

Étude des effets de l'uranium sur l'intégrité de l'os

MAÂMAR SOUIDI
NDÉYE MARIÈME WADE-GUEYE
LINE MANENS
ERIC BLANCHARDON
JOCELYNE AIGUEPERSE

Institut de radioprotection
et de sûreté nucléaire
(IRSN)
Laboratoire de
radiotoxicologie et
radiobiologie
expérimentale (LRTOX)
31, avenue de la Division
Leclerc
92262 Fontenay-aux-Roses
Cedex
France
<maamar.souidi@irsn.fr>
<line@manens.org>
<eric.blanchardon@irsn.fr>
<jocelyne.aigueperse@irsn.fr>

Tirés à part :
M. Souidi

Résumé. L'uranium naturel est un radionucléide (un métal lourd radioactif) présent naturellement dans l'environnement depuis l'origine de la terre. À cet uranium d'origine naturelle viennent s'ajouter des apports plus récents résultant des activités industrielles et militaires de l'homme, traduisant une dissémination de cette radionucléide dans l'environnement. Après ingestion chronique (alimentation, eau potable), l'uranium est accumulé dans divers organes, et plus particulièrement dans l'os, qui constitue un site préférentiel d'accumulation à long terme et d'une potentielle toxicité due essentiellement à ses propriétés chimio-toxiques. Plusieurs études ont montré que l'exposition à des concentrations élevées d'uranium affecte la croissance osseuse. Néanmoins, on connaît peu les effets de l'exposition chronique à de faibles doses d'uranium sur l'os, en particulier lorsqu'il est ingéré via l'eau de boisson, une des principales voies d'exposition pour le public après contamination de l'environnement. Dans cette étude, les effets d'une exposition chronique à l'uranium naturel via l'eau de boisson sur l'intégrité de l'os et le remodelage osseux ont été analysés. Pour cela des rats ont été contaminés dès la naissance avec différentes concentrations d'uranium naturel (1,5, 10 et 40 mg/L) pendant neuf mois. Afin d'étudier l'impact des modifications du métabolisme osseux susceptibles d'être engendrées par l'uranium sur l'intégrité du tissu osseux, nous avons utilisé pour la première fois la microtomographie tridimensionnelle qui correspond à un microscanner de haute résolution. Après neuf mois de contamination, l'étude des paramètres de microarchitecture a permis de mettre en évidence une diminution significative du diamètre de l'os cortical du fémur chez les rats contaminés dès la naissance, seulement avec la dose de 40 mg/L.

En conclusion, l'ingestion chronique d'uranium à de faibles concentrations est susceptible d'affecter la croissance en largeur de l'os cortical, suggérant un éventuel effet sur la robustesse de l'os. Ces résultats expérimentaux suggèrent ainsi qu'il est important d'apporter une attention particulière aux individus en croissance lors d'une exposition chronique à de faibles doses de ce radionucléide.

Mots clés : microtomographie tridimensionnelle ; uranium ; contamination chronique ; os.

Abstract

Uranium's effects on bone integrity

Uranium is a radioactive heavy metal naturally present in the environment. Its recent use in various civilian and military applications sometimes result in its release into the environment. After chronic ingestion, uranium accumulates in various organs, preferentially in bones. Several studies have shown that exposure to high concentrations of uranium affects bone growth. Little is known, however, about the effects of chronic exposure to low doses of uranium on bone, especially when ingested via drinking water, the main route by which the public is exposed to this radionuclide. This study examined the effects of chronic exposure to natural uranium through drinking water on bone integrity and bone turnover. Rats were contaminated with different concentrations of natural uranium (15, 10, and 40 mg / l) for 9 months. A high-resolution three-dimensional microtomography scanner was used for the first time to study uranium's impact on bone metabolism and thus on bone tissue integrity. After nine months of uranium exposure, microarchitecture analysis revealed that the cortical bone diameter of the femoral

diaphysis of rats contaminated at a concentration of 40 mg/L of uranium had decreased significantly.

In conclusion, our findings that chronic ingestion of uranium at low concentrations affects growth of cortical bone width suggests that it may affect bone strength. These results thus suggest the need to pay special attention to children during chronic low-dose exposure to this radionuclide.

Key words: three-dimensional microtomography; uranium; chronic contamination; bone.

L'uranium naturel est un métal lourd radioactif (qui fait partie de la famille des actinides), présent dans l'environnement à des concentrations différentes au niveau de la croûte terrestre [1]. Il est utilisé essentiellement dans l'industrie nucléaire civile et militaire ; sa dispersion potentielle dans l'environnement génère des inquiétudes de la part du public. L'ingestion constitue la principale source d'exposition interne et chronique à l'uranium. La quantité seuil de ce radionucléide dans l'eau de boisson a été fixée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) à 30 µg/L [2]. Cependant, certaines régions sont naturellement riches en uranium et les populations environnantes peuvent être exposées en consommant l'eau de boisson provenant de puits privés [3-5].

L'uranium possède une double toxicité, chimique et radiologique, et a un tropisme particulier pour certains organes et tissus, tels que les reins et l'os. L'équipe de Kurttio a montré chez l'homme, une corrélation entre la consommation d'eau contenant de l'uranium naturel et une augmentation des phases formation/résorption osseuse [6]. Chez l'animal, l'ingestion chronique d'uranium affecte différents métabolismes majeurs, mais aussi le système nerveux et le système reproducteur [7]. Des études expérimentales, notamment celles de l'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN) (programme Envirhom), ont montré des modifications du métabolisme rénal de la vitamine D [8], hormone essentielle pour l'os, chez le rat après ingestion chronique d'uranium *via* l'eau de boisson [9, 10]. D'autres études ont montré que l'exposition aiguë ou subchronique à l'uranium altère la formation et la croissance osseuse [11-13].

