrôles de 52%, 51%, 53% et 49% respectivement ce qui est en accord avec la chute de la production de glucose mesurée par la méthode enzymatique. La répartition des marquages est inchangée.

L'alanine et le pyruvate (recalculés à partir de l'alanine) sont essentiellement marqués sur le carbone 3 qui représente 72% et 80% du marquage total en l'absence et en présence de nitrate d'uranyle. L'absence d'effet du nitrate d'uranyle sur le marquage du carbone 3 est en accord avec le fait que l'accumulation d'alanine et de pyruvate reste inchangée, comme le montrent les dosages enzymatiques. Cependant, l'accumulation de  $[2-^{13}\text{C}]$  alanine et de  $[2-^{13}\text{C}]$  pyruvate est significativement diminuée (inhibition de 50% et de 52% respectivement) tout comme celle du  $[2-^{13}\text{C}]$  lactate. Le marquage du carbone 2 caractérise le passage du  $[3-^{13}\text{C}]$  lactate par la pyruvate carboxylase, la MDH, la PEPCK et la PK. Le glutamate détecté par spectroscopie RMN est marqué sur tous ses carbones. Le marquage du glutamate sur ses carbones 4, 2, 3, 1 et 5 représente 42%, 30%, 19%, 7% et 1% de son marquage total en l'absence de nitrate d'uranyle. Comme précédemment, le marquage du glutamate sur le carbone 4 indique que la pyruvate deshydrogénase fonctionne. Le nitrate d'uranyle n'a aucun effet significatif ni sur la quantité, ni sur la répartition des marquages. Il convient de faire remarquer que l'accumulation totale de glutamate mesurée par la méthode enzymatique est inchangée, et que ceci va dans le même sens.

Le marquage de l' $\alpha$ -cétoglutarate est recalculé à partir du glutamate marqué et suit la même répartition. Le nitrate d'uranyle augmente le marquage total de manière significative, ce qui est en accord avec l'augmentation de l'accumulation d' $\alpha$ -cétoglutarate constatée précédemment.

En l'absence comme en la présence de nitrate d'uranyle, une production d'aspartate et de citrate marqués est observée. Le nitrate d'uranyle n'exerce aucun effet significatif sur le marquage. Les dosages enzymatiques ne montrent également aucune variation des quantités accumulées.

Le tableau 21 montre les valeurs des flux enzymatiques du métabolisme du lactate. Ces valeurs ont été calculées en combinant les résultats obtenus par les dosages enzymatiques et la spectroscopie RMN à l'aide du même modèle mathématique que pour les tubules de souris.

Le nitrate d'uranyle à la concentration de 3 mM entraîne une réduction des flux de la lactate déshydrogénase (-20%) ainsi que de trois enzymes clés de la gluconéogenèse : la pyruvate carboxylase (-27%), la PEPCK (-35%) et la glucose-6-phosphatase (-39%). Les flux par la pyruvate deshydrogénase, l'alanine aminotransférase, la pyruvate kinase et les flux des enzymes du cycle de Krebs sont inchangés en présence de nitrate d'uranyle. En accord avec le fait que les tubules sont préparés à partir de patients à jeûn, le flux de la PDH est plus faible que celui de la pyruvate carboxylase et le rapport PC/PDH est plus important que chez la souris (tableaux 12 et 21). Enfin, le fait que le flux de la citrate synthase est plus important que celui de la pyruvate deshydrogénase montre qu'une fraction importante de l'acétyl-CoA vient de source endogène.

Utilisation (-) ou accumulation de métabolite ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ poids sec. $\text{h}^{-1}$ )										
[NU]	Lactate				Glucose					
	enz	C-3	C-1	C-2	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
0 mM	-534,5 $\pm 50,7$	-495,9 $\pm 49,1$	0,7 $\pm 0,3$	13,2 $\pm 2,4$	25,3 $\pm 3,1$	22,9 $\pm 2,8$	4,4 $\pm 0,8$	5,2 $\pm 1,3$	22,9 $\pm 3,2$	28,2 $\pm 2,8$
3 mM	-418,2 $\pm 39,1^*$	-379,2 $\pm 25,3^*$	1,1 $\pm 0,4$	8,6 $\pm 1,0^*$	12,1 $\pm 1,5^*$	10,7 $\pm 1,6^*$	2,4 $\pm 1,1$	2,6 $\pm 0,8$	11,6 $\pm 1,6^*$	13,9 $\pm 1,3^*$
[NU]	Alanine			Glutamate						
	C-1	C-2	C-3	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5		
0 mM	0,4 $\pm 0,1$	4,2 $\pm 1,0$	95,8 $\pm 22,2$	3,2 $\pm 0,7$	12,9 $\pm 1,7$	8,3 $\pm 0,6$	18,2 $\pm 1,6$	0,5 $\pm 0,2$		
3 mM	0,4 $\pm 0,1$	2,1 $\pm 0,8^*$	107,7 $\pm 20,4$	2,7 $\pm 0,4$	11,6 $\pm 1,3$	8,3 $\pm 0,7$	18,5 $\pm 0,9$	2,5 $\pm 2,4$		
[NU]	Pyruvate (calculé)			$\alpha$ -Cétoglutarate (calculé)						
	C-1	C-2	C-3	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5		
0 mM	0,06 $\pm 0,02$	0,60 $\pm 0,15$	13,6 $\pm 2,8$	0,20 $\pm 0,05$	0,86 $\pm 0,22$	0,55 $\pm 0,12$	1,20 $\pm 0,28$	0,03 $\pm 0,02$		
3 mM	0,06 $\pm 0,02$	0,31 $\pm 0,11^*$	15,8 $\pm 2,7$	0,24 $\pm 0,05$	1,06 $\pm 0,25$	0,72 $\pm 0,10$	1,64 $\pm 0,29^*$	0,26 $\pm 0,24^*$		
[NU]	Aspartate		Citrate		$^{13}\text{CO}_2$					
	C-2	C-3	C-2	C-3						
0 mM	1,4 $\pm 0,1$	1,6 $\pm 0,2$	1,2 $\pm 0,7$	0,7 $\pm 0,4$	224,7 $\pm 38,4$					
3 mM	0,7 $\pm 0,3$	0,7 $\pm 0,3$	0,8 $\pm 0,6$	0,4 $\pm 0,2$	159,8 $\pm 20,2$					

**Tableau 20.** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur le métabolisme du  $[3\text{-}^{13}\text{C}]$  L-lactate 3 mM dans les tubules proximaux de rein humain.

Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes". Le poids sec est de  $61,4 \pm 4,7$  mg pour chaque condition d'incubation. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de cinq expériences. L'analyse statistique entre les deux conditions, absence ou présence de nitrate d'uranyle, est faite avec le test t de Student pour données paires. (\*  $P < 0,05$ ) Les résultats des dosages enzymatiques pour les différents métabolites sont dans le tableau 17.



[NU]	Flux ( $\mu\text{mole d'unité équivalente en C3. g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ )						
	LDH	G6Pase	PDH	PC	PC /PDH	CS	$\alpha$ -CGDH
<b>0 mM</b>	<b>-535,5</b> $\pm 40,6$	<b>209,8</b> $\pm 20,6$	<b>121,5</b> $\pm 21,0$	<b>345,9</b> $\pm 34,6$	<b>3,4</b> $\pm 1,0$	<b>321,6</b> $\pm 55,6$	<b>237,5</b> $\pm 58,0$
<b>3 mM</b>	<b>-429,3</b> $\pm 30,7^*$	<b>127,2</b> $\pm 8,0^*$	<b>98,8</b> $\pm 24,0$	<b>253,7</b> $\pm 18,0^*$	<b>3,1</b> $\pm 0,6$	<b>250,2</b> $\pm 65,8$	<b>167,0</b> $\pm 65,1$

[NU]	Flux ( $\mu\text{mole d'unité équivalente en C3. g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ )					
	ICDH	PK	ALAT	PEPCK	MDH	Acétyl-CoA endogène
<b>0 mM</b>	<b>298,1</b> $\pm 57,6$	<b>50,2</b> $\pm 11,3$	<b>99,2</b> $\pm 22,6$	<b>260,0</b> $\pm 29,7$	<b>235,7</b> $\pm 59,0$	<b>200,1</b> $\pm 38,5$
<b>3 mM</b>	<b>227,9</b> $\pm 65,5$	<b>41,7</b> $\pm 7,5$	<b>98,9</b> $\pm 12,3$	<b>168,8</b> $\pm 13,4^*$	<b>165,4</b> $\pm 65,7$	<b>151,4</b> $\pm 43,6$

**Tableau 21.** Effet du nitrate d'uranyle (NU) 3 mM sur les flux enzymatiques au cours du métabolisme du lactate dans les tubules proximaux de rein humain.

Les tubules sont incubés 1h comme décrit dans la partie "matériel et méthodes". Le poids sec est de  $61,4 \pm 4,7$  mg pour chaque condition d'incubation. Les résultats du tableau (en  $\mu\text{mole d'unité équivalente en C3. g}^{-1} \text{ poids sec. h}^{-1}$ ) sont les moyennes  $\pm$  S.E.M. de cinq expériences. L'analyse statistique entre les deux conditions, absence ou présence de nitrate d'uranyle, est faite avec le test t de Student pour données paires. (\*  $P < 0,05$ ) Les résultats des dosages enzymatiques pour les différents métabolites sont dans le tableau 17.  $\alpha$ -KGDH,  $\alpha$ -cétoglutarate deshydrogénase; ALAT, alanine aminotransférase ; CS, citrate synthase ; G6Pase, glucose-6-phosphatase; ICDH, isocitrate deshydrogénase; LDH, lactate deshydrogénase; MDH, malate deshydrogénase; PC, pyruvate carboxylase; PDH, pyruvate deshydrogénase; PEPCK, phosphoénolpyruvate carboxykinase; PK, pyruvate kinase.

## DISCUSSION

### **I. Choix du modèle expérimental**

#### **I.1. Les espèces**

Les espèces utilisées sont l'homme et la souris. La souris est l'espèce animale choisie pour notre système d'essai en raison de son faible coût et de ses similitudes avec l'homme sur le plan génétique, physiologique et pathologique. Ce choix est justifié par nos résultats, car les tubules rénaux proximaux des deux espèces (l'homme et la souris) présentent des sensibilités similaires aux effets étudiés du nitrate d'uranyle.

L'utilisation de lots de souris consanguines swiss permet de diminuer les variabilités interindividuelles. Cependant, en raison de leur petite taille, les expérimentations nécessitent des effectifs importants.

#### ➤ **Etat nutritionnel**

Nos expériences avec la souris sont réalisées à partir d'animaux nourris, conformément aux conditions naturelles d'exposition à l'uranium. Il convient de remarquer que les seuls tubules rénaux proximaux humains disponibles sont issus de patients à jeûn. Cette différence nutritionnelle pourrait mettre en cause la pertinence d'une comparaison des résultats obtenus dans l'une et l'autre espèce. Cependant, le seul effet du jeûne chez la souris est d'augmenter la gluconéogenèse rénale au dépend de l'oxydation du substrat, ceci sans altérer sa consommation (Conjard, Brun et al. 2002). Puisque le nitrate d'uranyle diminue la gluconéogenèse rénale et la consommation du lactate sans variation de son oxydation, et étant donné que la gluconéogenèse demeure élevée dans les tubules rénaux des souris à l'état nourri, on peut considérer que les résultats sont comparables chez l'homme et la souris.

## **I.2. Les tubules proximaux isolés de rein**

Le choix d'un modèle *in vitro* est le seul possible chez l'homme et il permet d'éviter la souffrance animale chez la souris. De plus, les protocoles d'intoxication *in vivo* des animaux nécessiteraient une animalerie agréée dans le cas de l'uranium. Les tubules proximaux isolés présentent de nombreux avantages dans l'étude de la néphrotoxicité. Cette technique permet d'obtenir des préparations relativement pures tout en conservant l'architecture de l'épithélium tubulaire. De plus, ce modèle permet de contrôler précisément les concentrations du toxique, ceci malgré les mécanismes de réabsorption tubulaire dans les premiers millimètres du tube proximal. L'effet de plusieurs doses peut être étudié sur une même préparation. La lumière tubulaire est maintenue ouverte, ce qui permet l'accès des substrats et du toxique aux cellules à la fois par le pôle luminal et le pôle basal. Les suspensions sont fonctionnellement stables, présentent des récepteurs membranaires intacts, et sont le siège d'un métabolisme actif. Chez l'homme comme chez la souris, ce modèle de toxicité *in vitro* a ses limites. Tout d'abord, la fonction rénale ne peut être maintenue que temporairement (pas plus de quelques heures), ce qui limite la durée d'exposition à l'uranium. De plus, les facteurs hormonaux, nerveux et sanguins ne sont pas pris en compte. Les tubules proximaux sont incubés non pas en présence de plusieurs, mais d'un seul substrat, le lactate, à une concentration dépassant les concentrations physiologiques habituelles. En outre, les tubules proximaux isolés présentent des particularités métaboliques dues à la technique de préparation. En effet, ils sont initialement chargés en acides aminés du fait de la dégradation des protéines du tissu interstitiel lors de l'action de la collagénase en amont de la préparation. La présence de fortes concentrations de substrats élève les besoins énergétiques de la cellule nécessités pour leur transport, et peut causer une dépolarisation cellulaire du fait du co-transport de sodium. Ceci peut influencer la concentration intracellulaire de bicarbonate et avoir un effet sur le pH. Enfin, l'apport d'une forte concentration de lactate à la suspension de tubules modifie transitoirement dans la cellule l'équilibre thermodynamique de la réaction catalysée par la lactate deshydrogénase. Celle-ci maintient un rapport constant de lactate et de pyruvate de dix pour un. Le retour à l'équilibre entraîne une génération rapide et importante de pyruvate et de NADH.

Celui-ci pourra devenir transitoirement la principale source d'électrons pour la chaîne respiratoire. L'utilisation normale de substrats et le flux dans les voies métaboliques pourront donc être transitoirement modifiés.

### **I.3. Absence ou présence de précipité dans le milieu d'incubation**

Plusieurs études ont montré qu'à partir de concentrations allant de 200  $\mu\text{M}$  à 600  $\mu\text{M}$ , l'uranium n'est pas soluble dans des milieux de culture contenant du phosphate (Mirto, Henge-Napoli et al. 1999; Carriere, Thiebault et al. 2006; Carriere, Proux et al. 2008). L'analyse du précipité par ICP-MS montre qu'il contient de l'oxygène, du phosphate et de l'uranium (Carriere, Thiebault et al. 2006). La présence de phosphate dans le milieu Krebs-Henseleit correspond aux conditions physiologiques mais un précipité de couleur jaune se forme dès la concentration de 400 à 800  $\mu\text{M}$  de nitrate d'uranyle. Sans une analyse qualitative et quantitative du précipité observé dans ce travail, la répartition de l'uranium entre des formes solubles et insolubles est difficile à déterminer. Ceci peut cependant être crucial, en particulier concernant le transport de l'uranium dans la cellule. La formation du précipité apporte une autre imprécision : malgré l'agitation des fioles, celui-ci a tendance à rester au fond, ce qui ne rend pas le milieu très homogène. Une partie des expériences est réalisée en l'absence d'ions  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dans des conditions où le nitrate et l'acétate d'uranyle sont solubles à toutes les concentrations testées.

## **II. Qualité du modèle expérimental**

### **II.1. Qualité des tubules proximaux isolés**

La qualité et la spécificité des tubules proximaux sont vérifiées à la loupe binoculaire préalablement à l'exposition à l'uranium. Ceux-ci sont intacts, ouverts et présentent un diamètre normal.

## **II.2. Métabolisme de base**

Il a pu être établi chez l'homme (Baverel, Bonnard et al. 1979) et la souris (Conjard, Brun et al. 2002) que durant les 60 minutes d'incubation, la production de glucose dans les tubules proximaux de reins est linéaire au cours du temps. Dans notre étude, la consommation de lactate dans les tubules proximaux de reins de souris est comprise entre 683 et 858  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$  en l'absence d'uranyle, ce qui est cohérent avec les valeurs trouvées dans une autre étude pour une concentration de lactate de 1 mM (Conjard, Brun et al. 2002). De la même manière, la production de glucose, l'accumulation de glutamate, de glutamine, la quantité d'ATP et le pourcentage de LDH intracellulaire mesurés dans notre étude sont cohérents avec d'autres résultats précédemment publiés (Krebs, Notton et al. 1966; Conjard, Brun et al. 2002; Conjard, Komaty et al. 2003; Zager, Johnson et al. 2004). Chez l'homme, la consommation de lactate mesurée au cours de ce travail est en moyenne de  $428 \pm 68 \mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$  dans les tubules rénaux proximaux en l'absence d'uranyle. Ceci est cohérent avec les valeurs de 500 et 600  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$  et de 415  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  poids sec.  $\text{h}^{-1}$  mesurées lors d'études précédentes (Baverel, Bonnard et al. 1979; Dubourg, Michoudet et al. 2001). Il en est de même dans ce travail pour les mesures de la production de glucose, la quantité d'ATP, l'accumulation d'alanine et de pyruvate (Baverel, Bonnard et al. 1979; Dubourg, Michoudet et al. 2001).

