



HAL
open science

Etude mécaniste et multi-échelle de la toxicité des radionucléides : Approches expérimentales et modélisation

Frederic Alonzo

► **To cite this version:**

Frederic Alonzo. Etude mécaniste et multi-échelle de la toxicité des radionucléides : Approches expérimentales et modélisation. Sciences de l'environnement. Université Aix Marseille, 2019. tel-04559253

HAL Id: tel-04559253

<https://irsn.hal.science/tel-04559253>

Submitted on 25 Apr 2024

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.

Copyright

Mémoire présenté devant

L'UNIVERSITE AIX-MARSEILLE

pour l'obtention de l'Habilitation à Diriger des Recherches

Soutenu le 27 novembre 2019 par

Frédéric ALONZO

Ingénieur – Chercheur

**Etude mécaniste et multi-échelle
de la toxicité des radionucléides :
Approches expérimentales et modélisation**

Devant le jury composé de

Dr Marie-Agnès COUTELLEC	INRA, Rennes	Rapporteur
Pr Marie-Laure DELIGNETTE-MULLER	VetAgro Sup, UCBL Lyon 1	Rapporteur
Pr Alexandre PERY	AgroParis Tech, Paris	Rapporteur
Dr Farida AKCHA	IFREMER, Nantes	
Pr Nele HOREMANS	SCK•CEN, Mol, Belgique	
Pr Bernard CLEMENT	ENTPE, Vaux-en-Velin	
Pr Jean-Christophe POGGIALE	Université Aix-Marseille	
Dr Rodolphe GILBIN	IRSN, Cadarache	

Table des matières

Première partie : Présentation du candidat	7
<hr/>	
Chapitre 1 Etat-Civil	9
Chapitre 2 Fonctions et titres	11
Chapitre 3 Encadrement	13
3.1. Stages de Master 2	15
3.2. Co-direction de thèses.....	15
3.3. Post-doc	20
3.4. Autres stages	20
3.5. Comités de pilotage	20
Chapitre 4 Collaborations scientifiques	21
Chapitre 5 Animation scientifique	23
Chapitre 6 Publications, Colloques, Séminaires, Rapports	25
6.1. Articles.....	27
6.2. Communications orales.....	29
6.3. Posters	31
6.4. Séminaires.....	33
6.5. Rapports	35
6.6. Contributions à ouvrages	36
Deuxième partie : Etat de l'art	39
<hr/>	
Chapitre 1 Des radionucléides dans l'environnement	41
1.1. Radioactivité	43
1.1.1. Isotopes radioactifs	43
1.1.2. Types de rayonnements	43
1.1.3. Mesures de la radioactivité et de la radioprotection	45
1.2. Origine des rayonnements ionisants dans l'environnement	46
1.2.1. De la radioactivité naturelle.....	46
1.2.2. Des radionucléides d'origine artificielle dans l'environnement.....	47
1.2.3. Le cas de l'uranium (U).....	51
1.2.4. Le cas de l'américium-241 (Am-241)	54
1.3. Interactions avec la matière vivante.....	55
1.3.1. De la radiolyse de l'eau à la production des ROS.....	55
1.3.2. Lésions moléculaires	55
1.3.3. Mécanismes de toxicité de l'uranium	57
Chapitre 2 Effets radiotoxiques et chimiotoxiques pour la faune et la flore	59
2.1. Généralités sur les réponses biologiques	61
2.2. Toxicité à l'échelle moléculaire.....	61
2.2.1. Génotoxicité des rayonnements gamma	61
2.2.2. Génotoxicité de l'uranium	62
2.2.3. Mécanismes de réparation et conséquences cellulaires	62
2.2.4. Génotoxicité dans un contexte multigénération	63
2.2.5. Modifications épigénétiques	64

2.2.6. Mémoire épigénétique transgénérationnelle.....	65
2.3. Toxicité à l'échelle cellulaire et tissulaire	66
2.3.1. Stress oxydatif	66
2.3.2. Mortalité cellulaire.....	67
2.3.3. Toxicité tissulaire.....	67
2.3.4. Réversibilité des réponses.....	67
2.4. Toxicité à l'échelle de l'organisme.....	68
2.4.1. Toxicité aigüe	68
2.4.2. Toxicité chronique	70
2.4.3. Exposition multigénérationnelle.....	71
2.5. Impact sur la faune et la flore de Tchernobyl et Fukushima	72
2.6. Pour une protection des écosystèmes.....	73
2.6.1. Protéger l'environnement et plus seulement l'humain	73
2.6.2. Une valeur de référence pour la radioprotection des écosystèmes	74
2.6.3. Incertitudes	75
2.6.4. Comparaison à la situation naturelle.....	75
2.6.5. Efficacité biologique des différents types de rayonnements ionisants	76
 Troisième partie : Travaux de recherche	 79
<hr/>	
Chapitre 1 Introduction	81
1.1. Contexte et enjeux	83
1.2. Axes de recherche	84
1.2.1. Tests d'exposition multigénérationnelle.....	84
1.2.2. Approche intégrative multi-échelle	84
1.2.3. Modélisation du budget énergétique dynamique.....	85
1.2.4. Conséquences pour la dynamique de population.....	85
Chapitre 2 Effets multigénérationnels des radionucléides	87
2.1. Pourquoi <i>Daphnia magna</i> ?	89
2.1.1. Pour la petite histoire	89
2.1.2. Un peu de biologie.....	90
2.1.3. La daphnie et l'écotoxicologie.....	92
2.2. Plans expérimentaux	94
2.2.1. Conditions d'exposition.....	94
2.2.2. Scénarios d'exposition.....	95
2.2.3. Mesures.....	98
2.3. Toxicité du rayonnement alpha interne (Am-241)	99
2.3.1. Expositions au rayonnement alpha (Am-241).....	99
2.3.2. Toxicité chronique sur 23 jours	100
2.3.3. Toxicité du rayonnement alpha au fil des générations	102
2.4. Toxicité chimique de U appauvri.....	103
2.4.1. Expositions à l'U appauvri	103
2.4.2. Toxicité chronique sur 21 jours	104
2.4.3. Toxicité de l'U appauvri au fil des générations.....	105
2.4.4. Une réduction d'assimilation comme mode d'action toxique.....	108
2.4.5. Peut-on dire que la toxicité de l'U augmente au fil des générations ?	109
2.5. Toxicité du rayonnement gamma externe (Cs-137)	110
2.5.1. Expositions au rayonnement gamma (Cs-137).....	111
2.5.2. Toxicité chronique sur 21 jours	113
2.5.3. Toxicité du rayonnement gamma au fil des générations	113

2.5.4. Réversibilité des effets après une irradiation gamma parentale	115
2.6. Conclusions et perspectives	116
Chapitre 3 Etude des processus génétiques et épigénétiques	119
3.1. Une accumulation d'altérations de l'ADN	121
3.1.1. Quantification par la technique RAPD-qPCR	121
3.1.2. Suivi dynamique de la génotoxicité de l'U appauvri.....	122
3.1.3. Suivi dynamique de la génotoxicité du rayonnement gamma.....	124
3.2. Induction et hérédité des modifications épigénétiques	124
3.2.1. Analyse de la méthylation de l'ADN par séquençage bisulfite.....	124
3.2.2. Variations de la méthylation de l'ADN lors de l'irradiation gamma	127
3.3. Conclusions et perspectives	130
3.3.1. Dommages ADN et effets macroscopiques	130
3.3.2. Mécanismes de compensation	131
3.3.3. Conséquences des modifications épigénétiques	132
Chapitre 4 Modélisations du budget énergétique dynamique	135
4.1. Budget Energétique Dynamique	137
4.1.1. Pourquoi le Budget Energétique Dynamique ?	137
4.1.2. Concepts fondamentaux.....	138
4.1.3. Modèle DEB standard.....	139
4.1.4. Un DEB simplifié pour la toxicologie	141
4.1.5. Toxico-cinétique toxico-dynamique	143
4.1.6. Modes d'action métaboliques	144
4.1.7. Estimation des paramètres	146
4.1.8. Applications du modèle DEBtox	147
4.2. Première application du modèle DEBtox au cas de la radiotoxicité gamma.....	148
4.2.1. Contexte.....	148
4.2.2. Une métrique pour le stress radiologique chronique dans les modèles DEBtox	149
4.2.3. Modèles DEBtox pour les nématodes.....	149
4.2.4. Résultats.....	152
4.3. Première application du modèle DEBtox au cas de l'U appauvri	154
4.3.1. Un contexte d'exposition multigénérationnelle novateur.....	154
4.3.2. Résultats.....	155
4.3.3. Premières interprétations	157
4.4. Deuxième application du modèle DEBtox au cas de l'U appauvri	158
4.4.1. Contexte.....	158
4.4.2. Un dommage transmissible pour expliquer les effets transgénérationnels	159
4.4.3. Exposition du stade embryonnaire.....	160
4.4.4. Deux modes d'action pour décrire les effets de l'U appauvri	161
4.5. Analyse bayésienne des effets transgénérationnels (U, Cs-137, Am-241).....	163
4.5.1. Application du modèle DEBtox au cas de la radiotoxicité gamma et alpha.....	163
4.5.2. Deux modes d'action pour décrire les effets des rayonnements ionisants	164
4.5.3. Analyses bayésiennes	165
4.5.4. Résultats.....	167
4.6. Conclusions et perspectives	173
4.6.1. La toxicité, une affaire de temps.....	173

4.6.2. Des modes d'action métaboliques similaires d'une espèce à l'autre.....	174
4.6.3. L'irradiation gamma comme outil d'étude ?	176
Chapitre 5 Modélisations de la dynamique de population	177
5.1. Extrapolation individu – population	179
5.1.1. Contexte.....	179
5.1.2. Propager les effets de la radiotoxicité de l'organisme à la population	179
5.2. Modèles de population.....	180
5.2.1. Populations structurées en âge.....	180
5.2.2. Matrices de Leslie.....	181
5.2.3. Traits démographiques simulés	182
5.2.4. Combiner la radiosensibilité des traits biologiques	183
5.2.5. Espèces biologiques modélisées	185
5.2. Analyses de sensibilité.....	185
5.3. Radiotoxicité à l'échelle de la population.....	187
5.3.1. Retard de croissance des populations exposées aux rayonnements ionisantes	187
5.3.2. Radiosensibilité des traits démographiques.....	188
5.4. Risques pour la population dans quatre groupes taxonomiques	190
5.4.1. Quels niveaux de risques évaluer ?.....	190
5.4.2. Débits de dose causant des risques pour la population.....	192
5.4.3. Contre quel risque les populations sont-elles finalement protégées ?	194
5.5. <i>NEC plus ultra</i> : un couplage DEBtox-Matrices de Leslie (U appauvri)	194
5.5.1. Contexte.....	194
5.5.2. Une vision de la toxicité multigénérationnelle à l'échelle de la population	196
5.6. Conclusions et perspectives	198
Chapitre 6 Perspectives générales	201
6.1. Intégrer la toxicité des échelles moléculaire et cellulaire jusqu'à l'organisme ..	203
6.1.1. Un modèle conceptuel pour les réponses moléculaires et cellulaires.....	203
6.1.2. Couplage des modèles DEB-AOP	203
6.2. Analyser la radiosensibilité des espèces et modéliser sa variabilité interspécifique.....	205
6.2.1. Une variabilité mal comprise de la radiosensibilité.....	205
6.2.2. Conférer du sens aux données écotoxicologiques	205
6.2.3. Vers une approche mécaniste de la radiosensibilité	206
6.3. Promouvoir un plus grand réalisme dans l'évaluation du risque écologique	207
6.3.1. Perspectives	207
6.3.2. Effets indirects	208
6.3.3. Conditions variables	208
6.3.4. Systèmes multi-espèces	209
Références	211
<hr/>	
Résumé	250

Première partie

Présentation du candidat

Chapitre 1

Etat-Civil

Frédéric ALONZO

Date et lieu de naissance : 4 février 1971 à Nantes (Loire-Atlantique)

Situation familiale : Marié, deux enfants

Adresse personnelle :

33, chemin des Grandes Aires

04210 Valensole

Adresse professionnelle :

IRSN, PSE-ENV, SRTE, LECO

Centre d'Etudes de Cadarache, Bât.183, BP3

13115 St Paul-Lez-Durance cedex

Téléphone : 04 42 19 95 79

Courriel : frederic.alonzo@irsn.fr

Chapitre 2

Fonctions et titres

- Depuis 2006, Ingénieur-chercheur à l'IRSN, Cadarache
au Laboratoire de Modélisation Environnementale (DEI, SECRE),
puis au Laboratoire de recherche sur les Effets des radionucléides sur les Ecosystèmes
(PSE-ENV, SRTE), anciennement Laboratoire d'Ecotoxicologie des Radionucléides
(PRP-ENV, SERIS)
- 2004 Stage post-doctoral à l'IRSN, Cadarache
Projet : « Etude expérimentale des effets des radionucléides sur le budget énergétique
de la Daphnie. Extrapolation de l'individu à la population à l'aide de la
modélisation. »
Responsable scientifique : Dr. Rodolphe Gilbin, Ingénieur chercheur
Laboratoire : Laboratoire de Radioécologie et Ecotoxicologie (DEI, SECRE)
- 2001 Stage post-doctoral à l'Université de Tasmanie, CSIRO marine research et Australian
Antarctic Division (Hobart et Kingston, Australie).
Projet : « Validation expérimentale de l'utilisation des acides gras comme marqueurs
trophiques chez le krill antarctique. » assorti d'une campagne scientifique Antarctique
à bord du navire de recherche scientifique Aurora Australis
Responsables scientifiques : Dr. Patricia Virtue, Dr. Stephen Nicol, Dr. Peter Nichols
Laboratoire : Institute of Antarctic and Southern Ocean Studies
- 2000 Thèse de Doctorat en Sciences de l'Environnement, spécialité Océanographie,
soutenue le 3 juillet 2000. Université de la Méditerranée Aix-Marseille 2.
Mention Très Honorable avec Félicitations du Jury
Titre : « Stratégies reproductives des copépodes subantarctiques dominant
l'écosystème pélagique côtier des Iles Kerguelen. Implications écologiques. »
Directeur de thèse : Dr. Patrick Mayzaud, DR CNRS
Laboratoire : Laboratoire d'océanographie biochimique et d'écologie, ESA CNRS
7076, Observatoire océanologique de Villefranche sur mer
- 1995 Hivernant aux Iles Kerguelen (Terres Australes et Antarctiques Françaises) comme
Volontaire à l'Aide Technique pour l'Institut Polaire (14 mois).
- 1994 DEA « Analyses et Modélisation des Systèmes Biologiques » à l'Université Claude
Bernard Lyon 1. Mention Bien
- 1994 Magistère de Biologie Moléculaire et Cellulaire à l'Université Claude Bernard Lyon 1.
Mention Assez Bien
- 1991 – 1995 Normalien à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Chapitre 3

Encadrement

Sommaire

3.1. Stages de Master 2.....	15
3.2. Co-direction de thèses	15
3.3. Post-doc	20
3.4. Autres stages	20
3.5. Comités de pilotage	20

3.1. STAGES DE MASTER 2

- 1997, **Fanny HEROS**

Maîtrise « Biochimie » de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)

Sujet : Mise au point d'une quantification spectrofluorométrique des classes de lipides à l'aide des propriétés physico-chimiques du fluorochrome hydrophobe Nile red.

Responsable : Patrick Mayzaud (co-encadrement)

Laboratoire d'océanographie biochimique et d'écologie, ESA CNRS 7076, Observatoire océanologique de Villefranche sur mer

- 2005, **Stéphanie BOURRACHOT**

Master 2 « Systèmes écologiques aquatiques » de l'Université Bordeaux 1

Sujet : Effets de l'uranium sur les écosystèmes d'eau douce. Application au modèle biologique *Daphnia magna* Straus.

Responsable : Rodolphe Gilbin (co-encadrement)

Laboratoire de Radioécologie et Ecotoxicologie

- 2009, **Morgan DUTILLEUL**

Master 2 « Océanographie, spécialité Biologie et écologie marines » de l'Université de la Méditerranée - Aix-Marseille 2

Sujet : « Modélisation des effets de l'uranium sur *Daphnia magna*. Toxicité chronique affectant les processus physiologiques, le budget d'énergie et la dynamique de population »

Laboratoire de Modélisation Environnementale

- 2010, **Cyrine BOUAFIF**

Master 2 « Océanographie, spécialité Biologie et écologie marines » de l'Université de la Méditerranée - Aix-Marseille 2

Sujet : « Influence de la croissance par mue sur le budget énergétique et la bioaccumulation d'un radionucléide chez *Daphnia magna* »

Laboratoire de Modélisation Environnementale

- 2010, **Pierre-Albin BIRON**

Master 2 « Modélisation et Informatique du Vivant » de l'Université Claude Bernard Lyon 1

Sujet : « "Effets multigénérationnels de l'uranium sur *Daphnia magna*" »

Responsables : Laurent Garcia-Sanchez et Elise Billoir (collaboration)

Laboratoire de Modélisation Environnementale et Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive

3.2. CO-DIRECTION DE THESES

- **Sandrine MASSARIN**, 2007-2010

Thèse de l'Université de la Méditerranée - Aix-Marseille 2 « Sciences de l'environnement » (ED251)

Sujet : « Etude des effets de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population de *Daphnia magna*. »

Dirigée par Jean-Christophe Poggiale et Frédéric Alonzo

Soutenue le 12 décembre 2010, mention très honorable avec félicitations du jury

Ce travail avait pour objectif d'étudier les effets de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population d'un micro-crustacé représentatif des écosystèmes aquatiques d'eau douce, *Daphnia magna*. L'étude expérimentale de la toxicité de l'uranium sur la physiologie (nutrition, respiration) et l'histoire de vie (survie, croissance, reproduction) de *D. magna* a été réalisée au travers d'expositions sur une, deux ou trois générations successives (F0, F1, F2), commencées avec des néonates issus de 1^{ère} ou 5^{ème} ponte, à des concentrations de 0, 10, 25 et 75 $\mu\text{g L}^{-1}$. Les résultats ont mis en évidence l'aggravation des effets au travers des générations (en partie liée à l'exposition des daphnies pendant l'embryogénèse) et la sensibilité plus forte des individus issus de 1^{ère} ponte. Des réductions significatives des taux d'assimilation mesurés par méthode de marquage-traçage au ^{14}C de la nourriture nous ont permis d'identifier un effet sur l'assimilation comme mode d'action de l'uranium, en accord avec les altérations importantes de la structure de la paroi du tube digestif révélées par microscopie optique. L'intégration des résultats dans un modèle de budget énergétique (DEBtox) a abouti à l'estimation de concentrations seuil sans effet (NEC) de 9,37, 8,21 et 2,31 $\mu\text{g L}^{-1}$ au-delà desquelles le fonctionnement de l'organisme est altéré dans les générations F0, F1 et F2, respectivement. La combinaison du DEBtox avec des modèles matriciels a permis d'extrapoler les conséquences sur le taux de croissance asymptotique de la population (λ), critère plus pertinent dans un contexte écologique. Les simulations ont prédit une augmentation de l'impact de l'uranium au travers des générations avec une réduction de λ dans F0 et une extinction des populations pour des concentrations de 51-59 $\mu\text{g L}^{-1}$ dans F1 et de 39-41 $\mu\text{g L}^{-1}$ dans F2. Les simulations ont souligné l'importance de prendre en considération les individus les plus sensibles dans la détermination de la réponse des populations.

Mots clés :

• **Delphine PLAIRE**, 2010-2013

Thèse de l'Université Aix-Marseille « Sciences de l'environnement » (ED251)

Sujet : « Etude transgénérationnelle des altérations de l'ADN et de leurs conséquences sur les traits d'histoire de vie et le budget énergétique de *Daphnia magna* exposé à l'uranium appauvri »

Dirigée par Jean-Christophe Poggiale et Frédéric Alonzo

Soutenue le 12 décembre 2013, mention très honorable avec félicitations du jury

Comprendre comment les polluants affectent les espèces à différents niveaux d'organisation biologique est un enjeu majeur à la fois en écotoxicologie et en radioécologie. Dans le cadre du programme IRSN ENVIRHOM visant à évaluer les risques écologiques liés à la présence de radionucléides dans l'environnement, ce travail de thèse a pour objectif principal d'explorer les altérations de l'ADN et leurs conséquences potentielles pour les traits d'histoire de vie (survie, croissance et reproduction) d'un invertébré aquatique, *Daphnia magna*, exposé à de l'uranium appauvri. Pour répondre à cette problématique, une approche expérimentale et une approche de modélisation sont menées. La démarche expérimentale vise à évaluer l'accumulation et la transmission des altérations de l'ADN suite à une exposition à de l'uranium (0 ; 2 ; 9,9 ; 22,2 et 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) sur deux générations successives (F0 et F1). Différents scénarios d'exposition (exposition continue, post-éclosion et embryonnaire) sont

mis en place pour tester la sensibilité spécifique de divers stades de vie. Les effets génotoxiques sont estimés à l'aide d'une technique d'amplification aléatoire de l'ADN couplée à la PCR (PCR-RAPD). Lors d'expositions continue et post-éclosion, les résultats mettent en évidence une accumulation et une transmission des dommages à l'ADN au fil des générations en parallèle de la sévérité des effets. Les altérations de l'ADN sont reportées dès l'éclosion de la génération F1 à une concentration de $2 \mu\text{g L}^{-1}$. Les effets sur la croissance et la reproduction sont plus sévères lorsque le stade embryonnaire est exposé et restent visibles à partir de $9,9 \mu\text{g L}^{-1}$ malgré un retour en milieu non contaminé à l'éclosion. Les résultats suggèrent que les dommages à l'ADN pourraient être des indicateurs précoces de futurs effets sur les traits d'histoire de vie. Une analyse mécanistique des résultats expérimentaux est conduite à l'aide du modèle DEBtox (dynamique de budget énergétique appliquée à la toxicologie) afin de mieux cerner les causes de l'aggravation des effets d'une génération à l'autre. Un modèle à deux facteurs de stress (l'un corrélé à la concentration d'exposition et l'autre à un niveau de dommages) est développé. Les ajustements suggèrent l'implication d'un second mode d'action pour expliquer les effets immédiats de l'uranium sur la nutrition et les conséquences des dommages accumulés au fil des générations. La nature du second mode d'action reste à préciser, les ajustements pointant une augmentation des coûts de croissance et de maturation.

Mots clés : *Daphnia magna*, uranium, effets transgénérationnels, altérations de l'ADN, traits d'histoire de vie, DEBtox

• **Florian PARISOT**, 2012-2015

Thèse de l'Université Aix-Marseille « Sciences de l'environnement » (ED251)

Sujet : « Étude mécaniste des effets transgénérationnels des radiations ionisantes alpha et gamma chez *Daphnia magna* »

Dirigée par Jean-Christophe Poggiale et Frédéric Alonzo

Soutenue le 15 décembre 2015, mention très honorable avec félicitations du jury

Les activités anthropiques liées à l'industrie nucléaire contribuent à des rejets continus de radionucléides dans les écosystèmes terrestres et aquatiques. Au cours des dernières décennies, le risque écologique des rayonnements ionisants est devenu une préoccupation publique, réglementaire et scientifique majeure pour la protection des écosystèmes. A ce jour, très peu d'études se sont intéressées aux situations d'exposition chroniques à faibles doses, bien que ces situations soient représentatives des conditions environnementales réelles. Comprendre comment les rayonnements ionisants affectent les espèces au cours de plusieurs générations et à différents niveaux d'organisation biologique est un enjeu majeur en radioécologie. Dans ce contexte, les travaux réalisés au cours de ce doctorat visent à apporter de nouvelles connaissances relatives aux effets des rayonnements ionisants au cours d'une exposition multigénérationnelle de l'invertébré aquatique, *Daphnia magna*. Pour répondre à cet objectif, une stratégie en deux étapes a été mise en place. Tout d'abord, une irradiation gamma externe à des débits de dose pertinents du point de vue environnemental a été réalisée sur *D. magna* pendant trois générations successives (F0, F1 et F2). Les objectifs de cette démarche étaient d'évaluer si de faibles débits de dose d'irradiation gamma externe induisaient une aggravation des effets sur la survie, la croissance et la reproduction des daphnies au cours des générations et de tester s'il existait une accumulation transgénérationnelle d'altérations à l'ADN. Les résultats mettent en évidence une accumulation et une transmission d'altérations de l'ADN au fil des générations, en parallèle d'une augmentation de la sévérité des effets sur la croissance et la reproduction entre les générations F0 et F2. Toutefois, des effets moins prononcés ont été observés au cours de la

génération F1, laissant présager des processus de réparation de l'ADN transitoirement plus efficaces. Dans un second temps, les données d'irradiation gamma externe et celles d'une étude antérieure de contamination alpha interne ont été analysées à l'aide de modèles DEBtox (Budget d'Énergie Dynamique appliqué à la toxicologie), afin d'identifier et de comparer les causes de l'aggravation transgénérationnelle des effets entre les deux types de rayonnements. Dans les deux cas, deux modes d'action métaboliques distincts ont été nécessaires pour expliquer l'aggravation des effets sur la croissance et la reproduction de *D. magna* au cours des générations. Les résultats de modélisation suggèrent que les rayonnements alpha et gamma agissent selon deux combinaisons différentes de modes d'action, illustrant toute la complexité des processus biologiques mise en jeu. Ce projet de recherche contribue à apporter des connaissances significatives sur les effets chroniques des rayonnements ionisants et indique clairement qu'il est important, à l'avenir, d'étudier et de comprendre les effets transgénérationnels des rayonnements ionisants à faibles doses.

Mots clés : *Daphnia magna*, irradiation gamma, contamination alpha, altérations de l'ADN, effets transgénérationnels, DEBtox.