Actuellement très peu de données sont disponibles sur les effets biologiques induits après une ingestion chronique de faible quantité d'uranium sur le métabolisme osseux, et plus particulièrement sur l'intégrité du tissu osseux. En effet, l'intégrité du squelette revêt une importance capitale pour l'homéostasie phosphocalcique, mais aussi pour la qualité de vie, car la fragilisation de l'os peut entraîner certaines pathologies telles que l'ostéoporose. Au regard des connaissances scientifiques existantes, notre hypothèse est qu'une exposition

chronique à de faibles concentrations d'uranium pourrait affecter le remodelage osseux, soit en augmentant, soit en diminuant le *turnover* osseux, et par conséquent affecter la qualité et l'intégrité du tissu osseux. Actuellement, il existe peu d'informations scientifiques concernant la toxicité de l'uranium à faibles doses sur l'os après ingestion chronique chez l'animal [14]. Par ailleurs, l'analyse de la littérature indique que toutes les études portant sur les effets de l'uranium sur l'os sont réalisées en utilisant exclusivement des dosages sériques et/ou de l'histomorphométrie osseuse pour évaluer les paramètres impliqués dans le métabolisme osseux. Aucune étude n'a abordé l'impact des modifications de ce métabolisme sur l'intégrité du tissu osseux. Le microscanner est donc un outil sensible et indispensable, car il est le seul à pouvoir évaluer l'impact des modifications du métabolisme osseux sur ce tissu en renseignant sur la qualité et la micro-architecture osseuse.

Le but de ce travail est d'évaluer pour la première fois l'impact des modifications de ce métabolisme sur le squelette après ingestion chronique *via* l'eau de boisson chez le rat. Pour cela, nous avons utilisé un microscanner d'une haute résolution, la microtomographie tridimensionnelle (Scanco Viva CT 40), qui permet d'étudier la qualité et l'intégrité du tissu osseux chez un modèle « sensible » ou « postnatal » contaminé dès la naissance avec trois concentrations différentes d'uranium naturel pendant neuf mois.

Matériel et méthode

Animaux et procédure de contamination

Quarante-huit rats mâles Sprague-Dawley ont été utilisés dans cette étude. Ils ont été hébergés à température constante (21 ± 2 °C) avec un cycle 12 heures/12 heures (jour/nuit) et avaient libre accès aux granules standards de rat (A04-10 SÛR, Augy, France) et à l'eau. Toutes les procédures expérimentales ont été approuvées par le Comité d'éthique de l'IRSN et conformément à la réglementation française pour l'expérimentation

animale (ministère de l'Agriculture, décret n° 2001-464, mai 2001). Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle en croissance dit « sensible », c'est-à-dire que les animaux ont été contaminés dès la naissance (modèle postnatal). Pour cela, des rates gestantes Sprague-Dawley (souche CD) provenant de Charles Rivers (L'Arbresle/Rhône, France) ont été utilisées pour cette étude. Après la mise bas, les mères ont été exposées à de l'eau non contaminée ou contaminée à de l'uranium naturel 0,7 % d' U^{235} avec différentes concentrations (1,5 mg/L, 10 mg/L et 40 mg/L), et les rats ont donc été contaminés *via* la lactation. Après le sevrage, les rats mâles (N = 12 individus/groupe) issus de mères contaminées et de mères non contaminées ont été récupérés de telle sorte que dans chaque groupe les rats étaient issus de portées différentes. Après neuf mois de contamination, le sang a été prélevé sous anesthésie terminale pour le dosage de certains paramètres sériques, puis les rats ont été euthanasiés (figure 1). Les fémurs ont ainsi été prélevés, nettoyés, fixés et déshydratés dans du formol 10 % pendant 48 heures puis conservés dans de l'acétone. Ils ont ensuite été scannés au microtomographe *en ex vivo*.

Mesure des paramètres sanguins

La vitamine D active ($1,25(OH)_2D_3$), l'hormone parathyroïdienne (PTH), la C-télopeptide (CTX), la phosphatase alcaline (ALP) et l'ostéocalcine ont été mesurées dans le plasma à l'aide de kits de dosage radio-immunologique (IDS [immunodiagnostic systems] et

DSL [diagnostics systems laboratories], France). Les taux de créatinine, d'urée, de magnésium, de calcium et de phosphate inorganique plasmatique ont été déterminés par un analyseur Konelab 20 (Thermo Electron Corporation, France).

Mesure de l'uranium dans l'os

Les fémurs ont été préparés en ajoutant 8 ml d'acide nitrique à 70 % ultra-pure (intra-analysés pour l'analyse des métaux traces, Sodipro, Echirrolles, France) et 2 ml de peroxyde d'hydrogène. Ils ont ensuite été minéralisés en utilisant un four à micro-ondes 1 000 W (Ethos tactile, Milestone Systems Laboratory, Italie) avec une rampe de 20 minutes à 180 °C, suivies de 10 minutes à 180 °C. Les mesures ont enfin été analysées pour leur teneur en uranium par spectrométrie de masse à plasma à couplage intensif (ICP-MS) (EXCEL, ThermoFisher, France). Le bismuth (1 ug/L) a été utilisé comme standard interne.