## **III. Résumé des résultats et analyse**

### **III.1. Absence de toxicité cellulaire**

La concentration d'uranyle létale pour la moitié des cellules proximales après 24h d'exposition est de 0,5 mM dans des cellules humaines HEK293 (Prat, Berenguer et al. 2005), de 0,55 mM dans des cellules de rat NRK-52<sup>E</sup> (Thiebault, Carriere et al. 2007) et de 0,9 mM dans des cellules LLC-PK1 de porc (L'Azou, Henge-Napoli et al. 2002). Dans notre étude le temps d'incubation est plus court (60 minutes), et d'après les tests de relarguage de la lactate deshydrogénase, pour des concentrations élevées de nitrate

d'uranyle (3 mM chez la souris), la mort cellulaire par nécrose est négligeable dans les tubules rénaux proximaux.

### **III.2. Effet de l'acétate d'uranyle sur la gluconéogenèse rénale chez l'homme et la souris**

Notre étude révèle un effet stimulateur de l'acétate sur la gluconéogenèse rénale chez la souris tel que l'avaient déjà montré d'autres auteurs chez le rat (Krebs, Speake et al. 1965). Bien que l'ion acétate augmente la production de glucose, une inhibition de la synthèse de glucose est constatée dans les tubules rénaux proximaux de souris pour les concentrations de 2,5 mM (-20%) et 5 mM (-49%) d'acétate d'uranyle. La réduction de la consommation de lactate et l'effondrement du contenu intracellulaire en ATP observée dès 1,25 mM pourraient y contribuer. Chez l'homme, l'acétate d'uranyle diminue fortement la gluconéogenèse (-41%) à la concentration de 5 mM ainsi que la quantité d'ATP intracellulaire (-61%). Chez l'homme, l'acétate de sodium n'a pas d'effet sur la gluconéogenèse rénale.

### **III.3. Le nitrate d'uranyle à 3 mM inhibe des flux enzymatiques de la gluconéogenèse**

Nos résultats montrent que le nitrate d'uranyle interfère avec le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux chez l'homme et la souris à jeûn. Le nitrate d'uranyle entraîne une chute importante de la quantité intracellulaire d'ATP, qui est un indicateur de viabilité cellulaire, une diminution de la production de glucose et de la consommation de lactate. Ces effets sont observés lors d'une exposition aiguë à l'issue d'une incubation d'une heure en présence de lactate 5 mM. Nous avons également montré qu'ils sont dus aux ions uranyle et non pas aux ions nitrate. A la concentration de 3 mM de nitrate d'uranyle, des analyses par spectroscopie du <sup>13</sup>C ont permis d'établir que la diminution de la consommation de lactate s'accompagne d'une inhibition du flux de la pyruvate carboxylase, de la PEPCK, et de la glucose-6-phosphatase, trois enzymes clés de la gluconéogenèse. Ceci est cohérent avec la diminution de l'activité rénale de la glucose-6-phosphatase (-27%) et de la fructose 1,6 diphosphatase (-31%) observée dans une autre

étude portant sur des rats exposés in vivo au nitrate d'uranyle (Banday, Priyamvada et al. 2008). La réduction de la gluconéogenèse rénale pourrait donc venir de la chute d'ATP nécessaire aux réactions, en particulier à celles catalysées par la glucose-6-phosphatase, la pyruvate carboxylase et la PEPCK. Aucune altération du flux de la pyruvate kinase ni aucune variation de l'accumulation de pyruvate n'ont pu être observées, ce qui montre que la voie de la glycolyse n'est pas affectées. Chez le rat, des auteurs ont montré une réduction des l'activités rénales : la malate deshydrogénase, l'isocitrate deshydrogénase la succinate dehydrogenase, par le nitrate d'uranyle administré in vivo, ce qui suggère une perturbation du cycle de Krebs (Banday, Priyamvada et al. 2008).

Notre étude in vitro n'indique au contraire aucun effet du nitrate d'uranyle ni sur le flux de la pyruvate deshydrogénase ni sur ceux des principales enzymes du cycle de Krebs – la citrate synthase, l'isocitrate deshydrogénase, l' $\alpha$ -cétoglutarate deshydrogénase et la malate deshydrogénase- ceci malgré la diminution significative de la quantité de CoA qui est un cofacteur de la pyruvate deshydrogénase et de l' $\alpha$ -cétoglutarate deshydrogénase.

Chez la souris, l'augmentation de l'accumulation d'  $\alpha$ -cétoglutarate (+ 5.1  $\mu\text{mole. g}^{-1} \cdot \text{poids sec. h}^{-1}$ ) et de glutamate (+ 3.2  $\mu\text{mole. g}^{-1} \cdot \text{poids sec. h}^{-1}$ ) observée est associée à une importante baisse de la synthèse de glutamine (- 12  $\mu\text{mole } \mu\text{mole. g}^{-1} \cdot \text{poids sec. h}^{-1}$ ), suggérant une diminution du flux de la glutamine synthétase, celle-ci utilisant de l'ATP dont la quantité intracellulaire diminue. La réduction de l'accumulation de citrate et la production accrue d'alanine peuvent également contribuer à l'augmentation de l'accumulation d'  $\alpha$ -cétoglutarate, bien que les flux de l'isocitrate deshydrogénase, l' $\alpha$ -cétoglutarate deshydrogénase et l'alanine aminotransférase soient inchangés. Le nitrate d'uranyle fait chuter la consommation de lactate, la gluconéogenèse et le contenu intracellulaire en ATP sans toutefois altérer l'oxydation complète des carbones du substrat métabolisé. Il convient de noter que chez l'homme comme chez la souris, la diminution de la consommation de lactate divisée par deux est équivalente à la réduction de la production de glucose.

### **III.4. Le nitrate d'uranyle entraîne une diminution de la quantité de glutathion**

Pour la concentration de 3 mM de nitrate d'uranyle, une diminution de la quantité de glutathion est observée chez la souris (-36%) et chez l'homme (-12%), ainsi qu'une diminution des coenzymes A totaux. Ceci suggère une affinité de l'uranyle avec les métabolites contenant des groupements thiols. Bien que ce ne soit pas le cas dans d'autres études (Linares, Belles et al. 2006; Belles, Linares et al. 2007), une diminution des groupements thiols totaux a déjà été observée dans le cortex rénal de rat (-29%) après une intoxication à 0,5 mg / kg de nitrate d'uranyle (Banday, Priyamvada et al. 2008) . En raison de leur abondance en groupements SH, les sites actifs de la LDH, PEPCK, PC, G-6-Pase pourraient être affectés. Ceci pourrait contribuer à la réduction des flux enzymatiques observée. Enfin il est possible que la diminution de l'acétyl-CoA contribue à la réduction du flux de la pyruvate carboxylase car celui-ci est un cofacteur de cet enzyme. Dans le cas de la PEPCK, PC et la G-6-Pase, ces effets inhibiteurs sur les flux enzymatiques viendraient s'ajouter à celui causé par la chute d'ATP, nécessaire aux réactions.

### **III.5. Effet du phosphate et de la solubilité de l'uranyle**

Dans des cellules tubulaires proximales de rat NRK-52<sup>E</sup> , la cytotoxicité du bicarbonate d'uranyle à 700  $\mu\text{M}$  est fortement augmentée en présence de phosphate dans le milieu d'incubation. Par exemple, pour une exposition de 24h, aucune toxicité n'est observée en présence de concentrations de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  allant de 0,05 à 0,33 mM. La toxicité est maximale (avoisinant 100%) pour les concentrations de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  allant de 1,08 à 1,58 mM (Carriere, Avoscan et al. 2004). Selon une étude réalisée sur des cellules tubulaires proximales de porc LLC-PK1, il existe une relation linéaire entre la concentration des espèces  $\text{UO}_2(\text{PO}_4)^-$  et la toxicité des ions uranyle pour une concentration de 800  $\mu\text{M}$  (Muller, Houpert et al. 2006).

Dans notre étude, à la concentration de 3 mM de nitrate d'uranyle, la présence d'ions phosphate 1,18 mM dans le milieu d'incubation entraîne la formation d'un



précipité et semble diminuer les effets inhibiteurs de celui-ci sur le métabolisme du lactate dans les tubules proximaux de reins de souris. En présence de phosphate dans le milieu, une autre étude portant sur des cellules NRK-52<sup>E</sup> exposées 24h à des concentrations croissantes de bicarbonate d'uranyle montre que 80% des cellules meurent dans des conditions et à des concentrations où l'uranium est soluble indiquant que les formes solubles peuvent être très toxiques (Carriere, Thiebault et al. 2006). Il convient de remarquer que dans notre cas, la durée d'incubation est nettement plus courte (60 minutes).

## CONCLUSION

Le nitrate d'uranyle à la concentration de 3 mM entraîne une diminution de la gluconéogenèse rénale avec une diminution de la consommation de lactate, de la quantité intracellulaire d'ATP et des flux de la lactate deshydrogénase, de la phosphoénolpyruvate carboxykinase, de la pyruvate carboxylase et de la glucose-6-phosphatase dans les tubules proximaux isolés de reins humains et murins. Une diminution de la quantité intracellulaire des coenzymes A est observée sans diminution de la pyruvate deshydrogénase ou de la succinate deshydrogénase. Ces perturbations métaboliques semblent s'accompagner d'un stress oxydant, comme le suggère la chute de la quantité intracellulaire de glutathion. Il a été montré que l'uranium se lie à la majeure partie des phospholipides membranaires (Koban and Bernhard 2007) et peut entraîner le détachement des microvilli des cellules tubulaires proximales (Haley 1982; McDonald-Taylor, Singh et al. 1997). Ainsi, la diminution de la consommation de lactate pourrait venir d'un défaut de transport du lactate dans la cellule par effet direct de l'uranium sur les transporteurs du lactate ou après leur perte consécutive au détachement des microvilli. La diminution de la production de glutamine chez la souris pourrait permettre de compenser la diminution de l'utilisation du lactate. Concernant la diminution des flux de la LDH, de la PC, de la PEPCK et de la GPase, une action directe des ions uranyle sur ces enzymes n'est pas à exclure. Le ralentissement du métabolisme observé, en particulier de la gluconéogenèse, pourrait également résulter de l'effondrement d'ATP, nécessaire aux réactions de la PC de la PEPCK et de la G6Pase. Dans les études de dose-effet, cette chute a en effet tendance à précéder celle du glucose. Il n'y a vraisemblablement pas d'inhibition de la réoxydation du NADH car les enzymes dépendantes du NAD (exceptée la lactate deshydrogénase) impliquées dans le métabolisme du lactate, telles que la pyruvate deshydrogénase, et les deshydrogénases du cycle de Krebs ne sont pas affectées. La chute d'ATP peut être due à la liaison de l'uranium à celui-ci, tel que cela a été observé in vitro (De Stefano, Gianguzza et al. 2005). Elle pourrait aussi témoigner d'un découplage de la chaîne de phosphorylation oxydative respiratoire mitochondriale par

l'uranium. En effet, des études ont montré que l'uranium s'accumule à la surface et dans les mitochondries (Leggett 1989), qu'il entraîne une dépolarisation du potentiel membranaire mitochondrial (Thiebault, Carriere et al. 2007) et une altération de la chaîne de phosphorylation oxydative (Brady, Kone et al. 1989). Le potentiel d'oxydoréduction du couple UVI/UIV correspondant à l'état d'oxydation UVI -le plus fréquent en solution- est de 0,27 eV, ce qui est nettement inférieur au potentiel d'oxydoréduction de  $O_2/H_2O$  (1,229 eV) (Emsley 1989).

Des études sur des cellules tubulaires proximales de rat NRK-52<sup>E</sup> et de porc LLCPK1 ont montré que la toxicité des ions uranyle (700  $\mu M$  et 800  $\mu M$  respectivement) croît en présence des espèces  $UO_2(PO_4)^-$  (Carriere, Avoscan et al. 2004; Muller, Houpert et al. 2006). Ceci pourrait être lié à l'augmentation calculée dans ces conditions de la concentration des espèces  $UO_2(CO_3)_3^{4-}$  et  $UO_2(CO_3)_2^{2-}$  (Carriere, Avoscan et al. 2004; Muller, Houpert et al. 2006). En effet, l'uranium semble entrer dans la cellule sous forme soluble, complexé aux ions bicarbonate (Mirto, Henge-Napoli et al. 1999).

Les perspectives de ce travail sont donc les suivantes :

- La détermination de l'effet direct du nitrate d'uranyle sur l'activité enzymatique de la lactate deshydrogénase, de la pyruvate carboxylase, de la pyruvate deshydrogénase et de la phosphoénolpyruvate carboxykinase.
- L'effet du nitrate d'uranyle sur le métabolisme de la glutamine dans les tubules rénaux proximaux de souris
- L'étude de l'effet du nitrate d'uranyle sur l'activité des complexes III et IV de la chaîne respiratoire dans des mitochondries isolées.
- La mesure de marqueurs du stress oxydant dans des tubules proximaux isolés de reins de souris exposés au nitrate d'uranyle 3 mM.
- La recherche d'inhibiteurs du transport du lactate et de leur influence sur les effets du nitrate d'uranyle 3 mM dans des tubes rénaux proximaux de souris
- L'étude des effets du nitrate d'uranyle 3 mM dans les tubules rénaux proximaux humains et murins en l'absence ou en présence d'ions  $KH_2PO_4$  et en l'absence ou la présence d'inhibiteurs de l'endocytose.

➤ Enfin, l'utilisation de tranches de reins humains pourra être envisagée en vue de durées d'exposition plus longues (24h à 48h) à des concentrations de nitrate d'uranyle plus faibles.

## REFERENCES

- (1994). "Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection." Ann ICRP **24**(1-3): 1-482.
- (1996). "Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides: Part 5. Compilation of ingestion and inhalation dose coefficients." Ann ICRP **26**(1): 1-91.
- (1997). "Individual monitoring for internal exposure of workers replacement of ICRP publication 54." Ann ICRP **27**(3-4): i-x, 1-161.
- (1999). Toxicological Profile for Uranium. U.S.A., Agences for Toxic Substances and Disease Registry.
- (2001). Depleted Uranium: Sources, Exposure and Health Effects. Switzerland, World Health Organisation.
- (2001). "Doses to the embryo and fetus from intakes of radionuclides by the mother. A report of The International Commission on Radiological Protection." Ann ICRP **31**(1-3): 19-515.
- (2006). "Human alimentary tract model for radiological protection. ICRP Publication 100. A report of The International Commission on Radiological Protection." Ann ICRP **36**(1-2): 25-327, iii.
- Adler, S. and H. G. Preuss (1972). "Interrelationships between citrate metabolism, ammoniogenesis, and gluconeogenesis in renal cortex in vitro." J Lab Clin Med **79**(4): 505-15.
- Ansoborlo, E., O. Prat, et al. (2006). "Actinide speciation in relation to biological processes." Biochimie **88**(11): 1605-18.
- Appenroth, D., A. Lupp, et al. (2001). "Temporary warm ischaemia, 5/6 nephrectomy and single uranyl nitrate administration--comparison of three models intended to cause renal fibrosis in rats." Exp Toxicol Pathol **53**(4): 316-24.
- Arfsten, D. P., K. R. Still, et al. (2001). "A review of the effects of uranium and depleted uranium exposure on reproduction and fetal development." Toxicol Ind Health **17**(5-10): 180-91.
- Avasthi, P. S., A. P. Evan, et al. (1980). "Glomerular endothelial cells in uranyl nitrate-induced acute renal failure in rats." J Clin Invest **65**(1): 121-7.
- Bacallao, R. and L. G. Fine (1989). "Molecular events in the organization of renal tubular epithelium: from nephrogenesis to regeneration." Am J Physiol **257**(6 Pt 2): F913-24.
- Banday, A. A., S. Priyamvada, et al. (2008). "Effect of uranyl nitrate on enzymes of carbohydrate metabolism and brush border membrane in different kidney tissues." Food Chem Toxicol **46**(6): 2080-8.
- Barnett, T. B. and R. G. Metcalf (1949). The pathological anatomy of uranium poisoning. Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds. C. Voetling and H. C. Hodge, McGraw-Hill Book Company, Inc. **1**: 207-236.