• **Marie TRIJAU**, 2014-2018

Thèse de l'Université Aix-Marseille « Sciences de l'environnement » (ED251)

Sujet : « Etude à différentes échelles des mécanismes d'action toxique des radiations ionisantes chez *Daphnia magna* »

Dirigée par Jean-Christophe Poggiale et Frédéric Alonzo

Soutenue le 18 décembre 2018

Les écosystèmes aquatiques et terrestre sont exposés aux radionucléides lors de rejets planifiés ou accidentels, en grande partie liés à leur utilisation dans les centrales nucléaires de production d'électricité. Afin de protéger durablement ces écosystèmes et leur fonctionnement, il est nécessaire d'évaluer l'impact de leur exposition aux radiations ionisantes sur le long terme. La sensibilité des organismes pouvant varier au fil des générations, l'évaluation des effets des radiations ionisantes sur des échelles multigénérationnelles est essentielle. Dans ce contexte, ce travail de doctorat a visé à améliorer la caractérisation des processus moléculaires et la prédiction des effets transgénérationnels lors d'une exposition aux radiations gamma. Afin de répondre à cet objectif, deux approches, l'une expérimentale et l'autre basée sur la modélisation, ont été mises en place. La première approche concerne l'étude des processus épigénétiques, c'est-à-dire des mécanismes régulant l'activité des gènes sans modification de la séquence d'ADN elle-même, de leurs modifications transgénérationnelles radio-induites, pouvant perdurer dans la progéniture après une irradiation parentale, et du lien entre ces modifications épigénétiques et la radiotoxicité à l'échelle de l'organisme. Pour cela, le micro-crustacé *Daphnia magna* a été exposé aux radiations gamma externe ($6.5 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ et $41,3 \mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$) pendant 25 jours (génération F0). Une évaluation des effets sur la survie, la croissance et la reproduction a été réalisée sur la génération F0 et chez sa descendance, à savoir la génération F1, exposée au stade d'embryon, la génération F2, exposée au stade de cellule germinale et la génération F3, première génération non-exposée. Les résultats ont montré une réduction de la fécondité en F0 mais aucun effet à l'échelle de l'organisme en générations F1, F2 et F3. Une analyse des modifications épigénétiques a été conduite dans les générations F0, F2 et F3, à l'aide du séquençage bisulfite sur le génome entier. Grâce à cette technique, des modifications significatives de la méthylation de l'ADN ont été détectées à l'échelle du nucléotide dans toutes les générations, indépendamment du débit de dose. Certaines de ces modifications sont communes aux débits de dose et/ou aux générations. Les gènes concernés par ces

modifications de la méthylation sont en partie associés à des fonctions déjà connues pour être impliquées dans la réponse aux radiations ionisantes. Les modifications de la méthylation communes aux générations F2 et F3 démontrent clairement que certaines modifications épigénétiques peuvent être transmises par la lignée germinale vers les générations non-exposées. Dans la seconde approche, la modélisation avait pour objectif d'analyser les effets des radiations gamma sur la croissance et la reproduction de *D. magna* à l'échelle de plusieurs générations. Un modèle mécaniste, le DEBtox (Budget Energétique Dynamique appliqué à la toxicologie), a été modifié pour inclure des compartiments de dommage, dont le niveau peut être hérité d'une génération à la suivante. Le modèle a été ajusté aux données avec des méthodes d'inférence bayésienne afin d'estimer les paramètres tout en tenant compte des incertitudes qui leur sont associées. Nos résultats ont montré que ce modèle permet une bonne description de données acquises lors d'études multigénérationnelles. Toutefois, les incertitudes associées aux paramètres contrôlant la cinétique d'accumulation des dommages et l'apparition des effets, soulignent la nécessité de préciser davantage la nature des mécanismes moléculaires et métaboliques sous-jacents, afin de garantir une meilleure prédiction de l'évolution des effets sur le long terme.

Mots-clefs : irradiation gamma, effets transgénérationnels, modifications épigénétiques, méthylation de l'ADN, DEBtox, *Daphnia magna*

• **Audrey SOULOUMIAC**, 2017-2020

Thèse de l'Université Aix-Marseille « Sciences de l'environnement » (ED251)

Sujet : « Etude mécaniste et écophysiological des transferts du carbone 14 aux poissons »

Dirigée par Jean-Christophe Poggiale et Olivier Simon

En cours

Le carbone-14 (^{14}C) est l'un des deux principaux radionucléides rejetés en plus grande quantité dans les rivières par les Centrales Nucléaires de Production d'Electricité en fonctionnement normal. En France, le ^{14}C contribue ainsi à la majeure partie de la dose annuelle estimée pour les populations locales vivant dans à proximité des rivières nucléarisées, essentiellement par l'ingestion de poissons radiocontaminés. Toutefois, les modèles mathématiques utilisés pour évaluer le transfert du ^{14}C dans les écosystèmes aquatiques sont incapables d'expliquer la variabilité des teneurs observées dans les poissons échantillonnés. L'une des raisons tient à la nature extrêmement simpliste de ces modèles, qui négligent l'influence potentielle des variations de spéciation du ^{14}C , des transformations biochimiques qui interviennent au fil des chaînes trophiques et le rôle éventuel de la physiologie des poissons, sous contrôle des facteurs environnementaux forçants, comme la température et la disponibilité de la nourriture.

Dans ce contexte, le projet de doctorat (en cours) d'Audrey Souloumiac vise à adapter l'approche conceptuelle du Budget Isotopique Dynamique (DIB), une extension de la théorie du Budget Energétique Dynamique (DEB) utilisée pour décrire les flux d'isotopes stables au sein des organismes, au cas du transfert de ^{14}C entre colonne d'eau, sédiment, phyto- et zoo-plancton et poissons. Pour ce faire, *Danio rerio* et *Cyprinus carpio* sont sélectionnés respectivement comme modèles de laboratoire et espèce communément rencontrée dans les suivis radioécologiques des rivières françaises et dont les paramètres de modèle DEB sont disponibles dans la collection Add-My-Pet.

Une recherche bibliographique est d'abord conduite et ds données de taille et de reproduction sont utilisées pour améliorer la paramétrisation du modèle DEB pour *C. carpio*. Des analyses de sensibilité (MORRIS, SOBOL') sont ensuite réalisées pour identifier les paramètres les plus influents. Enfin, des expériences sont en cours pour tenter de quantifier les efficacités de

transfert du ^{14}C vers différents processus du modèle DIB, à l'aide de différentes formes de ^{14}C (portées par du glycérol, de l'arginine, du glucose, comme molécules précurseurs du métabolisme des lipides, protéines et glucides).

Mots-clés : Budget Isotopique Dynamique, carbone-14, transfert, poissons

3.3. POST-DOC

- **Emilie LANCE**, 2009-2010

Projet : « Intégration des modèles de dynamique de population à l'évaluation du risque écologique associé aux radiations ionisantes »

3.4. AUTRES STAGES

- **Antoine ALONZO**, 2012

D.U.T. « Génie Biologique », option « Génie de l'Environnement » de l'Université François-Rabelais Tours

Sujet : Etude de la toxicité de l'uranium appauvri - Influence de l'exposition des œufs chez *Daphnia magna*.

Laboratoire d'Ecotoxicologie des Radionucléides

- **Antoine ALONZO**, 2016-2017

D.E.S.U. de l'Université de Lorraine

Sujet : Analyse bayésienne des effets transgénérationnels des radiations ionisantes alpha chez *Daphnia magna* à l'aide du budget énergétique dynamique.

En collaboration avec le Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), UMR CNRS 7360, Université de Lorraine, Metz, France

3.5. COMITES DE PILOTAGE

- **Florence ZEMAN**, 2005-2008

Thèse de l'Université Montpellier 2 « Sciences de l'environnement » (ED « SIBAGHE »)

Titre : « Toxicité d'un mélange binaire chez la daphnie *Daphnia magna*. Etude des effets biologiques de l'uranium et du sélénium seuls et en mélange. »

- **Stéphanie BOURRACHOT**, 2005-2009

Thèse de l'Université Aix-Marseille 1 « Sciences de l'environnement » (ED251)

Titre : « Etude des effets biologiques de l'exposition à l'uranium chez le poisson zèbre (*D. rerio*). Impact sur les stades de vie. »

Chapitre 4

Collaborations scientifiques

Au cours de mes travaux de recherches, des collaborations scientifiques ont été établies avec :

- **Jean-Paul BOURDINEAUD** (Prof.), UMR 5805 EPOC (Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux), Station marine d'Arcachon, Université Bordeaux 1, France
- **Emilie LANCE** (Dr.), UMR-I 02 SEBIO (Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques), Université de Reims-Champagne-Ardenne, France
- **Elise BILLOIR** (Dr.), UMR 7360 LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), Université de Lorraine, Metz, France
- **Sandrine CHARLES** (Prof.), UMR 5558 LBBE (Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive), Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France
- **Jean-Christophe POGGIALE** (Prof.), UMR 7294 MIO (Institut Méditerranéen d'Océanographie), Institut Pytheas, Université d'Aix-Marseille, France
- **Alexandre PERY** (Dr.), **Rémy BEAUDOUIN** (Dr.), unité METO (Modèles pour l'Écotoxicologie et la Toxicologie), INERIS, Verneuil-en-Halatte, France
- **Philippe CIFFROY** (Dr.), EdF, Division Recherche et Développement, Département Laboratoire National d'Hydraulique et Environnement, Chatou, France
- **Deborah OUGHTON** (Dr.), **Turid HERTEL-AAS** (Dr.), **Dag BREDE** (Dr.), **Erica MAREMONTI** (Dr.), Centre for Environmental Radioactivity (CERAD), Department of Environmental Science, Norwegian University of Life Sciences (NMBU), Aas, Norvège
- **Almudena REAL** (Dr.), CIEMAT (Centro de Investigaciones Energéticas Medio Ambientales y Tecnológicas), Madrid, Espagne
- **Jordi VIVES I BATLLE** (Prof.), Belgian Nuclear Research Centre (SCK•CEN), Mol, Belgique
- **Clare BRADSHAW** (Dr.), Department of Ecology, Environment and Plant Sciences, Stockholm University, Suède
- **Mike GILEK** (Dr.), School of Life Sciences, Södertörn University College, Huddinge, Suède
- **Claire COUTRIS** (Dr.), Division of Environment and Natural Resources, Norwegian Institute of Bioeconomy Research (NIBIO), Aas, Norvège

- **Karel DE SCHAMPHELAERE** (Prof.), **Jana ASSELMAN** (Dr.), Laboratory of Environmental Toxicology and Aquatic Ecology, Ghent University, Belgique
- **D. COPPLESTONE** (Prof.), Université de Stirling, Biological and Environmental Sciences, Royaume-Uni

Chapitre 5

Animation scientifique

- Depuis mon arrivée à l'IRSN en 2004, mes travaux de recherche en écotoxicologie se déclinent autour de deux axes principaux :

1) Etudes en laboratoire des transferts et des effets toxiques des radionucléides (Am-241, Cs-137, U appauvri) et de leurs variations sur plusieurs générations successives (réponse multigénérationnelle et transgénérationnelle) chez les invertébrés d'eau douce à différentes échelles (histoire de vie, physiologie, modifications génétiques et épigénétiques) ;

2) Modélisation des effets de la toxicité radiologique et/ou chimique sur le budget énergétique des organismes et sur la dynamique de populations d'espèces animales aquatiques et terrestres, en vue d'élucider les liens mécanistes entre les différents niveaux d'organisation biologique et prédire leurs conséquences à une échelle plus pertinente au plan écologique.

- Encadrement d'étudiants en D.U.T., master 2, thèse de doctorat et post-doctorat au LME et au LECO.

- Participation aux programmes de recherche IRSN (Envirhom-Eco), nationaux (ANR AMORE, NEEDS DEB-RAD), européens (ERICA, PROTECT, STAR) et internationaux, incluant :

1) Animation et conduite du Workpackage 5 « Ecologically relevant low dose effects » du programme de recherche européen STAR (2011-2015) ;

2) Animation et conduite du Working group 9 « Models for assessing radiation effects on populations of wildlife species » du programme de recherche AIEA MODARIA (2012-2015).

- Mission d'expert confirmé « Études et recherches en écotoxicologie des éléments traces, radioactifs ou non » contribuant à l'expansion du rayonnement scientifique du laboratoire et de l'IRSN au niveau national et européen, aux développements de méthodes d'évaluation du risque aux écosystèmes pour les radionucléides et à la transmission des connaissances.

Chapitre 6

Publications, Colloques, Séminaires, Rapports

Sommaire

6.1. Articles.....	27
6.2. Communications orales.....	29
6.3. Posters	31
6.4. Séminaires	33
6.5. Rapports.....	35
6.6. Contributions à ouvrages.....	36

6.1. ARTICLES

A venir (titres provisoires)...

- [31] E. Billoir., Trijau M., Parisot F., Alonzo A., Alonzo F. (en prep.) An energy-based model to analyze transgenerational effects of internal alpha radiation in *Daphnia magna* exposed to waterborne Am-241.
- [30] Trijau M., Parisot F., E. Billoir., Alonzo F. (en prep.) A mechanistic model to analyze sub-lethal effects of chronic gamma irradiation in *Daphnia magna* in a multigeneration context.
- [29] Alonzo F., Trijau M., Plaire D., Massarin S., E. Billoir. (en prep.) An energy-based model with a transgenerational damage compartment to explain the increase in toxicity over generations in *Daphnia magna* exposed to depleted uranium.

Parus

- [28] Adam-Guillermin C, Hertel-Aas T, Oughton D, Blanchard L, Alonzo F, Armant O, Horemans N, on behalf of the related ALLIANCE Topical Working Group (2018) Radiosensitivity and transgenerational effects in non-human species. *Annals ICRP* 47:327–341
- [27] Trijau M, Jana Asselman, Armant O, Adam-Guillermin C, De Schamphelaere KAC, Alonzo F (2018) Transgenerational DNA methylation changes in *Daphnia magna* exposed to chronic gamma irradiation. *Environ Sci Technol* 52:4331–4339
- [26] Lecomte-Pradines C, Hertel-Aas T, Coutris C, Gilbin R, Alonzo F (2017) A dynamic energy-based model to analyze sub-lethal effects of chronic gamma irradiation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Toxicol Environ Health* 80:830–844
- [25] Alonzo F, Hertel-Aas T, Real A, Lance E, Garcia-Sanchez L, Bradshaw C, Vives i Batlle J, Oughton DH, Garnier-Laplace J (2016) Population modelling to compare chronic external radiotoxicity between individual and population endpoints in four taxonomic groups. *J Environ Rad* 152:46–59
- [24] Parisot F, Bourdineaud J-P, Plaire D, Adam-Guillermin C, Alonzo F (2015) DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations. *Aquat Toxicol* 163:27–36
- [23] Plaire D, Bourdineaud JP, Alonzo A, Camilleri V, Garcia-Sanchez L, Adam-Guillermin C, Alonzo F (2013) Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of *Daphnia magna* exposed to uranium. *J Compar Biochem Physiol C* 158:231–243
- [22] Hinton TG, Garnier-Laplace J, Vandenhove H, Dowdall M, Adam-Guillermin C, Alonzo F, ... , Vives i Batlle J (2013) An invitation to contribute to a strategic research agenda in radioecology. *J Environ Rad* 115:73–82

- [21] Lance E, Alonzo F, Garcia-Sanchez L, Beaugelin-Seiller K, Garnier-Laplace J (2012) Modelling population-level consequences of ionizing radiation effects in aquatic invertebrates under laboratory conditions. *Sci Total Environ* 429:206–214
- [20] Biron PA, Massarin S, Alonzo F, Garcia-Sanchez L, Charles S, Billoir E (2012) Population-level modelling to account for multigeneration effects of uranium in *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol* 46:1136–1143
- [19] Lance E, Alonzo F, Tanguy M, Gérard C, Bormans M (2011) Impact of microcystin-producing cyanobacteria on reproductive success of *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) and predicted consequences at the population level. *Ecotoxicology* 20:719–730
- [18] Massarin S, Beaudoin R, Zeman F, Floriani M, Gilbin R, Alonzo F, Péry A (2011) Biology-based modeling to analyze uranium toxicity data on *Daphnia magna* in a multigeneration study. *Environ Sci Technol* 45:4151–4158
- [17] Massarin S, Alonzo F, Garcia-Sanchez L, Gilbin R, Garnier-Laplace J, Poggiale J-C (2010) Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. *Aquat Toxicol* 99:309–319
- [16] Adam C, Alonzo F, Bonzom J-M, Gilbin R, Garnier-Laplace J, Simon O (2008) Ecological consequences of chronic uranium exposure [Conséquences écologiques d'une exposition chronique à l'uranium] *Biofutur* 291:42–45
- [15] Alonzo F, Gilbin R, Zeman F, Garnier-Laplace J (2008) Increased effects of internal alpha irradiation in *Daphnia magna* after chronic exposure over three successive generations. *Aquat Toxicol* 87:146–156
- [14] Alonzo F, Hertel-Aas T, Gilek M, Gilbin R, Oughton D, Garnier-Laplace J (2008) Modelling the propagation of effects of chronic exposure to ionising radiation from individuals to populations. *J Environ Rad* 99:1464–1473
- [13] Garnier-Laplace J, Copplestone D, Gilbin R, Alonzo F, Ciffroy P, Gilek M, Oughton D, Agüero A, Bjork M, Oughton D, Jaworska A, Larsson CM, Hingston J (2008) Issues and practices in the use of effects data from FREDERICA in the ERICA Integrated Approach. *Journal of Environmental Radioactivity* 99:1474–1483
- [12] Gilbin R, Alonzo F, Garnier-Laplace J (2008) Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *J Environ Rad* 99:134–145
- [11] Zeman F, Gilbin R, Alonzo F, Lecomte-Pradines C, Garnier-Laplace J, Aliaume C (2008) Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 86:370–378
- [10] Alonzo F, Gilbin R, Bourrachot S, Floriani M, Morello M, Garnier-Laplace J (2006) Effects of chronic internal alpha irradiation on physiology, growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 80:228–236

- [9] Alonzo F, Virtue P, Nicol S, Nichols PD (2005) Lipids as trophic markers in Antarctic krill. III. Temporal changes in digestive gland lipid composition of *Euphausia superba* in controlled conditions. *Mar Ecol Progr Ser* 296:81–91
- [8] Alonzo F, Virtue P, Nicol S, Nichols PD (2005) Lipids as trophic markers in Antarctic krill. II. Lipid composition of the body and digestive gland of *Euphausia superba* in controlled conditions. *Mar Ecol Progr Ser* 296:65–79
- [7] Alonzo F, Mayzaud P, Razouls S, Bocher P, Cherel Y (2003) Seasonal changes in biomass, growth rates and production of subantarctic calanoid copepods in the Bay of Morbihan, Kerguelen Islands. *Mar Biol* 142:525–536
- [6] Mayzaud P, Boutoute M, Alonzo F (2003) Lipid composition of the Antarctic euphausiids *Euphausia vallentini* and *Thysanoessa macrura* during summer in the Indian sector of the Southern Ocean. *Antarctic Sci* 15:463–475
- [5] Bocher P, Cherel Y, Alonzo F, Razouls S, Labat JP, Mayzaud P, Jouventin P (2002) Importance of the large copepod *Paraeuchaeta antarctica* (Giesbrecht, 1902) in coastal waters and the diet of seabirds at Kerguelen, Southern Ocean. *J Plankton Res* 24:1317–1333
- [4] Alonzo F, Mayzaud P, Razouls S (2001) Egg production and energy storage in relation to feeding conditions in the subantarctic copepod *Drepanopus pectinatus*: an experimental study of reproductive strategy. *Mar Ecol Progr Ser* 209:231–242
- [3] Alonzo F, Mayzaud P, Razouls S (2000) Egg production, population structure and biochemical composition of the subantarctic copepod *Paraeuchaeta antarctica* in the Kerguelen Archipelago. *Mar Ecol Progr Ser* 205:207–217
- [2] Alonzo F, Mayzaud P, Razouls S (2000) Egg-production dynamics, biochemical composition and hatching success of the subantarctic copepod *Paraeuchaeta antarctica*: laboratory studies. *Mar Ecol Progr Ser* 205:219–227
- [1] Alonzo F, Mayzaud P (1999) Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red. *Mar Chem* 67:289–301

6.2. COMMUNICATIONS ORALES

- [20] Alonzo F, Trijau M, Billoir E (2019) Molecular and metabolic mechanisms of transgenerational effects in *Daphnia* exposed to radionuclides. DEB2019, 6th International Symposium on DEB theory for metabolic organization, 10-12 avril 2019, Brest (France)
- [19] Souloumiac A, Poggiale J-C, Alonzo F (2019) Mecanistic and ecophysiological study of carbon 14 transfer in fish. 6th International Symposium on DEB theory for metabolic organization, 10-12 avril 2019, Brest (France)
- [18] Alonzo F (2017) Molecular and metabolic mechanisms of transgenerational effects of radionuclides in *Daphnia*. 2nd European Radiological Protection Research Week, 10-12 octobre 2017, Paris (France)

- [17] Alonzo F, Trijau M, Billoir E, Adam-Guillermin C (2017) Effects of radionuclides and ionizing radiation from the molecular to the population levels in *Daphnia*. 4th International Conference on Radioecology & Environmental Radioactivity, 3-8 septembre 2017, Berlin (Allemagne)
- [16] Alonzo F, Parisot F, Trijau M, Plaire D, Massarin S, Lance E, Garcia-Sanchez L, Adam-Guillermin C., Garnier-Laplace J (2016) Effects of ionizing radiation from the molecular to the population levels. 6th Norwegian Environmental Toxicology Symposium, 25-27 octobre 2016, Oslo (Norvège)
- [15] Trijau M, Alonzo F, Plaire D, Parisot F, Adam-Guillermin C., Garnier-Laplace J (2016) Mechanistic links between molecular alterations and transgenerational effects of depleted uranium and radionuclides in *Daphnia magna*. SETAC Europe 26th Annual Meeting, 22–26 May 2016, Nantes, France
- [14] Parisot F, Poggiale J-C, Alonzo F (2015) DNA alterations and effects on energy budget in *Daphnia magna* during chronic external gamma irradiation over three successive generations. DEB 2015, 4th Dynamic Energy Budget Symposium, 28-30 avril 2015, Marseille (France)
- [13] Alonzo F, Plaire D, Parisot F, Adam-Guillermin C., Garnier-Laplace J (2015) Links between DNA alterations and transgenerational effects of radionuclides in invertebrates. 4th Dynamic Energy Budget Symposium, 28-30 avril 2015, Marseille (France)
- [12] Parisot F, Bourdineaud J-P, Adam-Guillermin C., Alonzo F (2014) Mechanistic study of the toxicity of ionizing radiation in *Daphnia magna*. 3rd International Conference on Radioecology & Environmental Radioactivity, 7-12 septembre 2014, Barcelone (Espagne)
- [11] Alonzo F (2014) A mechanistic approach to link biological effects of radioactive substances from molecules to populations in wildlife species. 3rd International Conference on Radioecology & Environmental Radioactivity, 7-12 septembre 2014, Barcelone (Espagne)
- [10] Plaire D, Bourdineaud J-P, Garcia-Sanchez L, Poggiale J-C, Alonzo F (2013) Linking DNA damage and effects on life history in a multigenerational exposure of *Daphnia magna* to uranium SETAC Europe 23rd Annual Meeting, 12-16 mai 2013, Glasgow (Royaume-Uni)
- [9] Biron PA, Billoir E, Massarin S, Alonzo F, Charles S (2011) Effects of uranium in *Daphnia magna* exposed over three successive generations: extrapolation of DEBtox analyses to the population level. SETAC Europe 21st Annual Meeting, 15-19 May 2011, Milan (Italie)
- [8] Biron PA, Billoir E, Massarin S, Alonzo F, Charles S (2011) Effects of uranium in *Daphnia magna* exposed over three successive generations: extrapolation of DEBtox analyses to the population level. 2nd Dynamic Energy Budget Symposium, 13-15 avril 2011, Lisbonne (Portugal)

- [7] Massarin S, Alonzo F, Garcia-Sanchez L, Gilbin R, Garnier-Laplace J, Poggiale J-C (2010) Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. SETAC Europe 20th Annual Meeting, 23-27 mai 2010, Séville (Espagne)
- [6] Massarin S, Alonzo F, Garcia-Sanchez L, Beaudoin R, Péry A, Gilbin R (2010) Effets d'une exposition chronique à l'uranium sur les traits d'histoire de vie et la physiologie de *Daphnia magna* sur trois générations successives. Colloque de la SEFA, 31 mars 2010, Metz (France)
- [5] Alonzo F, Massarin S, Dutilleul M, Zeman F, Gilbin R, Garnier-Laplace J (2009) Modelling population responses of freshwater invertebrates to radionuclides with different toxic effects on organisms. 1st Dynamic Energy Budget Symposium, 19-22 avril 2009, Brest (France)
- [4] Alonzo F, Massarin S, Zeman F, Gilbin R, Garnier-Laplace J (2008) Modelling population responses of freshwater invertebrates to pollutants with different toxic effects on organisms. 5th SETAC World Congress, 3-7 août 2008, Sydney (Australie)
- [3] Alonzo F, Zeman F, Massarin S, Gilbin R, Garnier-Laplace J (2008) Predicting population response of a freshwater invertebrate after chronic exposure to radionuclides inducing different toxic effects on organisms. International Conference on Radioecology & Environmental Radioactivity, 25-20 juin 2008, Bergen (Norvège)
- [2] Alonzo F, Gilbin R, Garnier-Laplace J (2007) Extrapolation de l'effet des radionucléides de l'individu à la population. Application au microcrustacé d'eau douce *Daphnia magna*. 6e Congrès National de Radioprotection de la SFRP, 19-21 juin 2007, Reims (France)
- [1] Alonzo F (2006) Effects of chronic internal alpha radiation on individual energy budget and population dynamics in the waterflea *Daphnia magna* (Crustacean, Cladoceran). SETAC Asia/Pacific Meeting, 18-20 septembre 2006, Pékin (Chine)

6.3. POSTERS

- [18] Trijau M, Jana Asselman, Armant O, Adam-Guillermin C, De Schamphelaere KAC, Alonzo F (2019) Epigenetic modifications as a molecular mechanism for transgenerational effects in *Daphnia* exposed to radionuclides. DEB2019, 6th International Symposium on DEB theory for metabolic organization, 10-12 avril 2019, Brest (France)
- [17] Trijau M, Adam-Guillermin C., Poggiale J-C, Alonzo F (2016) Transgenerational effects of a chronic external gamma irradiation on *Daphnia magna*: epigenetic modification and inheritance. SETAC Europe 26th Annual Meeting, 22-26 May 2016, Nantes, France
- [16] Parisot F, Bourdineaud J-P, Adam-Guillermin C., Poggiale J-C, Alonzo F (2015) DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic

- exposure to gamma radiation over three successive generations. SETAC Europe 25th Annual Meeting, 3-7 mai 2015, Barcelone (Espagne)
- [15] Lance E, Alonzo F, Beaugelin-Seiller K, Garnier-Laplace J (2011) Extrapolation of responses to ionising radiation from the individual to the population level. May the critical ecotoxicity value obtained for the population challenge the predicted no-effect-dose-rate derived at the individual level? 2nd International Conference on Radioecology & Environmental Radioactivity, 19-24 juin 2011, Hamilton (Canada)
- [14] Alonzo F, Massarin S, Zeman F, Beaudoin R, Péry A, Garnier-Laplace J (2011) Modelling individual and population dynamics of an aquatic invertebrate exposed to uranium with multigenerational effects on physiology and life history. 2nd International Conference on Radioecology & Environmental Radioactivity, 19-24 juin 2011, Hamilton (Canada)
- [13] Plaire P, Alonzo F, Gilbin R, Poggiale J-C (2011) Effects of radionuclides on sexual reproduction in *Daphnia magna*: consequences for energy budget and population dynamics. 2nd Dynamic Energy Budget Symposium, 13-15 avril 2011, Lisbonne (Portugal)
- [12] Zeman FA, Alonzo F, Février L, Lecomte-Pradines C, Aliaume C, Gilbin R (2010) Importance of water chemistry for the toxicity of uranium on an aquatic organism *D. magna*. SETAC Europe 20th Annual Meeting, 23-27 mai 2010, Séville (Espagne)
- [11] Alonzo F, Massarin S, Billoir E, Charles S, Biron PA, Garcia-Sanchez L, Garnier-Laplace J (2010) Modelling individual and population dynamics of *Daphnia magna* exposed to uranium with multigenerational effects on physiology and life history. SETAC Europe 20th Annual Meeting, 23-27 mai 2010, Séville (Espagne)
- [10] Lance E, Alonzo F, Beaugelin-Seiller K, Garnier-Laplace J (2010) Derivation of predicted-no-effect-dose rate values by modelling population responses to ionizing radiation. SETAC Europe 20th Annual Meeting, 23-27 mai 2010, Séville (Espagne)
- [9] Massarin S, Dutilleul M, Alonzo F, Gilbin R, Poggiale J-C (2009) Effects of multigenerational uranium exposure on life history and energy budget of *Daphnia magna*. SETAC Europe 19th Annual Meeting, 31 mai-4 juin 2009, Göteborg (Suède)
- [8] Dutilleul M, Massarin S, Alonzo F, Poggiale J-C (2009) Modeling the effects of uranium on the physiological processes, energy budget and population dynamics of *Daphnia magna*. 1st Dynamic Energy Budget Symposium, 19-22 avril 2009, Brest (France)
- [7] Massarin S, Alonzo F, Gilbin R, Poggiale J-C (2008) Effects of feeding conditions on physiological processes and energy budget of *Daphnia magna* exposed to radionuclides. SETAC Europe 18th Annual Meeting, 25-29 mai 2008, Varsovie (Pologne)
- [6] Zeman F, Gilbin R, Alonzo F, Pradines C, Garnier-Laplace J, Aliaume C (2007) Chronic effects of uranium on *Daphnia magna* and consequences on populations: Integrating physiological processes into a classical 21-day reproduction test. SETAC Europe 17th Annual Meeting, 20-24 mai 2007, Porto (Portugal)

- [5] Alonzo F, Gilbin R, Zeman F, Garnier-Laplace J (2007) Effects of chronic internal alpha radiation on individual energy budget in *Daphnia magna* and consequences for population dynamics. SETAC Europe 17th Annual Meeting, 20-24 mai 2007, Porto (Portugal)
- [4] Gilbin R, Alonzo F, Pradines C, Fuma S, Zeman F, Bourrachot S, Garnier-Laplace J (2006) Chronic effects of radioactive substances: Physiological effects of α rays and α particles in *D. magna* SETAC Europe 16th Annual Meeting, 7-11 mai 2006, La Haye (Pays-Bas)
- [3] Bourrachot S, Fuma S, Alonzo F, Gilbin R, Garnier-Laplace J (2006) Chronic effects of uranium on ingestion and reproduction in *Daphnia magna* SETAC Europe 16th Annual Meeting, 7-11 mai 2006, La Haye (Pays-Bas)
- [2] Alonzo F, Gilbin R, Garnier-Laplace J (2005) Extrapolating effects of stress from individuals to populations based on bioenergetics: Experimental and modelling approach. SETAC Europe 15th Annual Meeting, 22-26 mai 2005, Lille (France)
- [1] Alonzo F, Nicol S, Virtue P, Nichols P (2001) Lipids as trophic markers in Antarctic krill. VIIIth SCAR International Biology Symposium, 27 août-1er septembre 2001, Amsterdam (Pays-Bas)

6.4. SÉMINAIRES

- [25] Alonzo F, Trijau M, Asselman J, Armant O, De Schamphelaere K, Adam-Guillermin C (2018) Transgenerational DNA methylation changes in daphnids exposed to gamma irradiation. ALLIANCE Workshop on Epigenetics, 4-6 Avril 2018, Fontenay-aux-Roses (France)
- [24] Alonzo F, E. Billoir, Trijau M, Alonzo A (2017) Propagation des effets toxiques des rayonnements gamma de l'individu à la population : implications pour la radioprotection de l'environnement. Workshop NEEDS Environnement, 6 Juillet 2017, Nantes (France)
- [23] Alonzo F, Lance E, Massarin S, Plaire D, Parisot F, Garcia-Sanchez L, Adam-Guillermin C., Garnier-Laplace J (2016) Propagation des effets toxiques des rayonnements gamma de l'individu à la population : implications pour la radioprotection de l'environnement. Séminaire annuel du SERIS, 21 Juin 2016, Aix-en-Provence (France)
- [22] Alonzo F, Parisot F, Plaire D, Adam-Guillermin C., Garnier-Laplace J (2016) Le budget énergétique dynamique pour expliquer les effets transgénérationnels des radiations ionisantes alpha et gamma. Séminaire du SRBE « Radiosensibilité », 8 février 2016, Fontenay-aux-Roses (France)
- [21] Alonzo F, Parisot F, Plaire D, Adam-Guillermin C., Garnier-Laplace J (2015) Mechanistic models to understand transgenerational effects of ionizing radiation at different biological scales. MEDILs meeting, 24 septembre 2015, Cadarache (France)

- [20] Alonzo F (2014) Etudes et recherches en écotoxicologie des éléments traces, radioactifs ou non. Présentations des experts PRP-ENV, 23 janvier 2015, Fontenay-aux-Roses (France)
- [19] Alonzo F (2015) Links between DNA alterations and transgenerational effects of radionuclides in invertebrates. STAR-COMET Workshop on Molecular Mechanisms of Radiation Toxicity at Chronic Low Dose Levels, 10-12 Décembre 2014, Oxford (Royaume-Uni)
- [18] Parisot F, Poggiale J-C, Alonzo F (2015) DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations. STAR-COMET Workshop on Molecular Mechanisms of Radiation Toxicity at Chronic Low Dose Levels, 10-12 Décembre 2014, Oxford (Royaume-Uni)
- [17] Alonzo F (2014) Rôle des dommages à l'ADN dans l'augmentation transgénérationnelle de la sensibilité aux radiations. Apports d'une modélisation mécaniste. Matinée D3P8, 2 juillet 2014, Fontenay-aux-Roses (France)
- [16] Alonzo F (2014) Ecotoxicité des radionucléides de l'échelle moléculaire à l'échelle populationnelle. Séminaire annuel du SERIS, 24 Juin 2014, Aix-en-Provence (France)
- [15] Alonzo F, Massarin S, Plaire D, Parisot F (2014) Etude mécaniste de la toxicité des radionucléides chez *Daphnia*. Rôle des dommages à l'ADN dans l'augmentation transgénérationnelle de la sensibilité. Journée D3P8 – Environnement, 20 mai 2014, Cadarache (France)
- [14] Alonzo F (2014) Application of the simplified DEBtox equations to the case of *Daphnia* exposed to uranium. STAR Practical courses, 29 janvier 2014, Mol (Belgique)
- [13] Alonzo F (2012) Effets transgénérationnels de l'uranium chez les microcrustacés aquatiques. Séminaire de toxicologie environnementale et humaine (MNHN), 23 octobre 2012, Paris (France)
- [12] Garnier-Laplace J, Alonzo F, Adam-Guillermin C (2012) Understanding the link between radionuclides exposure and biological effects in wildlife: a need to combine research from simple laboratory models to complex real world studies. Seminar of Environmental Radioactivity, 5 septembre 2012, Plymouth (Royaume-Uni)
- [11] Alonzo F, Massarin S (2010) Propagation de l'incertitude lors de l'analyse de données d'écotoxicité dans des calculs matriciels de dynamique de population (LME). Réunion Incertitude, 13 décembre 2010, Cadarache (France)
- [10] Alonzo F, Massarin S, Dutilleul M, Zeman F, Garcia-Sanchez L, Beaudoin R, Péry A, Gilbin R (2010) Effets des radionucléides sur le budget énergétique et la dynamique de population de daphnies *Daphnia magna*. Séminaire du LBBE, 1^{er} avril 2010, Lyon (France)
- [9] Alonzo F (2009) Effets des radionucléides sur la physiologie et l'histoire de vie et conséquences au niveau population chez *Daphnia magna*. Séminaire IRSN-INERIS, 5 novembre 2009, Fontenay-Aux-Roses (France)

- [8] Alonzo F, Massarin S, Dutilleul M, Zeman F, Gilbin R, Garnier-Laplace J (2009) Modelling population responses of freshwater organisms to radionuclides with different toxic effects on organisms. AIEA EMRAS II meeting, 21-22 juillet 2009, Vienne (Autriche)
- [7] Alonzo F, Massarin S, Dutilleul M, Zeman F, Gilbin R, Garnier-Laplace J (2009) Modelling population responses of freshwater invertebrates to radionuclides with different toxic effects on organisms. AIEA meeting, 11 mai 2009, Monaco
- [6] Alonzo F, Massarin S, Dutilleul M, Zeman F, Gilbin R (2009) Modélisation de la dynamique de population en réponse aux effets des radionucléides sur l’histoire de vie et le budget énergétique. Séminaire SECURE, 30-31 mars 2009, Cadarache (France)
- [5] Alonzo F, Massarin S, Zeman F, Gilbin R, Garnier-Laplace J (2008) Extrapolating chronic effects of radionuclides from organisms to population in a freshwater invertebrate. ANSTO, 8 août 2008, Lucas Heights (Australie)
- [4] Alonzo F (2006) Extrapolating effects of Americium-241 from individuals to population in the waterflea *Daphnia magna* (Crustacean, Cladoceran). Rencontre IRSN-Cemagref, 10 février 2006, Cadarache (France)
- [3] Alonzo F (2005) Extrapolating effects of radionuclides from individuals to population in the waterflea *Daphnia magna* (Crustacean, Cladoceran). Conseil scientifique du programme ENVIRHOM, 22-23 novembre 2005, Les Vaux de Cernay (France)
- [2] Alonzo F (2003) Lipids in Antarctic zooplankton. Norwegian Polar Institute et Akvaplan-Niva, Tromsø (Norvège), septembre 2003
- [1] Alonzo F (2003) Validation expérimentale de l’utilisation des lipides comme marqueurs trophiques chez le krill antarctique. Laboratoire Arago, Banyuls/mer (France), mai 2003

6.5. RAPPORTS

Programmes européens

- [6] Alonzo, F., Horemans, N., Oughton, D., Adam-Guillermin, C., Lecomte-Pradines, C., Parisot, F., Buisset-Goussen, A., Zimmer, E., Real, A., Garnier-Laplace, J. (2015) STAR Deliverable (D-N°5.5). Protection criteria: Integrating radiation protection from molecules to populations and evaluation of group specific criteria. European Commission, 7th Framework, Contract N(Fission-2010-3.5.1-269672), 69 pp.
- [5] Alonzo, F., Zimmer, E., Plaire, D., Buisset-Goussen, A., Adam-Guillermin, C., Lecomte-Pradines, C., Horemans, N., Hinton, T. (2014) STAR Deliverable (D-N°5.4). Understanding the “metabolic” mode of actions of two different types of radiation using biokinetics/DEBtox models. European Commission, 7th Framework, Contract N(Fission-2010-3.5.1-269672), 69 pp.
- [4] Oughton, D., Adam-Guillermin, C., Alonzo, F., Hertel-Aas, T., Horemans, N., Jaworska, A., Lecomte-Pradines, C., Lyche, J.L., Pereira, S., Teien, H.C., Vanhoudt, N.,

- Real, A., Février, L. (2013) STAR Deliverable (D-N°5.3). Radiation Quality: studying sub-cellular modes of action using biomarkers and “omics” tools. European Commission, 7th Framework, Contract N(Fission-2010-3.5.1-269672), 94 pp.
- [3] Alonzo, F., Vives i Batlle, J., Hertel-Aas, T., Bradshaw, C., Vandenhove, H., Garnier-Laplace, J., Real, A., Oughton, D. (2012) STAR Deliverable (D-N°5.2). Life history traits, radiosensitivity and population modeling: methods to extrapolate from individual endpoints to population dynamics. European Commission, 7th Framework, Contract N(Fission-2010-3.5.1-269672), 125 pp.
- [2] Alonzo, F., Bradshaw, C., Della-Vedova, C., Lecomte-Pradines, C., Garnier-Laplace J., Gilbin, R., Hertel-Aas, T., Hinton, T.G., Horemans, N., Oughton, D.H., Rudolfson, G., Salbu, B., Vandenhove, H. (2011) STAR Deliverable (D-N°5.1). Plans for laboratory radiation effects studies. European Commission, 7th Framework, Contract N(Fission-2010-3.5.1-269672), 127 pp.
- [1] Agüero A, Alonzo F, Björk M, Ciffroy P, Copplestone D, Garnier-Laplace J, Gilbin R, Gilek M, Hertel-Aas T, Jaworska A, Larsson C-M, Oughton D, Zinger I (2006) ERICA Deliverable 5. Derivation of Predicted-No-Effect-Dose-Rate values for ecosystems (and their sub-organisational levels) exposed to radioactive substances. Garnier-Laplace J. and Gilbin R. (Eds). ERICA, European Commission, 6th framework, Contract N°FI6R-CT-2004-508847, 88 p.

IRSN

- [5] Souloumiac A, Alonzo F (2018) Modélisation mécaniste des flux de carbone 14 chez les poissons à l’aide du Budget Energétique Dynamique. Rapport RT/PSE-ENV n° 2018-0006, 47 p.
- [4] Alonzo F (2009) Estimation de concentrations sans effet prévisible pour l’ammoniac en eau douce. Rapport DEI/SECRE n° 2009-028, 42 p.
- [3] Alonzo F (2009) Transferts au sein de l’écosystème aquatique d’eau douce : proposition de valeurs de paramètres pour SYMBIOSE (version 2 – Juillet 2009). Rapport DEI/SECRE n° 07-056, 40 p.
- [2] Alonzo F (2008) PNEC pour l’hydrazine en milieu aquatique. Rapport DEI/SECRE n° 08-015, 28 p.
- [1] Alonzo F (2007) Transferts au sein de l’écosystème aquatique d’eau douce : proposition de valeurs de paramètres pour SYMBIOSE. Rapport DEI/SECRE n° 07-056, 40 p.

6.6. CONTRIBUTIONS A OUVRAGES

- [3] Bonzom JM, Chapon V, Alonzo F (2009) Chapitre 21 : Conséquences écologiques. Dans « Toxicologie nucléaire environnementale et humaine », Ménager MT, Garnier-Laplace J, Goyffon, Editions Tec&Doc Lavoisier, Paris, pp. 369–383

- [2] Souidi M, Guéguen Y, Alonzo F, Henner P (2009) Chapitre 16 : Effets sur le métabolisme. Dans « Toxicologie nucléaire environnementale et humaine », Ménager MT, Garnier-Laplace J, Goyffon, Editions Tec&Doc Lavoisier, Paris, pp. 291–307
- [1] Alonzo F, Nicol S, Virtue P, Nichols P (2003) Lipids as trophic markers in Antarctic krill, I. Validation under controlled laboratory conditions. in: Antarctic Biology in a Global Context. Huiskes AHL, Gieskes WWC, Rozema J, Schorno RML, van der Vies SM, Wolff WJ (Eds) Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, p121–128

Deuxième partie

Etat de l'art

Chapitre 1

Des radionucléides dans l'environnement

Sommaire

1.1. Radioactivité	43
1.1.1. Isotopes radioactifs.....	43
1.1.2. Types de rayonnements.....	43
1.1.3. Mesures de la radioactivité et de la radioprotection.....	45
1.2. Origine des rayonnements ionisants dans l'environnement	46
1.2.1. De la radioactivité naturelle	46
1.2.2. Des radionucléides d'origine artificielle dans l'environnement	47
1.2.3. Le cas de l'uranium (U)	51
1.2.4. Le cas de l'américium-241 (Am-241).....	54
1.3. Interactions avec la matière vivante	55
1.3.1. De la radiolyse de l'eau à la production des <i>ROS</i>	55
1.3.2. Lésions moléculaires	55
1.3.3. Mécanismes de toxicité de l'uranium	57

1.1. RADIOACTIVITE

Dans la nature, la très vaste majorité des atomes qui composent la matière possède un noyau atomique stable. Il existe cependant des atomes qualifiés d'isotopes radioactifs (ou encore de radioisotopes, de radionucléides...) dont la particularité est de posséder un noyau instable, à l'origine de la radioactivité.

1.1.1. Isotopes radioactifs

Le noyau des atomes est doté d'un nombre variable de nucléons (protons et neutrons). C'est le nombre de protons dans le noyau atomique qui détermine la nature de l'élément – 6 pour les atomes de carbone, 92 pour les atomes d'uranium, etc. Pour un élément donné, le nombre de neutrons peut, quant à lui, varier et les différents atomes sont appelés isotopes. Si le nombre de protons et de neutrons est équilibré, le noyau atomique est stable et l'atome est un isotope stable. Par contre, lorsqu'il y a un excès de nucléons ou un déséquilibre entre le nombre de protons et neutrons, le noyau est instable et l'atome est un isotope radioactif.

L'instabilité des isotopes radioactifs se traduit par leur désintégration spontanée, au cours de laquelle la structure du noyau, en protons et neutrons, est modifiée pour former un noyau différent, pouvant lui-même être instable et se désintégrer à son tour, et ainsi de suite au travers d'une succession d'isotopes radioactifs, jusqu'à l'atteinte d'un isotope stable. Ce processus est connu sous le nom de chaîne de désintégration, caractéristique de chaque radionucléide.

La désintégration d'un isotope radioactif survient au bout d'un laps de temps très variable d'un radionucléide à l'autre, de quelques microsecondes à plusieurs milliards d'années. Le laps de temps nécessaire pour que l'activité spécifique d'un radionucléide décroisse de 50% est appelé la période radioactive (ou demi-vie). La période radioactive d'un radionucléide est une mesure de sa persistance. Elle est, par exemple, de plusieurs milliards d'années pour l'uranium-238 (^{238}U ou U-238), dont la radioactivité naturelle lors de l'apparition de la vie sur Terre était le double de celle estimée aujourd'hui.

La désintégration radioactive s'accompagne d'une émission de particules et/ou de rayonnements électromagnétiques de haute énergie. Ces émissions sont qualifiées de rayonnements ionisants, du fait de leur capacité à produire des particules chargées (ions), en arrachant des électrons dans la matière qu'elles traversent. Les effets, transitoires ou permanents, ne se limitent pas toutefois pas à l'ionisation et incluent également une excitation des atomes (électrisation et échauffement du milieu traversé) et des dommages aux molécules.

1.1.2. Types de rayonnements

Les différents types de rayonnement ionisant, désignés par les lettres alpha, bêta, gamma ou X, diffèrent par leur nature et leurs propriétés physiques, comme la quantité d'énergie mise en jeu (en électronvolt, eV), le pouvoir de pénétration et le transfert d'énergie linéique (TEL). Le TEL (en eV par μm) mesure la quantité d'énergie cédée par le rayonnement au milieu dans lequel il se propage, par unité de distance parcourue. Un TEL élevé ($>10 \text{ MeV } \mu\text{m}^{-1}$)

caractérise un fort pouvoir d'ionisation, plus endommageant pour la matière vivante, mais correspond également à un faible pouvoir de pénétration, suite à la dissipation importante de l'énergie.

Les rayonnements alpha correspondent à l'émission d'un noyau d'hélium, composé de deux protons et deux neutrons et donc doté d'une charge électrique positive $+2|e|$. La désintégration alpha concerne surtout les très gros noyaux atomiques, comme l'U-238, comportant 92 protons et 136 neutrons, ou l'américium-241 (^{241}Am ou Am-241). L'énergie cinétique des particules alpha est relativement grande, toujours supérieure à 4 MeV et s'élevant jusqu'à 8,78 MeV. Du fait de leur masse, les particules alpha ionisent davantage la matière que les autres types de rayonnements. Les rayonnements alpha possèdent donc un TEL élevé et un faible pouvoir de pénétration (0,04 cm dans les tissus). Stoppés par une simple feuille de papier ou quelques cm d'air, ce sont donc les rayonnements dont il est le plus facile de se protéger. Bien que les rayonnements alpha soient arrêtés par les téguments externes des organismes, comme la peau, ils deviennent extrêmement nocifs pour la matière vivante, dès que le radionucléide qui les émet est internalisé dans l'organisme.

La désintégration bêta concerne les atomes dont le noyau présente un écart important entre le nombre de protons et de neutrons. La particule bêta émise correspond, le plus souvent, à un électron (doté d'une charge négative $-|e|$) après transformation d'un neutron en proton et, moins fréquemment, à un positron (électron doté d'une charge positive $+|e|$) lorsqu'un proton se transforme en un neutron. Le tritium (^3H ou H-3) et le carbone-14 (^{14}C ou C-14) sont des émetteurs bêta. Les particules bêta, plus légères, ont une TEL plus faible et donc un pouvoir de pénétration plus grand, que les particules alpha. Des épaisseurs d'au moins 3 mm de métal, 6 mm de bois ou 5 mm de tissu sont nécessaires pour s'en protéger. L'énergie moyenne varie dans de grandes proportions entre les radionucléides : 5,69 keV pour le tritium ; 695 keV pour un puissant émetteur bêta comme le phosphore-32 (^{32}P ou P-32).

Les rayonnements gamma et les rayons X sont de nature électromagnétique. Comme la lumière visible, il s'agit de photons, dotés toutefois d'une énergie beaucoup plus élevée : de quelques dizaines de keV à plusieurs MeV. L'émission d'un ou plusieurs photons gamma correspond à une simple désexcitation du noyau atomique, évacuant le surplus d'énergie acquise suite à une désintégration bêta le plus souvent, à une désintégration alpha beaucoup plus rarement, ou encore à la capture d'un neutron par un noyau.

En interagissant peu avec la matière, les rayonnements gamma sont très pénétrants et beaucoup plus difficiles à arrêter, mais aussi beaucoup moins nocifs, que les rayonnements alpha ou bêta. Ils ne sont atténués que par une importante épaisseur d'eau, de plomb ou de béton, l'intensité des rayonnements diminuant de manière exponentielle avec cette épaisseur. Les effets des rayons gamma sont beaucoup plus diffus que ceux des rayons alpha ou beta et se font sentir dans des volumes importants (à l'échelle des organismes entiers). Le cobalt-60 (^{60}Co ou Co-60) et le césium-137 (^{137}Cs ou Cs-137) sont deux exemples d'émetteurs gamma.

1.1.3. Mesures de la radioactivité et de la radioprotection

L'activité, qui désigne le nombre de désintégrations produites par une source radioactive au cours du temps, est décrite dans le système international en becquerel (symbole Bq), 1 Bq correspondant à une désintégration par seconde. Le nom de cette unité fait référence à Henri Becquerel, découvreur de la radioactivité, qui constata en 1896 que des sels d'uranium avaient la propriété d'émettre des « rayonnements spontanés » capables de noircir les plaques photographiques.

Le becquerel remplace depuis 1964 l'unité originelle, le curie (symbole Ci), nommé en 1910 en l'honneur de Pierre Curie. Un curie correspond approximativement à l'activité d'un gramme de l'isotope Ra-226 du radium isolé par Pierre et Marie Curie en 1898. Le curie, qui équivaut à 37 GBq, est une unité bien adaptée aux très fortes activités (comme celles émises par le radium). À titre de comparaison, une tonne d'U-238 (assez faiblement radioactif) n'a qu'une activité totale de 0,3 Ci. L'activité spécifique, qui s'exprime en Bq par g, correspond à l'activité rapportée à la masse.

Le röntgen (symbole R), unité c.g.s. (centimètre gramme seconde) remplacée par le coulomb par kg dans le système international, est défini comme la quantité d'exposition aux rayonnements X ou gamma induisant une unité de charge électrostatique (esu) dans un centimètre cube d'air sec à pression atmosphérique standard et température de 0°C. Il est nommé en l'honneur du physicien allemand Wilhelm Röntgen, qui découvrit l'existence des rayons X en 1895.

La dose absorbée, exprimée en gray (symbole Gy), mesure la quantité d'énergie reçue par unité de masse, un gray correspondant à un joule par kg. La dose absorbée n'est toutefois pas un bon indicateur de l'effet biologique potentiel, celui-ci variant fortement selon le type de rayonnement ionisant.

Pour tenir compte des différences d'intensité des effets biologiques résultant d'une même dose entre rayonnement alpha (beaucoup plus nocives) et rayonnement gamma (qui le sont relativement moins), les radiobiologistes ont recours à l'application de facteurs de pondération (symbole w_R pour weighting factors), dont l'estimation requiert une masse importante de travaux expérimentaux. Leur valeur recommandée chez l'humain varie de 1 (pour les rayonnements bêta et gamma, et les rayons X) à 20 pour les particules alpha (ICRP, 1991, 2003). La valeur des w_R pour la faune et la flore varie certainement très fortement d'une espèce à l'autre. Les valeurs proposées pour les espèces non-humaines – de 1 to 3 pour les rayonnements bêta et de 5 à 20 pour les rayonnements alpha – ne font donc pas consensus (Sazykina et al., 2003). Leur estimation reste un sujet peu abordé et l'exposition est, le plus souvent, exprimée en dose absorbée.

Les facteurs de pondération w_R servent à calculer la dose équivalente, exprimée autrefois en REM (Röntgen equivalent man) et en sievert (symbole Sv) dans le système international. La dose équivalente est biologiquement plus significative et prend en compte l'efficacité des différents rayonnements (estimée sous la forme d'un facteur d'efficacité biologique relative ou EBR) à induire l'apparition d'un cancer dans différents organes humains.

Tableau 1. Unités de la radioactivité et de la radioprotection (Eisler, 1994 ; Talmage et Meyers-Schone, 1995).