Calcul de la dose au squelette due à la charge en uranium naturel

Une valeur haute de la dose absorbée par le squelette au cours de l'expérience a été estimée en appliquant des hypothèses majorantes. Le spectre d'émission énergétique de l'uranium naturel a été établi suivant les données de la publication de l'International Commission on Radiological Protection (ICRP) [15], et de la composition

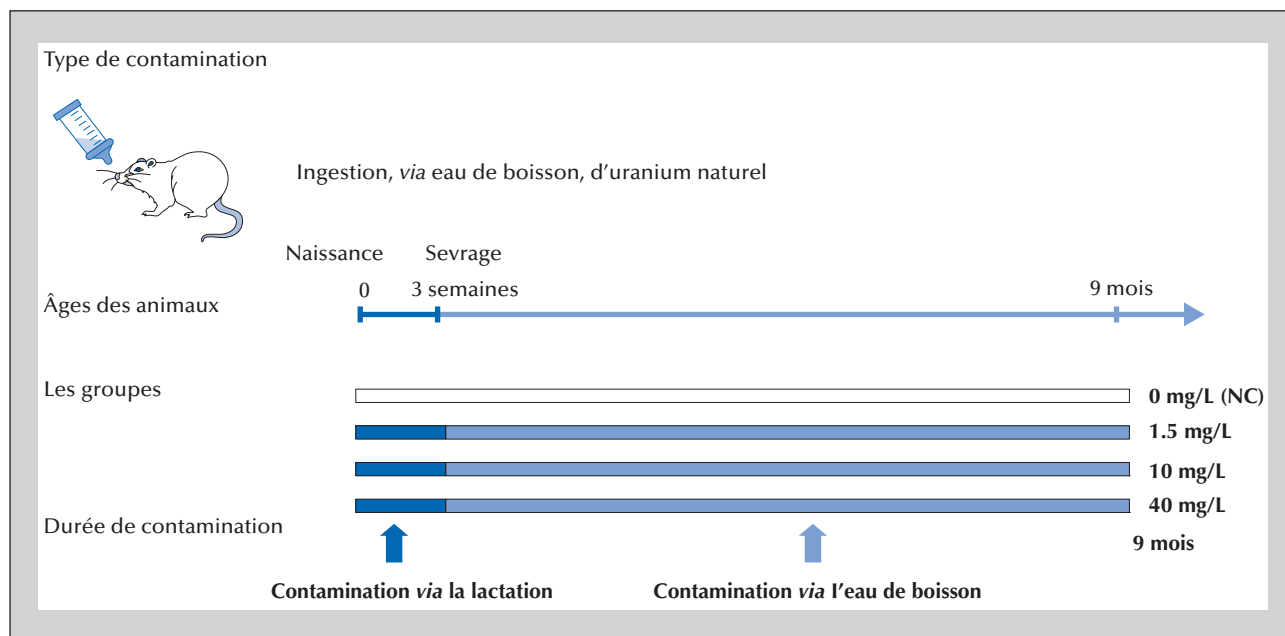


Figure 1. Protocole de contamination des rats avec de l'uranium naturel *via* l'eau de boisson.

Figure 1. Protocol of rat contamination by natural uranium *via* drinking water.

isotopique en activité radioactive suivante : Uranium-235 : 2,2 % ; Uranium-234 : 48,9 % ; Uranium-238 : 48,9 %. Toute l'énergie émise, majoritairement sous forme de particules alpha, est supposée localement absorbée dans l'os. L'activité cumulée dans les os a été évaluée sur la base d'une énergie spécifique de l'uranium naturel de 25,3 Bq/mg et d'une intégration approchée de la charge en uranium, considérée comme constante entre deux points de sacrifice des animaux, égale à la valeur maximum mesurée à la fin de la période. La dose absorbée totale est alors le produit de l'énergie émise par désintégration par l'activité cumulée pendant la durée de l'expérience, rapportée à la masse de l'os considéré. La quantité d'uranium estimée au niveau du fémur des animaux contaminés avec 40 mg/L après neuf mois de contamination était de 25 µGy.

Quantification des paramètres de masse et de micro-architecture en microtomographie tridimensionnelle (Scanco, Viva CT 40)

Dispositif et principe

Pour la mesure de ces paramètres, nous avons utilisé la microtomographie tridimensionnelle (μ CT) réalisée par un microscanner : le Viva CT 40 (figure 2A, Scanco Medical, Bassersdorf, Suisse). Un tube à rayon X a été utilisé comme source. Ce tube fonctionne avec une tension comprise entre 30 et 50 KeV. Une caméra (Camera Coupled Device, 1024 pixels/253) diode fonctionnant en mode linéaire a été couplée à l'appareil pour la détection de l'image. Le microtomographe fonctionne en mode