- Baverel, G., M. Bonnard, et al. (1978). "Lactate and pyruvate metabolism in isolated renal tubules of normal dogs." *Kidney Int* **14**(6): 567-75.
- Baverel, G., M. Bonnard, et al. (1978). "[Metabolic fate of lactate and pyruvate in isolated human renal tubules]." *J Urol Nephrol (Paris)* **84**(12): 889-90.
- Baverel, G., M. Bonnard, et al. (1979). "Lactate and pyruvate metabolism in isolated human kidney tubules." *FEBS Lett* **101**(2): 282-6.
- Baverel, G., A. Conjard, et al. (2003). "Carbon 13 NMR spectroscopy: a powerful tool for studying renal metabolism." *Biochimie* **85**(9): 863-71.
- Belles, M., V. Linares, et al. (2007). "Melatonin reduces uranium-induced nephrotoxicity in rats." *J Pineal Res* **43**(1): 87-95.
- Benoy, M. P. and K. A. Elliott (1937). "The metabolism of lactic and pyruvic acids in normal and tumour tissues: Synthesis of carbohydrate." *Biochem J* **31**(8): 1268-75.
- Bergmeyer, H. U. and E. Bernt (1974). Lactate dehydrogenase: UV assay with pyruvate and NADH. *Methods of Enzymatic Analysis*. H. U. Bergmeyer, Academic Press, New York. **2**: 574-579.
- Berradi, H., J. M. Bertho, et al. (2008). "Renal anemia induced by chronic ingestion of depleted uranium in rats." *Toxicol Sci* **103**(2): 397-408.
- Berry, J. P. (1996). "The role of lysosomes in the selective concentration of mineral elements. A microanalytical study." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **42**(3): 395-411.
- Berry, J. P., L. Zhang, et al. (1997). "Role of alveolar macrophage lysosomes in metal detoxification." *Microsc Res Tech* **36**(4): 313-23.
- Blantz, R. C. (1975). "The mechanism of acute renal failure after uranyl nitrate." *J Clin Invest* **55**(3): 621-35.
- Bleise, A., P. R. Danesi, et al. (2003). "Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview." *J Environ Radioact* **64**(2-3): 93-112.
- Boice, J. D., Jr., W. L. Bigbee, et al. (2003). "Cancer incidence in municipalities near two former nuclear materials processing facilities in Pennsylvania." *Health Phys* **85**(6): 678-90.
- Boice, J. D., Jr., S. S. Cohen, et al. (2007). "Mortality among residents of Uravan, Colorado who lived near a uranium mill, 1936-84." *J Radiol Prot* **27**(3): 299-319.
- Boice, J. D., Jr., S. S. Cohen, et al. (2008). "A cohort study of uranium millers and miners of Grants, New Mexico, 1979-2005." *J Radiol Prot* **28**(3): 303-25.
- Bolton, J. P. and C. R. Foster (2002). "Battlefield use of depleted uranium and the health of veterans." *J R Army Med Corps* **148**(3): 221-9.
- Brady, H. R., B. C. Kone, et al. (1989). "Early effects of uranyl nitrate on respiration and K<sup>+</sup> transport in rabbit proximal tubule." *Kidney Int* **36**(1): 27-34.
- Braunlich, H. and C. Fleck (1981). "Urinary enzyme excretion as a indicator of nephrotoxicity in dependence on age." *Exp Pathol* **20**(3): 182-7.
- Brugge, D., J. L. de Lemos, et al. (2005). "Exposure pathways and health effects associated with chemical and radiological toxicity of natural uranium: a review." *Rev Environ Health* **20**(3): 177-93.
- Bulger, R. E. (1986). "Renal damage caused by heavy metals." *Toxicol Pathol* **14**(1): 58-65.

- Burch, H. B., R. G. Narins, et al. (1978). "Distribution along the rat nephron of three enzymes of gluconeogenesis in acidosis and starvation." Am J Physiol **235**(3): F246-53.
- Canioni, P., J. R. Alger, et al. (1983). "Natural abundance Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver and adipose tissue of the living rat." Biochemistry **22**(21): 4974-80.
- Canu, I. G., E. D. Ellis, et al. (2008). "Cancer risk in nuclear workers occupationally exposed to uranium-emphasis on internal exposure." Health Phys **94**(1): 1-17.
- Carafoli, E., R. Tiozzo, et al. (1971). "A study of Ca<sup>2+</sup> metabolism in kidney mitochondria during acute uranium intoxication." Lab Invest **25**(6): 516-27.
- Carriere, M., L. Avoscan, et al. (2004). "Influence of uranium speciation on normal rat kidney (NRK-52E) proximal cell cytotoxicity." Chem Res Toxicol **17**(3): 446-52.
- Carriere, M., O. Proux, et al. (2008). "Transmission electron microscopic and X-ray absorption fine structure spectroscopic investigation of U repartition and speciation after accumulation in renal cells." J Biol Inorg Chem **13**(5): 655-62.
- Carriere, M., C. Thiebault, et al. (2006). "Citrate does not change uranium chemical speciation in cell culture medium but increases its toxicity and accumulation in NRK-52E cells." Chem Res Toxicol **19**(12): 1637-42.
- Chauvin, M. F., F. Megnin-Chanet, et al. (1994). "The rabbit kidney tubule utilizes glucose for glutamine synthesis. A 13C NMR study." J Biol Chem **269**(42): 26025-33.
- Chauvin, M. F., F. Megnin-Chanet, et al. (1997). "The rabbit kidney tubule simultaneously degrades and synthesizes glutamate. A 13C NMR study." J Biol Chem **272**(8): 4705-16.
- Chen, J., D. P. Meyerhof, et al. (2004). "Model results of kidney burdens from uranium intakes." Health Phys **86**(1): 3-11.
- Chevani, S. and D. Likhner (1968). "[Complex formation of natural uranium in blood]." Med Radiol (Mosk) **13**(8): 53-7.
- Cohen, J. J. (1979). "Is the function of the renal papilla coupled exclusively to an anaerobic pattern of metabolism?" Am J Physiol **236**(5): F423-33.
- Cole, B. R., J. G. Boylan, et al. (1988). "Progressive enzyme changes within anatomically defined segments of rabbit nephron: demonstration with a new technique." J Histochem Cytochem **36**(3): 285-9.
- Conjard, A., V. Brun, et al. (2002). "Effect of starvation on glutamine ammoniogenesis and gluconeogenesis in isolated mouse kidney tubules." Biochem J **368**(Pt 1): 301-8.
- Conjard, A., O. Komaty, et al. (2003). "Inhibition of glutamine synthetase in the mouse kidney: a novel mechanism of adaptation to metabolic acidosis." J Biol Chem **278**(40): 38159-66.
- Cooper, J. R., G. N. Stradling, et al. (1982). "The behaviour of uranium-233 oxide and uranyl-233 nitrate in rats." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **41**(4): 421-33.
- Craft, E., A. Abu-Qare, et al. (2004). "Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects." J Toxicol Environ Health B Crit Rev **7**(4): 297-317.

- Curthoys, N. P. and O. H. Lowry (1973). "The distribution of glutaminase isoenzymes in the various structures of the nephron in normal, acidotic, and alkalotic rat kidney." J Biol Chem **248**(1): 162-8.
- De Stefano, C., A. Gianguzza, et al. (2005). "Interaction of  $UO_2(2+)$  with ATP in aqueous ionic media." Biophys Chem **117**(2): 147-53.
- Diamond, G. L., P. E. Morrow, et al. (1989). "Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat." Fundam Appl Toxicol **13**(1): 65-78.
- Dickson, E. C. (1910). "California Academy of Medicine: Chronic Uranium Nephritis in Animals." Cal State J Med **8**(4): 140.
- Dickson, E. C. (1910). "Experimental Nephritis." Cal State J Med **8**(11): 359-62.
- Domingo, J. L. (1994). "Metal-induced developmental toxicity in mammals: a review." J Toxicol Environ Health **42**(2): 123-41.
- Domingo, J. L. (2001). "Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review." Reprod Toxicol **15**(6): 603-9.
- Domingo, J. L., J. M. Llobet, et al. (1987). "Acute toxicity of uranium in rats and mice." Bull Environ Contam Toxicol **39**(1): 168-74.
- Donnadieu-Claraz, M., M. Bonnehogne, et al. (2007). "Chronic exposure to uranium leads to iron accumulation in rat kidney cells." Radiat Res **167**(4): 454-64.
- Dublineau, I., S. Grison, et al. (2006). "Absorption, accumulation and biological effects of depleted uranium in Peyer's patches of rats." Toxicology **227**(3): 227-39.
- Dubourg, L., C. Michoudet, et al. (2001). "Human kidney tubules detoxify chloroacetaldehyde, a presumed nephrotoxic metabolite of ifosfamide." J Am Soc Nephrol **12**(8): 1615-23.
- Dugelay, S., M. F. Chauvin, et al. (1999). "Acetate stimulates flux through the tricarboxylic acid cycle in rabbit renal proximal tubules synthesizing glutamine from alanine: a  $^{13}C$  NMR study." Biochem J **342 Pt 3**: 555-66.
- Eidson, A. F. (1994). "The effect of solubility on inhaled uranium compound clearance: a review." Health Phys **67**(1): 1-14.
- Eismann, U., M. Sommer, et al. (2002). "Fibronectin splice variants--prognostic markers for the stage of renal interstitial fibrosis in the rat." Nephron **92**(2): 379-88.
- Emsley, J. (1989). The elements. 1. Chemical elements, chemical compounds-Technical data-For schools I. Title 540'. 212. United States, Oxford University Press, New York.
- Finkel, T. (2000). "Redox-dependent signal transduction." FEBS Lett **476**(1-2): 52-4.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**(6809): 239-47.
- Fitsanakis, V. A., K. M. Erikson, et al. (2006). "Brain accumulation of depleted uranium in rats following 3- or 6-month treatment with implanted depleted uranium pellets." Biol Trace Elem Res **111**(1-3): 185-97.
- Flamenbaum, W., R. J. Hamburger, et al. (1976). "The initiation phase of experimental acute renal failure: an evaluation of uranyl nitrate-induced acute renal failure in the rat." Kidney Int Suppl **6**: S115-22.
- Fleck, M., D. Appenroth, et al. (2002). "Renal interstitial fibrosis (RIF): II. Ultrasound follow up study of single uranyl nitrate administration causing renal dysfunction in rats--comparison with histologic and functional renal parameters." Exp Toxicol Pathol **54**(1): 15-23.



- Fouque, D., S. Dugelay, et al. (1996). "Alanine metabolism in isolated human kidney tubules--Use of a mathematical model." Eur J Biochem **236**(1): 128-37.
- Fujigaki, Y., T. Goto, et al. (2006). "Kinetics and characterization of initially regenerating proximal tubules in S3 segment in response to various degrees of acute tubular injury." Nephrol Dial Transplant **21**(1): 41-50.
- Fujigaki, Y., Y. Muranaka, et al. (2005). "Transient myofibroblast differentiation of interstitial fibroblastic cells relevant to tubular dilatation in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats." Virchows Arch **446**(2): 164-76.
- Fujimoto, T., Y. Fujigaki, et al. (2003). "Important role for fibronectin-EIIIA during renal tubular repair and cellular recovery in uranyl acetate-induced acute renal failure of rats." Virchows Arch **443**(2): 194-205.
- Fukuda, S., M. Ikeda, et al. (2006). "Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium." Radiat Prot Dosimetry **118**(3): 307-14.
- Galle, P. (1997). Toxiques nucléaires, Masson.
- Ghadially, F. N., J. M. Lalonde, et al. (1982). "Uraniosomes produced in cultured rabbit kidney cells by uranyl acetate." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **39**(1): 21-30.
- Ghosh, S., A. Kumar, et al. (2007). "Acute exposure of uranyl nitrate causes lipid peroxidation and histopathological damage in brain and bone of Wistar rat." J Environ Pathol Toxicol Oncol **26**(4): 255-61.
- Gilman, A. P., D. C. Villeneuve, et al. (1998). "Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat." Toxicol Sci **41**(1): 117-28.
- Goodman, A. D., R. E. Fuisz, et al. (1966). "Renal gluconeogenesis in acidosis, alkalosis, and potassium deficiency: its possible role in regulation of renal ammonia production." J Clin Invest **45**(4): 612-9.
- Goorno, W. E., F. C. Rector, Jr., et al. (1967). "Relation of renal gluconeogenesis to ammonia production in the dog and rat." Am J Physiol **213**(4): 969-74.
- Griffith, O. W. (1985). Glutathione and glutathione disulphide. Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis. Germany, VCH Verlagsgesellschaft. **8**: 521-529.
- Guder, W. G. and B. D. Ross (1984). "Enzyme distribution along the nephron." Kidney Int **26**(2): 101-11.
- Guder, W. G. and U. Schmidt (1974). "The localization of gluconeogenesis in rat nephron. Determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase in microdissected tubules." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **355**(3): 273-8.
- Guder, W. G. and U. Schmidt (1976). "Substrate and oxygen dependence of renal metabolism." Kidney Int Suppl **6**: S32-8.
- Gueguen, Y., M. Souidi, et al. (2006). "Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat." Arch Toxicol **80**(4): 187-95.
- Guglielmotti, M. B., A. M. Ubios, et al. (1984). "Effects of acute intoxication with uranyl nitrate on bone formation." Experientia **40**(5): 474-6.
- Guidet, B. and S. V. Shah (1989). "Enhanced in vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by rat kidney in glycerol-induced renal failure." Am J Physiol **257**(3 Pt 2): F440-5.
- Halestrap, A. (2005). "Biochemistry: a pore way to die." Nature **434**(7033): 578-9.

- Haley, D. P. (1982). "Morphologic changes in uranyl nitrate-induced acute renal failure in saline- and water-drinking rats." Lab Invest **46**(2): 196-208.
- Haley, D. P., R. E. Bulger, et al. (1982). "The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **41**(1-2): 181-92.
- Hirsch, G. H. (1976). "Differential effects of nephrotoxic agents on renal transport and metabolism by use of in vitro techniques." Environ Health Perspect **15**: 89-99.
- Horthwarth, O. W. and D. M. J. Lilley (1978). "Carbon-13-NMR of peptides and proteins." Prog. NMR Spectrosc. **12**(1): 1-40.
- Houpert, P., S. Frelon, et al. (2007). "Parental exposure to enriched uranium induced delayed hyperactivity in rat offspring." Neurotoxicology **28**(1): 108-13.
- Houpert, P., S. Frelon, et al. (2007). "Heterogeneous accumulation of uranium in the brain of rats." Radiat Prot Dosimetry **127**(1-4): 86-9.
- Humphreys, B. D. and J. V. Bonventre (2007). "The contribution of adult stem cells to renal repair." Nephrol Ther **3**(1): 3-10.
- Humphreys, B. D., J. D. Duffield, et al. (2006). "Renal stem cells in recovery from acute kidney injury." Minerva Urol Nefrol **58**(1): 13-21.
- Jadon, A. and R. Mathur (1983). "Gametogenic count and histopathological effect of thorium nitrate and uranyl nitrate on mice testes." Andrologia **15**(1): 40-3.
- Kathren, R. L. and R. K. Burklin (2008). "Acute chemical toxicity of uranium." Health Phys **94**(2): 170-9.
- Kato, A., A. Hishida, et al. (1994). "Effects of oxygen free radical scavengers on uranium-induced acute renal failure in rats." Free Radic Biol Med **16**(6): 855-9.
- Kida, K., T. Nishio, et al. (1982). "Gluconeogenesis in the kidney in vivo in fed rats. Circadian change and substrate specificity." J Biochem **91**(3): 755-60.
- Kim, K., K. M. Lee, et al. (2008). "Adult Stem Cell-like Tubular Cells Reside in the Corticomedullary Junction of the Kidney." Int J Clin Exp Pathol **1**(3): 232-41.
- Kleinman, J. G., J. S. McNeil, et al. (1975). "Uranyl nitrate acute renal failure in the dog: early changes in renal function and haemodynamics." Clin Sci Mol Med **48**(1): 9-16.
- Koban, A. and G. Bernhard (2007). "Uranium(VI) complexes with phospholipid model compounds--a laser spectroscopic study." J Inorg Biochem **101**(5): 750-7.
- Krebs, H. A. (1963). "Renal Gluconeogenesis." Adv Enzyme Regul **1**: 385-400.
- Krebs, H. A., D. A. Bennett, et al. (1963). "Renal gluconeogenesis. The effect of diet on the gluconeogenic capacity of rat-kidney-cortex slices." Biochem J **86**: 22-7.
- Krebs, H. A., B. M. Notton, et al. (1966). "Gluconeogenesis in mouse-liver slices." Biochem J **101**(3): 607-617.
- Krebs, H. A., R. N. Speake, et al. (1965). "Acceleration of Renal Gluconeogenesis by Ketone Bodies and Fatty Acids." Biochem J **94**: 712-20.
- Krebs, H. A. and T. Yoshida (1963). "Renal Gluconeogenesis. 2. The Gluconeogenic Capacity of the Kidney Cortex of Various Species." Biochem J **89**: 398-400.
- Kurttio, P., A. Auvinen, et al. (2002). "Renal effects of uranium in drinking water." Environ Health Perspect **110**(4): 337-42.
- Kurttio, P., A. Harmoinen, et al. (2006). "Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water." Am J Kidney Dis **47**(6): 972-82.