Grandeur	Unité	Symbole	Description
Activité	Becquerel (s.i.)	Bq	1 désintégration s ⁻¹
	Curie U	Ci	1 Ci = 3,7 10 ¹⁰ Bq
Dose absorbée	Gray (s.i.)	Gy	1 Gy = 1 J kg ⁻¹ tissu
	Radiation absorbed dose (c.g.s.)	rad	1 rad = 0,01 Gy
Exposition	Röntgen (c.g.s.)	R	2,58 10 ⁻⁴ coulomb kg ⁻¹ air
Dose équivalente	Sievert (s.i.)	Sv	1 Sv = 1 Gy pondéré
	Röntgen equivalent man	REM	1 rem = 0,01 Sv = 1,07 R

Le système c.g.s. fut proposé par la British Association for the Advancement of Science en 1874. Il fut utilisé en science jusqu'au milieu du XXe siècle.

1.2. ORIGINE DES RAYONNEMENTS IONISANTS DANS L'ENVIRONNEMENT

1.2.1. De la radioactivité naturelle

La radioactivité est présente partout, dans l'espace, dans l'atmosphère, sur Terre et même dans les êtres vivants. Cette radioactivité, dite naturelle, trouve son origine dans les radionucléides issus de deux sources : les radionucléides primordiaux, d'une part, et cosmogéniques, d'autre part.

Les radionucléides primordiaux, produits au cœur des étoiles massives et dispersés au moment de leur mort, sont incorporés aux roches de l'écorce terrestre depuis la formation de la Terre. Les plus abondants aujourd'hui, U-235 et U-238, le thorium-232 (Th-232) et le potassium-40, ont survécu en raison de leur durée de vie de plusieurs milliards d'années. Le radium et le polonium, identifiés par Pierre et Marie Curie en 1898, font partie des filiations radioactives du thorium et de l'uranium, comme le radon, élément gazeux célèbre en raison de sa part importante dans la radioactivité naturelle.

Les radionucléides dits cosmogéniques, dont les représentants les plus abondants sont le C-14, le tritium, le béryllium-10 et l'aluminium-26, sont continuellement régénérés par le rayonnement cosmique, flux de particules de haute énergie en provenance de l'espace, dont l'atmosphère et le champ magnétique terrestre atténuent considérablement l'impact.

L'ensemble de ces isotopes radioactifs et de leurs descendants sont présents dans tous les compartiments de la biosphère : air, eau, sol, organismes. Tous les êtres vivants baignent donc dans un flux, continu et bénin, de rayonnements ionisants d'origine naturelle, sans que cela les empêche de survivre, se multiplier, se diversifier et coloniser tous les habitats de la Terre, comme en témoigne le foisonnement des espèces depuis l'aube de la vie.

La dose de radioactivité naturelle reçue par les organismes peut fortement varier en fonction des milieux habités, des modes de vie et de nombreux facteurs environnementaux, dont l'altitude et la nature des roches environnantes. Elle est ainsi estimée à 3,11 mGy par an chez les organismes terrestres supérieurs (Sample et Irvine, 2011), dont 20% environ résulterait de sources externes (rayonnements cosmique, atmosphérique et tellurique) et 80% de sources internes inhalées dans le milieu ou ingérées par l'eau et la nourriture. Cette dose atteindrait plusieurs centaines de mGy par an dans le Massif Central (Lodève) en raison de l'altitude et des sols riches en argile et grès (rayonnements cosmiques et telluriques) (Delpoux et al., 1997 ; UNSCEAR, 2000a). Celle reçue par les organismes aquatiques d'eau douce pourrait varier de 0,02 à 2,6 mGy par an (Hoffman et al., 2002).

1.2.2. Des radionucléides d'origine artificielle dans l'environnement

Origine artificielle

Depuis sept décennies, de nouvelles sources de radioactivité, liées à l'activité humaine, s'ajoutent aux sources naturelles. L'utilisation grandissante du nucléaire, dans une multitude d'applications civiles, médicales ou militaires, conduit en effet à des rejets de radionucléides dans les écosystèmes terrestres et aquatiques (Aarkrog, 2003). Ces rejets prennent deux formes, les uns, réguliers, dans la situation dite de fonctionnement normal, les autres, exceptionnels, principalement lors des situations accidentelles.

Les réacteurs à eau pressurisée (EPR), qui équipe la majorité du parc électronucléaire français, génèrent un cortège de radionucléides, confinés dans le circuit primaire du réacteur. Les plus importants sont le Cs-137, le Cs-134, l'iode-131 (I-131), le tellure-123m (Te-123m) qui résultent de la fission de l'uranium en noyaux moins lourds, le tritium, le fer-55, le cobalt-58 (Co-58), le nickel-63 (Ni-63) ou l'argent-110m (Ag-110m) qui proviennent de l'activation des éléments structurels du réacteur et, enfin, l'U-235, l'U-238, le plutonium-238, le plutonium-239 et l'Am-241, générés par capture neutronique. L'ensemble des propriétés des radionucléides d'origine artificielle est décrit et disponible sur le site de l'IRSN dans les fiches radionucléides (<http://www.irsn.fr>).

Fonctionnement normal

Hautement réglementés et contrôlés, les rejets en fonctionnement normal font l'objet de demandes d'autorisation. Ces rejets sont opérés par les installations nucléaires telles que les centrales de production d'électricité et les usines de retraitements du combustible, par les centres médicaux réalisant des examens et des traitements radiologiques, et enfin par l'agriculture intensive, lors de l'épandage d'engrais ou de pesticides. Ainsi, malgré le confinement, diverses opérations liées aux manipulations du combustible nucléaire peuvent entraîner la perte de quantités plus ou moins importantes de produits radioactifs, qui sont collectés dans les effluents liquides. Les effluents primaires sont généralement recyclés, et les effluents usés subissent de nombreuses opérations (dilution, filtration, évaporation, décontamination et déminéralisation).

En France, les rejets radioactifs dans les rejets liquides sont assez fluctuants entre les divers réacteurs du parc électronucléaire et pour un même réacteur d'une année à l'autre. Il apparaît qu'une dizaine de radionucléides artificiels (le C-14, le tritium, I-131, Co-60, Co-58, Ag-110m, Ni-63, Cs-134, Cs-137, antimoine-124, Te-123m) sont identifiés. Un seuil réglementaire fixe l'activité maximale dans le cours d'eau récepteur à $0,8 \text{ Bq L}^{-1}$ pour les émetteurs bêta et gamma, le rejet d'émetteurs alpha n'étant pas autorisé. En terme de quantités, l'activité moyenne rejetée en 2005 dans les effluents liquides était de $6 \cdot 10^6 \text{ Bq}$ pour l'iode I-131, $13,3 \cdot 10^9 \text{ Bq}$ pour le C-14 et jusqu'à $25,9 \cdot 10^{12} \text{ Bq}$ (par tranche de 1300 MW) pour le tritium. Le rejet de tritium en Manche par l'usine de traitements des déchets radioactifs de la Hague avoisinait $4 \cdot 10^{12} \text{ Bq}$ durant l'année 2000 (Devos, 2013). L'exposition des organismes aquatiques aux rejets contrôlés d'une centrale nucléaire n'excéderait pas $0,01 \text{ mGy}$ par an (IRSN, 2011).

Essais nucléaires

De larges quantités d'éléments radioactifs sont libérées dans l'environnement lors des essais atmosphériques d'armes nucléaires. Un essai nucléaire désigne l'explosion d'une bombe atomique à des fins expérimentales. Le premier a lieu en 1945 aux Etats-Unis (désert du Nouveau-Mexique), trois semaines avant les bombardements d'Hiroshima et Nagasaki au Japon. Entre 1945 et 1980, plus de 540 essais nucléaires atmosphériques sont réalisés par les grandes puissances (U.R.S.S., Etats-Unis, Grande-Bretagne, France, Chine). Chaque explosion a pour conséquence le rejet et la dissémination de matières radioactives dans l'environnement. Cette contamination concerne l'ensemble du globe, mais compte-tenu de la répartition des sites de tir, l'hémisphère Nord (notamment entre les 40e et 50e degrés de latitude) reçoit 75% des retombées radioactives totales.

Accidents

Plusieurs événements accidentels marquent l'histoire de l'industrie nucléaire. Le 29 septembre 1957, une puissante explosion au niveau des cuves de déchets radioactifs du complexe nucléaire de Maiak répand dans l'environnement $7,4 \cdot 10^{17} \text{ Bq}$ (soit environ la moitié des quantités rejetées à Tchernobyl) sur une distance de 300 km. Il entraîne la contamination d'une zone de 15000 à 23000 km² et l'évacuation de la population humaine dans la zone où les concentrations de strontium-90 (Sr-90) excèdent $7,4 \cdot 10^2 \text{ Bq par m}^2$. Cet accident nucléaire, dit de Kychtym, le plus grave en U.R.S.S. après la catastrophe de Tchernobyl, est classifié au niveau 6 de l'échelle INES (échelle internationale des événements nucléaires). En octobre 1957, un feu de graphite dans le cœur d'un réacteur de production de plutonium, au sein du complexe nucléaire de Windscale, entraîne le rejet de $1,86 \cdot 10^{16} \text{ Bq}$ en Grande Bretagne et sur la mer d'Irlande. En 1979, la fusion partielle du cœur d'un des réacteurs de la Centrale Nucléaire de Three Miles Island en Pennsylvanie, entraîne le rejet accidentel de $1,59 \cdot 10^{15} \text{ Bq}$.

Cependant, seules les catastrophes nucléaires de Tchernobyl en 1986 en Ukraine et de Fukushima-Daiichi en 2011 au Japon ont été classées comme accidents majeurs, au niveau 7, maximal en gravité, sur l'échelle INES. Lors de ces accidents, une grande diversité et de grandes quantités de radionucléides ont en effet été libérées dans l'environnement (Tableau 2).

A Tchernobyl, suite à l'explosion et à l'incendie du réacteur, c'est un total d'environ $12 \cdot 10^{18}$ Bq qui a été rejeté en 10 jours, la grande majorité (84 % de l'activité totale rejetée) correspondant à des éléments radioactifs de période inférieure à un mois. L'Ukraine, la Biélorussie et la Russie sont les pays les plus touchés par les retombées radioactives. Ces pays, qui ont reçu environ 60 % de la radioactivité totale rejetée, détiennent de vastes territoires (près de $150\,000 \text{ km}^2$) où les dépôts de Cs-137 dépassent $40 \cdot 10^3 \text{ Bq/m}^2$ et atteignent souvent plusieurs centaines milliers de Bq/m^2 . Sur l'Europe entière, au gré du déplacement du nuage radioactif soumis aux conditions météorologiques, des « taches » de contamination se sont constituées, en fonction du relief, du couvert végétal et des précipitations, dépassant localement $40 \cdot 10^3 \text{ Bq/m}^2$. Les dépôts ont ainsi été jusqu'à 10 fois plus importants dans les zones où il a plu (comme les zones montagneuses), par comparaison aux dépôts secs formés aux mêmes endroits.

A Fukushima, la quantité des rejets est beaucoup plus difficile à estimer. Selon les estimations, les activités totales de Cs-137 rejetées dans l'atmosphère varient entre $8 \cdot 10^{15}$ et $20 \cdot 10^{15}$ Bq (Tableau 2). Cette incertitude dans les prédictions tient à la difficulté à obtenir des prévisions météorologiques fiables en raison de l'orographie complexe des lieux (marquée avec des reliefs importants à seulement quelques kilomètres à l'intérieur des terres) et de la destruction d'une partie des infrastructures (par le tremblement de terre et le tsunami) rendant impossible l'acquisition de données d'observations météorologiques. Or, comme à Tchernobyl, les conditions météorologiques (vents, stabilité de l'atmosphère, précipitations...) déterminent le transport du panache radioactif dans l'atmosphère et son dépôt sur les sols et les couverts végétaux.

Les rejets liquides sont aussi responsables d'une pollution de l'écosystème marin aux alentours de la centrale nucléaire de Fukushima-Daiichi (IRSN, 2012). Un niveau élevé de radioactivité a ainsi été observé dans l'eau de mer et le sédiment de la zone côtière, dans les jours suivants la catastrophe. Les principaux radionucléides détectés, l'iode I-131 et le Cs-137, sont respectivement détectés à des concentrations allant jusqu'à $200 \cdot 10^3$ et $70 \cdot 10^3 \text{ Bq L}^{-1}$ dans l'eau de mer. Ces concentrations décroissent rapidement avec la distance (1/1000 à 30 km des côtes) en raison de la très forte dilution par la masse d'eau. Hormis aux abords directs de la centrale, où les valeurs sont très élevées ($100\,000$ et $150\,000 \text{ Bq/kg}$ au niveau du déversoir), les concentrations de Cs-137 dans le sédiment récolté sur la côte et en mer varient de 1 to $10,000 \text{ Bq/kg}$, en augmentation avec le temps. La quantité d'iode I-131, prédominante au moment de l'accident, décroît rapidement dans les semaines suivantes en raison de la désintégration rapide (période radioactive de 8 j). Il n'est plus détectable dans l'eau de mer après mai 2011 et dans le sédiment en juillet 2011. D'autres radionucléides, la plupart de période radioactive courte, sont occasionnellement détectés à des concentrations moindres. A partir d'avril 2014, les concentrations de Cs-137 mesurées affichent des valeurs environ 10 000 fois plus faibles que celles détectées en avril 2011 ($0,01$ à 5 Bq/L à moins de 2 km de la centrale de Fukushima-Daiichi) mais globalement stables par rapport à l'été 2012 à proximité comme à distance du site. La stabilité de ce marquage ne peut être expliquée que par des apports continus de Cs-137 dans l'eau de mer, imputables à des fuites en provenance du site accidenté, au lessivage des sols contaminés par les eaux de surface et la nappe phréatique

Tableau 2. Comparaison des circonstances et de l'activité estimée des principaux radionucléides rejetés lors de l'accident de Tchernobyl et de Fukushima (IAEA, 2006 ; IRSN, 2012, 2016).

	Tchernobyl	Fukushima
Date	26 avril 1986	11 mars 2011
Circonstances des accidents	Augmentation brutale et incontrôlée de la réaction nucléaire entraînant l'explosion du cœur du réacteur et la destruction du bâtiment. Dispersion du combustible autour de l'installation.	Perte des alimentations électriques et du refroidissement entraînant la fusion du cœur de 3 réacteurs, fuites des enceintes libérant des produits radioactifs. Combustible fondu resté à l'intérieur de l'enceinte.
Rejets atmosphériques	12 10 ¹⁸ Bq Rejet continu pendant 10 jours suite à l'incendie du graphite du réacteur	8 à 20 10 ¹⁵ Bq de ¹³⁷ Cs Rejet discontinu au cours d'une quinzaine d'épisodes pendant 14 jours
Rejets marins	Néant	27 10 ¹⁵ Bq de césium ¹³⁷ Cs
Composition :		
Gaz rares : dont ¹³³ Xe	6 533 10 ¹⁵ Bq	6 550 10 ¹⁵ Bq
Iodes : ¹³¹ I, ¹³² I	4 260 10 ¹⁵ Bq	408 10 ¹⁵ Bq
Tellures ¹³² Te, ^{129m} Te	1 390 10 ¹⁵ Bq	145 10 ¹⁵ Bq
Césiums : ¹³⁷ Cs, ¹³⁴ Cs, ¹³⁶ Cs	168 10 ¹⁵ Bq	58 10 ¹⁵ Bq (+ 27 10 ¹⁵ Bq marin)
Autres : dont ⁹⁰ Sr, ²⁴¹ Pu etc.	1 227 10 ¹⁵ Bq	29 10 ¹⁵ Bq
Etendue des dépôts	Dépôts hétérogènes (dits « en taches de léopard ») à une échelle continentale, dans l'Europe entière, dépassant localement 40 10 ³ Bq par m ² . En Ukraine, Russie et Biélorussie : - 150 000 km ² dépassant 40 10 ³ Bq par m ² de ¹³⁷ Cs ; - 13000 par km ² dépassant 600 10 ³ Bq par m ² de ¹³⁷ Cs.	Dépôts hétérogènes (dits « en taches de léopard ») à une échelle régionale, jusqu'à 250 km autour de la centrale : - 24 000 km ² dépassant 10 10 ³ Bq par m ² de ¹³⁷ Cs ; - 600 km ² dépassant 600 10 ³ Bq par m ² de ¹³⁷ Cs.

parvenant à la mer ou de la désorption des radionucléides fixés sur les sédiments déposés ou en suspension (IRSN, 2015).

En terme de dose absorbée, les retombées radioactives atmosphériques sur les surfaces végétales et terrestres délivrent, 20 jours après l'accident nucléaire de Tchernobyl, un débit de dose externe ambiant pouvant aller jusqu'à 20 Gy j^{-1} , du à la présence en grande quantité de radionucléides à vie courte (UNSCEAR, 2008). Malgré la décroissance radioactive, la zone d'exclusion de Tchernobyl présente encore aujourd'hui un fond radioactif résiduel associé aux radionucléides à demi-vie longue, persistant dans le temps, comme le Cs-137, le Sr-90, et les isotopes du plutonium, Pu-240 et Pu-239. Les débits de dose externes y varient de $0,1 \mu\text{Gy h}^{-1}$ à 10 mGy h^{-1} en addition du bruit de fond naturel (Garnier-Laplace et al., 2013). L'exposition interne représenterait en moyenne près de 70% de la dose totale absorbée par les organismes (rats, grenouilles, poissons, invertébrés etc.) (Beresford et al., 2005 ; Vives i Batlle et al., 2011). Dans la plupart des cas, les rayonnements alpha et bêta contribueraient significativement à la dose de radioactivité absorbée par les organismes. Chez les invertébrés présents dans les sols par exemple, cette contribution pourrait représenter 7-27% et 35-47% de la dose totale de radioactivité (Gilhen, 2001).

A Fukushima, les écosystèmes côtiers proches de la centrale nucléaire sont les plus impactés par les rejets radioactifs. Un débit de dose voisin de $2,6 \text{ Gy j}^{-1}$ a ainsi été estimé pour la faune benthique (poissons, crustacés, mollusques etc.), 30 jours après l'accident (Garnier-Laplace et al., 2011a).

1.2.3. Le cas de l'uranium (U)

Parmi les radionucléides rencontrés dans l'environnement, l'uranium occupe une place à part du fait des nombreuses applications industrielles et militaires (en tant que composant du combustible des centrales nucléaires, des explosifs des bombes atomiques et du blindage de certains équipements militaires). L'uranium est un radioélément, ce qui signifie que tous ses isotopes sont radioactifs. Présent à l'état naturel sous une forme faiblement radioactive, sa radioactivité peut varier fortement en fonction de sa composition, certains radio-isotopes présentant une activité spécifique relativement élevée.

Uranium naturel

L'uranium naturel est composé en très grande majorité de trois isotopes. Ses deux isotopes les plus abondants, U-238 et U-235, représentent aujourd'hui 99,27% et 0,7% de la masse totale. Ce sont des radionucléides primordiaux, qui ont subsisté dans l'écorce terrestre jusqu'à nos jours, du fait de périodes radioactives exceptionnellement longues – respectivement 4,5 milliards d'années et 700 millions d'années (Ribera et al., 1996 ; WHO, 2001). L'isotope U-234, issu de la désintégration de U-238, est également présent à raison de 0,0005%. Bien qu'en proportion infime, cet isotope contribue autant à la radioactivité de l'uranium naturel que l'U-238, du fait de sa très forte activité spécifique (Tableau 3) (Madic et Genet, 2001 ; Markich, 2002 ; Bleise et al., 2003). Avec le Th-232, les isotopes de l'uranium représentent ainsi les éléments les plus lourds existant à l'état naturel. Les isotopes naturels de l'uranium

émettent principalement des rayonnements alpha accompagnés parfois de gamma de faible énergie. Leurs chaînes de désintégration comporte également des émetteurs gamma et bêta (Madic et Genet, 2001 ; Bleise et al., 2003).

L'uranium est largement distribué dans l'environnement où il est naturellement présent dans les roches, le sol et l'eau. Il reste cependant un élément relativement rare que l'on trouve à raison de 3 grammes par tonne en moyenne dans la croûte terrestre, en particulier dans les roches granitiques ou volcaniques (Bonin et Blanc, 2001). Cette teneur peut s'élever de 28 jusqu'à 210 kg d'uranium par tonne de minerai, dans les gisements particulièrement riches de l'Ouest du Canada (Plateau de l'Athabasca, dans la province de Saskatchewan).

Uraniums enrichi et appauvri

Seul isotope naturel aisément fissile, l'U-235 sert de combustible dans les réacteurs nucléaires et d'explosif dans les bombes atomiques. Avec une teneur naturelle en U-235 de 0,7 %, l'uranium naturel doit être enrichi à 3-4 % pour la plupart des réacteurs actuels (cet enrichissement est porté au-delà de 90 % pour les bombes atomiques). L'enrichissement de l'uranium naturel en U-235 génère en contrepartie des quantités importantes d'uranium dit « appauvri » (8000 tonnes par an en France). L'uranium appauvri provient également du retraitement des combustibles irradiés (Aigueperse et al., 2001). L'uranium est considéré comme appauvri lorsque ses teneurs en U-235 et U-234 sont réduites par rapport à celle trouvée dans l'uranium naturel (WHO, 2001). Dans l'uranium appauvri, la proportion d'U-235 est généralement de l'ordre de 0,2 à 0,3% et celle d'U-234 de 0,0008% (Tableau 3). Débarrassé en grande partie de ses isotopes les plus radioactifs, l'uranium appauvri est environ 60% moins radioactif que l'uranium naturel.

Apports anthropiques

A la redistribution naturelle de l'uranium s'ajoutent des perturbations anthropogéniques à l'origine d'une dispersion de l'uranium dans l'environnement. Ainsi, on dénombre quatre

Tableau 3. Composition isotopique en masse et en activité de l'uranium naturel, de l'uranium enrichi et de l'uranium appauvri (Aigueperse et al., 2001 ; Métivier, 2001)

Isotopes	Masse (%)			Activité (%)			Activité (10 ³ Bq par gramme d'U)		
	²³⁸ U	²³⁵ U	²³⁴ U	²³⁸ U	²³⁵ U	²³⁴ U	²³⁸ U	²³⁵ U	²³⁴ U
Uranium naturel	99,27	0,72	0,0056	48,4	2,3	49,3	12,3	0,58	12,5
Uranium enrichi	96,73	3,25	0,022	18,4	4,0	77,6	12,0	2,6	50,6
Uranium appauvri	99,8	0,20	0,0008	86,1	1,1	12,8	12,4	0,16	1,84

types d'activités industrielles et agricoles ayant un impact sur le cycle de l'uranium dans l'environnement (Colle et al., 2001) :

- les activités minières et industrielles liées au cycle du combustible nucléaire, avec des concentrations localement élevées, atteignant 10–20 mg L⁻¹ en aval des mines (Ragnarsdottir et Charlet, 2000) ;
- l'utilisation du charbon dont la combustion conduit à la libération dans l'atmosphère des radionucléides naturels qu'il contient (radium, thorium, uranium, potassium) ;
- l'utilisation en agriculture d'importantes quantités de phosphates naturels (qui peuvent contenir quelques dizaines de mg d'uranium par kg) pour la fertilisation des cultures et pour l'élaboration de compléments alimentaires pour le bétail ;
- l'utilisation militaire d'uranium appauvri qui peut conduire à un dépôt de fines particules d'UO₂(s) dans les sites bombardés.

Comportement dans l'environnement

Sous l'action des processus d'érosion et d'autres mécanismes géologiques, l'uranium présent dans les roches est naturellement transféré dans les sols. Leur lessivage par les eaux de pluie conduit alors naturellement à sa dissémination dans toutes les composantes de l'environnement (Colle et al., 2001). A la surface du sol, les conditions oxydantes confèrent à l'uranium une forte mobilité, avec le passage d'un état de valence de +IV à +VI et la formation de composés solubles comme l'ion uranyle UO₂²⁺ (Garnier-Laplace et al., 2001 ; Sheppard et al., 2005). L'ion uranyle se complexe facilement avec les carbonates, les phosphates et les ions sulfates. L'uranium forme aisément des complexes organiques à la fois avec des ligands organiques de faible poids moléculaire et avec les substances humiques et fulviques (Sheppard et al., 2005). La répartition de l'uranium en surface des sols est influencée par quatre mécanismes principaux: le transport par les eaux de pluies (lixivation), les mouvements de diffusion, les transports biologiques (plantes, micro-organismes,...) et la resuspension par l'eau et l'air (Ribera et al., 1996).

En milieu aquatique continental, la forme +VI est largement dominante (Colle et al., 2001). Les sédiments ont une forte capacité à fixer l'uranium ce qui leur donne le rôle de compartiment de stockage. La fixation est influencée par la granulométrie : les plus grandes quantités s'associant aux fractions les plus fines (Ribera et al., 1996). L'uranium est aussi présent dans la colonne d'eau, en surface comme en profondeur. Son abondance est extrêmement variable, de 0,01 µg L⁻¹ à 1,5 mg L⁻¹ (WHO, 2001) et reflète sa concentration à la surface des roches. En Europe, la distribution de l'uranium dans les cours d'eau est similaire à celle des ions majeurs et est dépendante du climat et de l'abondance des sédiments (Salminen, 2005).

Biodisponibilité, contamination et bioaccumulation

Comme la plupart des métaux présents dans l'environnement, l'uranium peut présenter, indépendamment de sa concentration, une capacité plus ou moins importante à contaminer les organismes. Cette capacité, que l'on définit comme la biodisponibilité – terme emprunté aux sciences pharmaceutiques pour estimer à quel point une molécule (active) est assimilable – dépend de sa spéciation chimique. Sous l'influence des paramètres physico-chimiques du

milieu comme la dureté, l'alcalinité ou la teneur en matière organique (Garnier-Laplace et al., 2001 ; Markich, 2002), la toxicité de l'uranium en solution varie ainsi selon qu'il se trouve piégé sous forme de complexes peut biodisponibles (par exemple UO_2CO_3 avec les carbonates) ou sous forme d'ion uranyle UO_2^+ ou de sa forme hydroxylée UO_2OH^+ , espèces chimiques les plus biodisponibles qui peuvent contaminer les organismes. Lorsque la dureté de l'eau augmente, la toxicité de l'uranium décroît en raison de sa compétition avec le calcium ou le magnésium.