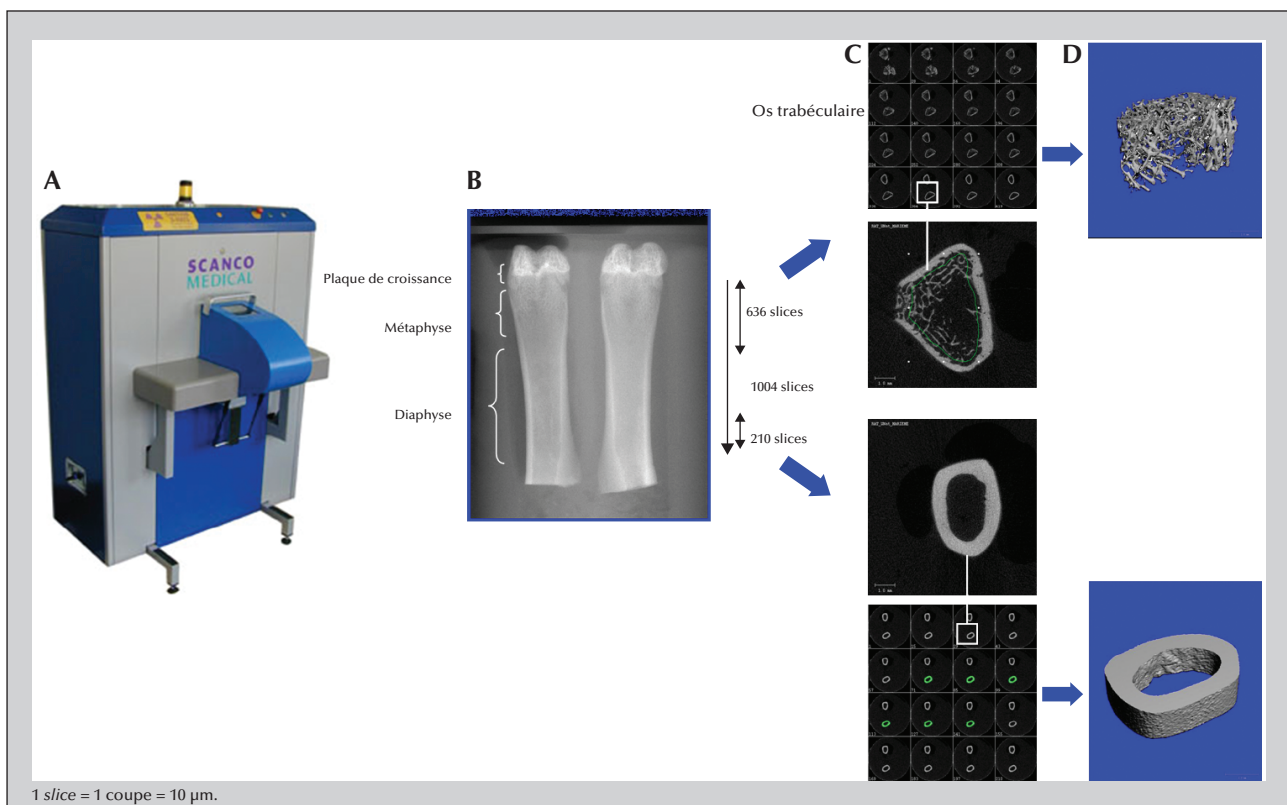


Figure 2. Principe de l'acquisition et de l'évaluation des paramètres de masse et de micro-architecture de l'os en microtomographie tridimensionnelle. (A) Scanco Viva CT 40. (B) Zones d'intérêts acquises sur le fémur. (C) Piles d'images en deux dimensions (2D) obtenues après acquisition des zones d'intérêts (os trabéculaire au niveau de la métaphyse distale = 636 slices, et os cortical au niveau de la diaphyse = 210 slices) sur lesquelles sont évaluées 210 coupes pour l'os trabéculaire et 50 coupes pour l'os cortical. (D) Images obtenues après évaluation et reconstruction en trois dimensions (3D) des zones évaluées, qui permettent d'obtenir les paramètres de masse et de micro-architecture de l'os trabéculaire et cortical.

Figure 2. Principle for the acquisition and evaluation of bone mass indicators and of bone microarchitecture by 3D microtopography. (A) Scanco Viva CT 40. (B) Femoral area of interest acquired. (C) Stacked 2-dimensional images obtained after acquisitions of the areas of interest (trabecular bone from the distal metaphysis = 636 slices and cortical bone from the diaphysis = 210 slices), from which we evaluated 210 slices of trabecular bone and 50 slices of cortical bone. (D) Images obtained after assessment and 3-dimensional reconstruction of the areas evaluated, which enabled us to obtain indicators for the mass and the microarchitecture of the trabecular and cortical bones.

d'acquisition spiralé : l'objet balayé reste stationnaire, la source de rayon X et le détecteur tournent autour. La résolution utilisée pour l'acquisition dans cette étude était de $10 \mu\text{m}$ (X, Y, Z) et donnait donc une taille de voxel de $10 \times 10 \times 10 \mu\text{m}^3$. Après reconstruction des fichiers d'acquisition en piles d'images (figure 2C), ils ont été analysés grâce à un ordinateur relié au tomographe. Les images tridimensionnelles (figure 2D) ont ensuite été générées permettant d'obtenir des paramètres morphométriques et de micro-architecture (organisation et relations des unités élémentaires ou structurales du tissu osseux entre elles) de l'os (trabéculaire et cortical) [16].

Protocole de mesure

Le site osseux acquis sur les fémurs de rat en *ex vivo* était une zone de 636 coupes allant de la plaque de croissance au milieu de la diaphyse (figure 2B). Après acquisition et segmentation des images à 55 Kev, un volume d'intérêt de 210 coupes correspondant à la spongieuse secondaire (os trabéculaire) a été choisi pour l'évaluation tridimensionnelle des paramètres morphométriques et de micro-architecture.

Pour l'os cortical, une zone d'intérêt de 210 coupes, à partir du milieu de la diaphyse, a été acquise, puis un volume d'intérêt de 50 coupes a été évalué pour déterminer les paramètres morphométriques (figure 2B).

Paramètres mesurés

Paramètres morphométriques

Le BV/TV (*bone(os) volume/tissue volume*) est la fraction volumique du tissu osseux ou la masse osseuse (en %). Les autres paramètres mesurés sur l'os trabéculaire étaient le Tb.N (*trabecular number*) ou nombre de trabécules (en trabécules/ μm), la Tb.Sp (*trabecular separation*) ou séparation entre les trabécules (en μm), et le Tb.Th (*trabecular thickness*) ou épaisseur des trabécules (en μm).

Pour l'os cortical, la Ct.Th (*cortical thickness*) ou épaisseur de l'os cortical et la BMD (*bone mineral density*) ou la densité minérale osseuse ont aussi été mesurées. La B.Ar (*bone area*) ou la surface osseuse, la C.S.Ar (*total cross-sectional area*) ou surface totale et la porosité corticale ont ensuite été déduites par des calculs.