- Kurttio, P., H. Komulainen, et al. (2005). "Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water." Environ Health Perspect **113**(1): 68-72.
- Kurttio, P., L. Salonen, et al. (2006). "Well water radioactivity and risk of cancers of the urinary organs." Environ Res **102**(3): 333-8.
- L'Azou, B., M. H. Henge-Napoli, et al. (2002). "Effects of cadmium and uranium on some in vitro renal targets." Cell Biol Toxicol **18**(5): 329-40.
- Landau, B. R. (1960). "Gluconeogenesis and pyruvate metabolism in rat kidney, in vitro." Endocrinology **67**: 744-51.
- Lee, J. B., V. K. Vance, et al. (1962). "Metabolism of C14-labeled substrates by rabbit kidney cortex and medulla." Am J Physiol **203**: 27-36.
- Leggett, R. W. (1989). "The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment." Health Phys **57**(3): 365-83.
- Leggett, R. W. (1994). "Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium." Health Phys **67**(6): 589-610.
- Leggett, R. W. and J. D. Harrison (1995). "Fractional absorption of ingested uranium in humans." Health Phys **68**(4): 484-98.
- Leggett, R. W. and T. C. Pellmar (2003). "The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments." J Environ Radioact **64**(2-3): 205-25.
- Lemercier, V., X. Millot, et al. (2003). "Study of uranium transfer across the blood-brain barrier." Radiat Prot Dosimetry **105**(1-4): 243-5.
- Leonard, S. S., G. K. Harris, et al. (2004). "Metal-induced oxidative stress and signal transduction." Free Radic Biol Med **37**(12): 1921-42.
- Li, W. B., P. Roth, et al. (2005). "Biokinetic modeling of uranium in man after injection and ingestion." Radiat Environ Biophys **44**(1): 29-40.
- Lim, I. K., K. H. Lee, et al. (1987). "Uranyl nitrate induced polyuric acute tubular necrosis in rats." Yonsei Med J **28**(1): 38-48.
- Lin, J. H. and T. H. Lin (1988). "Renal handling of drugs in renal failure. I: Differential effects of uranyl nitrate- and glycerol-induced acute renal failure on renal excretion of TEAB and PAH in rats." J Pharmacol Exp Ther **246**(3): 896-901.
- Linares, V., M. L. Albina, et al. (2005). "Combined action of uranium and stress in the rat. II. Effects on male reproduction." Toxicol Lett **158**(3): 186-95.
- Linares, V., M. Belles, et al. (2006). "Assessment of the pro-oxidant activity of uranium in kidney and testis of rats." Toxicol Lett **167**(2): 152-61.
- Malenchenko, A. F., N. A. Barkun, et al. (1978). "Effect of uranium on the induction and course of experimental autoimmune orchitis and thyroiditis." J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol **22**(3): 268-77.
- Malhotra, J. D. and R. J. Kaufman (2007). "Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?" Antioxid Redox Signal **9**(12): 2277-93.
- Mao, Y., M. Desmeules, et al. (1995). "Inorganic components of drinking water and microalbuminuria." Environ Res **71**(2): 135-40.
- Marshall, A. C. (2008). "Gulf war depleted uranium risks." J Expo Sci Environ Epidemiol **18**(1): 95-108.
- Martinez, A. B., P. M. Mandalunis, et al. (2003). "Renal function in mice poisoned with oral uranium and treated with ethane-1-hydroxy-1,1-bisphosphonate (EHBP)." Health Phys **85**(3): 343-7.

- McClain, D. E., K. A. Benson, et al. (2001). "Biological effects of embedded depleted uranium (DU): summary of armed forces radiobiology research institute research." Sci Total Environ **274**(1-3): 115-8.
- McDermott, F. T., J. Nayman, et al. (1968). "The effect of acute renal failure upon wound healing: histological and autoradiographic studies in the mouse." Ann Surg **168**(1): 142-6.
- McDiarmid, M. A., J. P. Keogh, et al. (2000). "Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans." Environ Res **82**(2): 168-80.
- McDonald-Taylor, C. K., A. Singh, et al. (1997). "Uranyl nitrate-induced proximal tubule alterations in rabbits: a quantitative analysis." Toxicol Pathol **25**(4): 381-9.
- Michal, G. and H. U. Bergmeyer (1985). Coenzyme A: Catalytic method with phosphate acetyltransferase. Methods of Enzymatic Analysis. H. U. Bergmeyer. Weinheim, Verlag Chemie. **VII**: 169-177.
- Miller, A. C. and D. McClain (2007). "A review of depleted uranium biological effects: in vitro and in vivo studies." Rev Environ Health **22**(1): 75-89.
- Miller, B. A. (2006). "The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death." J Membr Biol **209**(1): 31-41.
- Mirto, H., M. H. Henge-Napoli, et al. (1999). "Intracellular behaviour of uranium(VI) on renal epithelial cell in culture (LLC-PK1): influence of uranium speciation." Toxicol Lett **104**(3): 249-56.
- Monleau, M., C. Bussy, et al. (2005). "Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations." Neurosci Lett **390**(1): 31-6.
- Morris, K. J., P. Khanna, et al. (1990). "Long-term clearance of inhaled UO<sub>2</sub> particles from the pulmonary region of the rat." Health Phys **58**(4): 477-85.
- Mueller, C. B. and A. D. Mason (1956). "The pathogenesis of acute renal failure following incompatible blood transfusion; an experimental study." Am J Clin Pathol **26**(7): 705-20.
- Muller, D., P. Houpert, et al. (2006). "Role of the sodium-dependent phosphate cotransporters and of the phosphate complexes of uranyl in the cytotoxicity of uranium in LLC-PK1 cells." Toxicol Appl Pharmacol **214**(2): 166-77.
- Muller, D. S., P. Houpert, et al. (2008). "Role of the sodium-dependent phosphate cotransporters and absorptive endocytosis in the uptake of low concentrations of uranium and its toxicity at higher concentrations in LLC-PK1 cells." Toxicol Sci **101**(2): 254-62.
- Murer, H., N. Hernando, et al. (2000). "Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms." Physiol Rev **80**(4): 1373-409.
- Nemery, B. (1990). "Metal toxicity and the respiratory tract." Eur Respir J **3**(2): 202-19.
- Neuman, W. F. (1949). The distribution and excretion of uranium. Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds. C. Voetling and H. C. Hodge, McGraw-Hill Company. **1**.
- Newmeyer, D. D. and S. Ferguson-Miller (2003). "Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death." Cell **112**(4): 481-90.
- Pasanen, M., S. Lang, et al. (1995). "Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver." Environ Res **70**(2): 126-33.

- Pasquale, L., A. Winiski, et al. (1986). "An experimental test of new theoretical models for the electrokinetic properties of biological membranes. The effect of  $UO_2^{++}$  and tetracaine on the electrophoretic mobility of bilayer membranes and human erythrocytes." J Gen Physiol **88**(6): 697-718.
- Passonneau, J. V. and W. O. Lowry (1993). Enzymatic Analysis: A Practicle Guide., The Humana Press. Totowa. NJ.
- Pavlakakis, N., C. A. Pollock, et al. (1996). "Deliberate overdose of uranium: toxicity and treatment." Nephron **72**(2): 313-7.
- Pellmar, T. C., D. O. Keyser, et al. (1999). "Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments." Neurotoxicology **20**(5): 785-92.
- Peterson, O. W., F. B. Gabbai, et al. (1989). "A single nephron model of acute tubular injury: role of tubuloglomerular feedback." Kidney Int **36**(6): 1037-44.
- Petitot, F., A. M. Moreels, et al. (2004). "In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig." Can J Physiol Pharmacol **82**(2): 133-9.
- Pourahmad, J., M. Ghashang, et al. (2006). "A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity." Environ Toxicol **21**(4): 349-54.
- Prat, O., F. Berenguer, et al. (2005). "Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity." Proteomics **5**(1): 297-306.
- Ruegg, C. E. and L. J. Mandel (1990). "Bulk isolation of renal PCT and PST. I. Glucose-dependent metabolic differences." Am J Physiol **259**(1 Pt 2): F164-75.
- Russell, J. J. and R. L. Kathren (2004). "Uranium deposition and retention in a USTUR whole body case." Health Phys **86**(3): 273-84.
- Salto, R., J. Oliver, et al. (1991). "Distribution of pyruvate carboxylase along the rat nephron: an immunological and enzymatic study." Kidney Int **39**(6): 1162-7.
- Sanchez, D. J., M. Belles, et al. (2001). "Nephrotoxicity of simultaneous exposure to mercury and uranium in comparison to individual effects of these metals in rats." Biol Trace Elem Res **84**(1-3): 139-54.
- Sano, K., Y. Fujigaki, et al. (2000). "Role of apoptosis in uranyl acetate-induced acute renal failure and acquired resistance to uranyl acetate." Kidney Int **57**(4): 1560-70.
- Schmid, H., A. Mall, et al. (1980). "Unchanged glycolytic capacity in rat kidney under conditions of stimulated gluconeogenesis. Determination of phosphofructokinase and pyruvate kinase in microdissected nephron segments of fasted and acidotic animals." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **361**(6): 819-27.
- Shaka, A. J., J. Keeler, et al. (1983). "Evaluation of a new broadband decoupling sequence: WALTZ-16  
" Journal of Magnetic Resonance **52**: 335-338.
- Sheppard, S. C., M. I. Sheppard, et al. (2006). "Revision and meta-analysis of selected biosphere parameter values for chlorine, iodine, neptunium, radium, radon and uranium." J Environ Radioact **89**(2): 115-37.
- Simpson, D. P. (1972). "Pathways of glutamine and organic acid metabolism in renal cortex in chronic metabolic acidosis." J Clin Invest **51**(8): 1969-78.

- Souidi, M., Y. Gueguen, et al. (2005). "In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat." *Toxicology* **214**(1-2): 113-22.
- Squires, E. J., D. E. Hall, et al. (1976). "Arteriovenous differences for amino acids and lactate across kidneys of normal and acidotic rats." *Biochem J* **160**(1): 125-8.
- Stefanovic, V., M. A. Ivic, et al. (1987). "Calcium and phosphate metabolism in uranyl nitrate-induced acute renal failure." *Arch Int Physiol Biochim* **95**(3): 223-8.
- Stein, J. H., J. Gottschall, et al. (1975). "Pathophysiology of a nephrotoxic model of acute renal failure." *Kidney Int* **8**(1): 27-41.
- Stein, J. H., M. D. Lifschitz, et al. (1978). "Current concepts on the pathophysiology of acute renal failure." *Am J Physiol* **234**(3): F171-81.
- Stevens, W., F. W. Bruenger, et al. (1980). "The distribution and retention of hexavalent <sup>233</sup>U in the beagle." *Radiat Res* **83**(1): 109-26.
- Stohs, S. J. and D. Bagchi (1995). "Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions." *Free Radic Biol Med* **18**(2): 321-36.
- Stradling, G. N., J. W. Stather, et al. (1987). "Metabolism of uranium in the rat after inhalation of two industrial forms of ore concentrate: the implications for occupational exposure." *Hum Toxicol* **6**(5): 385-93.
- Stradling, G. N., J. W. Stather, et al. (1989). "The metabolic behaviour of uranium octoxide bearing residues after their deposition in the rat lung: the implications for occupational exposure." *Exp Pathol* **37**(1-4): 76-82.
- Stradling, N., A. Hodgson, et al. (2002). *Industrial Uranium Compounds: Exposure Limits, Assessment of Intake and Toxicity after Inhalation*. France, National Radiological Protection Board: 119.
- Stumvoll, M., C. Meyer, et al. (1997). "Renal glucose production and utilization: new aspects in humans." *Diabetologia* **40**(7): 749-57.
- Sudo, M., N. Honda, et al. (1977). "Renal hemodynamics in uranyl acetate-induced acute renal failure of rabbits." *Kidney Int* **11**(1): 35-43.
- Sun, D. F., Y. Fujigaki, et al. (2002). "Mycophenolate mofetil inhibits regenerative repair in uranyl acetate-induced acute renal failure by reduced interstitial cellular response." *Am J Pathol* **161**(1): 217-27.
- Sun, D. F., Y. Fujigaki, et al. (2002). "Relation of distal nephron changes to proximal tubular damage in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats." *Am J Nephrol* **22**(5-6): 405-16.
- Sun, D. F., Y. Fujigaki, et al. (2000). "Possible involvement of myofibroblasts in cellular recovery of uranyl acetate-induced acute renal failure in rats." *Am J Pathol* **157**(4): 1321-35.
- Sutton, M. and S. R. Burastero (2004). "Uranium(VI) solubility and speciation in simulated elemental human biological fluids." *Chem Res Toxicol* **17**(11): 1468-80.
- Tajima, N., M. Soma, et al. (2005). "Quantitative evaluation of effect of renal failure on the pharmacokinetics of panipenem in rats." *Biol Pharm Bull* **28**(11): 2170-2.
- Taulan, M., F. Paquet, et al. (2006). "Comprehensive analysis of the renal transcriptional response to acute uranyl nitrate exposure." *BMC Genomics* **7**: 2.
- Taulan, M., F. Paquet, et al. (2004). "Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice." *Environ Health Perspect* **112**(16): 1628-35.

- Taylor, D. M. and S. K. Taylor (1997). "Environmental uranium and human health." Rev Environ Health **12**(3): 147-57.
- Teng, C. T. (1954). "Studies on carbohydrate metabolism in rat kidney slices. II. Effect of alloxan diabetes and insulin administration on glucose uptake and glucose formation." Arch Biochem Biophys **48**(2): 415-23.
- Thadhani, R., M. Pascual, et al. (1996). "Acute renal failure." N Engl J Med **334**(22): 1448-60.
- Thiebault, C., M. Carriere, et al. (2007). "Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells." Toxicol Sci **98**(2): 479-87.
- Tissandie, E., Y. Gueguen, et al. (2007). "In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat." Biochim Biophys Acta **1770**(2): 266-72.
- Toback, F. G. (1992). "Regeneration after acute tubular necrosis." Kidney Int **41**(1): 226-46.
- Tolson, J. K., S. M. Roberts, et al. (2005). "Heat shock proteins and acquired resistance to uranium nephrotoxicity." Toxicology **206**(1): 59-73.
- Vandewalle, A., G. Wirthensohn, et al. (1981). "Distribution of hexokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase along the rabbit nephron." Am J Physiol **240**(6): F492-500.
- Vesterbacka, P., I. Makelainen, et al. (2005). "Natural radioactivity in drinking water in private wells in Finland." Radiat Prot Dosimetry **113**(2): 223-32.
- Vidaud, C., A. Dedieu, et al. (2005). "Screening of human serum proteins for uranium binding." Chem Res Toxicol **18**(6): 946-53.
- Vidaud, C., S. Gourion-Arsiquaud, et al. (2007). "Structural consequences of binding of UO<sub>2</sub>(2+) to apotransferrin: can this protein account for entry of uranium into human cells?" Biochemistry **46**(8): 2215-26.
- Vittorelli, A., C. Gauthier, et al. (2005). "Characteristics of glutamine metabolism in human precision-cut kidney slices: a 13C-NMR study." Biochem J **387**(Pt 3): 825-34.
- Wills, J. H. (1949). Characteristics of uranium poisoning. Pharmacology and Toxicology of uranium compounds. C. Voegtlin and H. C. Hodge, McGraw-Hill Book Company. **1**: 237-280.
- Wright, P. A. and M. A. Knepper (1990). "Phosphate-dependent glutaminase activity in rat renal cortical and medullary tubule segments." Am J Physiol **259**(6 Pt 2): F961-70.
- Wright, P. J. and D. T. Plummer (1974). "The use of urinary enzyme measurements to detect renal damage caused by nephrotoxic compounds." Biochem Pharmacol **23**(1): 65-73.
- Zager, R. A., A. C. Johnson, et al. (2004). "Parenteral iron nephrotoxicity: potential mechanisms and consequences." Kidney Int **66**(1): 144-56.
- Zalups, R. K., R. M. Gelein, et al. (1988). "Nephrotoxicity of uranyl fluoride in uninephrectomized and sham-operated rats." Toxicol Appl Pharmacol **94**(1): 11-22.
- Zamora, M. L., B. L. Tracy, et al. (1998). "Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans." Toxicol Sci **43**(1): 68-77.

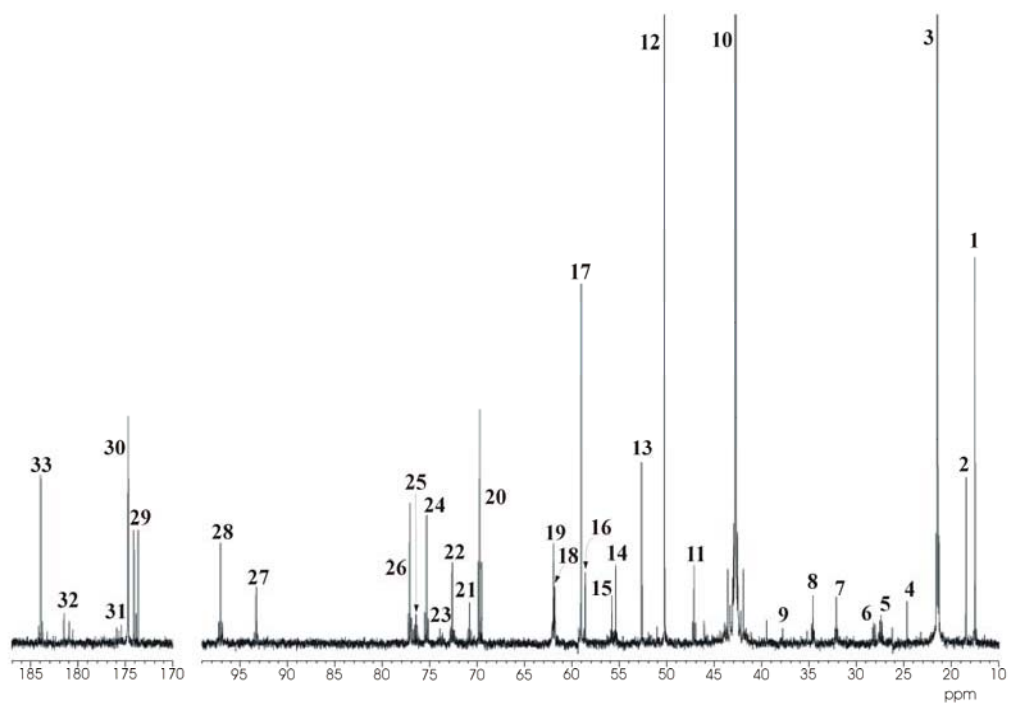
Zhu, G., X. Xiang, et al. (2008). "Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats." Arch Toxicol.