Les voies de contamination des organismes par l'uranium sont multiples, celle-ci s'opérant par voie directe (au contact de l'eau ou du sédiment), par voie trophique (par ingestion de nourriture contaminée) ou par voie maternelle (par le dépôt dans la progéniture). Les espèces benthiques accumulent d'uranium. Les branchies et la masse viscérale sont les organes les plus contaminés chez *Corbicula fluminea* (Labrot et al., 1999) avec un facteur de concentration maximum de 0,056 (masse fraîche). L'entrée de l'uranium chez le poisson zèbre *Danio rerio* s'effectue principalement par la voie branchiale avec un facteur de concentration de 0,0089 (Barillet et al., 2007 ; Labrot et al., 1999). Les sédiments accumulent les plus fortes concentrations d'uranium, les poissons benthiques peuvent accumuler dix fois plus d'uranium que les organismes pélagiques (Ribera et al., 1996). L'uranium biodisponible a la possibilité de s'accumuler dans certains tissus, au cours du temps. Ce processus suggère que des effets toxiques seraient susceptibles d'apparaître sur le long terme, même à faible concentration.

1.2.4. Le cas de l'américium-241 (Am-241)

Le devenir et les effets des émetteurs alpha à longue demi-vie, comme l'Am-241, restent peu étudiés. Une connaissance des effets biologiques associés à l'exposition chronique aux rayonnements alpha est pourtant urgemment requise, aussi bien pour la gestion des situations post-accidentelles que pour celle, à plus long-terme, des déchets nucléaires.

L'Am-241, d'origine totalement artificielle, est un radionucléide pertinent d'un point de vue environnemental, dont les émissions contribuent significativement à la radioactivité alpha des déchets nucléaires. L'Am-241 est présent à l'état de traces sur l'ensemble du globe, suite aux retombées des essais nucléaires passés et aux rejets accidentels de Tchernobyl. Les concentrations rencontrées dans les écosystèmes aquatiques sont de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-5} Bq L^{-1} . Des valeurs plus fortes, de 10^{-5} to 10^{-2} Bq L^{-1} , sont enregistrées localement dans les eaux douces (Matsunaga et al., 1998 ; Choppin, 2006). Les sols contaminées, présentant des teneurs moyennes de l'ordre de 10^{-2} à 10 Bq kg^{-1} et pouvant localement s'élever de 10 à 10^4 Bq kg^{-1} , représentent une source potentielle d'Am-241 pour les eaux souterraines ou de surface (Pourcelot et al., 2003 ; Agapkina et al., 1995). Les concentrations les plus élevées, jusqu'à 10^5 Bq kg^{-1} , sont retrouvées dans les sédiments marins des plateaux continentaux. Am-241 est susceptible de devenir l'un des contaminants dominants dans les zones affectées par l'accident de Tchernobyl, suite à la désintégration du stock de Pu-241 (Muravitsky et al., 2005).

1.3. INTERACTIONS AVEC LA MATIERE VIVANTE

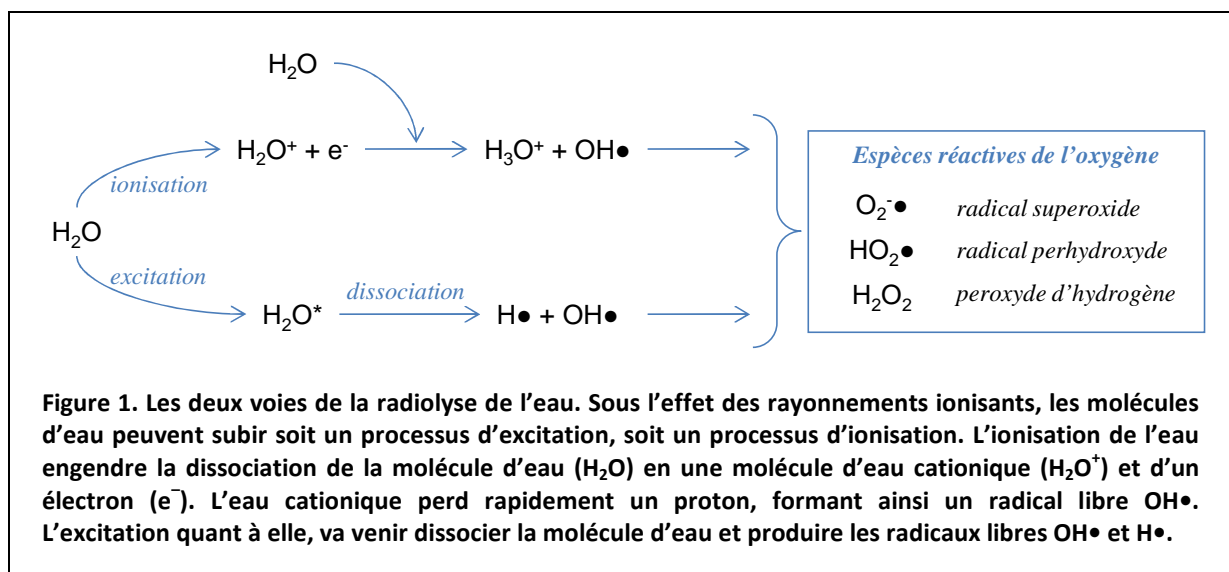
1.3.1. De la radiolyse de l'eau à la production des ROS

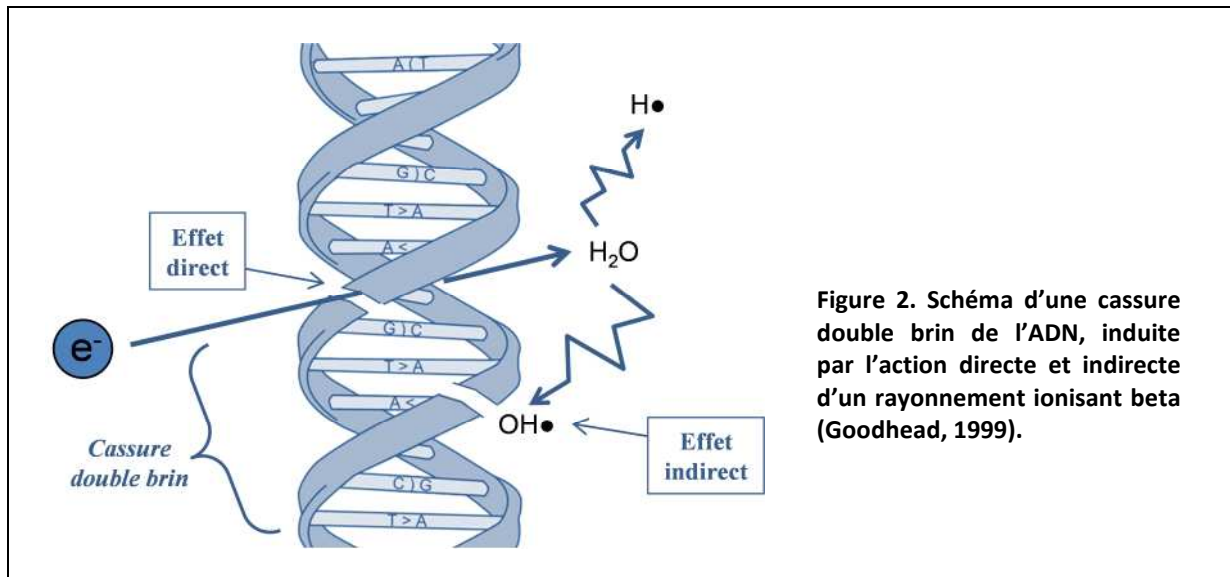
La matière vivante étant majoritairement constituée d'eau, l'action des rayonnements entraîne, dans 80% des cas, une radiolyse des molécules d'eau présentes dans les cellules (Figure 1). Ce mode d'action, dit indirect, serait responsable de la plus grande partie des dommages biologiques observés chez les organismes vivants (Bernhard et Close, 2003). La radiolyse de l'eau conduit à la production de radicaux, $\text{OH}\bullet$ oxydant et $\text{H}\bullet$ réducteur, qui génèrent, de manière aléatoire, des espèces radicalaires secondaires dites « espèces réactives de l'oxygène » (ROS en anglais pour « Reactive Oxygen Species »), telles que le radical superoxide $\text{O}_2^{\bullet-}$, le radical perhydroxyde $\text{HO}_2\bullet$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ces ROS sont à l'origine de nombreuses réactions avec les biomolécules (protéines, glucides, lipides et acides nucléiques, via des oxydations et des peroxydations (Spitz et al., 2004 ; Afonso et al., 2007 ; Ishii, 2007 ; Halliwell, 2012).

1.3.2. Lésions moléculaires

Dans 20% des cas, le rayonnement interagit directement avec des biomolécules, le mode d'action étant dit direct (Figure 2). Dans tous les cas, les phénomènes physiques initiaux, directs ou indirects, aboutissent à une dégradation des macromolécules structurales ou à la désactivation de molécules fonctionnelles, contribuant au fonctionnement et à la survie des cellules (Darby et Doll, 1987). En perdant leur fonction biologique, ces molécules deviennent des déchets qui doivent être éliminés.

Parmi les nombreuses biomolécules sujettes aux dégradations radio-induites, l'acide désoxyribonucléique (ADN) représente une cible critique des rayonnements ionisants (Goodhead, 1994). En interaction étroite avec un groupe de protéines dites « histones », l'ADN constitue la chromatine, matière composant les chromosomes contenus dans le noyau de toute cellule vivante. Au travers de la séquence des bases nucléotidiques qui la composent





(l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymine liées par une chaîne de sucre-phosphate), la molécule d'ADN est porteuse de l'information génétique de l'organisme, essentielle à la vie et transmise de génération en génération. De tous les agents toxiques, les rayonnements ionisants se distinguent par la diversité et la multiplicité des altérations qu'ils engendrent au niveau de l'ADN. On parle de site à dommages multiples (MDS pour « Multiple Damaged Sites ») (Ward, 1988) lorsque deux ou plusieurs types de dommages interviennent sur une courte distance (< 4 nm). Quatre types d'altérations peuvent être distingués :

- 1) Les modifications chimiques des bases nucléotidiques, en particulier des bases puriques (adénine et guanine) qui seraient plus radiosensibles que les bases pyrimidiques (cytosine et thymine), du fait de leur potentiel d'ionisation le plus élevé (Dizdaroglu, 1992). Le taux d'induction estimé est en moyenne de 2000 par cellule eucaryote et par Gy pour un rayonnement de faible TEL.
- 2) Les pontages covalents entre l'ADN et les protéines nucléaires environnantes, dont les histones (Gajewski et al., 1988). Ces altérations radio-induites sont plus rares, 1 Gy provoquant en moyenne 30 par cellule eucaryote pour un rayonnement de faible TEL.
- 3) Les cassures dites « simple-brin » (CSB) d'une des deux chaînes sucre-phosphate composant la structure en double hélice de l'ADN. Ces cassures, très fréquentes, présentent un taux d'induction moyen qui augmente linéairement avec la dose absorbée (Tubiana et al., 2006) mais décroît avec le TEL : de 1000 par cellule de mammifère et par Gy lors d'une irradiation gamma (faible TEL) à 500 dans le cas de rayonnement de TEL plus élevé (Tubiana et Aurengo, 2005).
- 4) Les cassures dites « double-brin » (CDB) des deux chaînes sucre-phosphate composant la structure en double hélice de l'ADN. Elles peuvent résulter de deux cassures simple-brin simultanées intervenant dans une zone rapprochée. Ces cassures, plus rares, apparaissent avec un taux qui s'accroît avec le TEL (Heilmann et al., 1996) : de 40 par cellule de mammifère par Gy de rayonnement lors d'une irradiation de faible TEL à 100 lors d'une irradiation de TEL élevé (Tubiana et Aurengo, 2005).

1.3.3. Mécanismes de toxicité de l'uranium

La toxicité induite par l'uranium a plusieurs origines, à la fois chimique et radiologique. La dominance de l'une ou l'autre de ces toxicités varie selon la composition isotopique et le degré d'enrichissement ou d'appauvrissement en isotopes radioactifs (Tableau 4). Comprendre les effets biologiques de l'uranium implique de prendre en compte à la fois ses propriétés chimiques et radiologiques.

La toxicité radiologique est directement liée à l'action des rayonnements ionisants. Cette forme de toxicité apparaît à partir d'un enrichissement d'au moins 10% en ^{235}U (Ribera et al., 1996). L'uranium appauvri présente une radioactivité faible : moins d'un Bq alpha par μg . Cependant, des études *in vitro* et à l'aide d'isotopes d'activités spécifiques différentes montrent que les particules alpha sont impliquées dans l'apparition de dommages à l'ADN et d'effets cellulaires, et de croissance tissulaire réduite, en particulier lors d'expositions de plus longue durée (Aigueperse et al., 2001). Toutefois, la toxicité de l'uranium appauvri reste en grande partie le fruit de ses propriétés chimiques (Miller et al., 2002).

Des études ont ainsi montré que l'ion UO_2^{2+} internalisé entraîne une toxicité chimique comparable à celle des métaux lourds (cadmium, mercure, plomb,...) qui peuvent induire des effets toxiques sur de nombreux organes : rein, foie, système reproducteur etc. (Ribera et al., 1996). Ces études suggèrent que l'uranium se comporte de façon analogue à certains métaux de transition, comme le fer par exemple, dans la réaction d'oxydoréduction de Fenton en entraînant la production de radicaux hydroxyles avec le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 contenu dans les cellules (Miller et al., 2002). Cette production de ROS induit un stress oxydant, en cause dans divers dommages à l'ADN tels que la production d'adduits et de cassures d'ADN (Yazzie et al., 2003 ; Stearns et al., 2005).

Tableau 4. Toxicité de l'uranium selon sa composition (Ribera et al., 1996)

Formes de l'uranium	Type de toxicité
^{232}U , ^{233}U et U fortement enrichi	Radiologique
U naturel, appauvri	Chimique
^{238}U et U enrichi	Radiologique et chimique

Chapitre 2

Effets radiotoxiques et chimiotoxiques pour la faune et la flore

Sommaire

2.1. Généralités sur les réponses biologiques	61
2.2. Toxicité à l'échelle moléculaire	61
2.2.1. Génotoxicité des rayonnements gamma.....	61
2.2.2. Génotoxicité de l'uranium.....	62
2.2.3. Mécanismes de réparation et conséquences cellulaires	62
2.2.4. Génotoxicité dans un contexte multigénération	63
2.2.5. Modifications épigénétiques	64
2.2.6. Mémoire épigénétique transgénérationnelle	65
2.3. Toxicité à l'échelle cellulaire et tissulaire	66
2.3.1. Stress oxydatif	66
2.3.2. Mortalité cellulaire	67
2.3.3. Toxicité tissulaire	67
2.3.4. Réversibilité des réponses	67
2.4. Toxicité à l'échelle de l'organisme	68
2.4.1. Toxicité aiguë.....	68
2.4.2. Toxicité chronique	70
2.4.3. Exposition multigénérationnelle	71
2.5. Impact sur la faune et la flore de Tchernobyl et Fukushima	72
2.6. Pour une protection des écosystèmes	73
2.6.1. Protéger l'environnement et plus seulement l'humain.....	73
2.6.2. Une valeur de référence pour la radioprotection des écosystèmes	74
2.6.3. Incertitudes	75
2.6.4. Comparaison à la situation naturelle.....	75
2.6.5. Efficacité biologique des différents types de rayonnements ionisants.....	76

2.1. GENERALITES SUR LES REPOSES BIOLOGIQUES

La toxicité des radionucléides se répercute à tous les niveaux d'organisation biologique au travers de processus en cascade, de nature physique, biochimique, puis biologique (Favier, 2003). Si les mécanismes par lesquels les rayonnements ionisants interagissent physiquement avec la matière vivante sont relativement simples et bien décrits aux échelles moléculaire et cellulaire, au travers des phénomènes d'ionisation et d'excitation des molécules décrits plus haut, les réponses biologiques très variées qui en découlent, revêtent une complexité beaucoup plus difficile à appréhender. La matière vivante possède, quant à elle, une certaine faculté de réparation quand l'exposition reste faible. En pratique, la mise en évidence d'effets délétères induits par la radio- et la chimio-toxicité est relativement aisée à l'échelle de l'individu, du moins chez les espèces faciles à maintenir au laboratoire, mais leurs conséquences sur les écosystèmes sont très difficiles à prévoir sur le long terme, sauf en cas d'exposition à une dose très importante laissant relativement moins de place à l'incertitude.

Les effets radiotoxiques sont regroupés en deux catégories (Coppstone et al., 2001 ; Delistraty, 2008). Les effets déterministes apparaissent au-dessus d'un certain seuil de dose absorbée, et voient leur sévérité augmenter avec le niveau d'exposition. Des dommages à un tissu ou un organe, une réduction de la fécondité ou de la survie sont typiquement des effets déterministes. *A contrario*, les effets stochastiques, apparemment sans seuil de dose absorbée, voient leur probabilité d'apparition (mais pas leur sévérité) augmenter avec l'exposition. Ils présentent un délai et une incertitude dans la réponse. L'induction de cancers et les effets génétiques héréditaires sont, de façon caractéristique, de l'ordre des effets stochastiques.

2.2. TOXICITE A L'ECHELLE MOLECULAIRE

2.2.1. Génotoxicité des rayonnements gamma

La littérature et les bases de données regorgent d'exemples illustrant la toxicité des radionucléides pour la molécule d'ADN elle-même. Cette toxicité génétique et cytogénétique inclut l'apparition d'aberrations chromosomiques, de micronoyaux, et d'échanges de chromatides (*sister chromatid exchange*) ainsi que l'induction de cassures simple ou double brin, de perturbations de la synthèse d'ADN, et de modifications des profils d'expression génétique (Adam-Guillermin et al., 2012 ; Dallas et al., 2012 ; Won et al., 2014a, 2014b ; Fuller et al., 2015).

Chez les mammifères, la fréquence de micronoyaux est accrue après exposition de 30 à 40 jours à $1,7 \text{ mGy h}^{-1}$ de souris *Mus musculus* issues de la Red Forest dans la Zone d'Exclusion de Tchernobyl (Rodgers et al., 2001). Des aberrations génétiques dans les cellules hématopoiétiques de la moelle osseuse sont observées, dans deux des sites les plus contaminés, avec une fréquence 2 à 3 fois supérieure, par rapport à celle des sites témoins et un niveau élevé d'aberrations chromosomiques est observé dans la progéniture des femelles gravides capturées sur le terrain (Ryabokon et Goncharova, 2006). Chez les oiseaux, un taux de mutation accru de 2 à 10 fois et des lésions ADN plus fréquentes dans les cellules sanguines sont reportés dans les populations d'hirondelles *Hirundo rustica* vivant à proximité

du site de Tchernobyl par rapport aux régions moins contaminées (Ellegren et al., 1997 ; Bonisoli-Alquati et al., 2009).

Chez les organismes aquatiques comme les larves du ver polychète marin *Neanthes arenaceodentata*, deux fois plus d'échanges de chromatides sont observés après 24h à 400 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ que chez le témoin. Chez le poisson zèbre *D. rerio*, des dommages à l'ADN (test des comètes) sont mis en évidence *in vitro*, avec une radiosensibilité plus forte des spermatoocytes par rapport aux hépatocytes (LOEDR respectives de 42 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ et 31 mGy h^{-1}) (Adam et al., 2006). Une augmentation dose-dépendante des cassures double brin et micronoyaux est également rapportée *in vivo* sur des œufs fertilisés et sur les fibroblastes embryonnaires ZF4 après exposition à 420 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ (Bourrachot, 2009 ; Pereira et al., 2011). Des dommages à l'ADN (test des comètes) sont observés *in vivo* chez des larves de 5-6 jours à des débits de dose faibles (7-8 $\mu\text{Gy h}^{-1}$) (Jarvis et Knowles, 2003). Chez une autre espèce de poisson, le medaka japonais *Oryzias latipes*, des pontages entre chromosomes sont observés dans les œufs exposés à un fort débit de dose de 100 mGy h^{-1} (Suyama et al., 1981). Des mutations affectant seulement certaines cellules (mutants « mosaïques ») ou l'organisme entier, sont observées après expositions aiguës à des doses de 2,4 à 9,5 Gy, selon que la modification génétique intervient au stade cellule germinale ou au cours de l'embryogénèse (Shimada et Shima, 2001, 2004).

2.2.2. Génotoxicité de l'uranium

De la même manière, la génotoxicité de l'uranium pour de nombreuses espèces biologiques, allant des invertébrés à l'humain, n'est plus à démontrer. Un niveau élevé de dommages à l'ADN est ainsi observé par le test des comètes dans les cellules sanguines d'une population humaine vivant à proximité d'une ancienne mine d'uranium (Lourenço et al., 2013). Des lésions, cassures double-brin, et aberrations chromosomiques (test des comètes, marquage des histones γ -H2AX, test des micronoyaux) sont également mis en évidence à court terme (moins de 2 jours) chez le rat à 71 mg L^{-1} . Ces dommages à l'ADN seraient réversibles aux concentrations de 48 à 95 mg L^{-1} et irréversibles au-delà (Thiébaud et al., 2007). L'effet génotoxique de l'uranium est aussi décrit chez le poisson rouge *Carassius auratus* après 96 h d'exposition à 100 mg L^{-1} , chez le poisson zèbre *D. rerio*, exposé *in vivo* pendant 20 jours à 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (test des comètes sur les érythrocytes) et *in vitro* à 2,3 mg L^{-1} (cassures doubles brin des cellules embryonnaires) (Lourenço et al., 2010 ; Barillet et al., 2005 ; Pereira et al., 2012). Chez les invertébrés, des altérations de l'ADN sont également induits chez le bivalve dulçaquicole *Corbicula fluminea* et le ver de terre *Eisenia andrei* (Simon et al., 2011 ; Lourenço et al., 2012).

2.2.3. Mécanismes de réparation et conséquences cellulaires

Les lésions moléculaires et cellulaires induites par les rayonnements ionisants sont, dans une certaine mesure, atténuées par de nombreux mécanismes de réparation mis en œuvre par les cellules. L'efficacité de ces processus – plus élevée pour des niveaux d'endommagement faible à modéré induits par les particules beta ou les rayonnements gamma – conditionne l'état de santé et le devenir de la cellule. Ainsi, les pontages ADN-protéines et les cassures

simple-brin, qui représentent la majorité des cas, sont réparés relativement rapidement (en moins d'une heure) et ont peu d'impact en matière de létalité cellulaire. La réparation repose sur des mécanismes d'excision de bases ou de nucléotides (BER et NER, pour « Base Excision Repair » et « Nucleotide Excision Repair ») impliquant des endonucléases, glycosylases, polymérase et ligases. *A contrario*, les cassures double brin sont très délétères pour la cellule et peuvent conduire à la mort cellulaire lorsqu'elles sont mal réparées. Elles sont reconnues comme la première cause de létalité chez les mammifères suite à une irradiation (Tubiana et Aurengo, 2005). La réparation des CDB est relativement longue et sa cinétique varie selon la taille des cassures et le type cellulaire qui sont autant de facteurs importants dans la radiosensibilité à l'échelle de la cellule (Löbrich et al., 1998). Une coordination entre le métabolisme de l'ADN et le cycle cellulaire, sous l'action de protéines effectrices, est indispensable (Daboussi et al., 2002). Deux mécanismes de réparation, plus ou moins efficaces selon le type cellulaire et la position dans le cycle, entrent en jeu : la recombinaison homologue (HR pour « Homologous Recombinaison »), et la jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ pour « Non-Homologous End-Joining »). Le processus HR fait intervenir le chromosome homologue pour reconstruire le double brin d'ADN lésé à l'identique. La réparation est qualifiée de « fidèle » car elle n'engendre pas d'erreur de réparation. Le processus NHEJ reforme les liaisons chimiques cassées entre les bases. Ce mécanisme de réparation, qualifié d'« infidèle », ne restaure pas la séquence initiale de l'ADN et entraîne une perte de l'information génétique. Les lésions à l'intérieur d'un site à dommages multiples sont les plus difficiles à réparer (Ward, 1988 ; Brenner et Ward, 1992).

Dans les cas où une réparation intégrale des lésions est possible, le génome conserve son intégrité et la cellule poursuit son cycle cellulaire. A l'échelle moléculaire et cellulaire, la réparation est un processus continu. En conséquence, la même dose totale est beaucoup moins délétère si elle est absorbée au cours d'une exposition chronique ou de multiples expositions à faible niveau plutôt qu'au cours d'une unique exposition massive. Toutefois, elle augmente les chances d'une accumulation de lésions moléculaires et cellulaires non-létales.

Si la réparation de l'ADN est partielle et si les lésions résiduelles ne sont pas létales, les modifications génétiques, ou mutations, sont conservées, peuvent s'additionner et être transmises à la descendance lorsqu'elles touchent la lignée germinale. Leur accumulation en trop grand nombre dans le génome conduit à terme, à l'instabilité génétique et une perte de diversité biologique dans les populations (Thompson et Schild, 2002 ; Bertrand et al., 2009). Les mutations, quand elles n'entraînent pas la mort des cellules de la lignée somatique, peuvent induire le développement de tumeurs cancéreuses. Ces mutations, fréquentes lors d'une irradiation à faible dose, ont des conséquences aléatoires, tardives et dépendantes de la nature des gènes touchés (effets stochastiques).

2.2.4. Génotoxicité dans un contexte multigénération

A notre connaissance, au début du doctorat de Delphine Plaire en 2010, les effets génotoxiques induits par l'uranium n'ont jamais été examinés dans un contexte multigénérationnel. Ceux des rayonnements gamma l'ont été beaucoup plus, en radiobiologie. Les travaux sur la souris et le rat permettent d'éclaircir le rôle clé joué par les

mécanismes moléculaires et cellulaires dans les effets transgénérationnels radio-induits (Morgan, 2003a, 2003b ; Dauer et al., 2010). De nombreuses études épidémiologiques mettent en évidence qu'une irradiation parentale induisait des effets sur les générations de descendants, même lorsque ces dernières ne sont pas exposées (Green, 1964 ; Dubrova et al., 2000 ; Barber et al., 2002 ; Barber et Dubrova, 2006 ; Barber et al., 2006).