Paramètres de micro-architecture

Le SMI (*structure modele index*) ou index de modèle structural est le reflet de l'agencement de la micro-architecture trabéculaire ; lorsque la structure adopte une organisation en plaques, le SMI est proche de 1, et le tissu osseux est donc de bonne qualité, alors que pour une organisation en colonnes, il est proche de 3, et le tissu osseux est à tendance ostéoporotique. Le DA (*degree of anisotropy*) ou degré d'anisotropie est le reflet de l'orientation des travées osseuses, le tissu osseux étant par essence anisotrope, c'est-à-dire que les travées

osseuses sont bien orientées selon une direction orientée sous l'effet de la gravité. La Den.Con. (*density of connectivity*) ou densité de connexion est le reflet du degré de connexion entre les trabécules. Plus la Den. Con. est élevée et plus les trabécules sont connectés entre eux, et donc plus le réseau osseux est de meilleure qualité.

Analyse statistique

Les résultats sont présentés en moyenne \pm SEM. Nous avons fait une analyse statistique test *t* de student entre groupes contaminés (C) et non contaminés (NC) et une analyse de variance à une voie test entre les groupes avec différentes concentrations d'uranium, avec $p < 0,05$ considéré comme significatif.

Résultats

L'homéostasie phosphocalcique et la fonction rénale

Quelle que soit la dose utilisée dans cette étude, l'uranium n'affecte pas l'homéostasie phosphocalcique reflétée par les minéraux sériques (calcium, phosphore), la vitamine D et la parathormone sérique. On note une diminution significative de l'urée à la dose de 1,5 mg/L et de la créatinine à 40 mg/L, en comparaison aux animaux non contaminés (Test *t*, $p = 0,038$ et $p = 0,020$ respectivement). Cependant ces valeurs restent dans la tranche des valeurs physiologiquement normales chez le rat (tableau 1). L'analyse de variance à une voie montre qu'il n'existe pas d'effet dose. Ces résultats suggèrent que l'uranium n'affecte pas la fonction rénale et non-néphrotoxique à ces doses après une exposition chronique.

Accumulation de l'uranium dans l'os

Après neuf mois de contamination, l'uranium s'accumule dans le fémur des rats contaminés. L'analyse de variance à une voie montre que l'uranium s'accumule significativement dans l'os dose-dépendant ($p < 0,0001$, tableau 2).

Paramètres de masse et de micro-architecture de l'os trabéculaire

Après neuf mois de contamination, l'évaluation en microtomographie tridimensionnelle des paramètres de masse, que sont la masse osseuse (BV/TV), le nombre de trabécules (Tb.N), l'épaisseur des trabécules (Tb.Th) et l'espacement entre les trabécules (Tb.Sp), montre que l'uranium naturel ingéré à une dose de 1,5, 10 et 40 mg/L, n'altère pas ces paramètres (tableau 3). De la même façon,

Tableau 1. Quantité d'uranium accumulée dans le fémur des rats non contaminés et contaminés à l'uranium naturel via la consommation d'eau de boisson pendant neuf mois.

Table 1. Quantity of uranium accumulated in the femur of rats contaminated by natural uranium via drinking water for 9 months and non-contaminated (NC) rats.

Modèle	Postnatal			
	NC	1,5 mg/L	10 mg/L	40 mg/L
Traitement (uranium naturel)	NC	1,5 mg/L	10 mg/L	40 mg/L
Concentration d'uranium (ng/g de fémur)	5,90 ± 0,39	11,04 ± 0,73*	32,21 ± 2,60*	113,36 ± 8,45*
N	8	8	8	8

*: $p < 0,001$ comparé aux rats non contaminés (NC). Les résultats sont présentés par la moyenne ± SEM.

ces doses n'affectent pas les paramètres de micro-architecture que sont le degré d'anisotropie (DA), l'index de modèle structural (SMI) et la densité de connexion des trabécules (Den.Con) (tableau 3).

Surfaces osseuses et surface totale de l'os cortical

Après neuf mois de contamination, l'uranium naturel n'affecte pas les paramètres que sont la densité minérale osseuse (BMD), la porosité corticale et l'épaisseur corticale chez les rats contaminés avec 1,5, 10 et 40 mg/L (tableau 3). Cependant, nous observons une diminution significative de la surface osseuse (test t, $p = 0,039$, figure 3B) de l'os cortical diaphysaire chez les rats contaminés avec 40 mg/L, en comparaison aux animaux non contaminés. L'analyse de variance à une voie n'est pas significative, nous n'avons pas d'effet dose. La surface

osseuse étant significative à la dose de 40 mg/L, nous avons alors calculé la surface médullaire (test t, $p = 0,09$, tableau 3) et la surface totale qui est significativement diminuée par rapport aux rats non contaminés (test t, $p = 0,020$, figure 3B).

Discussion

Le squelette est un tissu vivant en perpétuel remaniement. Le capital osseux est maintenu et renouvelé par le remodelage osseux qui est un couplage entre la formation et la résorption de l'os. Il est régulé par des facteurs physiologiques et environnementaux. Les modifications de ce couplage peuvent impacter l'intégrité du tissu osseux. La micro-architecture osseuse est importante pour comprendre les mécanismes de la fragilité osseuse, de même que l'action de certaines molécules (molécules

Tableau 2. Paramètres biochimiques sériques des rats non contaminés et contaminés à l'uranium naturel via la consommation d'eau de boisson pendant neuf mois.

Table 2. Serum biochemical indicators of non contaminated and contaminated rats after 9 months of ingestion of natural uranium via drinking water.