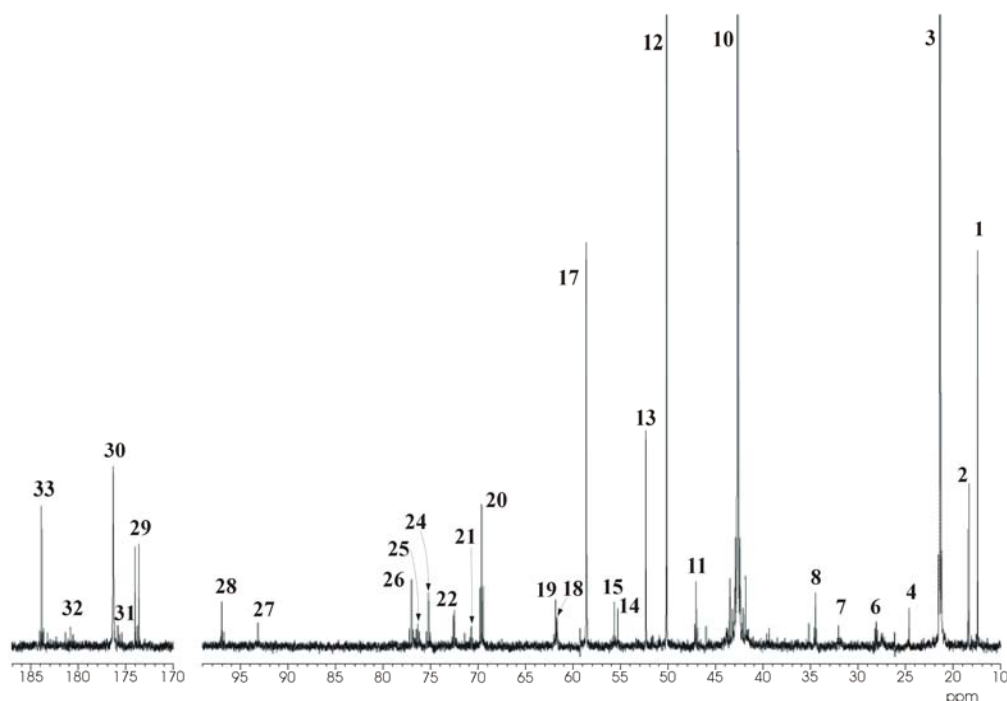




## Spectres RMN

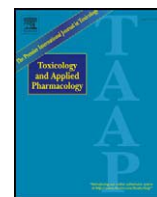
Figure 2A



**Figure 2B**

**Figure 2.** Spectres RMN au <sup>13</sup>C (125.17 MHz) d'extraits perchloriques neutralisés obtenus à partir de tubules proximaux isolés de souris incubés 60 minutes avec du [3-<sup>13</sup>C]lactate en l'absence (Figure 2.A) ou en la présence (Figure 2.B) de nitrate d'uranyle. (1) alanine C-3; (2) lactate C-3 contaminant; (3) lactate C-3; (4) acétate C-2; (5) glutamine C-3; (6) glutamate C-3; (7) glutamine C-4; (8) glutamate C-4; (9) aspartate C-3; (10) glycine C-2; (11) citrate (C2+C4); (12) artefact; (13) EDTA; (14) glutamine C-2; (15) glutamate C-2; (16) inconnu; (17) EDTA; (18) glucose C-6 α; (19) glucose C-6 β; (20) lactate C-2; (21) glucose C-4 (α+β); (22) glucose (C-2+C-5) α; (23) glucose C-3 α; (24) glucose C-2 β; (25) glucose C-3 β; (26) glucose C-5 β; (27) glucose C-1 α; (28) glucose C-1 β; (29) glycine C-1; (30) EDTA; (31) glutamate C-1; (32) glutamate C-5; (33) lactate C-1.

**Articles**



## Uranyl nitrate inhibits lactate gluconeogenesis in isolated human and mouse renal proximal tubules: A $^{13}\text{C}$ -NMR study

Sophie Renault, Hassan Faiz, Rudy Gadet, Bernard Ferrier, Guy Martin, Gabriel Baverel, Agnès Conjard-Duplany\*

Métabolisme et Maladies Métaboliques, Institut National de la Santé et de la recherche Médicale, Unit #820, Faculté de Médecine R.T.H. Laennec, Université de Lyon, 7-11 rue G. Paradin, 69372 Lyon Cedex 08, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 June 2009

Revised 27 August 2009

Accepted 2 September 2009

Available online 9 September 2009

#### Keywords:

Nephrotoxicity

Uranium

Metabolism

Lactate

Gluconeogenesis

Human

### ABSTRACT

As part of a study on uranium nephrotoxicity, we investigated the effect of uranyl nitrate in isolated human and mouse kidney cortex tubules metabolizing the physiological substrate lactate. In the millimolar range, uranyl nitrate reduced lactate removal and gluconeogenesis and the cellular ATP level in a dose-dependent fashion. After incubation in phosphate-free Krebs–Henseleit medium with 5 mM L-[1- $^{13}\text{C}$ ]-, or L-[2- $^{13}\text{C}$ ]-, or L-[3- $^{13}\text{C}$ ]lactate, substrate utilization and product formation were measured by enzymatic and NMR spectroscopic methods. In the presence of 3 mM uranyl nitrate, glucose production and the intracellular ATP content were significantly reduced in both human and mouse tubules. Combination of enzymatic and NMR measurements with a mathematical model of lactate metabolism revealed an inhibition of fluxes through lactate dehydrogenase and the gluconeogenic enzymes in the presence of 3 mM uranyl nitrate; in human and mouse tubules, fluxes were lowered by 20% and 14% (lactate dehydrogenase), 27% and 32% (pyruvate carboxylase), 35% and 36% (phosphoenolpyruvate carboxykinase), and 39% and 45% (glucose-6-phosphatase), respectively. These results indicate that natural uranium is an inhibitor of renal lactate gluconeogenesis in both humans and mice.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Uranium is largely used for civilian and military purposes. It is naturally found in waters, soils and rocks (Bleise et al., 2003). Renal toxicity is the hallmark effect of exposure to natural uranium (Craft et al., 2004). This nephrotoxicity has been studied in various animal models as well as in humans (Leggett, 1989; Craft et al., 2004). Several *in vivo* experiments have raised concerns of retention of uranium in the kidneys (Chen et al., 2004; Taulan et al., 2004; Linares et al., 2006; Belles et al., 2007). *In vitro* experiments revealed that proximal tubular cells can accumulate uranium (Ghadially et al., 1982; Mirto et al., 1999; Muller et al., 2008). As a consequence, the proximal tubule is the main target of its renal toxicity (Leggett, 1989). Histopathological studies revealed tubular lesions including tubular cellular vacuolization (Haley, 1982; Lim et al., 1987; McDonald-Taylor et al., 1997; Martinez et al., 2003), loss of brush border membrane (Haley, 1982; McDonald-Taylor et al., 1997) and alterations of mitochondria (Mueller and Mason, 1956; Blantz, 1975; Haley, 1982; Lim et al., 1987; Zhu et al., 2009). The precise cellular mechanisms of injury are

still poorly understood. Some investigations have provided data demonstrating mitochondrial dysfunctions (Thiebault et al., 2007), signs of oxidative stress (Kato et al., 1994; Linares et al., 2006; Thiebault et al., 2007; Banday et al., 2008), necrosis (Hirsch, 1976; Diamond et al., 1989; McDonald-Taylor et al., 1997; Mirto et al., 1999; L'Azou et al., 2002; Martinez et al., 2003; Thiebault et al., 2007) and apoptosis (Sano et al., 2000; Tolson et al., 2005; Thiebault et al., 2007). Surprisingly, the possible effects of uranium on the metabolism of renal proximal tubules remain poorly explored. At high concentrations, uranium was found to cause a diminution of oxygen consumption in isolated rabbit kidney tubules (Brady et al., 1989). Experiments conducted in cultured human renal cells HEK293 demonstrated a decrease in intracellular ATP levels and a down-regulation of the expression of the *Ldh1* gene (Prat et al., 2005). With the serial analysis of gene expression method, Taulan et al. (2004, 2006) evidenced a modified expression level of renal genes related to cell metabolism after acute and chronic exposure to uranium in mice but the possibility of associated biochemical changes has not been explored. The effect of uranyl nitrate on the activity of various enzymes of carbohydrate metabolism has recently been studied in rats after an *in vivo* intoxication (Banday et al., 2008); the renal activity of glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase significantly decreased with uranium exposure. Using rat kidney slices, Fleck et al. (2002) briefly mentioned that uranium intoxication

\* Corresponding author. Fax: +33 478778739.

E-mail address: [agnes.duplany@recherche.univ-lyon1.fr](mailto:agnes.duplany@recherche.univ-lyon1.fr) (A. Conjard-Duplany).

could reduce renal gluconeogenesis. In our study, we tested the hypothesis that uranium is an inhibitor of renal gluconeogenesis both in humans and mice. For this, we have incubated isolated human and mouse renal proximal tubules with lactate, a physiological substrate of the human (Nieth and Schollmeyer, 1966; Meyer et al., 2002) and rat kidney *in vivo* (Elhamri et al., 1993).

## Material and methods

**Isolation of human and mouse renal proximal tubules.** Fresh human normal kidney cortex was obtained from the uninvolved pole of kidneys removed for neoplasm from 18-h-fasted patients. The study received ethical committee approval, and informed consent was obtained from patients. Suspensions of renal tubular fragments were prepared by the method of Baverel et al. (1979). All animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Lyon 1 University. Fed female OF1 mice weighing 30 g were obtained from Charles River (Saint Germain sur l'Arbresle, France). They were killed by cervical dislocation and the kidneys, which were immediately removed, were used to prepare proximal tubular suspensions as described by Conjard et al. (2002).

**Uranyl stock solution and media preparation.** Uranyl stock solution ( $[U] = 6 \text{ mM}$ ) in Krebs–Henseleit buffer was obtained by dissolution of uranyl-nitrate crystals ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) in a solution of 9‰ NaCl. The pH was adjusted to 7.4 by addition of 2 M NaOH. Then, 0.154 M  $\text{NaHCO}_3$ , 0.154 M KCl, 0.154 M  $\text{MgSO}_4$  and 0.11 M  $\text{CaCl}_2$  were added to obtain a Krebs–Henseleit medium free of phosphate. The solution was gassed with a mixture of 95%  $\text{O}_2$  5%  $\text{CO}_2$ . For experimental purposes, this stock solution was diluted in a Krebs–Henseleit medium free of phosphate to obtain the required concentration of uranium. The incubation medium also contained 5 mM L-lactate. Note that our experiments were performed in a phosphate free Krebs–Henseleit medium because this avoided the appearance of a precipitate of uranyl phosphate in the presence of 3 mM uranyl nitrate.

**Incubation of proximal tubules for the dose-effect studies.** Tubular suspensions (200  $\mu\text{l}$ ) were incubated for 60 min in 10 ml stoppered Erlenmeyer flasks containing 1 ml Krebs–Henseleit medium. Incubations were carried out at 37°C in an atmosphere of  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (19:1). Uranyl nitrate was added to the medium so that final concentrations of 0.625, 1.25, 2.5 or 5 mM were obtained. In every experiment for each concentration of uranyl nitrate triplicates were performed. In order to test the possible influence of nitrate, two experiments were performed in which uranyl nitrate was replaced by sodium nitrate (0, 2.5, 5 and 10 mM). Incubation was stopped by adding perchloric acid (3% [vol/vol] final concentration) to each flask. In all experiments, zero-time flasks with substrates were prepared by adding perchloric acid before the tubules. After removal of the denatured protein by centrifugation, the supernatant was neutralized with 20% (wt/vol), KOH + 1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  for metabolite determination. The dry weight of the tissue was determined by drying a 200- $\mu\text{l}$  tubular suspension to constant weight at 110 °C.

**Incubation of proximal tubules for the  $^{13}\text{C}$ -NMR studies.** Five experiments were performed with human kidney tubules and six experiments were performed with mouse kidney tubules. One tubular suspension has been obtained for each experiment and equal aliquots of this suspension were distributed in the different flasks (1 ml). Each flask also contained 8 ml Krebs–Henseleit medium plus  $^{13}\text{C}$ -lactate labeled either on its C-1, or C-2 or C-3. The final concentration of L-[1- $^{13}\text{C}$ ]lactate, L-[2- $^{13}\text{C}$ ]lactate or L-[3- $^{13}\text{C}$ ]lactate was 5 mM. Incubations were performed for 60 min in the absence or in the presence of 3 mM uranyl nitrate. Thereafter, perchloric acid (3% [vol/vol] final concentration) was added and the supernatant was neutralized as previously described. A volume of 9 ml was

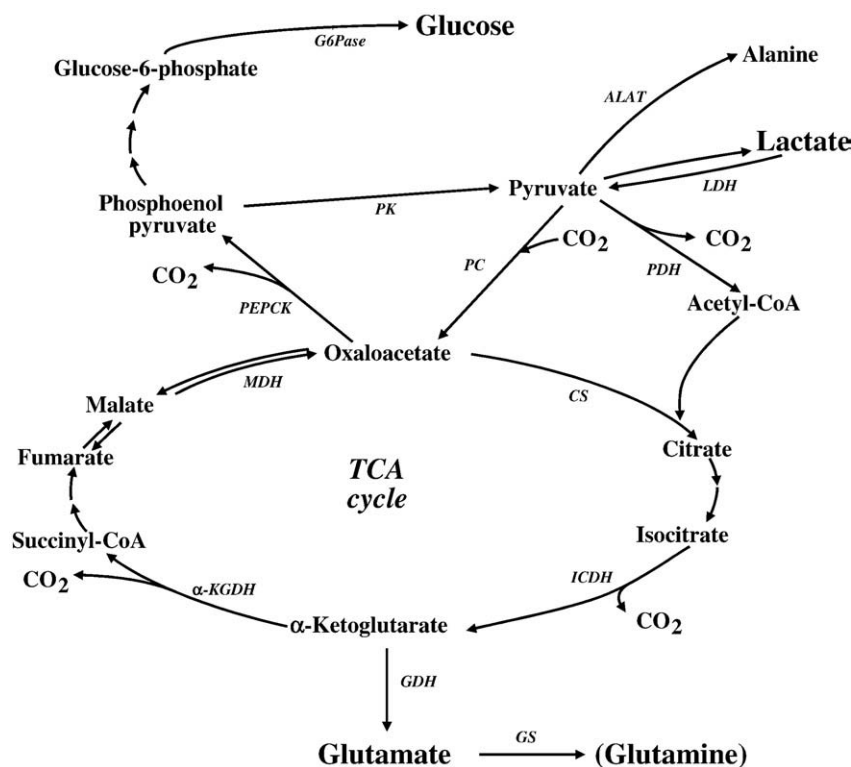
collected for NMR spectroscopic measurements. Enzymatic measurements were performed with the rest of the supernatant.

**$^{13}\text{C}$ -NMR techniques.** NMR measurements were performed and data were recorded as indicated previously (Chauvin et al., 1994, 1997; Vittorelli et al., 2005) at 125.75 MHz on a Bruker AM-500 WB spectrometer using a 5 mm broadband probe thermostatically maintained at  $8 \pm 0.5$  °C. In brief, magnet homogeneity was adjusted using the deuterium lock signal. In order to obtain absolute quantitative results, special care was taken in data acquisition. Acquisition parameters were as follows: spectral width, 25 000 Hz; tilt angle, 90°; data size, 32 K; repetition time, 50 s or 80 s; number of scans, 420. We used a standard (Waltz-16) pulse sequence for inverse-gated proton decoupling (Shaka et al., 1983). We did not use nuclear Overhauser enhancement during proton decoupling to avoid the use of corresponding correction factors. A 1 Hz line broadening was applied. Chemical shifts were expressed as p.p.m. (parts per million) relative to tetramethylsilane. Assignments were made by comparing the chemical shifts obtained with those given in the literature (Horthwarth and Lilley, 1978; Canioni et al., 1983).

**Metabolite assays.** Glutamine, glutamate, alanine, lactate, pyruvate, aspartate, glucose, citrate,  $\alpha$ -ketoglutarate, malate and ATP were determined according to the methods of Passonneau and Lowry (1993). CoA and the sum of acetyl-CoA + CoA were determined as described by Michal and Bergmeyer (1985).

**Reagents.** Enzymes, coenzymes were supplied by Roche Molecular Biochemicals (Meyland, France). L-[1- $^{13}\text{C}$ ]lactate, L-[2- $^{13}\text{C}$ ]lactate and L-[3- $^{13}\text{C}$ ]lactate were obtained from Euriso-Top (St. Aubin, France). Uranyl nitrate hexahydrate was purchased from Fluka Chemie (Buchs, Germany). Other reagents used in this study were from Sigma Chemicals (St. Louis, MO).