Les effets génotoxiques transgénérationnels des rayonnements ionisants à faibles doses sont abordés chez de nombreuses espèces. Chez le campagnol *Clethrionomys glareolus* vivant dans la zone d'exclusion de Tchernobyl, un niveau élevé d'anomalies chromosomiques continue d'être observé dans la descendance non exposée de femelles capturées gravides (Ryabokon et Goncharova, 2006). Chez les organismes aquatiques par exemple, la génotoxicité transgénérationnelle suite à une irradiation gamma externe comprend des cassures double brin de l'ADN chez le poisson medaka *Oryzias latipes*, des aberrations chromosomiques chez le polychète marin *Neanthes arenaceodentata*, de l'apoptose dans les ovocytes de l'artémie *Artemia salina* et du stress oxydatif chez les nouveaux nés de saumon pacifique *Oncorhynchus tshawytscha* (Iwasaki, 1973 ; Harrison et al., 1983 ; Dowling et al., 2005 ; Tsyusko et al., 2007 ; Grygoryev et al., 2013). Ces résultats contredisent l'hypothèse que les altérations génétiques radio-induites pourraient se dissiper dès que la dose absorbée décroît. Les différentes études démontrent, au contraire, que l'irradiation parentale peut conduire à l'accumulation d'altérations génétiques et à leur transmission aux générations suivantes.

Les études de la génotoxicité des rayonnements ionisants chez les rongeurs et les poissons mettent en évidence l'apparition d'une instabilité génomique dans la descendance non exposée. Celle-ci se caractérise par l'augmentation de la fréquence des mutations et de diverses autres aberrations chromosomiques sur plusieurs générations (Reisz, et al., 2014 ; Kubota et al., 1995 ; Luke et al., 1997 ; Dubrova et al., 1993 ; Shimada et Shima, 2004). Chez le medaka *Oryzias latipes* par exemple, le taux de mutation dans l'ADN microsatellite de la progéniture issue de parents exposés s'avère plus élevé que chez les parents témoins et plus fort qu'attendu d'un mécanisme d'endommagement direct, ce qui suggère que des mécanismes indirectes, distincts dans le temps, interviennent dans l'induction de mutations.

2.2.5. Modifications épigénétiques

Tandis que les altérations induites par les rayonnements ionisants de la séquence d'ADN (les lésions génétiques *sensu stricto*) sont décrites de façon assez approfondie, le constat que l'hérédité de l'instabilité génomique ne suit pas le schéma classique de la génétique mendélienne suggère l'implication possible d'autres altérations moléculaires rassemblées sous le terme d'« épigénétique ». Les processus épigénétiques, sujet extrêmement novateur en génétique moléculaire comme en écologie et écotoxicologie, concernent toutes les altérations héréditaires, transmises aux cellules somatiques ou germinales, qui interviennent sans modification de la séquence d'ADN. Un volume important de recherche montre que des changements épigénétiques (méthylation de l'ADN, modification des histones, ARN non codants) sont induits par divers stress environnementaux (Russo et al., 1996 ; Daxinger et Whitelaw, 2010).

La méthylation de l'ADN est le premier processus épigénétique découvert et reste le plus étudié aujourd'hui. Chez diverses espèces, l'état de méthylation des cytosines immédiatement suivies d'une guanine (une situation qualifiée de « site CpG ») intervient comme mécanisme épigénétique régulant l'expression des gènes au cours du développement et de la vie entière chez diverses espèces (Kovalchuk et al., 2004a, 2004b ; Zemach et al., 2010 ; Smith et Meissner, 2013 ; Li et al., 1993). Chez l'homme, il est reconnu qu'une méthylation aberrante est en cause dans une grande variété de maladies, dont certains cancers (Putiri et Robertson, 2011). Quelques études se penchent sur les modifications épigénétiques dans différents groupes taxonomiques suite à l'exposition à divers polluants (Vandegheuchte et Janssen, 2014). Des modifications de la méthylation de l'ADN sont mises en évidence, en lien avec l'apparition de tumeurs chez un poisson exposé à un contaminant cancérigène (Mirbahai et al., 2011). Des grenouilles développent des perturbations tardives du système hormonal après l'exposition aux perturbateurs endocriniens durant le stade embryonnaire (Andres et al., 1984). Des modifications de la méthylation sont également observées chez le crustacé *D. magna*, suite à l'exposition à une nourriture de faible qualité, au chlorure de sodium et à des signaux chimiques d'un prédateur (Asselman et al., 2015).

L'étude de la méthylation de l'ADN revêt un intérêt tout particulier en écotoxicologie nucléaire. En effet, les rayonnements ionisants sont reconnus pour affecter la méthylation de l'ADN dans les populations de grenouilles et les pins sylvestres prélevés dans les zones contaminées de Tchernobyl et Fukushima (Kovalchuk et al., 2003, 2004a, 2004b ; Gombeau, 2015). Les études montrent une hypométhylation globale de l'ADN chez les deux espèces. L'effet des radiations ionisantes sur la méthylation de l'ADN est confirmé expérimentalement chez la souris et le rat, lors de tests *in vivo* et sur cultures cellulaires. Les réponses diffèrent toutefois en fonction des tissus et du type d'exposition, aigu ou chronique (Tawa et al., 1998 ; Pogribny et al., 2004 ; Kovalchuk et al., 2004a, 2004b ; Koturbash et al., 2006 ; Youngson et Whitelaw, 2008).

2.2.6. Mémoire épigénétique transgénérationnelle

La question de savoir si des changements épigénétiques peuvent être transmis via la lignée germinale et induire des effets négatifs ou des réponses évolutives dans les générations ultérieures, malgré l'absence d'exposition, suscite un intérêt croissant depuis deux décennies dans les domaines de la biologie évolutive et de l'écotoxicologie (Jablonka et Raz, 2009 ; Vandegheuchte et Janssen, 2014 ; Youngson et Whitelaw, 2008 ; Daxinger et al., 2010). Certains auteurs suggèrent, chez plusieurs espèces, que l'instabilité génomique observée dans la descendance de parents irradiés soit liée à la transmission de modifications épigénétiques (Dubrova et al., 1993, 2000 ; Kubota et al., 1995 ; Luke et al., 1997 ; Shimada et Shima, 2004 ; Barber et al., 2006). Il n'existe, toutefois, aucune étude démontrant de façon indéniable l'hérédité épigénétique transgénérationnelle. Celle-ci requerrait de mettre en évidence la persistance des modifications épigénétiques dans des générations jamais exposées aux facteurs environnementaux qui les ont induites (Skinner, 2011).

Chez le rat, l'exposition *in utero* à différentes substances toxiques (dioxines, bisphénol A... etc.) entraîne des modifications épigénétiques transgénérationnelles dans la lignée

germinale (Manikkam et al., 2012a, 2012b, 2013). Des modifications de la méthylation de l'ADN ne sont transmissibles d'un parent exposé à sa descendance que dans les groupes taxonomiques chez lesquels aucune reprogrammation n'est observée durant l'embryogénèse – chez le poisson-zèbre et la grenouille par exemple (Macleod et al., 1999 ; Stancheva et Meehan, 2000). L'hérédité semble moins probable dans le cas des mammifères, chez lesquels cette reprogrammation intervient juste après la fécondation. Pourtant, l'étude d'Anway et al. (2005) montre chez le rat, que l'exposition d'embryons au vinclozoline (un perturbateur endocrinien utilisé comme pesticide) cause, dans la lignée germinale des trois générations suivantes, une modification du profil de méthylation de l'ADN accompagnée d'une diminution de la fertilité. Cette étude reste très controversée dans la mesure où aucun autre laboratoire n'a réussi à confirmer ce résultat (Vandegheuchte et Janssen, 2014). Les modifications induites par différentes substances (vinclozoline, 5-azacytidine et génistéine), connues pour affecter la méthylation de l'ADN chez les mammifères, sont étudiée chez *D. magna* (Vandegheuchte et al., 2010a). Une modification du taux de méthylation est rapportée dans les générations exposées au vinclozoline et à la 5-azacytidine. Si la modification est également observée dans la descendance dans le cas de la 5-azacytidine, rien ne prouve qu'elle ne résulte pas de l'exposition directe des cellules germinales.

2.3. TOXICITE A L'ECHELLE CELLULAIRE ET TISSULAIRE

2.3.1. Stress oxydatif

Rayonnements ionisants

Le fort pouvoir oxydatif des ROS produits par l'irradiation provoque un stress oxydant quasi instantané dans les cellules exposées. Ce stress oxydatif engendre une dégradation des structures cellulaires, notamment des membranes des organelles (noyau, mitochondries etc.) et de la cellule elle-même, qui peut causer une rupture de la régulation osmotique, et de l'équilibre ionique, l'induction d'un vieillissement cellulaire et d'une mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Sazykina et al., 2003). Les cellules possèdent toutefois une batterie de mécanismes de défenses, appelés antioxydants (enzymes telles que la catalase et la peroxydase, molécules exogènes ou endogènes telles que les vitamines C et E, etc.), pour pallier les déséquilibres entre oxydants et antioxydants (Ames et al., 1993).

Uranium

Les réponses de plusieurs marqueurs du stress oxydatif sont observées après exposition chronique à l'uranium. Les études *in vivo* chez le poisson *D. rerio* mettent en évidence une diminution significative de la quantité de superoxyde dismutase dans le foie après exposition à l'uranium appauvri et de l'activité de la catalase après exposition à un mélange uranium appauvri – uranium 233 (Barillet et al., 2007). Les études *in vitro* montrent chez le poisson *D. rerio*, le bivalve *Corbicula* sp. et le ver oligochète *Eisenia fetida* que l'exposition à l'uranium induit un changement du taux de malondialdéhyde (MDA) (Labrot et al., 1996).

2.3.2. Mortalité cellulaire

La mort cellulaire peut être induite lors de l'apparition d'une mutation létale. Si la cellule est encore fonctionnelle, elle peut provoquer sa propre élimination, par apoptose, mort cellulaire programmée qui intervient après la division cellulaire. Quand leur nombre est trop important, les lésions ne sont pas réparées et sont également létales pour les cellules. Les effets observés sont une mortalité cellulaire et tissulaire à court terme. Cet effet, déterministe, est observé lorsque la dose reçue est très forte.

2.3.3. Toxicité tissulaire

Les cellules ne présentent pas toutes la même sensibilité aux rayonnements ionisants. De façon générale, les cellules indifférenciées en division mitotique active sont plus radiosensibles que les cellules différenciées (Environment Canada, 2003 ; Delistraty, 2008). Le constat s'étant aux tissus jeunes en croissance rapide et est connu comme la loi de Bergonie et Tribondeau, postulée dès le début du XX^e siècle (Bergonie et Tribondeau, 1906). Ainsi, les fibres musculaires et les neurones (qui sont des cellules très spécialisées) présentent une radiosensibilité bien moindre que les cellules souches germinales, dermiques ou gastro-intestinales (toutes des cellules indifférenciées). De même, les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, à l'origine des cellules sanguines, et les cellules souches du cristallin comptent parmi les plus radiosensibles (ICRP, 2008). La conséquence directe de la plus grande radiosensibilité de certains types cellulaires est que les systèmes reproductif, digestif, immunitaire auxquels ils appartiennent sont, eux aussi, plus radiosensibles. Chez les végétaux, les méristèmes, tissus spécialisés dans la croissance des tiges et des racines et composés de cellules indifférenciées en division, sont aussi plus sensibles (Zelena et al., 2005 ; Yoschenko et al., 2011 ; Watanabe et al., 2015).

Chez le poisson zèbre *D. rerio*, la toxicité de l'uranium se traduit par des atteintes neurologiques et histologiques et une perturbation du système olfactif aux concentrations de 20 et 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Barillet, 2007 ; Lerebours, 2009 ; Lerebours et al., 2010).

2.3.4. Réversibilité des réponses

Les mécanismes de compensation et de réparation mis en place par les cellules permettent à certains organismes de récupérer si les effets toxiques induits par l'exposition – aigüe ou chronique – aux rayonnements ionisants restent peu sévères. Chez les oiseaux par exemple, des pathologies hématologiques réversibles sont observées après une irradiation gamma aigüe (une ou deux doses de 2,1 Gy) chez la poule *Gallus gallus domesticus* (Malhotra et al., 1990). Des poussins montrent, dans les 60 jours, une capacité à récupérer suite au déclin rapide de la numération des érythrocytes et leucocytes et du taux d'hémoglobine et d'hématocrite. L'absence de récupération à la dose de (6,6 Gy) est marquée par l'apparition d'effets macroscopiques sévères et d'une mortalité dans les 7 jours.

2.4. TOXICITE A L'ECHELLE DE L'ORGANISME

Les effets délétères commencent à se manifester au niveau macroscopique dès que les mécanismes de compensation et de réparation observés aux échelles moléculaire et cellulaire ne sont plus capables de faire face au dommage causé par l'exposition aux rayonnements ionisants.

Dans la littérature, la grande majorité des études des effets des rayonnements ionisants concerne des tests d'exposition aiguë à forte dose, lors desquels les organismes sont affectés en peu de temps pour une dose absorbée dépassant souvent 1 Gy. Ces travaux sont principalement basés sur une irradiation gamma externe (Cs-137 ou Co-60 par exemple) plus facile en pratique à mettre en œuvre et visent à déterminer la dose létale entraînant 50% de mortalité (LD_{50}) chez les espèces étudiées (Rose, 1991). De la même manière, la majorité des connaissances sur l'écotoxicité de l'uranium concerne la valeur de la LC_{50} (concentration létale induisant 50% de mortalité) mesurée lors de tests d'exposition aiguë.

2.4.1. Toxicité aiguë

Dose létale en irradiation gamma

La dose létale est la méthode la plus simple pour classer les différents groupes taxonomiques en fonction de leur radiosensibilité (Figure 3) – une faible valeur de LD_{50} indiquant une forte radiosensibilité. La sensibilité des principaux groupes taxonomiques étudiés à l'égard du rayonnement gamma externe s'échelonne sur quatre ordres de grandeur. Les mammifères sont réputés être les organismes les plus radiosensibles des espèces animales, suivis par les oiseaux, les poissons, les reptiles, les crustacés et les insectes. La radiosensibilité des plantes chevauche, quant à elle, une grande partie des groupes taxonomiques. La radiosensibilité varie fortement selon le stade de vie étudié, aussi bien chez les plantes que chez les animaux. La LD_{50} des graines de pin en dormance) varie de 5 à

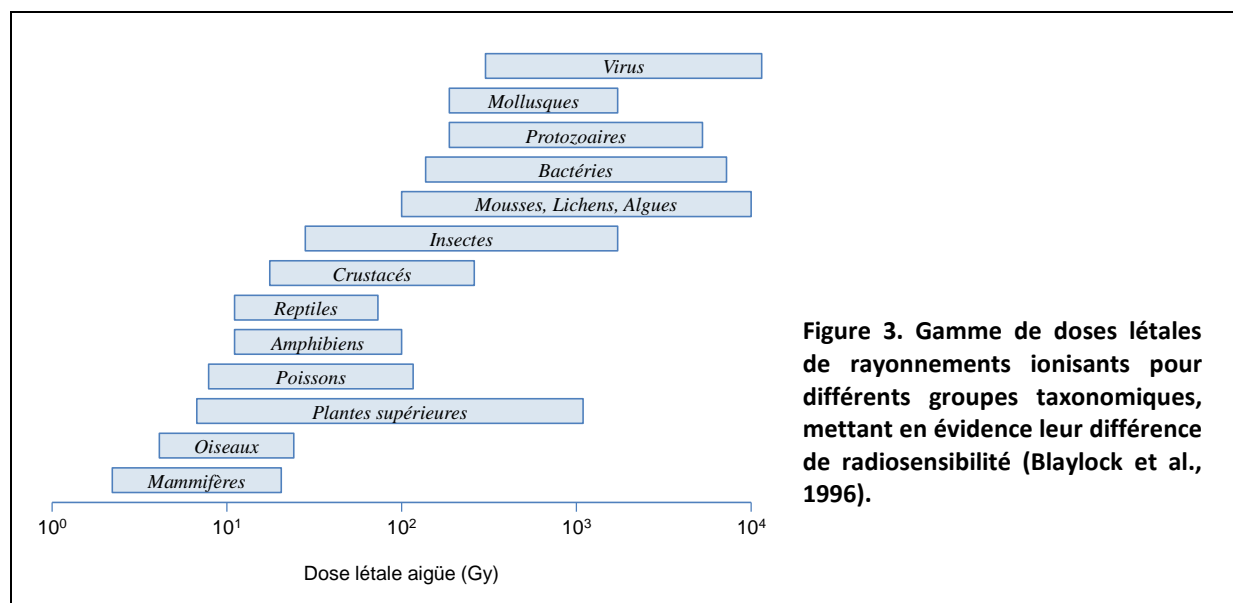


Figure 3. Gamme de doses létales de rayonnements ionisants pour différents groupes taxonomiques, mettant en évidence leur différence de radiosensibilité (Blaylock et al., 1996).

63 Gy, alors que celle du pin en phase de développement varie de 3,5 à 4 Gy (UNSCEAR, 2000b). Chez la souris, l'adulte présente une LD_{50} de 6,4 Gy, alors que celle de l'embryon est inférieure à 1 Gy (Copplestone et al., 2001). Une valeur de LD_{50} de 1 à 2 Gy est estimée chez les embryons de drosophiles ou de guêpes, alors que celle des adultes varie de 20-3000 Gy (Woodhead, 1998). Il existerait donc, au sein des différentes espèces, des stades de vie particulièrement sensibles aux rayonnements ionisants. Tenir compte de la sensibilité de tous les stades composant le cycle de vie des espèces lors d'expositions chroniques paraît donc nécessaire afin de conduire une meilleure évaluation du risque écologique.

Concentration létale de l'uranium

La sensibilité des organismes aquatiques à l'uranium, mesurée au travers de la LC_{50} , varie avec certains facteurs physico-chimiques de l'eau qui conditionnent la biodisponibilité de l'ion libre (Tableau 5). Diverses études montrent ainsi que la toxicité pour les poissons et les cladocères diminue lorsque l'alcalinité et la dureté du milieu augmentent (Poston et al., 1984 ; Barata et al., 1998 ; Zeman et al., 2008). Les données de la littérature montrent que les valeurs

Tableau 5. Toxicité aiguë de l'uranium chez différentes espèces aquatiques (LC_{50} mesurée à 48h chez les cladocères et 96h chez les bivalves et les poissons) en fonction des facteurs physico-chimiques de l'eau.

Espèce (âge)	LC_{50} (mg L ⁻¹)	Dureté (mg L ⁻¹)	Alcalinité (mg L ⁻¹)	Référence
Poissons				
<i>Melanotaenia nigrans</i> (7 j)	1,7		3,26	Bywater et al., 1991
<i>Melanotaenia nigrans</i> (90 j)	1,9		3,26	
<i>Mogurnda mogurnda</i> (7 j)	1,11		3,26	
<i>Mogurnda mogurnda</i> (90 j)	1,46		3,26	
<i>Ptycholcheilus lucius</i>	46	197	107	Hamilton, 1995
<i>Xyrauchen texanus</i>				
<i>Gila elegans</i>				
<i>Danio rerio</i>	3,02			Ribera et al., 1996
<i>Danio rerio</i>	3,05	178		Labrot et al., 1999
Bivalves				
<i>Corbicula fluminea</i>	1872	178		Labrot et al., 1999
Cladocères				
<i>Daphnia magna</i>	4,12 – 8,36	90,7	62,1	Barata et al., 1998
	6,9 – 15,5			
	10,3 – 25,5	179	126	
	15,9 – 27,3			
<i>Daphnia magna</i>	0,39	250	2,7	Zeman et al., 2008
	7,8	250	34	
<i>Daphnia magna</i>	5,34 – 7,62	66 – 73	54 – 60	Poston et al., 1984
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	10,5	176	126	Kuhne et al., 2002
<i>Moinodaphnia macleayi</i>	0,09 – 0,39			Semaan et al., 2001

de LC_{50} , varient entre les espèces et entre les stades de vie au sein d'une même espèce, le stade larvaire étant réputé plus sensible (Bywater et al., 1991 ; Pickett et al., 1993 ; Sheppard et al., 2005).

2.4.2. Toxicité chronique

À ce jour, un nombre plus restreint d'études s'intéresse aux effets à long terme d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants ou à l'uranium, bien que ce type d'exposition soit plus représentatif de la situation dans laquelle les êtres vivants sont réellement exposés dans les sites contaminés. La grande majorité des études se concentre là encore sur les effets d'une irradiation gamma externe, les données concernant les effets des rayonnements alpha et bêta interne restant beaucoup plus rares. Les principaux critères d'effets biologiques étudiés sont la morbidité, la reproduction, et dans une moindre mesure, la survie et le taux de mutation (Real et al., 2004 ; Copplestone et al., 2008). La survie, la morbidité et la reproduction jouent un rôle crucial dans le maintien et la dynamique des populations et sont donc particulièrement pertinents à l'évaluation du risque écologique (Woodhead, 2003).

Effets chroniques des rayonnements ionisants

La reproduction, processus critique de la dynamique de population, assure *in fine* le maintien et la pérennité des écosystèmes (Stearns, 1992). Le succès reproducteur des organismes est défini par leur fécondité (nombre de descendants produits) et leur fertilité (capacité à produire des descendants viables). Les nombreuses études sur les effets chroniques des rayonnements ionisants permettent d'identifier la reproduction comme l'un des processus biologiques les plus radiosensibles, et ce quelle que soit l'espèce, animale ou végétale, considérée. Chez le pin et certaines espèces herbacées par exemple, une réduction de la production de graines et du pourcentage de germination est observée lors d'expositions chroniques à des rayonnements gamma externes à des doses comprises entre 0,01 et 10 Gy (UNSCEAR, 1996 ; Whicker, 1997 ; Kal'chenko et Fedotov, 2001 ; Minouflet et al., 2005 ; Geras'kin et al., 2008, 2013). Chez les organismes aquatiques, une réduction de la masse des gonades, du taux d'éclosion, de la fécondité (nombre d'œufs ou de larves) est rapportée chez les poissons (médaka, guppy etc.) et les polychètes exposées sur une gamme de débits de dose comprenant des valeurs environnementales ($2,4 \mu\text{Gy h}^{-1}$ à $2,5 \text{ Gy h}^{-1}$) aux rayonnements gamma ou bêta (Cooley et Miller, 1971 ; Ichikawa et Suyama, 1974 ; Hyodo-Taguchi et Etoh, 1986 ; Knowles et Greenwood, 1994, 1997). Chez les mammifères, une décroissance du nombre de cellules germinales, de la masse des ovaires et des capacités reproductrices sont observées chez le rat *Rattus norvegicus* et le porc *Sus crofa*, à des débits de dose gamma chroniques variant de 0,1 à 1 mGy h^{-1} (Erickson, 1978 ; Erickson et Martin, 1976, 1984).

La morbidité regroupe l'ensemble des perturbations radio-induites causant une diminution de la valeur sélective des organismes (capacité à se reproduire ou à survivre) (Dallas et al., 2012). Ces effets chroniques sont principalement représentés par des perturbations du développement et des réductions de la taille ou de la masse des individus. Chez la brassicacée *Arabidopsis Thaliana* par exemple, une réduction de la taille et de la masse des racines et des

feuilles est identifiée (Vandenhove et al., 2009, 2010 ; Biermans et al., 2015). Un retard de croissance chez la truite arc en ciel *Oncorhynchus mykiss*, une perturbation du développement chez le copépode marin, *Tigriopus japonicus* et une diminution de la masse du cerveau chez le rat *Rattus norvegicus* sont décrits suite à l'exposition chronique aux rayonnements gamma à des débits de dose de $3 \mu\text{Gy h}^{-1}$ et 100 mGy h^{-1} (Real et al., 2004 ; Han et al., 2014a, 2014b ; Oujifard et al., 2015). Des anomalies du développement et une augmentation de la mortalité sont rapportées chez le stade larvaire de la moule marine *Mytilus edulis*, après une contamination chronique à l'eau de mer tritiée (le tritium étant l'isotope radioactif H-3, émetteur beta) (Hagger et al., 2005). L'effet de l'eau tritiée est détecté dès le débit de dose de $2 \mu\text{Gy h}^{-1}$, valeur extrêmement faible à imputer au rôle crucial joué par l'eau au sein des êtres vivants.

Les études des expositions chroniques permettent de détecter des effets biologiques à des débits de dose faibles, inférieurs à $100 \mu\text{Gy h}^{-1}$ chez certains groupes taxonomiques (Erickson et Martin, 1976, 1984 ; Hyodo-Taguchi et Etoh, 1986 ; Hagger et al., 2005). Le mécanisme en cause fait appel à l'accumulation progressive de mutations au cours du temps, conduisant à un effet observable à l'échelle de l'organisme (Morgan, 2003a, 2003b). Chez le poisson zèbre *D. rerio*, une accumulation progressive d'altérations de l'ADN et une réduction de la viabilité des œufs sont détectées lors d'une exposition chronique au rayonnement gamma externe (SNIFFER, 2002).

Effets chroniques de l'uranium

À l'échelle macroscopique, l'uranium présente une toxicité chronique chez diverses espèces aquatiques. Chez les cladocères, la survie et la reproduction de *Moinodaphnia macleayi* sont affectés à des valeurs respectives de LOEC (concentration la plus faible où un effet est observé) entre 20 et $49 \mu\text{g L}^{-1}$ et entre 7 et $49 \mu\text{g L}^{-1}$ (Semaan et al., 2001). Une réduction de la taille est observée entre 0 à 70 mg L^{-1} et dès $25 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivement chez *Ceriodaphnia dubia* et *Daphnia magna* (Kuhne et al., 2002 ; Zeman et al., 2008). Chez *D. magna*, la reproduction est affectée dès $0,52 \text{ mg L}^{-1}$ (Poston et al., 1984). Chez le poisson zèbre *D. rerio*, l'exposition chronique entraîne une altération des tissus gonadiques des mâles et les femelles et une diminution du succès reproducteur à partir de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (Bourrachot, 2009).

2.4.3. Exposition multigénérationnelle

Les études évaluant les effets des rayonnements ionisants à faibles doses sur les organismes vivants pendant plusieurs générations permettent de détecter des effets à long terme. Ces études se rapprochent ainsi un peu plus des situations naturelles. En effet, dans la nature, les populations sont exposées à des contaminants pendant plusieurs semaines, plusieurs mois, voire même plusieurs années, dépassant ainsi la longévité des individus et impliquant plusieurs générations. Malgré leur pertinence écologique, les études multigénérationnelles restent extrêmement rares dans le domaine de la radioprotection environnementale.

