

AVIS DE SOUTENANCE DE THÈSE

Yvan EB-LEVADOUX

CANDIDAT au DOCTORAT CHIMIE,
à **L'UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR**
SOUTIENDRA PUBLIQUEMENT sa THÈSE

le **03 avril 2017 à 14h00**
à **L'UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR**
Technopole HELIOPARC

SUR LE SUJET SUIVANT :

**"Identification des ligands biologiques de l'uranium dans les gonades de *Danio Rerio* -
Impact sur leur fonctionnalité"**

JURY :

Catherine BERTHOMIEU, Directeur de Recherche - HDR, COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
Xavier COUSIN, Chargé de Recherche - HDR, IFREMER
Sandrine FRELON, Chargée de Recherche, INSTITUT DE RADIOPROTECTION ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE
Ryszard LOBINSKI, Directeur de Recherche CNRS, IPREM - UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR
Richard ORTEGA, Directeur de Recherche CNRS, CENTRE D'ETUDES NUCLÉAIRES DE BORDEAUX GRADIGNAN
Florence PANNIER, Professeur des Universités, UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

Pau, le 30 mars 2017

Le Président et,
Par délégation, la Vice-Présidente de la Commission de la
Recherche

Isabelle BARAILLE



Tél. : 05 59 40 70 00
www.univ-pau.fr

Avenue de
l'Université
BP 576
64012
PAU Cedex

Résumé de thèse : Identification des ligands biologiques de l'uranium dans les gonades de *Danio rerio*. Impact sur leur fonctionnalité.

Doctorant : Yvan Eb-Levadoux

Directeur de thèse : Ryszard Lobiński

Encadrantes : Sandrine Frelon et Sandra Mounicou

L'uranium (U) est naturellement présent à l'état de trace dans l'eau ($\mu\text{g.L}^{-1}$), sa concentration pouvant atteindre localement quelques mg.L^{-1} du fait des activités anthropiques. Plusieurs études écotoxicologiques sur *Danio rerio* ont mis en évidence la toxicité, e.g. le stress oxydant, la génotoxicité mais aussi la reprotoxicité (i.e. réduction du nombre de pontes et d'œufs chez les poissons contaminés) de l'U. Toutefois les mécanismes d'action toxique ne sont pas connus.

L'objectif de cette étude est de contribuer à la compréhension de la reprotoxicité de l'U par l'élucidation de mécanismes moléculaires, associés aux protéines, perturbés après contamination. Pour cela, des investigations ont été menées sur les ovaires de poissons zèbre *Danio rerio*, reproduits (R) ou non (NR), après exposition par voie directe en condition de laboratoire à des concentrations représentatives d'environnements contaminés.

Ce travail de thèse a été divisé en deux volets. Un premier volet analytique avait pour but la poursuite des développements de méthodes pour l'identification des complexes U-protéines en condition non dénaturante, autour du couplage de techniques de séparation (chromatographie d'exclusion stérique SEC, électrophorèse hors gel OGE) et de détection sensible par spectrométrie de masse élémentaire (ICP MS) et moléculaire (ESI MS). Le second volet a été dédié à l'étude de la reprotoxicité de l'U à l'échelle moléculaire, avec i) l'étude des complexes natifs U-protéines (approche métallomique), et ii) l'analyse différentielle de l'expression des protéines (approche protéomique).

Les développements analytiques ont permis de garder le tampon physiologique et non dénaturant d'extraction pour l'étape de séparation OGE, améliorant le taux de recouvrement en U. En écotoxicologie, les principaux résultats montrent que l'ovaire est un organe accumulateur de l'U et que le statut de reproduction a une influence sur le niveau d'accumulation (R<NR). En revanche, cet état a peu d'influence sur sa distribution protéique pour laquelle 4 fractions (dont 1 principale) ont été identifiées, toutes contenant aussi du phosphore. L'identification des cibles potentielles de l'U et des protéines exprimées différemment (vtg, GST, GAPDH,...) a montré que les processus biologiques perturbés suite à la contamination sont de deux niveaux : 1/ générique (stress oxydant) et 2/ plus spécifique de la gonade (développement et maturation des ovocytes). En conclusion, ces deux approches complémentaires ont permis de mettre en évidence un effet direct (complexation) et indirect (expression protéique modulée) de l'U, et de proposer l'hypothèse d'un défaut de maturation des ovocytes après contamination. Ce défaut pourrait impacter la réduction du nombre de ponte et *in fine* expliquer la reprotoxicité observée lors d'études écotoxicologiques précédentes.

Mots clés : écotoxicologie, uranium, reprotoxicité, poisson zèbre *Danio rerio*, complexe uranium-protéine, métallomique, couplage spectrométrie de masse élémentaire et moléculaire, analyse non dénaturante, protéomique, vitellogénine, stress oxydant, électrophorèse hors gel, SEC-ICP SFMS, LC-ESI FTMS.

Identification of biological ligands of uranium in *Danio rerio* gonads: Impact on their function.

PhD student: Yvan Eb-Levadoux

Thesis supervisor: Ryszard Łobiński

Thesis co-tutors: Sandrine Frelon and Sandra Mounicou

Uranium (U) is naturally presents at trace level ($\mu\text{g.L}^{-1}$) in aquatic environment; its concentration can increase up to a few mg.L^{-1} due to human activities. Several ecotoxicological studies have shown uranium toxicity in contaminated zebrafishes *Danio rerio*, e.g. oxidative stress, genotoxicity and reprotoxicity (*i.e.* lower number of spawn and eggs laid). However mechanisms of toxicity are not well known.

The objective of this study is to contribute to the understanding of uranium reprotoxicity by elucidating the disrupted molecular mechanisms, *i.e.* associated to proteins, after contamination. Therefore, investigations have been carried out on ovaries from reproduced (R) and non-reproduced (NR) zebrafishes after waterborne exposure in laboratory conditions at environmentally relevant concentrations.

This project was divided into two parts. Firstly, analytical investigations were carried out to continue the development of non-denaturing methods for U-protein identification by coupling separative techniques (size exclusion chromatography SEC, off gel electrophoresis OGE) with elemental (ICP MS) and molecular (ESI MS) sensitive mass spectrometry detection. Secondly, studies of U reprotoxicity were investigated by studying i) native U-protein complexes (metallomics approach) and ii) differential analysis of protein expression (proteomics approach)

Analytical developments allowed keeping the physiological and non-denaturing extraction buffer for OGE separation step, improving U recovery. In ecotoxicology, the major results showed that ovary is an U accumulating organ and that the reproduction status modifies the accumulation level (R<NR). However, this status is of little influence on its distribution on proteins with 4 fractions (including a major one) determined, all of them coeluting with phosphorus. The identification of U potential targets and of protein expression differences (vtg, GST, GAPDH...) showed that biological processes disrupted after contamination are at two levels: 1/ generic (oxidative stress) and 2/ more specific to gonad (oocyte development and maturation).

As a conclusion, these two complementary approaches showed a direct (complexation) and indirect (modification of protein expression) effects of U, and enabled to hypothesize a lack of oocyte maturation after contamination. This defect could impact the number of spawn and *in fine* explain the reprotoxicity observed in previous ecotoxicological studies.

Key words: ecotoxicology, uranium, reprotoxicity, zebrafish *Danio rerio*, uranium-protein complex, metallomics, elemental and molecular mass spectrometry coupling, non-denaturing analysis, proteomics, vitellogenin, oxidative stress, off gel electrophoresis, SEC-ICP SFMS, LC-ESI FTMS.