**Calculations and statistical analysis.** Net substrate utilization and product formation were calculated as the difference between the total flasks contents (tissue plus medium) at the start (zero-time flasks) and after the period of incubation. The net metabolic rates, reported as means  $\pm$  S.E.M., are expressed in  $\mu\text{moles}$  of substance removed or produced per g of tubule dry weight per hour. With [1- $^{13}\text{C}$ ]-, [2- $^{13}\text{C}$ ]- or [3- $^{13}\text{C}$ ] of lactate as substrate, the transfer of the C-1, C-2 or C-3 lactate to a given position was calculated by using the formula described previously (Chauvin et al., 1994, 1997; Vittorelli et al., 2005). For the interpretation of these data, we used a mathematical model derived from a model previously validated and published for alanine (Fouque et al., 1996; Dugelay et al., 1999). In this study with lactate as substrate, the removal of lactate by lactate dehydrogenase simply replaced the removal of alanine by alanine aminotransferase. The model used is based on the incorporation of  $^{13}\text{C}$  into various metabolites and allows the calculation of reaction rates of lactate degradation, of the tricarboxylic acid cycle, gluconeogenesis, alanine aminotransferase as well as pyruvate kinase, pyruvate dehydrogenase and pyruvate carboxylase (see more information on the model used and our calculation strategy provided in the [Supplementary Material section](#)). To evaluate the complete oxidation of lactate, the carbon balance was calculated from the enzymatic measurements by subtracting from the lactate removal the sum of the formation of pyruvate, alanine, aspartate and twice the formation of citrate,  $\alpha$ -ketoglutarate, malate, glutamate, glutamine and glucose. The  $^{13}\text{CO}_2$  production was calculated as the difference between the removal of the [1- $^{13}\text{C}$ ]-, [2- $^{13}\text{C}$ ]- or [3- $^{13}\text{C}$ ]lactate and the sum of the labeled non volatile products calculated from the [ $^{13}\text{C}$ ] NMR spectra. The results were analyzed by the Student's *t* test for paired data, comparing values obtained in the control conditions with those in the presence of 3 mM uranyl nitrate. A *p* value  $< 0.05$  was considered to be statistically



**Fig. 1.** Schematic representation of lactate metabolism in human and mouse renal proximal tubules.  $\alpha$ -KGDH,  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase; ALAT, alanine aminotransferase; CS, citrate synthase; GDH, glutamate dehydrogenase; G6Pase, glucose-6-phosphatase; GS, glutamine synthetase; ICDH, isocitrate dehydrogenase; LDH, lactate dehydrogenase; MDH, malate dehydrogenase; PC, pyruvate carboxylase; PDH, pyruvate dehydrogenase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PK, pyruvate kinase. Note that GS is absent in human renal proximal tubules.

significant. In the experiments performed with 5 mM unlabeled L-lactate as substrate in the presence of 0.625, 1.25, 2.5 and 5 mM uranyl nitrate or 2.5, 5 and 10 mM sodium nitrate, the results were analysed by the ANOVA test for repeated measurements followed by the Newman-Keul post-hoc test.

## Results

A schematic representation of the metabolism of lactate in human and mouse kidney tubules and the main enzymes involved are presented in Fig. 1.

### Effect of various concentrations of uranyl nitrate on the metabolism of unlabeled lactate in human and mouse kidney tubules

First, we established that neither 2.5 or 5 mM or 10 mM sodium nitrate had any effect on lactate removal, glucose synthesis and on the

ATP content of both human and mouse tubules incubated for 60 min in the presence of 5 mM lactate ( $n = 2$  with tubules from both species; data not shown).

Then, dose-effect experiments were performed by adding increasing concentrations (0.625, 1.25, 2.5 and 5 mM) of uranyl nitrate to the medium containing the tubules incubated for 60 min in the presence of 5 mM unlabeled lactate as substrate. In both human ( $n = 4$ ) and mouse tubules ( $n = 3$ ), 0.625 mM uranyl nitrate did not alter lactate removal or glucose production. By contrast, higher concentrations of uranyl nitrate modified either lactate utilization or glucose production or both. In the presence of 2.5 and 5 mM uranyl nitrate, the mean glucose production by human tubules was significantly inhibited by 13% and 37%, respectively; the mean lactate utilization was significantly inhibited (by 28%) only in the presence of 5 mM uranyl nitrate ( $n = 4$ ; results not shown).

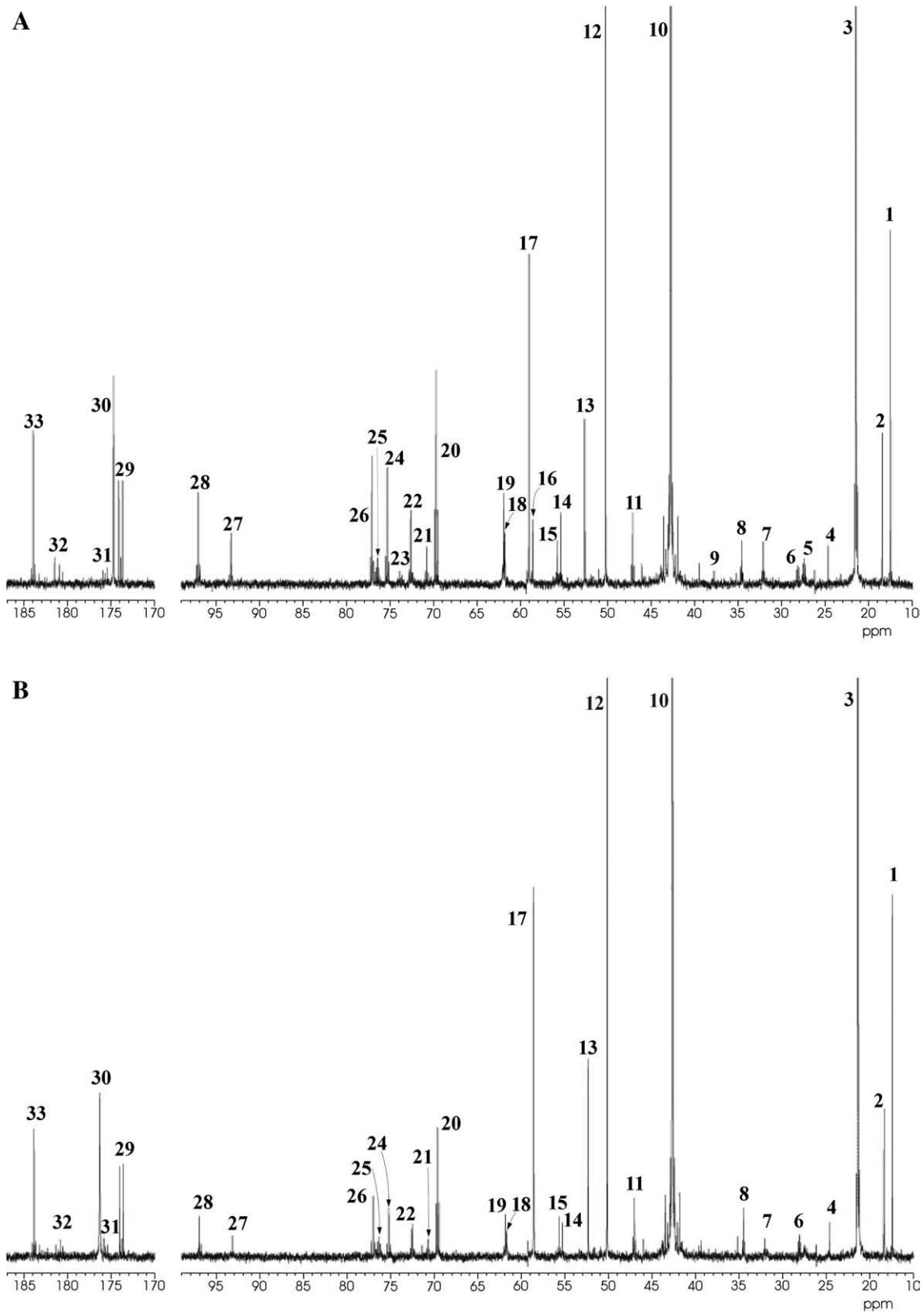
In mouse tubules, the mean glucose production was significantly inhibited by 6%, 25% and 53% in the presence of 1.25, 2.5 and 5 mM

**Table 1**  
Effect of 3 mM uranyl nitrate on the metabolism of 5 mM L-lactate in mouse kidney tubules.

[Uranyl nitrate]	Metabolite utilization (–) or accumulation ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ dry weight. $\text{h}^{-1}$ )					
	Lactate	Glucose	Alanine	Glutamate	Glutamine	Pyruvate
0 mM	$-714.2 \pm 59.9$	$90.1 \pm 9.6$	$28.7 \pm 3.0$	$7.7 \pm 2.0$	$26.3 \pm 6.7$	$15.7 \pm 3.5$
3 mM	$-617.0 \pm 46.6^*$	$49.7 \pm 4.5^*$	$33.4 \pm 2.9^*$	$10.9 \pm 3.1^*$	$14.3 \pm 5.5^*$	$14.0 \pm 3.0$
[Uranyl nitrate]	$\alpha$ -Keto-glutarate	Citrate	Carbon balance	Intracellular level ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ dry weight)		
				ATP	Acetyl-CoA	CoA
0 mM	$1.6 \pm 2.3$	$11.2 \pm 2.1$	$395.9 \pm 36.6$	$5.8 \pm 0.6$	$0.15 \pm 0.02$	$0.12 \pm 0.02$
3 mM	$6.7 \pm 4.2^*$	$8.1 \pm 1.9^*$	$390.2 \pm 33.1$	$2.8 \pm 0.5^*$	$0.08 \pm 0.01^*$	$0.05 \pm 0.01^*$

Kidney tubules were incubated for 1 h as described under Material and methods. The tubular dry weight was  $43.2 \pm 2.4$  mg. Results (in  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  dry weight.  $\text{h}^{-1}$ ) are reported as means  $\pm$  S.E.M. for six experiments. Statistical difference was measured by the paired Student's t test against the control.

\*  $p < 0.05$ . The corresponding  $^{13}\text{C}$ -NMR data are reported in Tables 2, S1 and S2.



**Fig. 2.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra (125.17 MHz) of neutralized  $\text{HClO}_4$  extracts obtained from isolated renal proximal tubules of mice incubated for 60 minutes with  $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ lactate in the absence (A) or in the presence (B) of 3 mM uranyl nitrate. (1) alanine C-3; (2) lactate C-3 contaminant; (3) lactate C-3; (4) acetate C-2; (5) glutamine C-3; (6) glutamate C-3; (7) glutamine C-4; (8) glutamate C-4; (9) aspartate C-3; (10) glycine C-2; (11) citrate (C2 + C4); (12) artefact; (13) EDTA; (14) glutamine C-2; (15) glutamate C-2; (16) unknown; (17) EDTA; (18) glucose C-6  $\alpha$ ; (19) glucose C-6  $\beta$ ; (20) lactate C-2; (21) glucose C-4 ( $\alpha$  +  $\beta$ ); (22) glucose (C-2 + C-5)  $\alpha$ ; (23) glucose C-3  $\alpha$ ; (24) glucose C-2  $\beta$ ; (25) glucose C-3  $\beta$ ; (26) glucose C-5  $\beta$ ; (27) glucose C-1  $\alpha$ ; (28) glucose C-1  $\beta$ ; (29) glycine C-1; (30) EDTA; (31) glutamate C-1; (32) glutamate C-5; (33) lactate C-1.

uranyl nitrate, respectively; lactate utilization was significantly inhibited by 8% and 24% only in the presence of 2.5 and 5 mM uranyl nitrate, respectively ( $n = 10$ ; results not shown).

On the basis of these results and in order to be able to measure precisely the key NMR resonances obtained with  $^{13}\text{C}$ -lactates, we decided to choose a 3-mM uranyl nitrate concentration to test the effect of the latter compound on fluxes through the pathways involved in lactate metabolism both in human and mouse tubules.

#### Effect of 3 mM uranyl nitrate on the pathways of lactate metabolism in mouse and human tubules

Tubules were incubated for 60 min in six experiments with 5 mM [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate, [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate and [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate in the absence and the presence of 3 mM uranyl nitrate.

#### Effect in mouse tubules

Table 1 shows the effect of 3 mM uranyl nitrate on lactate metabolism measured by enzymatic methods when all the values obtained with 5 mM [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate, [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate and [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate metabolism in mouse tubules were combined. The addition of uranyl nitrate caused a decrease in the mean lactate utilization ( $-14\%$ ), the mean glucose production ( $-45\%$ ) and the cellular ATP content ( $-52\%$ ). Uranyl nitrate also lowered the mean production of glutamine ( $-46\%$ ), citrate ( $-28\%$ ), the mean level of acetyl-CoA ( $-47\%$ ) and CoA ( $-58\%$ ) in a statistically significant manner. The synthesis of alanine was slightly increased ( $+16\%$ ). The complete oxidation of the lactate carbon skeleton was not modified (Table 1).

The values calculated from the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of perchloric extracts obtained after 60 min of incubation of the mouse tubules with 5 mM [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate (Fig. 2) in the absence or the presence of 3 mM uranyl nitrate are given in Table 2. The values for lactate removal measured by  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy were in good agreement with those measured enzymatically. Uranyl nitrate decreased the removal of [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate by 13% which is in agreement with the lowered lactate utilization ( $-14\%$ ) measured enzymatically. The accumulation of the labeled C-1 and C-2 of lactate indicated that lactate resynthesis occurred. 100% and 106% of the alanine accumulated was labeled in the absence and the presence of 3 mM uranyl nitrate, respectively; this indicates that some alanine present at zero-time was replaced by alanine synthesized from the added lactate. Uranyl nitrate increased

the labeling of alanine on its C-3 by 23%, which is in agreement with the enzymatic data (Table 1). Note that the labelings of the C-1, C-2, C-5 and C-6 of glucose were approximately equal which is in agreement with the passage of the lactate-derived metabolites through symmetrical molecules of the tricarboxylic acid cycle. The labeling of the C-3 and C-4 of glucose indicates a passage through citrate synthase and the subsequent tricarboxylic acid cycle steps. In the presence of 3 mM uranyl nitrate, the labeling of glucose on its C-1, C-6, C-2 and C-5 was reduced by 47%, 53%, 57% and 48%, respectively; this is in concordance with the reduced production of glucose ( $-45\%$ ) previously measured enzymatically. The labeling of the C-3 and C-4 of glucose was also greatly diminished by the addition of uranyl nitrate. The labeling of the C-4 of glutamate and glutamine indicates a passage through pyruvate dehydrogenase.

The total amount of labeled glutamine was significantly reduced in the presence of 3 mM uranyl nitrate ( $-52\%$ ) which is also in agreement with the enzymatic data presented in Table 1. Thanks to the activity of aspartate aminotransferase, small amounts of [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ] aspartate were produced both in the absence and the presence of uranyl nitrate.

The values derived from the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra (not shown) obtained with [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate as substrate without and with uranyl nitrate are given in Table 1 of the Supplementary Material section. The [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate removed was also in good agreement with the lactate removed measured enzymatically. Small amounts of the C-1 and C-3 of lactate were labeled both in the absence and the presence of uranyl nitrate. Uranyl nitrate reduced the labeling of glucose on all its carbons. Glutamine and glutamate were labeled on their C-1, C-2, C-3 and C-5. The labeling of C-2 and C-3 glutamate and glutamine indicates that C-2 lactate was metabolized through pyruvate carboxylase whereas the labeling of the C-5 of glutamate and glutamine occurred thanks to the operation of pyruvate dehydrogenase. Note that the labeling of glutamine on its C-2, C-3 and C-5 were strongly reduced in the presence of uranyl nitrate.

The values derived from the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra (not shown) obtained with [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate as substrate without and with uranyl nitrate are given in Table 2 of the Supplementary Material section. The [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate removed was in good agreement with the lactate removed measured enzymatically. The labeling of glucose on its C-3 and its C-4 reveals that lactate was metabolized through pyruvate carboxylase, yielding the labeling of the C-1 of oxaloacetate and then the labeling of the C-3 and C-4 of glucose through the gluconeogenic pathway. Uranyl nitrate significantly reduced the amount of glucose

**Table 2**  
Effect of 3 mM uranyl nitrate on the metabolism of 5 mM L-[ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate in mouse kidney tubules.

Metabolite utilization (–) or accumulation ( $\mu\text{mole. g}^{-1}$ dry weight. $\text{h}^{-1}$ )											
[Uranyl nitrate]	Lactate				Glucose						
	enz	C-3	C-1	C-2	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	
0 mM	$-723.2 \pm 56.5$	$-706.6 \pm 55.3$	$5.3 \pm 1.5$	$24.6 \pm 4.4$	$31.0 \pm 4.7$	$28.6 \pm 4.0$	$8.0 \pm 1.6$	$10.0 \pm 2.1$	$29.6 \pm 4.5$	$41.9 \pm 6.5$	
3 mM	$-634.8 \pm 39.4^*$	$-616.9 \pm 43.1^*$	$7.8 \pm 2.9^*$	$15.7 \pm 4.3$	$16.5 \pm 3.1^*$	$12.3 \pm 2.2^*$	$4.1 \pm 1.3$	$4.5 \pm 0.6$	$15.4 \pm 2.2^*$	$19.8 \pm 2.9^*$	
[Uranyl nitrate]	Alanine			Glutamate							
	C-1	C-2	C-3	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5			
0 mM	$0.1 \pm 0.1$	$0.7 \pm 0.5$	$27.9 \pm 3.8$	$2.5 \pm 0.7$	$5.0 \pm 0.6$	$4.7 \pm 1.3$	$7.7 \pm 1.2$	–			
3 mM	–	$1.0 \pm 0.5$	$34.3 \pm 3.2^*$	$3.0 \pm 0.4$	$7.0 \pm 1.6$	$6.2 \pm 1.0$	$11.0 \pm 1.5$	$0.4 \pm 0.2$			
[Uranyl nitrate]	Glutamine				Aspartate		$^{13}\text{CO}_2$				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-2	C-3					
0 mM	$2.7 \pm 0.2$	$9.6 \pm 1.0$	$10.9 \pm 1.2$	$11.1 \pm 1.4$	$0.2 \pm 0.2$	$0.4 \pm 0.2$	$444.1 \pm 63.3$				
3 mM	$0.7 \pm 0.5^*$	$5.2 \pm 1.5^*$	$4.2 \pm 1.7^*$	$6.1 \pm 2.2$	–	$0.4 \pm 0.2$	$441.3 \pm 38.1$				

Kidney tubules were incubated for 1 h as described under Material and methods. The tubular dry weight was  $43.2 \pm 2.4$  mg. Results (in  $\mu\text{mole. g}^{-1}$  dry weight.  $\text{h}^{-1}$ ) are reported as means  $\pm$  S.E.M. for six experiments. Statistical difference was measured by the paired Student's  $t$  test against the control.