Les données disponibles montrent que les effets à l'échelle de l'organisme peuvent différer d'une génération à l'autre. Certaines mettent en évidence une augmentation de la sensibilité des organismes au fil des générations. Chez le polychète marin *Ophryotrocha diadema* exposé au rayonnement gamma externe (Cs-137) à faible dose (de 1,7 à 13,7 mGy h⁻¹) sur 7 générations successives, une atteinte progressive de la reproduction est mise en évidence (Knowles et Greenwood, 1994). Seul le nombre d'œufs produits montre un déclin au plus fort débit de dose dans la première génération, alors que tous les paramètres de reproduction (nombre d'œufs, taux d'éclosion et survie etc.) sont affectés dès la plus faible dose testée dans les générations suivantes. Une diminution du succès reproducteur au fil des générations est également mise en évidence chez le polychète marin *Neanthes arenaceodentata* exposé à l'irradiation gamma externe (Co-60), quel que soit le débit de dose testé (de 0,19 à 17 mGy h⁻¹) (Harrison et Anderson, 1994). Très récemment, une augmentation de l'apoptose et une diminution du nombre de spermatozoïdes et du nombre de cellules mitotiques expliqueraient la réduction de la reproduction observée chez le nématode *Caenorhabditis elegans* lors d'une exposition au rayonnement gamma externe (Cs-137) sur trois générations (Buisset-Goussen et al., 2014).

2.5. IMPACT SUR LA FAUNE ET LA FLORE DE TCHERNOBYL ET FUKUSHIMA

Faisant l'objet de très nombreux travaux, les effets des rayonnements ionisants observés chez les espèces animales ou végétales peuplant les zones contaminées de Tchernobyl ou Fukushima reflètent plus étroitement les conséquences écologiques réelles des accidents dans les milieux naturels. Hormis dans la phase aigüe durant laquelle l'exposition à des doses massives (jusqu'à 20 Gy j⁻¹) entraîne une mortalité accrue des pins (forêt rousse), des invertébrés et des mammifères, une réduction de la reproduction chez les animaux et les plantes (IRSN, 2016), les résultats sur le long terme sont souvent compliqués à interpréter, du fait des nombreux biais associés aux facteurs confondants, parmi lesquels l'afflux depuis des zones peu contaminées d'organismes moins exposés et l'effet positif de l'abandon des zones d'exclusion par les populations humaines.

Chez les pins survivants de Tchernobyl comme de Fukushima, une morphogénèse anormale est observée suite à la mort du méristème et à la perte de dominance apicale (Zelena et al., 2005 ; Yoschenko et al., 2011 ; Watanabe et al., 2015). Celle-ci touche aussi bien les arbres ayant survécu à la phase aigüe de l'accident (où les doses absorbées entraînent une mortalité importante) que ceux plantés après l'accident, dans des proportions toutefois différentes. Si les capacités reproductives ne semblent pas affectées sur le long terme dans la zone d'exclusion de Tchernobyl, un déclin de la production de fruits semble résulter du déclin des populations d'insectes pollinisateurs (Møller et al., 2012a). A Tchernobyl, un impact est effectivement rapporté sur l'abondance des insectes comme les bourdons, sauterelles, papillons, libellules, ainsi que des araignées (Møller et Mousseau, 2009). Chez les invertébrés du sol, les résultats suggèrent une diversité réduite des communautés même si cet impact reste modéré sur les communautés de nématodes (Jackson et al., 2005 ; Lecomte-Pradines et al., 2014). La progéniture des sauterelles, suite à l'exposition parentale, montre une viabilité et un succès reproducteur moindres, accompagnée d'anomalies de développement (Beasley et al.,

2012). A Fukushima, des anomalies morphologiques sont observées chez les individus du papillon *Zizeeria maha* prélevés dans des sites contaminés. Le suivi écologique des populations suggèrent un retour à la normale dans les deux années qui suivent. Les anomalies morphologiques s'avéraient plus sévères chez les descendants maintenus en condition non contaminée pendant 2 générations (Hiyama et al., 2012, 2015). Une mortalité accrue et des anomalies morphologiques sont également rapportées en 2012 chez les pucerons prélevés proximité du site de Fukushima Dai-chi (Akimoto, 2014). Les communautés d'oiseaux sont suivies sur le long terme à Tchernobyl et Fukushima. Des décroissances de la diversité, de l'abondance et de la densité y sont rapportées, en lien avec l'augmentation du débit de dose ambiant (Møller et Mousseau, 2006, 2009 ; Møller et al., 2012b, 2015). Les auteurs interprètent les résultats à Tchernobyl comme le fruit d'un effet direct sur la survie et la fécondité des oiseaux, d'un comportement d'évitement des habitats les plus contaminés ou d'un effet indirect sur la disponibilité de la nourriture, composée en majeure partie d'invertébrés du sol (Møller et Mousseau, 2007a, 2007b). Les différences de sex-ratio et structure de population observées chez les oiseaux de Tchernobyl suggèrent un impact plus sévère chez les femelles et les stades adultes, que chez les mâles et stades plus jeunes (Møller et al., 2012b). A Tchernobyl, un taux de survie réduit s'accompagne de l'observation de diverses pathologies et anomalies morphologiques (cataracte, tumeur, albinisme partiel, malformations du bec (Møller et al., 2007 ; Mousseau et Møller, 2013). De façon plus générale sur les 48 espèces d'oiseaux recensées, les individus présenteraient une réduction du volume du cerveau de 5% dans les sites marqués par un débit de dose ambiant de $100 \mu\text{Gy h}^{-1}$ par rapport aux sites peu contaminés (Møller et al., 2011). Chez les grands mammifères de Tchernobyl, les études de dénombrement ne permettent pas de conclure quant à l'impact de la contamination sur la densité des populations d'ongulés (élan, cerf, chevreuil, sanglier) et de loups (Møller et Mousseau, 2013 ; Deryabina et al., 2015).

2.6. POUR UNE PROTECTION DES ECOSYSTEMES

Si la radioactivité peut être très utile pour produire de l'énergie, traiter certains cancers ou mieux comprendre l'Univers, son impact biologique reste également pour la société, une source importante de questionnements – voire d'inquiétudes – en termes de risque à l'homme et aux écosystèmes (ICRP, 1991, 2001, 2007).

2.6.1. Protéger l'environnement et plus seulement l'humain

Historiquement, la préoccupation première de la radioprotection est de protéger la santé des populations humaines (public et travailleurs du nucléaire) contre les effets potentiellement néfastes des rayonnements ionisants. Les premières normes, définies par la Commission Internationale de Protection Radiologique (ICRP) dans les années 1970, reposent, de fait, sur le postulat que « si l'homme est protégé de manière adéquate contre les rayonnements ionisants, alors tous les êtres vivants sont également susceptibles d'être suffisamment protégés » (ICRP, 1977). Au cours des décennies suivantes pourtant, les événements et l'absence de méthodes scientifiquement éprouvées conduisent à remettre en cause ce postulat insuffisamment démontré (ICRP, 1991 ; Whicker et Bedford, 1995 ; Pentreath, 1998). Les

autorités internationales reconnaissent alors la nécessité de développer un système de radioprotection propre aux espèces de la faune et de la flore, en supplément des normes de radioprotection déjà établies pour l'Homme. Divers organismes nationaux et internationaux (IAEA, 2006 ; ICRP, 2007) développent des cadres de régulation, des recommandations et principes de sécurité afin de fournir des guides pour l'évaluation de la protection de l'environnement contre les effets des rayonnements ionisants et la définition de critères de protection écologique (ICRP, 2008 ; UNSCEAR, 2008). (Pentreath et al., 2015). Les méthodologies qui en découlent, à l'époque, ne se basent sur aucun concept commun, transparent et uniforme et ne font pas consensus à l'échelle internationale. Les valeurs de radioprotection proposées pour l'environnement peuvent, dès lors, varier de plusieurs ordres de grandeur. Par exemple, l'UNSCEAR (2008) estime que des débits de dose inférieurs à 100 et 400 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ ne présenteraient respectivement pas de danger pour les écosystèmes terrestres et aquatiques. L'ICRP (2008) propose des *DCRL* (pour « *Derived consideration reference levels* »), des valeurs pour la protection des espèces animales, de 400 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ chez les invertébrés, 40 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ chez les poissons et 4 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ chez les mammifères.

2.6.2. Une valeur de référence pour la radioprotection des écosystèmes

Dans ce contexte, une abondante recherche est menée au niveau international au cours de la dernière décennie, afin de fournir des critères et des approches méthodologiques cohérents pour la protection de l'environnement contre le risque associé aux rayonnements ionisants. Dans le cadre des programmes européens FASSET, ERICA et PROTECT (Williams, 2004 ; Larsson, 2008 ; Howard et al., 2010 ; Hinton et Février, 2011) notamment, les scientifiques s'accordent sur l'utilisation d'une approche d'évaluation du risque écologique similaire à celle adoptée pour les substances chimiques (EC, 2003, 2011). L'évaluation du risque, d'une manière générale, vise à estimer la probabilité et la magnitude des effets adverses affectant la faune et la flore à différentes échelles d'organisation biologique (individus, populations, communautés, écosystèmes) pour de nombreuses espèces représentatives des biota naturels. L'application de l'approche au cas des rayonnements ionisants implique la mise à jour d'une base de données, FREDERICA, qui compile les données primaires de la littérature concernant les effets des rayonnements ionisants sur la mortalité, la reproduction, les mutations et la morbidité acquis lors de tests de radiotoxicité en conditions contrôlés au sein de seize groupes taxonomiques (Coppstone et al., 2008). Une méta-analyse des données disponibles pour les expositions chroniques aboutit à l'estimation de valeurs d'*EDR₁₀* (« effective dose rate »), débits de dose effectifs induisant 10% d'effet – équivalents des *EC₁₀* pour les contaminants chimiques – sur les différents critères testés chez chaque espèce. La construction d'une SSD (« species sensitivity distribution »), distribution de sensibilité des espèces cumulant avec l'accroissement du débit de dose le nombre d'espèces affectées (sur la base de l'*EDR₁₀* la plus faible pour chaque espèce), permet de dériver une valeur générique de *PNEDR* (« Predicted No Effect Dose Rate ») de 10 $\mu\text{Gy h}^{-1}$, débit de dose en dessous duquel, en addition au bruit de fond naturel, l'ensemble des écosystèmes terrestres ou aquatiques est théoriquement protégé (Garnier-Laplace et al., 2010). Cette valeur de référence pour la radioprotection fait aujourd'hui consensus au niveau international.

2.6.3. Incertitudes

Il faut toutefois rappeler que la méthode utilisée par les scientifiques et les régulateurs pour l'évaluation du risque écologique associé aux contaminants chimiques fait régulièrement l'objet de réserves, en particulier concernant son manque de pertinence environnementale et écologique (Belanger et al., 2017). Certains auteurs signalent notamment que l'estimation d'une valeur de protection générique à tous les types d'organismes est susceptible de poser certains problèmes dans la mesure où l'espèce la plus radiosensible n'est pas nécessairement la plus exposée au risque (Beresford et al., 2009). Il n'en demeure pas moins que l'application de l'approche SSD au cas des rayonnements ionisants représente un progrès méthodologique certain, là où n'existait au préalable aucune approche reconnue. La SSD n'a pas vocation à décrire le degré d'impact des processus en jeu au niveau des écosystèmes mais seulement de dresser une synthèse des connaissances disponibles sur la toxicité d'un contaminant, en classant les espèces testées par ordre de sensibilité, au travers de leur trait le plus sensible au niveau de l'organisme. Il est donc important de remarquer que l'évaluation du risque écologique s'opère dans des conditions très éloignées de l'objectif initial de la radioprotection, qui est de veiller à la conservation de la structure et du fonctionnement des écosystèmes dans un contexte réaliste, en assurant la pérennité des populations de la majorité des espèces (avec une attention spéciale portée aux espèces clés, rares, protégées ou présentant une importance culturelle particulière (Williams, 2004 ; Larsson, 2008 ; Andersson et al., 2009 ; Bradshaw et al., 2014). L'essentiel de l'évaluation du risque écologique repose, dès lors, sur une extrapolation des connaissances sur la toxicité chimique ou radiologique des substances du laboratoire au milieu naturel. Afin de prendre en compte les nombreuses hypothèses et sources d'incertitude associées à cette extrapolation et d'incorporer un niveau de prudence adéquate à l'évaluation du risque écologique, les régulateurs recommandent de diviser les valeurs de *PNEC* ou de *PNEDR* issues des données de laboratoire par un facteur de sécurité plus ou moins élevé. Dans les recommandations de la Communauté Européenne (EC, 2011) par exemple, la valeur peut varier de 1 à 10000 selon la quantité et la qualité des données de toxicité disponibles (tests aigus ou chroniques, nombre d'espèces testées, nombre de niveaux trophiques représentés, etc.). Elle est fixée à 2 lors du calcul de la *PNEDR* générique de $10 \mu\text{Gy h}^{-1}$ lors du programme européen ERICA (Garnier-Laplace et al., 2010). Cependant, plusieurs études montrent que l'emploi de facteurs de sécurité peut conduire aussi bien à une sous-estimation qu'à une surestimation du risque écologique (Forbes et al., 2001).

2.6.4. Comparaison à la situation naturelle

Malgré les nombreux effets mis en évidence à Tchernobyl et Fukushima, le lien qui les unit au débit de dose s'avère toutefois difficile à établir sur le terrain et les conclusions sont souvent contradictoires d'une étude à l'autre. Ainsi, si l'effet sur la croissance des pins de Tchernobyl augmente de façon nette avec la dose ambiante, celui sur l'abondance des araignées dans les zones les plus contaminées de Fukushima semble être positif (Møller et al., 2013). Chez les invertébrés terrestres, la corrélation entre dose ambiante et abondance observée varie entre les études, et peut être absent, s'avérer positive, négative, ou dépendre des taxons (Møller et al., 2013 ; Bezrukov et al., 2015 ; Fuller et al., 2018). Quand il est

avérer, l'effet peut être décrit pour des doses externes différant d'un ordre de grandeur entre les études (Jackson et al., 2005 ; Møller et Mousseau, 2009).

Les observations sur le terrain sont donc difficiles à rapprocher de la connaissance de la radiotoxicité dérivée des tests expérimentaux. Les résultats d'une synthèse des effets chez les espèces de la zone d'exclusion de Tchernobyl, basée sur une approche SSD identique à celle utilisée pour dériver la valeur de référence pour la radioprotection des écosystèmes, mettent en lumière une plus grande radiosensibilité des organismes sur le terrain, avec une valeur de *PNEDR* différant d'environ un ordre de grandeur entre laboratoire et milieu naturel (Garnier-Laplace et al., 2013). La plupart des études menées sur le terrain souffre toutefois d'une estimation dosimétrique incomplète, limitée le plus souvent au débit de dose ambiant. En nourrissant, au laboratoire, des larves de papillons *Z. maha* issues d'une zone non contaminée de Fukushima avec des feuilles cueillies en zone contaminée, Nohara et al. (2014) parviennent à reproduire l'augmentation du taux de mortalité et d'anomalies morphologiques. Leur résultat souligne l'importance, dans les sites contaminés, de prendre en compte la dose interne dans la caractérisation de la relation dose-réponse pour ne pas sous-estimer la dose totale réellement absorbée. Finalement, une analyse statistique récente des données écologiques décrivant la communauté des oiseaux, acquises sur la période 2011-2014 dans un rayon de 50 km autour de la centrale de Fukushima-Daichi, réconcilie l'estimation des effets des rayonnements ionisants entre terrain et laboratoire. En reconstruisant la dose totale absorbée pour les oiseaux et en prenant en compte les variables confondantes descriptives des conditions environnementales (e.g., température, heure de l'observation, couvert nuageux, type de paysage), les auteurs estiment que l'augmentation de la dose absorbée explique la variation du nombre total d'oiseaux (Garnier-Laplace et al., 2015).

2.6.5. Efficacité biologique des différents types de rayonnements ionisants

La question des différences d'efficacité biologique entre types de rayonnements ionisants (dus aux différences d'interaction avec la matière) est cruciale pour une évaluation correcte du risque écologique. En effet, la diversité des radionucléides présents dans l'environnement, auxquels les populations naturelles sont exposées, comprend des émetteurs de différents types de rayonnements (alpha, bêta et gamma). Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont tenté d'appliquer au cas des espèces non-humaines, l'Efficacité Biologique Relative (*EBR*), concept emprunté à la radiobiologie. Les estimations pour le rayonnement alpha mettent en évidence une incertitude considérable, avec des valeurs d'*EBR* allant de 1 à 377. Cette gamme reflète toute la difficulté de l'exercice, les valeurs dépendant de nombreux facteurs, allant de l'espèce biologique étudiée à l'ensemble des conditions expérimentales (dont le débit de dose, le temps d'exposition etc.). (SNIFFER, 2002 ; FASSET, 2003 ; Hofmann et al., 2004 ; Chambers et al., 2006 ; UNSCEAR, 2008 ; Priest et Hoel, 2010 ; Franken et al., 2012 ; Mothersill et al., 2013). Par conséquent, déterminer une valeur d'*EBR* robuste relève, en pratique, du défi. Les études publiées sont émaillées de nombreuses approximations dans l'estimation de la dose absorbée par les organismes (voire même parfois, d'une absence d'estimation), surtout dans le cas des faibles débits de dose et des émetteurs internes (Salomaa et al., 2013). On pressent, dans ce contexte, que le recours à la modélisation

mécanisme permettrait de pallier certains des problèmes soulevés, en permettant, par exemple, d'estimer plus précisément les débits de dose absorbés par les organismes, malgré le contraste entre les voies d'exposition en jeu, et d'extrapoler les effets biologiques à des scénarios mieux comparables entre types de rayonnements.

Troisième partie

Travaux de recherche

Chapitre 1

Introduction

Sommaire

1.1. Contexte et enjeux	83
1.2. Axes de recherche	84
1.2.1. Tests d'exposition multigénérationnelle	84
1.2.2. Approche intégrative multi-échelle	84
1.2.3. Modélisation du budget énergétique dynamique	85
1.2.4. Conséquences pour la dynamique de population	85

1.1. CONTEXTE ET ENJEUX

La question de savoir si les faibles débits de dose présentent un danger à long terme pour l'environnement s'inscrit comme l'un des objectifs principaux de l'IRSN depuis de nombreuses années. Aujourd'hui encore, l'ampleur des risques à faibles doses reste controversée en raison du manque de preuves scientifiques, que ce soit dans le domaine de la radioprotection humaine que dans le domaine environnemental (Bréchignac et Paquet, 2013 ; Morgan et Bair, 2013 ; Mothersill et Seymour, 2013).

Même si un nombre croissant d'études mettent en évidence les atteintes des radionucléides aux échelons moléculaire, cellulaire, tissulaire et macroscopique, rares sont celles qui abordent plus d'un niveau d'organisation biologique à la fois. Pourtant, une approche multi-échelle est la clé pour comprendre comment les contaminants toxiques en général, et les substances radioactives en particulier, affectent les espèces naturelles aux différents niveaux d'organisation biologique. Etablir les liens mécanistes qui unissent les différentes perturbations observées, enjeu majeur en écotoxicologie comme en radioécologie, est indispensable pour prédire les conséquences sur la survie, la croissance et la reproduction des organismes, processus critiques pour la dynamique de population, et la réponse aux échelles écologiquement pertinentes (Forbes et Calow, 1999 ; Stark et al., 2004).

Dans ce contexte, mes travaux de recherche en radioprotection de l'environnement au fil de la décennie passée comme chercheur IRSN en écotoxicologie des radionucléides au SECRE, au SERIS puis au SRTE, se fondent sur le constat, dès 2004, que notre connaissance de la radiotoxicité correspond à une situation très éloignée de la réalité des milieux naturels :

→ Les données expérimentales disponibles (Real et al., 2004) découlent exclusivement de tests d'irradiation externe (rayonnements gamma ou X) alors que la toxicité des autres types de rayonnements (alpha, beta) restent inconnue pour les espèces non-humaines.

→ La grande majorité des effets décrits concerne la mortalité, mesurée suite à une exposition aiguë, alors qu'une exposition chronique à des débits de dose inférieurs à $100 \mu\text{Gy h}^{-1}$ est reconnue comme plus représentative des conditions réelles dans lesquelles les organismes sont exposés sur le terrain (UNSCEAR, 1996).

→ Quand les données de toxicité chronique à moins de 1 mGy h^{-1} existent, elles correspondent à des durées d'exposition équivalentes, dans le meilleur des cas, à un cycle de vie ou à un stade de vie spécifique. Or, pour les populations à protéger dans l'environnement, les temps d'expositions dépassent largement la longévité des individus et peuvent impliquer plusieurs générations.

→ Les réponses biologiques décrites concernent des échelles peu pertinentes du point de vue écologique, les effets toxiques étant mesurés à des niveaux d'organisation biologique qui excèdent rarement celui de l'organisme tandis que leurs conséquences en termes de dynamique de population ne sont jamais réellement abordées.

1.2. AXES DE RECHERCHE

Les différentes études réalisées ou supervisées, en collaboration ou non, visent à promouvoir une évaluation plus robuste du risque lié à la présence de radionucléides dans l'environnement en l'appréhendant à des doses et des temps d'exposition, et à des échelles d'organisation biologique pertinentes sur le plan environnemental (Garnier-Laplace et al., 2011b).

1.2.1. Tests d'exposition multigénérationnelle

Questions :

- Quels sont les effets à long terme des rayonnements alpha, gamma et de l'U appauvri ?
- Comment leur toxicité varie-t-elle au fil des générations ?

Les expérimentations menées en conditions contrôlées sur la daphnie (*D. magna*), microcrustacé d'eau douce mis à profit en tant que organisme modèle, ont pour objectif d'étudier les effets des radionucléides lors d'expositions chroniques sur plusieurs générations successives à l'Am-241, à l'U appauvri et au Cs-137, représentant respectivement une exposition aux rayonnements alpha interne, une contamination par un métal radioactif principalement chimiotoxique et une irradiation gamma externe. Les résultats permettent de comparer la toxicité entre les stressors et d'examiner si l'intensité des effets augmente au fil des générations ou si, au contraire, les mesures effectuées au cours d'une génération unique est représentative de la toxicité sur le long terme.

1.2.2. Approche intégrative multi-échelle

Questions :

- Quels liens unissent les réponses biologiques et physiologiques observées lors des expositions aux radionucléides ?
- Quels sont les mécanismes génétiques et épigénétiques en cause dans la réponse transgénérationnelle ?

Dès le départ, une approche intégrative, basée sur les théories de l'Histoire de Vie et du Budget Énergétique Dynamique (Stearns, 1992 ; Kooijman, 2010), est choisie. En examinant de front un large éventail de traits biologiques et physiologiques sur le cycle de vie entier, l'objectif est d'analyser le lien unissant les différentes réponses à la toxicité, et tout particulièrement celles de la survie, la croissance et la reproduction qui représentent les processus critiques de la dynamique de population et de la sélection naturelle. Les êtres vivants étant limités par leurs caractéristiques intrinsèques et par les contraintes de l'environnement, l'idée est de quantifier chaque perturbation métabolique induite et de comprendre comment la dépense énergétique supplémentaire qu'elle engendre au sein de l'organisme se répercute sur la réalisation des fonctions clés du cycle de vie. Si l'approche s'avère rapidement extrêmement puissante pour identifier les processus métaboliques sous-jacents en cause dans l'apparition des effets biologiques, une limite se fait jour : l'analyse du budget énergétique ne permet pas de comprendre pourquoi la toxicité augmente en intensité

au fil des générations. L'approche expérimentale est donc complétée par une batterie d'analyses moléculaires visant à explorer les processus génétiques et épigénétiques en cause lors des réponses transgénérationnelles.

1.2.3. Modélisation du budget énergétique dynamique

Questions :

- Quels sont les modes d'action métaboliques associés à la toxicité des radionucléides ?
- Les modèles de budget énergétique dynamique peuvent-ils être appliqués au cas de la radiotoxicité ? Quelle(s) métrique(s) explique(nt) le mieux les niveaux de stress estimés ?
- Les modèles de budget énergétique dynamique peuvent-ils mieux expliquer les réponses transgénérationnelles ?

Le volet expérimental des études est accompagné d'une approche de modélisation au niveau de l'organisme. Le modèle mathématique utilisé est le Budget Énergétique Dynamique appliqué à la Toxicologie (DEBtox). Les analyses DEBtox permettent de décrire et d'expliquer les données expérimentales acquises au laboratoire et de produire des prédictions robustes dans tout scénario d'exposition non testé. Développé pour l'analyse des effets de contaminants chimiques, le modèle DEBtox est appliqué pour la première fois au cas d'un radionucléide, l'U appauvri et, très récemment, adapté au cas de la radiotoxicité pour décrire les effets des rayonnements gamma et alpha. Un développement novateur du modèle DEBtox est mis en œuvre pour prendre en considération l'accumulation d'un dommage transmissible d'une génération à la suivante au cours d'une cinétique transgénérationnelle, afin d'expliquer l'accroissement de l'intensité des effets et d'identifier les processus métaboliques qui lui sont associés.

1.2.4. Conséquences pour la dynamique de population

Questions :

- Tous les effets observés au niveau des organismes sont-ils égaux en termes de risque pour la population ?
- Quels sont les risques d'extinction des différentes espèces biologiques exposées aux rayonnements ionisants ?

Les prédictions du modèle DEBtox sont couplées à un modèle de population dits « Matrices de Leslie » (Leslie, 1945 ; Caswell, 2001) afin d'en calculer les conséquences pour la dynamique de population, en termes de croissance de population et de risque d'extinction en fonction du niveau d'exposition. La modélisation de la dynamique de population est également mise en œuvre chez les espèces biologiques pour lesquelles les données d'effets chroniques des rayonnements ionisants permettent une description simplifiée des réponses, de type courbe dose-réponse, mais ne sont pas suffisantes pour paramétrer un modèle DEBtox.