Modèle	Postnatal			
	NC	1,5 mg/L	10 mg/L	40 mg/L
Traitement (uranium naturel)				
Minéraux sériques				
Calcium (mM)	2,66 ± 0,03	2,66 ± 0,04	2,73 ± 0,04	2,74 ± 0,02
Phosphore (mM)	1,56 ± 0,02	1,58 ± 0,04	1,61 ± 0,07	1,58 ± 0,04
Magnésium (mM)	0,71 ± 0,02	0,68 ± 0,04	0,72 ± 0,03	0,69 ± 0,03
Fonction rénale				
Urée (mM)	7,00 ± 0,4	5,9 ± 0,3*	6,82 ± 0,3	6,13 ± 0,3
Créatinine (µM)	55,14 ± 1,0	51,72 ± 1,4	51,15 ± 3,9	51,61 ± 1,1*
Remodelage osseux				
ALP (U/L)	78,90 ± 4,1	78,46 ± 6,0	85,62 ± 6,0	84,93 ± 10,8
Ostéoclastine (ng/mL)	101,01 ± 4,36	87,96 ± 5,54	82,16 ± 12,17	114,65 ± 17,38
CTX (ng/mL)	14,20 ± 1,93	14,20 ± 1,68	13,52 ± 1,42	15,32 ± 1,83
Homéostasie phospho-calcique				
PTH (pg/mL)	749,94 ± 103,26	806,43 ± 92,80	796,94 ± 143,75	801,23 ± 58,77
1.25 Vitamine D3 (pmol/L)	133,62 ± 30,87	66,84 ± 11,83	122,37 ± 28,04	117,6 ± 26,05
N	12	11	8	11

*: $p < 0,05$ comparé aux rats non contaminés (NC). Les résultats sont présentés par la moyenne ± SEM.

ALP : phosphatase alcaline ; CTX : télopeptide C terminal du collagène de type I ; PTH : parathormone.

Tableau 3. Paramètres morphométriques de masse et de micro-architecture de l'os trabéculaire et cortical des rats non contaminés et contaminés à l'uranium via la consommation d'eau de boisson pendant neuf mois.

Table 3. Morphometric parameters of the mass and microarchitecture of the trabecular and cortical bones of rats contaminated after 9 months of ingestion of natural uranium via drinking water and of non-contaminated rats (NC).

Modèle Traitement	Postnatal			
	NC	1,5 mg/l	10 mg/l	40 mg/l
Paramètres de l'os trabéculaire				
BV/TV (%)	10,89 ± 1,67	8,80 ± 1,18	10,54 ± 1,18	10,37 ± 1,8
Tb.Th (µm)	79,94 ± 3,0	76,86 ± 2,02	81,68 ± 1,55	79,18 ± 2,35
Tb.N (/mm)	2,08 ± 0,21	1,71 ± 0,17	2,10 ± 0,18	1,95 ± 0,25
Tb.Sp (µm)	490,34 ± 43,36	611,62 ± 71,95	490,34 ± 61,06	549,54 ± 78,24
Con.Den /mm	23,12 ± 4,76	18,95 ± 2,55	21,42 ± 3,40	22,69 ± 5,38
SMI	2,33 ± 0,15	2,30 ± 0,12	2,35 ± 0,11	2,26 ± 0,19
Paramètres de l'os cortical				
BMD (mg/cm ³)	1296,97 ± 6,35	1293 ± 7,02	1291,12 ± 3,37	1298,97 ± 4,33
Épaisseur corticale (µm)	719,80 ± 13,65	692,80 ± 27,72	727,00 ± 10,38	696,00 ± 11,47
Porosité corticale (%)	0,17 ± 0,008	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,18 ± 0,007
Surface médullaire (µm ²)	5,31 ± 0,12	-	-	4,63 ± 0,39
N	5	5	5	5

Les résultats sont présentés par la moyenne ± SEM.

NC : non contaminé ; BV/TV : bone volume/tissue volume ; Tb.Th : trabecular thickness ; Tb.N : trabecular number ; Tb. Sp : trabecular separation ; Con.Den : connection density ; SMI : structure model index ; BMD : bone mineral density.