\*  $p < 0.05$ . Substrate utilization and product formation, measured enzymatically, are reported in Table 1.



**Table 3**  
Effect of 3 mM uranyl nitrate on enzymatic fluxes during the metabolism of lactate in mouse kidney tubules.

[Uranyl nitrate]	Flux ( $\mu\text{mole of C3 units. g}^{-1} \text{ dry weight. h}^{-1}$ )						
	LDH	G6Pase	PDH	PC	PC /PDH	CS	$\alpha$ -KGDH
0 mM	-714.2 $\pm$ 59.9	180.3 $\pm$ 19.1	443.3 $\pm$ 42.0	280.9 $\pm$ 20.6	0.7 $\pm$ 0.1	707.9 $\pm$ 67.9	661.1 $\pm$ 58.3
3 mM	-617.0 $\pm$ 46.6*	99.5 $\pm$ 9.0*	431.1 $\pm$ 37.0	190.1 $\pm$ 14.4*	0.5 $\pm$ 0.1*	689.9 $\pm$ 75.5	650.0 $\pm$ 67.4
[Uranyl nitrate]	Flux ( $\mu\text{mole of C3 units. g}^{-1} \text{ dry weight. h}^{-1}$ )						
	ICDH	PK	ALAT	PEPCK	MDH	Endogenous Acetyl-CoA	
0 mM	696.8 $\pm$ 66.8	53.8 $\pm$ 9.9	28.2 $\pm$ 4.2	234.1 $\pm$ 14.9	661.1 $\pm$ 58.3	264.7 $\pm$ 55.6	
3 mM	681.8 $\pm$ 74.4	50.7 $\pm$ 10.5	32.5 $\pm$ 2.8	150.1 $\pm$ 9.4*	650.0 $\pm$ 67.4	258.9 $\pm$ 73.8	

Kidney tubules were incubated for 1 h as described under **Material and methods**. The tubular dry weight was  $43.2 \pm 2.4$  mg. Values (in  $\mu\text{mole of C3 units. g}^{-1} \text{ dry weight. h}^{-1}$ ) are given as means  $\pm$  S.E.M. for six experiments. Statistical difference was measured by the paired Student's t test against the control.

\*  $p < 0.05$ . Substrate utilization and product formation, measured enzymatically, are reported in **Table 1**.  $\alpha$ -KGDH,  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase; ALAT, alanine aminotransferase; CS, citrate synthase; G6Pase, glucose-6-phosphatase; ICDH, isocitrate dehydrogenase; LDH, lactate dehydrogenase; MDH, malate dehydrogenase; PC, pyruvate carboxylase; PDH, pyruvate dehydrogenase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PK, pyruvate kinase.

labeled on its C-3 (-78%) and its C-4 (-67%). As expected, there was no labeling of glucose on its carbons other than the C-3 and C-4 both in the absence and the presence of uranyl nitrate. The labeling of the C-1 of glutamate and glutamine also indicates that lactate was metabolized through pyruvate carboxylase. The labeling of the C-1 of glutamine was significantly reduced in the presence of uranyl nitrate (-44%), in agreement with the enzymatic data (**Table 1**).

**Table 3** shows the absolute values of fluxes through the enzymes involved in lactate metabolism. These values are derived from the combination of the enzymatic and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy results shown in **Tables 1 and 2** of this manuscript and in **Tables 1 and 2 of the Supplementary Material section** with calculations derived from a mathematical model identical with one previously developed for alanine (Dugelay et al., 1999). Uranyl nitrate decreased fluxes through lactate dehydrogenase (-14%), pyruvate carboxylase (-32%), phosphoenolpyruvate carboxykinase (-36%) and glucose-6-phosphatase (-45%). Fluxes through pyruvate dehydrogenase, alanine aminotransferase, pyruvate kinase and the enzymes of the tricarboxylic acid cycle were unchanged by the addition of uranyl nitrate. In agreement with the fact that the tubules were prepared from fed mice, a high flux through pyruvate dehydrogenase was observed and the ratio of the flux through pyruvate carboxylase over that through pyruvate dehydrogenase was low. Since flux through citrate synthase was much higher than that through pyruvate dehydrogenase this means that a significant fraction of the acetyl-CoA needed to synthesize citrate came from endogenous sources (**Table 5**).

#### Effect in human tubules

**Table 4** shows the effect of 3 mM uranyl nitrate on lactate metabolism measured by enzymatic methods when all the values

obtained with 5 mM [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate, [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate and [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate metabolism in human tubules were combined. The addition of uranyl nitrate caused a decrease in the mean lactate utilization (-21%), the mean glucose production (-39%) and the cellular ATP content (-61%). Uranyl nitrate also lowered the mean level of CoA and acetyl-CoA in a statistically significant manner. The synthesis of alanine and the complete oxidation of the lactate carbon skeleton (which did not occur when determined by carbon balance calculations) did not change in the presence of uranyl nitrate (**Table 4**).

The values derived from the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra (not shown) obtained with [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate as substrate in the absence and the presence of uranyl nitrate are given in **Table 5**; those obtained with [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate and [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate as substrate without and with uranyl nitrate are given in **Tables 3 and 4 of the Supplementary Material section**, respectively.

Irrespective of the carbon of lactate that was labeled, there was a good agreement between the removal of lactate measured enzymatically and that measured by NMR spectroscopy. Again, a small resynthesis of lactate occurred as seen with [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate and [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate as substrate because lactate carbons other than the one initially labeled became labeled during incubation (**Tables 5 of the main manuscript and Table 3 of the Supplementary Material section**). As explained above, the labelings of the C-1, C-2, C-5 and C-6 of glucose were approximately the same when [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate was the substrate (**Table 5**); this was also true when [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate was the substrate (**Table 3 of the Supplementary Material section**). As already seen with mouse tubules, the labeling of the C-3 and C-4 of glucose from [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate and [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactate indicates that citrate synthase and all the subsequent steps of the tricarboxylic acid cycle were involved in gluconeogenesis. That pyruvate dehydrogenase was functional is indicated by the significant labeling of the C-4 or the

**Table 4**  
Effect of 3 mM uranyl nitrate on the metabolism of 5 mM L-lactate in human kidney tubules.

[Uranyl nitrate]	Metabolite utilization (-) or accumulation ( $\mu\text{mole. g}^{-1} \text{ dry weight. h}^{-1}$ )						
	Lactate	Glucose	Alanine	Glutamate	Pyruvate	$\alpha$ -Keto-glutarate	Aspartate
0 mM	-519.6 $\pm$ 47.4	104.9 $\pm$ 10.3	133.0 $\pm$ 21.2	57.0 $\pm$ 5.9	19.1 $\pm$ 3.1	3.6 $\pm$ 0.7	7.6 $\pm$ 1.6
3 mM	-407.9 $\pm$ 34.1*	63.6 $\pm$ 4.0*	134.1 $\pm$ 21.2	55.9 $\pm$ 5.3	19.7 $\pm$ 2.8	5.1 $\pm$ 0.9*	6.3 $\pm$ 1.1
[Uranyl nitrate]	Citrate	Malate	Carbon balance	Intracellular level ( $\mu\text{mole. g}^{-1} \text{ dry weight}$ )			
				ATP	Acetyl-CoA	CoA	
0 mM	23.5 $\pm$ 3.8	1.8 $\pm$ 1.2	-21.7 $\pm$ 31.9	5.7 $\pm$ 0.6	0.07 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	
3 mM	22.3 $\pm$ 2.5	1.6 $\pm$ 1.0	-49.2 $\pm$ 34.7	2.2 $\pm$ 0.4*	0.04 $\pm$ 0.01*	0.05 $\pm$ 0.01*	

Kidney tubules were incubated for 1 h as described under **Material and methods**. The tubular dry weight was  $61.4 \pm 4.7$  mg. Results (in  $\mu\text{mole. g}^{-1} \text{ dry weight. h}^{-1}$ ) are reported as means  $\pm$  S.E.M. for five experiments. Statistical difference was measured by the paired Student's t test against the control.

\*  $p < 0.05$ . The corresponding  $^{13}\text{C}$ -NMR data are reported in **Tables 5, S3 and S4**.

**Table 5**  
Effect of 3 mM uranyl nitrate on the metabolism of 5 mM L-[3-<sup>13</sup>C]lactate in human kidney tubules.

Metabolite utilization (–) or accumulation (μmole. g <sup>-1</sup> dry weight. h <sup>-1</sup> )											
[Uranyl nitrate]	Lactate				Glucose						
	enz	C-3	C-1	C-2	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	
0 mM	-534.5 ± 50.7	-495.9 ± 49.1	0.7 ± 0.3	13.2 ± 2.4	25.3 ± 3.1	22.9 ± 2.8	4.4 ± 0.8	5.2 ± 1.3	22.9 ± 3.2	28.2 ± 2.8	
3 mM	-418.2 ± 39.1*	-379.2 ± 25.3*	1.1 ± 0.4	8.6 ± 1.0*	12.1 ± 1.5*	10.7 ± 1.6*	2.4 ± 1.1	2.6 ± 0.8	11.6 ± 1.6*	13.9 ± 1.3*	
[Uranyl nitrate]	Alanine			Glutamate							
	C-1	C-2	C-3	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5			
0 mM	0.4 ± 0.1	4.2 ± 1.0	95.8 ± 22.2	3.2 ± 0.7	12.9 ± 1.7	8.3 ± 0.6	18.2 ± 1.6	0.5 ± 0.2			
3 mM	0.4 ± 0.1	2.1 ± 0.8*	107.7 ± 20.4	2.7 ± 0.4	11.6 ± 1.3	8.3 ± 0.7	18.5 ± 0.9	2.5 ± 2.4			
[Uranyl nitrate]	Aspartate		Citrate		<sup>13</sup> CO <sub>2</sub>						
	C-2	C-3	C-2	C-3	C-2	C-3					
0 mM	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.7	0.7 ± 0.4	224.7 ± 38.4						
3 mM	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.3	0.8 ± 0.6	0.4 ± 0.2	159.8 ± 20.2						

Kidney tubules were incubated for 1 h as described under **Material and methods**. The tubular dry weight was 61.4 ± 4.7 mg. Results (in μmole. g<sup>-1</sup> dry weight. h<sup>-1</sup>) are reported as means ± S.E.M. for five experiments. Statistical difference was measured by the paired Student's t test against the control.

\*  $p < 0.05$ . Substrate utilization and product formation, measured enzymatically, are reported in **Table 4**.

C-5 of glutamate from [3-<sup>13</sup>C]lactate or [2-<sup>13</sup>C]lactate, respectively. However, the fact that, with [2-<sup>13</sup>C]lactate as substrate and unlike in mouse tubules, the labeling of the C-3 and C-4 of glucose was much lower than that of the other glucose carbons, suggests that flux through pyruvate dehydrogenase was limited. **Table 4** of the Supplementary Material section shows that, like in mouse tubules, pyruvate carboxylase functioned in human tubules to lead to the labeling of C-3 and C-4 of glucose. The addition of 3 mM uranyl nitrate led approximately to a 50% inhibition of the labeling of the glucose carbons when 5 mM [1-<sup>13</sup>C]lactate, [2-<sup>13</sup>C]lactate or [3-<sup>13</sup>C]lactate were the substrates (**Table 5** of the main manuscript and **Tables 3 and 4** of the Supplementary Material section).

Using the same model of lactate metabolism as that employed for mouse tubules, fluxes through the pathways of lactate metabolism in human tubules have been calculated in the absence and the presence of 3 mM uranyl nitrate (**Table 6**).

Uranyl nitrate decreased fluxes through lactate dehydrogenase (-20%), pyruvate carboxylase (-27%), phosphoenolpyruvate carboxykinase (-35%) and glucose-6-phosphatase (-39%). Fluxes through pyruvate dehydrogenase, alanine aminotransferase, pyruvate kinase and the enzymes of the tricarboxylic acid cycle were unchanged by the addition of uranyl nitrate. In agreement with the fact that the tubules were prepared from fasted patients, flux through pyruvate dehydrogenase was much lower than that through pyruvate carboxylase and the ratio of the flux through pyruvate carboxylase over that through

pyruvate dehydrogenase was much higher than that in mouse tubules (see **Tables 3 and 6** for comparison). Again, since flux through citrate synthase was much higher than that through pyruvate dehydrogenase this means that a significant fraction of the acetyl-CoA needed to synthesize citrate came from endogenous sources (**Table 6**).

## Discussion

The present study establishes for the first time that uranyl nitrate interferes with lactate metabolism in kidney tubules from both fasted humans and fed mice. Uranyl nitrate also caused a large fall of the cellular level of ATP, an important marker of cell viability. These toxic effects occurred acutely and could be demonstrated after only 1 h of incubation. Our data also demonstrate that the effect of uranyl nitrate on renal lactate metabolism was due to the uranyl but not to the nitrate moiety of uranyl nitrate. This demonstration is consistent with numerous animal studies that have provided evidence of *in vivo* (Wright and Plummer, 1974; Blantz, 1975; Haley et al., 1982; McDonald-Taylor et al., 1997; Gilman et al., 1998; Sanchez et al., 2001; Martinez et al., 2003; Banday et al., 2008) and *in vitro* (L'Azou et al., 2002; Thiebault et al., 2007) uranium-induced cytotoxicity on renal cells. It also supports the view that an alteration of cellular metabolism is a major factor of uranium toxicity (Brady et al., 1989; Fleck et al., 2002; Taulan et al., 2004; Prat et al., 2005; Taulan et al., 2006; Banday et al., 2008).

**Table 6**  
Effect of 3 mM uranyl nitrate on enzymatic fluxes during lactate metabolism in human kidney tubules.

[Uranyl nitrate]	Flux (μmole of C3 units. g <sup>-1</sup> dry weight. h <sup>-1</sup> )						
	LDH	G6Pase	PDH	PC	PC /PDH	CS	α-KGDH
0 mM	-535.5 ± 40.6	209.8 ± 20.6	121.5 ± 21.0	345.9 ± 34.6	3.4 ± 1.0	321.6 ± 55.6	237.5 ± 58.0
3 mM	-429.3 ± 30.7*	127.2 ± 8.0*	98.8 ± 24.0	253.7 ± 18.0*	3.1 ± 0.6	250.2 ± 65.8	167.0 ± 65.1
[Uranyl nitrate]	Flux (μmole of C3 units. g <sup>-1</sup> dry weight. h <sup>-1</sup> )						
	ICDH	PK	ALAT	PEPCK	MDH	Endogenous acetyl-CoA	
0 mM	298.1 ± 57.6	50.2 ± 11.3	99.2 ± 22.6	260.0 ± 29.7	235.7 ± 59.0	200.1 ± 38.5	
3 mM	227.9 ± 65.5	41.7 ± 7.5	98.9 ± 12.3	168.8 ± 13.4*	165.4 ± 65.7	151.4 ± 43.6	

Kidney tubules were incubated for 1 h as described under **Material and methods**. The tubular dry weight was 61.4 ± 4.7 mg. Values (in μmole of C3 units. g<sup>-1</sup> dry weight. h<sup>-1</sup>) are given as means ± S.E.M. for five experiments. Statistical difference was measured by the paired Student's t test against the control.

\*  $p < 0.05$ . Substrate utilization and product formation, measured enzymatically, are reported in **Table 4**. α-KGDH, α-ketoglutarate dehydrogenase; ALAT, alanine aminotransferase; CS, citrate synthase; G6Pase, glucose-6-phosphatase; ICDH, isocitrate dehydrogenase; LDH, lactate dehydrogenase; MDH, malate dehydrogenase; PC, pyruvate carboxylase; PDH, pyruvate dehydrogenase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PK, pyruvate kinase.

It is important to emphasize that uranyl nitrate reduced lactate removal and the production of glucose but did not alter the complete oxidation of lactate. Consistent with these observations, fluxes through lactate dehydrogenase and through the entire gluconeogenic pathway but not fluxes through pyruvate dehydrogenase and through the tricarboxylic acid cycle were diminished. In agreement with this, it is of interest to mention that the diminution of flux through lactate dehydrogenase was close to the reduction of flux through glucose-6-phosphatase in both human and mouse kidney tubules (Tables 3 and 6). Note also that a decrease in the glucose-6-phosphatase (–27%) and the fructose 1-6-bisphosphatase (–31%) enzymatic activities has been established, but in a study conducted on rats exposed *in vivo* to uranyl nitrate (Banday et al., 2008).

Since lactate gluconeogenesis is an ATP-dependent process and since the cellular ATP level was greatly diminished by the addition of uranyl nitrate, it is logical to consider that, in our experiments, the inhibition of gluconeogenesis was a primary effect of uranyl nitrate leading to a secondary inhibition of lactate removal. The reduction of glutamine synthesis (that does not exist in human tubules) in mouse tubules can also be attributed to the fall of the cellular level of ATP because glutamine synthetase is an ATP-dependent enzyme.

The fall of the cellular level of ATP in both human and mouse kidney tubules raises the question of the mechanism of this effect. It is very likely that this did not result from an inhibition of the respiratory chain because fluxes through most of the NADH-dependent enzymes (except lactate dehydrogenase) involved in lactate metabolism such as pyruvate dehydrogenase and the dehydrogenases operating in the tricarboxylic acid cycle were not reduced. Thus, it is likely that the dramatic fall of the cellular ATP level observed in the present study was due to the capacity of uranyl to bind to ATP (De Stefano et al., 2005). Also in agreement with this view is the observation that uranyl nitrate did not alter the complete oxidation of lactate determined by carbon balance calculations or by the production of <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> from the variously <sup>13</sup>C-labeled lactates employed in this study (see Tables 1, 2, 4 and 5 of the main manuscript and Tables 1–4 of the Supplementary Material section).

The large reduction of the cellular level of CoA and acetyl-CoA in both human and mouse tubules (Tables 1 and 4) suggests that uranyl has some affinity for thiol-containing metabolites. Although this was not observed in all studies (Linares et al., 2005; Belles et al., 2007), it is interesting to note that a decline of total-SH (–29%) was observed in the renal cortex of rats after an uranyl nitrate injection (Banday et al., 2008). It is conceivable that, besides the fall of the cellular level of ATP, the depletion of acetyl-CoA contributed to the reduction of flux through pyruvate carboxylase because the latter metabolite is a cofactor of this enzyme. It is interesting to note that, although CoA is a substrate of pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase, the cellular depletion of CoA did not reduce fluxes through these enzymes.

Our results demonstrate that the effect of uranyl nitrate on lactate metabolism in human and mouse kidney tubules are similar and this may raise the question of the interest to study such effects of this compound in kidney tubules from these two species. First, it should be emphasized that, for obvious reasons, the availability of human tissue pieces is limited. This is why an animal model is needed to perform such studies with the hope that the data obtained are extrapolable to humans. As shown in this study, the human and mouse kidney tubules seem to have the same sensitivity to the deleterious effects of uranyl nitrate on lactate metabolism by human and mouse kidney tubules. Therefore, it seems justified to use mouse kidney tubules to predict the effects of uranyl nitrate in human kidney tubules.

It should also be underlined that, in present study, we used tubules from fasted patients on the one hand, and, on the other hand, from fed mice. This may raise the question of the possibility to directly compare results obtained with human and mouse kidney tubules. It should be pointed out here that tubules from fed patients are not

available. Despite this, we have deliberately chosen to use tubules from fed mice because this represents the nutritional state in which these animals are liable to be exposed to uranium in the nature. In addition, as demonstrated in a previous study from this laboratory (Conjard et al., 2002), the only effect of fasting on lactate metabolism in mouse kidney tubules is to stimulate glucose synthesis at the expense of lactate complete oxidation without altering lactate utilization. Since uranyl nitrate affected only lactate utilization and lactate gluconeogenesis without changing lactate oxidation in the present study, and since lactate gluconeogenesis persisted at high rates in tubules from fed mice, we consider that we can compare the effects of uranyl nitrate on fluxes through enzymes of lactate metabolism in human and mouse kidney tubules.

Finally, it is important to examine whether the deleterious effects of uranyl on lactate gluconeogenesis and on the cellular ATP content of human kidney tubules has some clinical relevance in the case of uranium exposure. Data in the literature report that the urinary uranium concentration in humans or rats exposed to uranium is in the nanomolar to micromolar range (Miller et al., 1998; Pellmar et al., 1999; Krystek and Ritsema, 2002; Arfsten et al., 2007). Given that we found in this study that uranyl nitrate has adverse effects on lactate gluconeogenesis and the cellular level of ATP in human and mouse kidney tubules in the millimolar range, our results suggest that, at least acutely, natural uranium is moderately nephrotoxic when compared with the classical nephrotoxic metals (cadmium, lead, mercury) as pointed out by a report by Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR, 1999). These results also suggest that, like *in vitro*, uranyl has to accumulate within renal proximal tubular cells *in vivo* to produce its toxic effect and that, for this, sufficient time of exposure to uranyl has to occur. In agreement with this view is the observation that renal injury resulting from uranium exposure can be diagnosed within days of exposure (ATSDR, 1999). In this respect it should also be underlined that at least 15 h exposure of cultured renal cells to 1 mM uranium was needed to observe a toxic effect (Muller et al., 2006).

#### Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest.

#### Acknowledgments

This research was financially supported by the CEA, INSERM, INRA and CNRS by the “ToxNuc-E” program.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.taap.2009.09.002](https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.09.002).

#### References

- Arfsten, D.P., Wilfong, E.R., Bekkedal, M.Y., Johnson, E.W., McInturf, S.M., Eggers, J.S., Schaeffer, D.J., Still, K.R., 2007. Evaluation of the effect of implanted depleted uranium (DU) on adult rat behavior and toxicological endpoints. *J. Toxicol. Environ. Health A* 70, 1995–2010.
- ATSDR, 1999. Toxicological Profile for Uranium. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
- Banday, A.A., Priyamvada, S., Farooq, N., Yusufi, A.N., Khan, F., 2008. Effect of uranyl nitrate on enzymes of carbohydrate metabolism and brush border membrane in different kidney tissues. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2080–2088.
- Baverel, G., Bonnard, M., Pellet, M., 1979. Lactate and pyruvate metabolism in isolated human kidney tubules. *FEBS Lett.* 101, 282–286.
- Belles, M., Linares, V., Luisa Albina, M., Sirvent, J., Sanchez, D.J., Domingo, J.L., 2007. Melatonin reduces uranium-induced nephrotoxicity in rats. *J. Pineal. Res.* 43, 87–95.
- Blantz, R.C., 1975. The mechanism of acute renal failure after uranyl nitrate. *J. Clin. Invest.* 55, 621–635.
- Bleise, A., Danesi, P.R., Burkart, W., 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J. Environ. Radioact.* 64, 93–112.
- Brady, H.R., Kone, B.C., Brenner, R.M., Gullans, S.R., 1989. Early effects of uranyl nitrate on respiration and K<sup>+</sup> transport in rabbit proximal tubule. *Kidney Int.* 36, 27–34.

- Canoni, P., Alger, J.R., Shulman, R.G., 1983. Natural abundance Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver and adipose tissue of the living rat. *Biochemistry* 22, 4974–4980.
- Chauvin, M.F., Megnin-Chanet, F., Martin, G., Lhoste, J.M., Baverel, G., 1994. The rabbit kidney tubule utilizes glucose for glutamine synthesis. A <sup>13</sup>C NMR study. *J. Biol. Chem.* 269, 26025–26033.
- Chauvin, M.F., Megnin-Chanet, F., Martin, G., Mispelter, J., Baverel, G., 1997. The rabbit kidney tubule simultaneously degrades and synthesizes glutamate. A <sup>13</sup>C NMR study. *J. Biol. Chem.* 272, 4705–4716.
- Chen, J., Meyerhof, D.P., Tracy, B.L., 2004. Model results of kidney burdens from uranium intakes. *Health Phys.* 86, 3–11.
- Conjard, A., Brun, V., Martin, M., Baverel, G., Ferrier, B., 2002. Effect of starvation on glutamine ammoniogenesis and gluconeogenesis in isolated mouse kidney tubules. *Biochem. J.* 368, 301–308.
- Craft, E., Abu-Qare, A., Flaherty, M., Garofolo, M., Rincavage, H., Abou-Donia, M., 2004. Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 7, 297–317.
- De Stefano, C., Gianguzza, A., Pettignano, A., Sammartano, S., 2005. Interaction of UO<sub>2</sub> (2+) with ATP in aqueous ionic media. *Biophys. Chem.* 117, 147–153.
- Diamond, G.L., Morrow, P.E., Panner, B.J., Gelein, R.M., Baggs, R.B., 1989. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* 13, 65–78.
- Dugelay, S., Chauvin, M.F., Megnin-Chanet, F., Martin, G., Lareal, M.C., Lhoste, J.M., Baverel, G., 1999. Acetate stimulates flux through the tricarboxylic acid cycle in rabbit renal proximal tubules synthesizing glutamine from alanine: a <sup>13</sup>C NMR study. *Biochem. J.* 342 (Pt 3), 555–566.
- Elhamri, M., Martin, M., Ferrier, B., Baverel, G., 1993. Substrate uptake and utilization by the kidney of fed and starved rats *in vivo*. *Ren. Physiol. Biochem.* 16, 311–324.
- Fleck, M., Appenroth, D., Malich, A., Stein, G., Fleck, C., 2002. Renal interstitial fibrosis (RIF): II. Ultrasound follow up study of single uranyl nitrate administration causing renal dysfunction in rats—comparison with histologic and functional renal parameters. *Exp. Toxicol. Pathol.* 54, 15–23.
- Fouque, D., Dugelay, S., Martin, G., Combet, J., Baverel, G., 1996. Alanine metabolism in isolated human kidney tubules—use of a mathematical model. *Eur. J. Biochem.* 236, 128–137.
- Ghadially, F.N., Lalonde, J.M., Yang-Steppuhn, S., 1982. Uraniosomes produced in cultured rabbit kidney cells by uranyl acetate. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 39, 21–30.
- Gilman, A.P., Villeneuve, D.C., Secours, V.E., Yagminas, A.P., Tracy, B.L., Quinn, J.M., Valli, V.E., Willes, R.J., Moss, M.A., 1998. Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague–Dawley rat. *Toxicol. Sci.* 41, 117–128.
- Haley, D.P., 1982. Morphologic changes in uranyl nitrate-induced acute renal failure in saline- and water-drinking rats. *Lab. Invest.* 46, 196–208.
- Haley, D.P., Bulger, R.E., Dobyan, D.C., 1982. The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 41, 181–192.
- Hirsch, G.H., 1976. Differential effects of nephrotoxic agents on renal transport and metabolism by use of *in vitro* techniques. *Environ. Health Perspect.* 15, 89–99.
- Horthwarth, O.W., Lilley, D.M.J., 1978. Carbon-13-NMR of peptides and proteins. *Prog. NMR Spectrosc.* 12, 1–40.
- Kato, A., Hishida, A., Nakajima, T., 1994. Effects of oxygen free radical scavengers on uranium-induced acute renal failure in rats. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 855–859.
- Krystek, P., Ritsema, R., 2002. Determination of uranium in urine—measurement of isotope ratios and quantification by use of inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 374, 226–229.
- L'Azou, B., Henge-Napoli, M.H., Minaro, L., Mirto, H., Barrouillet, M.P., Cambar, J., 2002. Effects of cadmium and uranium on some *in vitro* renal targets. *Cell Biol. Toxicol.* 18, 329–340.
- Leggett, R.W., 1989. The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys.* 57, 365–383.
- Lim, I.K., Lee, K.H., Han, B.D., Jang, J.J., Yun, T.K., 1987. Uranyl nitrate induced polyuric acute tubular necrosis in rats. *Yonsei Med. J.* 28, 38–48.
- Linares, V., Albina, M.L., Belles, M., Mayayo, E., Sanchez, D.J., Domingo, J.L., 2005. Combined action of uranium and stress in the rat. II. Effects on male reproduction. *Toxicol. Lett.* 158, 186–195.
- Linares, V., Belles, M., Albina, M.L., Sirvent, J.J., Sanchez, D.J., Domingo, J.L., 2006. Assessment of the pro-oxidant activity of uranium in kidney and testis of rats. *Toxicol. Lett.* 167, 152–161.
- Martinez, A.B., Mandalunis, P.M., Bozal, C.B., Cabrini, R.L., Ubios, A.M., 2003. Renal function in mice poisoned with oral uranium and treated with ethane-1-hydroxy-1,1-bisphosphonate (EHBP). *Health Phys.* 85, 343–347.
- McDonald-Taylor, C.K., Singh, A., Gilman, A., 1997. Uranyl nitrate-induced proximal tubule alterations in rabbits: a quantitative analysis. *Toxicol. Pathol.* 25, 381–389.
- Meyer, C., Stumvoll, M., Dostou, J., Welle, S., Haymond, M., Gerich, J., 2002. Renal substrate exchange and gluconeogenesis in normal postabsorptive humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E428–E434.
- Michal, G., Bergmeyer, H.U., 1985. Coenzyme A: catalytic method with phosphate acetyltransferase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 169–177.
- Miller, A.C., Fuciarelli, A.F., Jackson, W.E., Ejniak, E.J., Emond, C., Strocko, S., Hogan, J., Page, N., Pellmar, T., 1998. Urinary and serum mutagenicity studies with rats implanted with depleted uranium or tantalum pellets. *Mutagenesis* 13, 643–648.
- Mirto, H., Henge-Napoli, M.H., Gibert, R., Ansoborlo, E., Fournier, M., Cambar, J., 1999. Intracellular behaviour of uranium(VI) on renal epithelial cell in culture (LLC-PK1): influence of uranium speciation. *Toxicol. Lett.* 104, 249–256.
- Mueller, C.B., Mason, A.D., 1956. The pathogenesis of acute renal failure following incompatible blood transfusion: an experimental study. *Am. J. Clin. Pathol.* 26, 705–720.
- Muller, D., Houpert, P., Cambar, J., Henge-Napoli, M.H., 2006. Role of the sodium-dependent phosphate co-transporters and of the phosphate complexes of uranyl in the cytotoxicity of uranium in LLC-PK1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 214, 166–177.
- Muller, D.S., Houpert, P., Cambar, J., Henge-Napoli, M.H., 2008. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporters and absorptive endocytosis in the uptake of low concentrations of uranium and its toxicity at higher concentrations in LLC-PK1 cells. *Toxicol. Sci.* 101, 254–262.
- Nieth, H., Schollmeyer, P., 1966. Substrate-utilization of the human kidney. *Nature* 209, 1244–1245.
- Passonneau, J.V., Lowry, O.H., 1993. *Enzymatic Analysis: A Practice Guide*. The Humana Press, Totowa, NJ.
- Pellmar, T.C., Fuciarelli, A.F., Ejniak, J.W., Hamilton, M., Hogan, J., Strocko, S., Emond, C., Mottaz, H.M., Landauer, M.R., 1999. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol. Sci.* 49, 29–39.
- Prat, O., Berenguer, F., Malard, V., Tavan, E., Sage, N., Steinmetz, G., Quemeneur, E., 2005. Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity. *Proteomics* 5, 297–306.
- Sanchez, D.J., Belles, M., Albina, M.L., Sirvent, J.J., Domingo, J.L., 2001. Nephrotoxicity of simultaneous exposure to mercury and uranium in comparison to individual effects of these metals in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 84, 139–154.
- Sano, K., Fujigaki, Y., Miyaji, T., Ikegaya, N., Ohishi, K., Yonemura, K., Hishida, A., 2000. Role of apoptosis in uranyl acetate-induced acute renal failure and acquired resistance to uranyl acetate. *Kidney Int.* 57, 1560–1570.
- Shaka, A.J., Keeler, J., Freeman, R., Frenkiel, T., 1983. Evaluation of a new broadband decoupling sequence: WALTZ-16. *J. Magn. Reson.* 52, 335–338.
- Taulan, M., Paquet, F., Maubert, C., Delissen, O., Demaille, J., Romey, M.C., 2004. Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environ. Health Perspect.* 112, 1628–1635.
- Taulan, M., Paquet, F., Argiles, A., Demaille, J., Romey, M.C., 2006. Comprehensive analysis of the renal transcriptional response to acute uranyl nitrate exposure. *BMC Genomics* 7, 2.
- Thiebault, C., Carriere, M., Milgram, S., Simon, A., Avoscan, L., Gouget, B., 2007. Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicol. Sci.* 98, 479–487.
- Tolson, J.K., Roberts, S.M., Jortner, B., Pomeroy, M., Barber, D.S., 2005. Heat shock proteins and acquired resistance to uranium nephrotoxicity. *Toxicology* 206, 59–73.
- Vittorelli, A., Gauthier, C., Michoudet, C., Martin, G., Baverel, G., 2005. Characteristics of glutamine metabolism in human precision-cut kidney slices: a <sup>13</sup>C-NMR study. *Biochem. J.* 387, 825–834.
- Wright, P.J., Plummer, D.T., 1974. The use of urinary enzyme measurements to detect renal damage caused by nephrotoxic compounds. *Biochem. Pharmacol.* 23, 65–73.
- Zhu, G., Xiang, X., Chen, X., Wang, L., Hu, H., Weng, S., 2009. Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats. *Arch. Toxicol.* 83, 37–46.