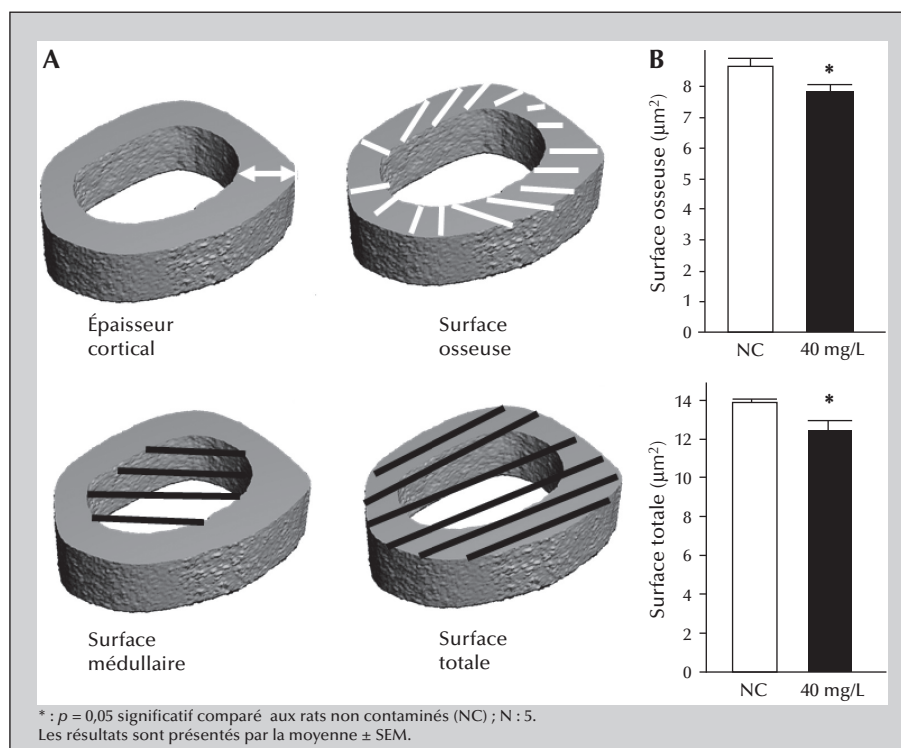


Figure 3. (A) Zone de mesure de l'épaisseur corticale, de la surface osseuse, de la surface de la cavité médullaire et de la surface totale osseuse de l'os cortical diaphysaire. (B) Surface osseuse et surface totale de l'os cortical fémoral diaphysaire de rats non contaminés et contaminés avec de l'uranium naturel à 40 mg/L.

Figure 3. (A) Measurement area for cortical thickness, bone area, area of the medullary cavity, and total bone area of the diaphyseal cortical bone. (B) Bone area and total area of the cortical bone of the femoral diaphysis of rats contaminated by natural uranium at 40 mg/L and of non-contaminated rats.

toxiques, par exemple certains métaux lourds qui ont un tropisme particulier pour l'os, ou molécules utilisées pour le traitement de l'ostéoporose, par exemple le strontium susceptible d'affecter le remodelage osseux) [17-19].

L'os constitue le site préférentiel d'accumulation de l'uranium à long terme [20, 21]. L'uranium est capable de se substituer au calcium par de l'ion uranyle UO_2^{2+} au calcium (Ca^{2+}) de l'hydroxyapatite de la matrice osseuse, sans participer à la formation de ces cristaux [22], ce qui peut entraîner un dysfonctionnement de la minéralisation de la matrice osseuse lors de longue ou de forte accumulation d'uranium dans l'os. En effet, il a été décrit que l'uranium, après 28 jours d'une unique injection en intra-musculaire, diminue la densité minérale de l'os [13]. Dans ce cas-là, c'est la toxicité chimique et donc métallique de l'uranium naturel qui est prépondérante sur sa toxicité radiologique. Dans notre étude, l'uranium naturel est essentiellement caractérisé pour sa toxicité chimique, d'autant que dans nos conditions expérimentales la contamination par l'uranium correspond à une dose radioactive absorbée au niveau du fémur qui a été estimée à 25 μ Gy (rayonnements α), représentant une très faible dose de radioactivité. Les effets de ce radionucléide pourraient donc induire, comme d'autres métaux lourds tels que le cadmium, une diminution significative du contenu en minéral de l'os [23].

Il y a cinq ans, une étude utilisant deux modèles expérimentaux, un modèle adulte (les animaux sont contaminés à partir de l'âge de trois mois) *versus* un modèle postnatal (les animaux sont contaminés à partir de la naissance), avait montré que le modèle postnatal est plus sensible à l'uranium en termes d'effets biologiques [24]. Pour compléter ces données scientifiques, nous avons utilisé dans notre étude ce modèle postnatal pour estimer l'impact d'une exposition à l'uranium, et plus particulièrement avec l'utilisation de différentes concentrations de ce radionucléide, afin de déterminer à quelle dose apparaissent les effets de l'uranium sur le métabolisme osseux et sur l'intégrité de l'os.

Dans notre étude, après neuf mois d'exposition chronique, nous n'observons pas de modification au niveau sérique de l'homéostasie phosphocalcique ainsi que des paramètres du remodelage osseux. Cependant, nous observons que l'uranium s'accumule dans l'os et que cette accumulation est dose-dépendante dans le fémur des animaux contaminés. L'uranium naturel n'affecte pas les paramètres de masse (la masse osseuse, le nombre de trabécules, l'épaisseur des trabécules et l'espacement entre les trabécules), ni les paramètres de micro-architecture (le degré d'anisotropie, l'index de structure et la densité de connexion) de l'os trabéculaire, quelle que soit la concentration d'uranium utilisée. Ces paramètres renseignent sur la qualité de l'os trabéculaire. L'os trabéculaire est formé de travées osseuses qui sont connectées entre elles pour former un réseau bien orienté selon les forces mécaniques appliquées à l'os telles que la pesanteur. Cet os trabéculaire représente 20 % de la masse

osseuse et est métaboliquement le plus actif. Toute modification du remodelage osseux peut donc affecter cet os à court ou à long terme. Au niveau de l'os cortical (80 % de la masse osseuse), l'uranium n'affecte pas la densité minérale osseuse, l'épaisseur corticale et la porosité corticale. Cependant, de façon intéressante, nous observons chez le modèle postnatal, une diminution significative de 9,5 % de la surface osseuse et une diminution de 10,60 % de la surface totale chez les rats contaminés avec 40 mg/L d'uranium, en comparaison aux rats non contaminés. Ces résultats signifient que le diamètre du fémur au niveau de la diaphyse est plus petit et qu'il pourrait être expliqué par un ralentissement de la croissance en largeur. Il a été décrit chez le rat que la quantité d'uranium accumulée dans l'os cortical et trabéculaire du fémur est écart en raison de leur différence de croissance et de leur taux de remodelage [25]. Ces travaux montrent que, 32 jours après une unique injection intraveineuse de l'uranium, ce dernier n'est pas localisé dans la partie non-minéralisée de la plaque de croissance du fémur de rat [25], un lieu où se produit la croissance en longueur du fémur. Dans notre étude, aucune différence de longueur du fémur entre rats contaminés et non contaminés n'est observée (résultats du laboratoire non publiés). Par contre, nous observons une diminution du diamètre de l'os fémoral cortical qui pourrait être expliquée par le fait que la croissance radiale se produit directement dans le périoste. Le périoste est l'un des sites d'accumulation préférentielle de l'uranium, et il pourrait ainsi modifier ou perturber la croissance en largeur du fémur. En effet, cette croissance par apposition périostée détermine la taille du diamètre de l'os cortical au niveau de la diaphyse et est donc un facteur déterminant de la solidité de l'os [26].

En conclusion, cette étude décrit pour la première fois *in vivo* les effets d'une contamination chronique à de l'uranium naturel sur la micro-architecture et la qualité de l'os en utilisant un scanner d'une haute résolution. Cette technique a permis de mettre en évidence que l'uranium naturel ingéré à faibles concentrations de façon chronique *via* l'eau de boisson est susceptible d'affecter la croissance osseuse en largeur du fémur d'individus en croissance, sans cependant entraîner des pathologies osseuses. Néanmoins, ces résultats suggèrent qu'il est nécessaire de porter une attention particulière aux individus en croissance lors d'exposition chronique à ce radionucléide. ■

Remerciements et autres mentions

Nous remercions le Dr Laurence Vico et Norbert Laroche pour nous avoir facilité l'accès au microtomographe tridimensionnel (Scanco Viva CT 40).

Financement : ce travail s'inscrit dans le cadre du programme Envirhom financé par l'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN) ; **liens d'intérêts** : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

Références

1. Durakovic A. Medical effects of internal contamination with uranium. *Croat Med J* 1999 ; 40 : 49-66.
2. World Health Organization (WHO). *Uranium in drinking-water background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality*, 4th ed. Switzerland : WHO, 2011.
3. Auvinen A, Kurttio P, Pekkanen J, Pukkala E, Ilus T, Salonen L. Uranium and other natural radionuclides in drinking water and risk of leukemia: a case-cohort study in Finland. *Cancer Causes Control* 2002 ; 13 : 825-9.
4. Hakonson-Hayes AC, Fresquez PR, Whicker FW. Assessing potential risks from exposure to natural uranium in well water. *J Environ Radioact* 2002 ; 59 : 29-40.
5. Prat O, Vercouter T, Ansoborlo E, et al. Uranium speciation in drinking water from drilled wells in southern Finland and its potential links to health effects. *Environ Sci Technol* 2009 ; 43 : 3941-6.
6. Kurttio P, Komulainen H, Leino A, Salonen L, Auvinen A, Saha H. Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 2005 ; 113 : 68-72.
7. Souidi M, Gueguen Y, Linard C, et al. *In vivo* effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* 2005 ; 214 : 113-22.
8. Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Paquet F, Aigueperse J, Souidi M. Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Arch Toxicol* 2006 ; 80 : 473-80.
9. Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, et al. *In vivo* effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat. *Biochim Biophys Acta* 2007 ; 1770 : 266-72.
10. Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, et al. Enriched uranium affects the expression of vitamin D receptor and retinoid X receptor in rat kidney. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008 ; 110 : 263-8.
11. Ubios AM, Guglielmotti MB, Steimetz T, Cabrini RL. Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ Res* 1991 ; 54 : 17-23.
12. Diaz Sylvester PL, Diaz Sylvester PL, Lopez R, Ubios AM, Cabrini RL. Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation. *Arch Environ Health* 2002 ; 57 : 320-5.
13. Fukuda S, Ikeda M, Chiba M, Kaneko K. Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium. *Radiat Prot Dosimetry* 2006 ; 118 : 307.
14. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological profile for uranium*. ATSDR, 2011.
15. ICRP. *Nuclear decay data for dosimetric calculations*. ICRP publication 107. 2008.
16. David V, Laroche N, Boudignon B, et al. Noninvasive *in vivo* monitoring of bone architecture alterations in hind limb-unloaded female rats using novel three-dimensional micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2003 ; 18 : 1622-31.
17. Dalle Carbonare L, Giannini S. Bone micro-architecture as an important determinant of bone strength. *J Endocrinol Invest* 2004 ; 27 : 99-105.
18. Lespessailles E. Follow-up of osteoporosis treatment. *Presse Med* 2006 ; 35 : 1565-70.
19. Chappard D, Basle MF, Legrand E, Audran M. Trabecular bone micro-architecture. *Morphologie* 2008 ; 92 : 162-70.
20. Paquet F, Houpert P, Blanchardon E, et al. Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys* 2006 ; 90 : 139-47.
21. Leggett RW. Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium. *Health Phys* 1994 ; 67 : 589-610.
22. Neuman WF, Fleming RW, Dounce AL, Carlson AB, O'Leary J, Mulryan B. The distribution and excretion of injected uranium. *J Biol Chem* 1948 ; 173 : 737-48.
23. Bhattacharyya MH, Whelton BD, Stern PH, Peterson DP. Cadmium accelerates bone loss in ovariectomized mice and fetal rat limb bones in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 ; 85 : 8761-5.
24. Wade-Gueye NM, Delissen O, Gourmelon P, Aigueperse J, Dublineau I, Souidi M. Chronic exposure to natural uranium via drinking water affects bone in growing rats. *Biochim Biophys Acta* 2012 ; 1820 : 1121-7.
25. Priest ND, Howells GR, Green D, Haines JW. Uranium in bone: metabolic and autoradiographic studies in the rat. *Hum Toxicol* 1982 ; 1 : 97-114.
26. Klosla SBTM, Drezner KM, Gordon CM, et al. Forum on aging and skeletal health: summary of the proceedings of an ASBMR workshop. *J Bone Miner Res* 2011 ; 26 : 2565-78.