Chapitre 2

Effets multigénérationnels des radionucléides

Sommaire

2.1. Pourquoi <i>Daphnia magna</i> ?	89
2.1.1. Pour la petite histoire	89
2.1.2. Un peu de biologie	90
2.1.3. La daphnie et l'écotoxicologie	92
2.2. Plans expérimentaux	94
2.2.1. Conditions d'exposition	94
2.2.2. Scénarios d'exposition	95
2.2.3. Mesures	98
2.3. Toxicité du rayonnement alpha interne (Am-241)	99
2.3.1. Expositions au rayonnement alpha (Am-241).....	99
2.3.2. Toxicité chronique sur 23 jours.....	100
2.3.3. Toxicité du rayonnement alpha au fil des générations.....	102
2.4. Toxicité chimique de U appauvri	103
2.4.1. Expositions à l'U appauvri.....	103
2.4.2. Toxicité chronique sur 21 jours.....	104
2.4.3. Toxicité de l'U appauvri au fil des générations	105
2.4.4. Une réduction d'assimilation comme mode d'action toxique.....	108
2.4.5. Peut-on dire que la toxicité de l'U augmente au fil des générations ?.....	109
2.5. Toxicité du rayonnement gamma externe (Cs-137)	110
2.5.1. Expositions au rayonnement gamma (Cs-137)	111
2.5.2. Toxicité chronique sur 21 jours.....	113
2.5.3. Toxicité du rayonnement gamma au fil des générations.....	113
2.5.4. Réversibilité des effets après une irradiation gamma parentale.....	115
2.6. Conclusions et perspectives	116

2.1. POURQUOI DAPHNIA MAGNA ?

2.1.1. Pour la petite histoire

En biologie, derrière chaque expérimentation se cache un modèle biologique de prédilection. Le mien se nomme *Daphnia magna*, la daphnie (branchiopode cladocère, microcrustacé d'eau douce). Ce choix repose sur certaines caractéristiques (facilité de l'élevage, faible encombrement au laboratoire, cycle de vie court) qui font des daphnies une espèce idéale pour les tests de toxicité, dès qu'il est question de produire, au cours de plusieurs générations, un nombre important de mesures à toutes les échelles biologiques (moléculaires, macroscopiques, etc.). Pour remettre les choses dans l'ordre, c'est l'adoption de *D. magna* comme modèle d'étude au LRE qui entraîne mon recrutement en contrat post-doctoral en 2004, comme expérimentateur modélisateur en biologie et écophysiologie du zooplancton au sein du programme européen ERICA. Au début, il n'est nullement question d'exposition multigénérationnelle. Les besoins modestes de *D. magna* en terme d'espace (voir encadré) sont vus comme un atout pour comparer les effets chroniques entre un émetteur gamma et un émetteur alpha et répondre, en pratique, à l'un des objectifs du projet tout en

Encadré. La daphnie en chiffres

6
mm

C'est la taille maximale d'une daphnie adulte.

50
mL

C'est le volume de milieu nécessaire pour maintenir une daphnie dans des conditions optimales. Une bouteille d'1 L peut donc contenir 20 daphnies sans que leur nombre ne soit un inconvénient pour elles. Une petite armoire réfrigérée bien organisée peut contenir un millier d'individus dans quelques dizaines de litres.

4
millions

C'est le nombre de cellules de phytoplancton qu'il faut apporter quotidiennement pour nourrir une daphnie à satiété. Cette quantité est fournie par 1 mL de nos cultures d'algues unicellulaires de l'espèce *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophycés).

10
jours

C'est le temps qu'il faut à un œuf fraîchement pondu pour se développer, éclore, grandir et pondre à son tour. Avec un temps de génération aussi court, 2 mois suffisent pour étudier le cycle de vie complet durant 3 générations successives.

200

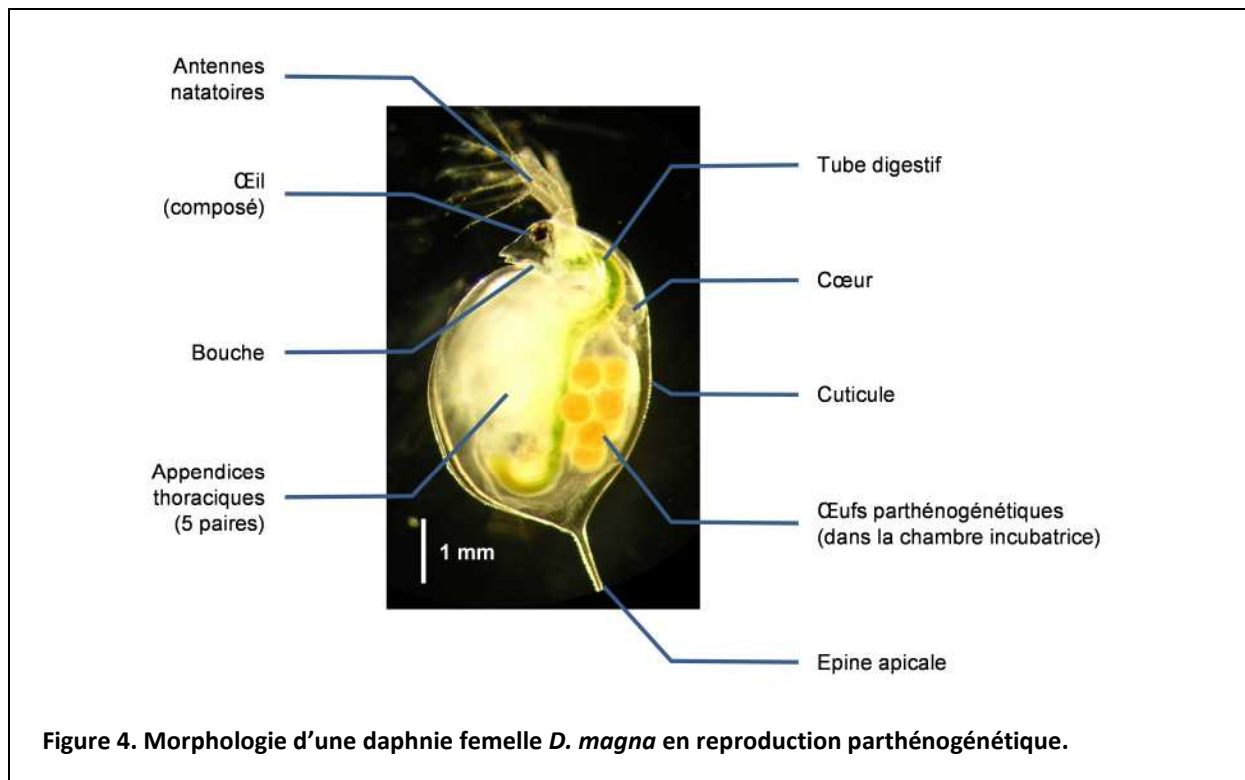
C'est le nombre de filles parthénogénétiques que va produire une daphnie au cours des 3 premières semaines de vie. Pourtant, cette multitude ne représente qu'un seul individu. En effet, le mode de reproduction, par parthénogénèse, qui caractérise les daphnies, donne naissance à des clones, tous identiques sur le plan génétique et censés répondre de manière égale à la toxicité, ce qui en facilite grandement l'étude des effets biologiques.

irradiant ou en contaminant des volumes de milieu de culture les plus faibles. Les résultats acquis peuvent être comparés à l'abondante littérature sur la toxicité des polluants chimiques, grâce au rôle que joue l'espèce comme modèle standard en écotoxicologie (ASTM, 1998 ; OECD, 2004, 2008). La daphnie est en outre, l'espèce qui a inspiré au professeur Kooijman de l'université d'Amsterdam, la théorie du Budget Energétique Dynamique (DEB), maintenant utilisée pour décrire le comportement physiologique de plus d'un millier d'espèces, et son application à la Toxicologie (approche DEBtox) (Kooijman et Bedaux, 1996 ; Kooijman, 2010). Le génome de *D. magna*, enfin, est à l'époque en passe d'être entièrement séquencé (Shaw et al., 2008 ; Colbourne et al., 2011).

2.1.2. Un peu de biologie

Biologie : *D. magna* vit dans la colonne d'eau où elle se déplace à l'aide de ses deux antennes biramées (Figure 4). Organisme filtreur, elle se nourrit des particules en suspension, composées principalement d'algues phytoplanctoniques mais également de bactéries et de champignons, qu'elle collecte et achemine vers la bouche grâce au courant organisé par le mouvement des appendices thoraciques dans la cavité de la cuticule. Le cycle de vie est marqué par la succession saisonnière de deux modes de reproduction (Figure 5) :

- Lorsque les conditions du milieu sont favorables (ensoleillement, température, production primaire), une reproduction asexuée par parthénogénèse est mise en place, donnant naissance sans accouplement à des générations clonales composées de femelles génétiquement identiques. Les œufs parthénogénétiques, diploïdes, sont portés dans un repli dorsal de la cuticule, pendant les quelques jours du développement embryonnaire. Ils éclosent sans fécondation sous forme de juvéniles au moment de la mue des femelles.



- Une génération automnale composée de mâles et femelles se met en place lorsque les conditions du milieu se dégradent. Les femelles produisent deux œufs haploïdes contenus dans une capsule résistante, l'éphippie, fécondés par les mâles. Les éphippies sont la forme de résistance durant l'hiver ou les épisodes de sècheresse, jusqu'au retour des conditions favorables. Les embryons, en dormance, peuvent reposer dans le sédiment pendant de nombreuses années, dans l'attente du stimulus d'éclosion approprié.

Ecologie : La daphnie vit dans les eaux calmes voire stagnantes (lacs, étangs, mares) des zones tempérées, proches des côtes, dans l'est du continent nord-américain et dans le nord de l'Europe où elle joue un rôle d'espèce clé (*keystone species*) des écosystèmes aquatiques continentaux. Elle participe en effet à l'équilibre écologique de la colonne d'eau, en régulant la biomasse du phytoplancton et en soutenant le fonctionnement des chaînes alimentaires depuis le plancton vers les poissons planctonophages et les échelons trophiques supérieurs. Faut de consommateur zooplanctonique efficace comme la daphnie, la production phytoplanctonique peut s'accumuler dans le milieu conduisant rapidement à la détérioration sévère de la qualité de l'eau (eutrophisation) avec des implications pour la santé, humaine et animale, et la valeur récréative des plans d'eau.

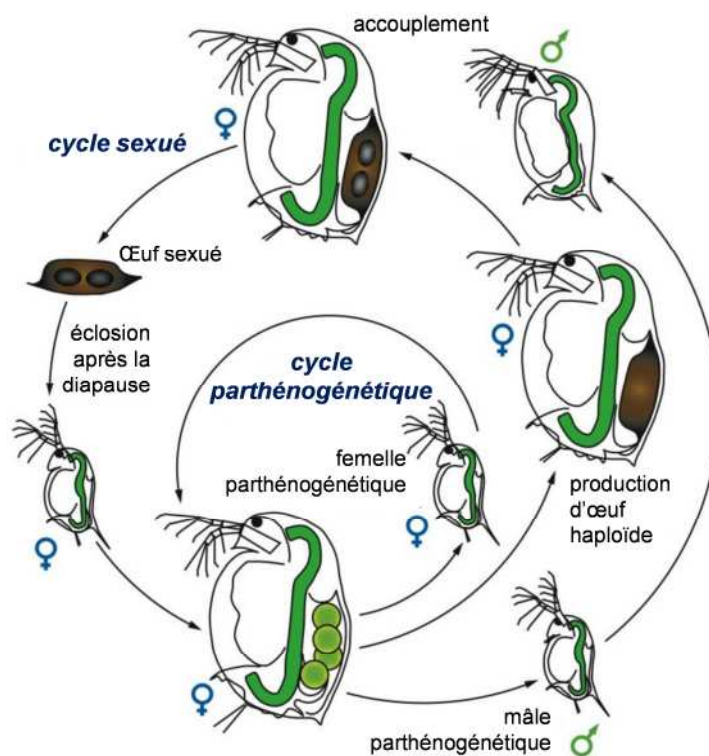


Figure 5. Cycle de vie sexué et asexué d'une espèce parthénogénétique de *Daphnia*. Durant le cycle asexué (parthénogénétique), les femelles produisent des œufs diploïdes qui se développent directement en femelles. La même femelle peut produire des œufs diploïdes qui se développent en mâles. L'apparition des mâles est contrôlée par des facteurs environnementaux. De plus, la même femelle peut produire des œufs haploïdes qui requièrent une fécondation par les mâles. Ces œufs sont ensuite inclus dans une coquille protectrice (l'éphippie) et ont besoin de subir une diapause avant que de nouvelles femelles n'en éclosent. D'après Ebert (2005).

2.1.3. La daphnie et l'écotoxicologie

Depuis les premiers travaux au début du XXe siècle (Warren, 1900 ; Buijtendijk, 1918 ; Naumann, 1934), l'implication de l'espèce *D. magna* dans l'évaluation toxicologique et écotoxicologique n'a cessé de grandir, pour représenter, aujourd'hui, 8% à elle seule de l'ensemble des données aquatiques expérimentales disponibles dans la littérature (Denslow et al., 2007). L'intérêt scientifique de la daphnie est loin de se limiter à l'écotoxicologie, puisque l'espèce a inspiré une vaste recherche dans les domaines de la biologie évolutive, de l'écologie, de la génétique et l'épigénétique (Ringelberg, 1964 ; Koivisto, 1995 ; De Meester, 1996 ; Atienzar et Jha, 2004 ; Hooper et al., 2008 ; Shaw et al., 2008 ; Zeman et al., 2008 ; Preuss et al., 2009 ; Harris et al., 2012). La complémentarité des disciplines couvertes contribue pourtant à améliorer la compréhension des mécanismes de toxicité à différentes échelles (moléculaire cellulaire, individuelle, populationnelle).

Effets macroscopiques

Des tests chroniques standards sur 21 jours (OECD, 2008) révèlent, au niveau macroscopique, la sensibilité de l'espèce vis-à-vis d'une large gamme de polluants. Parmi eux, citons les métaux (Cd, Zn, Cu, ...), les pesticides (Pirimicarb, Malathion, ...), les herbicides (pentachlorophénol), les produits pharmaceutiques et autres antibiotiques (carbamazépine, diclofénac, éthinylestradiol, métoprolol, sulfathiazole, tétracycline), les nanoparticules (CuO, TiO₂, ...), les rayons ultra-violet (UV) etc. (Ward et Robinson, 2005 ; Muysen et al., 2006 ; De Schampelaere et al., 2007 ; Dietrich et al., 2010 ; Kim et al., 2009 ; Kim et al., 2010a ; Kim et al., 2012, 2014 ; Chen et al., 2014 ; Jacobasch et al., 2014 ; de O.F. Rossetto et al., 2014 ; Andersen et al., 2015). Les effets décrits – réduction de la survie, de la croissance en taille ou en masse, retard des pontes et réduction du nombre d'œufs produits, perturbation de la nutrition, altérations morphologiques – peuvent considérablement varier d'un toxique chimique à l'autre.

La daphnie *D. magna*, ainsi que *D. pulex*, est aussi utilisée pour caractériser la toxicité des radionucléides tels que l'U naturel, le tritium (rayonnement bêta) et le Cs-137 (rayonnement gamma aigu, seuls ou en mélange avec le fluoranthène) (Marshall, 1962, 1963, 1966 ; Poston et al., 1984 ; Gudkov et Kipnis, 1996 ; Antunes et al., 2007 ; Sarapultseva et Gorski, 2013 ; Nascimento et al., 2015).

Marqueurs moléculaires et cellulaires

Une batterie de marqueurs permet d'explorer la toxicité moléculaire et cellulaire chez *D. magna*.

- Les effets génotoxiques sont examinés par l'observation des cassures double-brins à l'aide du test des comètes. Ceux-ci sont observés lors d'expositions aux nanoparticules de CeO₂ ou d'Ag (Lee et al., 2009 ; Park et Choi, 2010). Des altérations de l'ADN sont mises en évidence à l'aide de la technique de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) lors d'expositions au Cu (Atienzar et al., 2001). Leur transmission de la mère aux descendants est observée chez des daphnies exposées au benzo[a]pyrène (Atienzar et Jha, 2004). Les auteurs montrent que

l'accumulation de ces lésions peut s'accompagner d'effets sévères à l'échelle macroscopique (mortalité, réduction de croissance et de reproduction).

- La technique des puces à ADN est utilisée pour mettre en évidence des changements de profils d'expression génique, suite à une exposition au Cd ou aux nanoparticules de Zn (Soetaert et al., 2007 ; Poynton et al., 2010). Les analyses pointent certains mécanismes associées incluant respectivement une perturbation de la digestion, du transport de l'oxygène, de la croissance cuticulaire et du développement et des perturbations du stress oxydatif, de la respiration cellulaire et de la reproduction.

- Des analyses transcriptomiques sont réalisées sur plusieurs gènes d'intérêt chez les daphnies exposées au benzo[a]pyrène et au dichromate de sodium ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (David, 2009 ; David et al., 2011). Les gènes impliqués dans les processus de réparation de l'ADN et de réponses au stress oxydatif sont surexprimés chez les adultes mais pas chez les juvéniles de moins de 24h, ce qui montre l'influence de l'âge sur la capacité à réparer les dommages face à un stress chimique.

- Le stress oxydatif peut être étudié via la quantification des ROS, de l'activité des enzymes antioxydantes (catalase, glutathionine peroxydase, glutathionine-S-transferase) et de l'état d'oxydation des lipides et des protéines. Leur augmentation est mise en évidence lors d'expositions au Cu, aux nanoparticules de TiO_2 et à l'aspirine (acide acétylsalicylique) (Xie et al., 2006 ; Kim et al., 2009 ; Kim et al., 2010a ; Gómez-Oliván et al., 2014).

Processus de réparation

La disparition des effets toxiques lors d'un retour des daphnies en milieu non contaminé, suggère l'intervention de mécanisme d'élimination ou de réparation des dommages moléculaires. Une étude montre que le genre *Daphnia* possède deux voies spécifiques de réparations des dommages ADN induits par les rayonnements ultraviolets (UV) : les processus de réparation photo-enzymatique (PER) et d'excision de nucléotide (NER) (Rautio et Tartarotti, 2010). La survie des daphnies exposées aux rayons UV-B, variable selon la température, est mieux corrélée à l'efficacité des processus PER qu'à celle des processus NER (Connelly et al., 2009).

A l'échelle multigénérationnelle

De nombreuses auteurs ont utilisé *D. magna* pour étudier les variations de toxicité au cours d'expositions sur plusieurs générations et mis en évidence que les réponses pouvaient fortement différer sur le long terme, reflétant selon les contaminants, une augmentation de la tolérance ou de la sensibilité.

- L'acquisition d'une résistance pourrait être le résultat d'une réponse adaptative issue d'un processus sélectif lors des expositions au Cd sur huit générations (Ward et Robinson, 2005) et le fruit de la plasticité phénotypique permettant une acclimatation des individus lors d'expositions au Zn ou à la tétracycline (Muyssen et Janssen, 2001 ; Kim et al., 2012, 2014). L'acclimatation serait caractérisée par la réapparition de la sensibilité après plusieurs générations passées en condition non exposée (Muyssen et Janssen, 2004).

- Une augmentation de la sensibilité au cours des générations est observée lors d'expositions des doses environnementales d'un mélange réaliste de pesticides, au pentachlorophénol et aux

nanoparticules de TiO₂ (Brausch et Salice, 2011 ; Chen et al., 2014 ; Jacobasch et al., 2014). Cette augmentation est caractérisée par une aggravation des effets pouvant aller, à certaines concentrations, jusqu'à l'extinction de la lignée, celle-ci pouvant intervenir aussi tard que la cinquième génération. Une étude de la radiotoxicité bêta du tritium (H-3) sur cinq générations de *D. magna* montre que les effets sur la longévité, la croissance et la reproduction s'aggravent à partir de la deuxième génération exposée (Gudkov et Kipnis, 1996). Chez les daphnies exposées au fluoxetine, les effets plus prononcés dans la deuxième génération sont attribués à une perturbation du développement des larves dont les auteurs rapportent la taille plus petite (Péry et al., 2008).

- Muysen et Janssen (2004) montrent avec le cadmium que l'acquisition sur plusieurs générations d'une plus grande résistance ou d'une plus grande sensibilité pourrait dépendre de la concentration à laquelle les daphnies sont exposées.

- L'exposition à long-terme à la carbamazépine, le diclofénac, l'éthinylestradiol et le métoprolol produiraient des variations complexes de toxicité au fil des générations, dont l'interprétation est plus difficile (Dietrich et al., 2010).

- Dans d'autres cas, enfin, l'aggravation des effets est en partie interprétée comme le résultat d'une différence d'exposition entre les générations, lorsque l'exposition débute avec des daphnies fraîchement écloses (<24 h), suivant l'une des recommandations du test chronique de l'OCDE (Villarroel et al., 2000 ; Sobral et al., 2001 ; Arndt et al., 2014). Un tel design expérimental néglige l'influence du stade embryonnaire, dont l'exposition diffère, de fait, entre la première génération et les suivantes. La réponse des daphnies est plus représentative de la toxicité d'un polluant à long terme lorsque le stade embryonnaire est inclus dans l'exposition (Van Leeuwen et al., 1985).

2.2. PLANS EXPERIMENTAUX

2.2.1. Conditions d'exposition

Une culture de *D. magna* (clone A, INERIS, France) est maintenue en reproduction parthénogénétique, depuis plusieurs années au laboratoire. Conformément aux lignes directrices 211 de l'OCDE (OECD, 2008), elle est réalisée à 20°C, sous une intensité lumineuse de 30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, une photopériode de 16:8 h, et à la densité d'un individu pour 50 mL de milieu M4, en parallèle à pH = 8 et pH = 7 (Tableau 6) (Elendt et Bias, 1990 ; Zeman et al., 2008). Les daphnies sont nourries quotidiennement à la ration de 100 μg de carbone par daphnie, à l'aide d'algues unicellulaires *Chlamydomonas reinhardtii*, cultivées de façon axénique à 24°C dans le milieu HSM (High Salt Medium) (Harris, 1989). Les individus fraîchement éclos sont séparés et éliminés. L'ensemble des conditions est identique entre cultures et tests de toxicité, à l'exception du renouvellement de milieu qui est effectué à 100% tous les jours lors des expositions (pour maintenir la concentration des radionucléides dans le milieu) et à 50% toutes les semaines dans les cultures.

Tableau 6. Composition des milieux M4 à pH = 8 et pH = 7.

Composé (mg L ⁻¹)	pH = 8	pH = 7	Composé (µg L ⁻¹)	pH = 8	pH = 7
Ca	79,95	79,95	NH ₄	0,089	0,089
Mg	12,03	12,03	Li	50	50
Na	20,07	3,52	Rb	50	50
K	0,13	0,13	Sr	50	50
Cl	144,84	170,36	Br	12	12
SO ₄	48,82	48,82	Mo	29	29
NO ₃	0,20	0,20	Cu	6,2	6,2
PO ₄	0,20	0,20	Zn	3,2	3,2
HCO ₃	0,47	0,47	Co	2,5	2,5
SiO ₃	2,68	2,68	I	2,5	2,5
B	0,5	0,5	Se	0,91	0,91
Mn	0,1	0,1	V	0,25	0,25
Fe	0,4	0,4	Thiamine	47	47
EDTA	3,9	3,9	Vitamine B ₁₂	0,96	0,96
			Biotine	0,75	0,75

2.2.2. Scénarios d'exposition

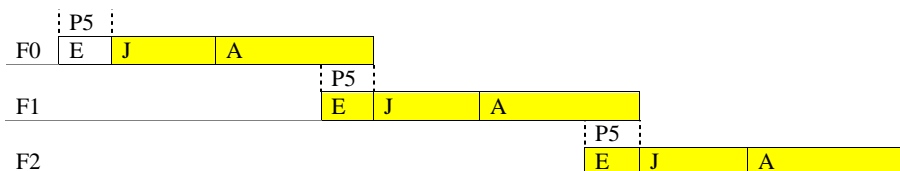
Les scénarios d'exposition mis en place évoluent, au fil du temps, pour répondre aux différentes questions posées. Je les ai schématisés dans la Figure 6 pour mieux souligner leurs points communs et leurs différences. Dans les premières années, l'exposition à Am-241, Cs-137 et U appauvri (Alonzo et al., 2006 ; Gilbin et al., 2008 ; Zeman et al., 2008) correspond strictement au schéma d'un test chronique standard sur 21 jours (OECD, 2008) (Schéma 1). On expose donc une génération unique (F0), issue le plus souvent d'une 5^e ponte (P5) des cultures. L'exposition débute à l'aide de daphnies écloses depuis moins de 24h et se poursuit au cours des stades juvéniles (J) et adultes (A). Le stade embryon (E) n'est pas exposé.

Les premiers tests d'exposition multigénération à Am-241 et U appauvri (Alonzo et al., 2008a ; Massarin et al., 2010) visent à vérifier si les effets chroniques, mesurés dans une génération F0 au cours d'un test standard sur 21 jours (OECD, 2008), sont représentatifs de la toxicité à plus long terme, dans les générations suivantes. On reprend donc le schéma précédent dont on prolonge l'exposition dans les générations F1 et F2, issues chaque fois de la 5^e ponte (Schéma 2). Là encore, le stade embryon (E) n'est pas exposé dans la génération F0,

Schéma 1.



Schéma 2.



Schémas 3.

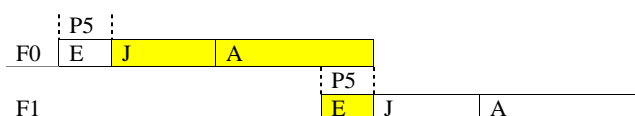


Schéma 4.

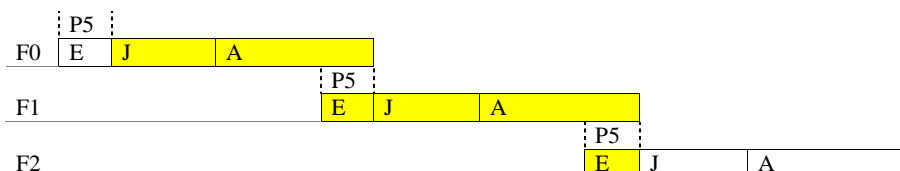


Schéma 5.

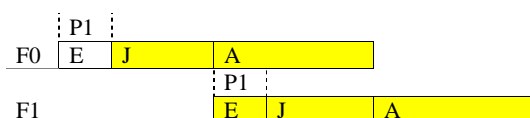


Figure 6. Schémas d'exposition de *D. magna* dans les études Alonzo et al. (2006, 2008a), Gilbin et al. (2008), Zeman et al., 2008 et Massarin et al. (2010).

détail qui prendra une importance cruciale ultérieurement. L'étude des effets d'une exposition multigénérationnelle à U appauvri (Massarin et al., 2010) donne également lieu à des scénarios de dépuración en générations F1 ou F2 (Schémas 3 et 4). Un autre scénario (Schéma 5) vise à comparer la sensibilité selon le numéro de ponton (P1 ou P5) dont sont issues les générations testées. Cette fois encore, la génération F0 n'est pas exposée durant le stade embryon (E).

C'est lorsque l'on cherche à éclaircir la cause de l'augmentation de la toxicité au fil des générations exposées que l'on prend conscience que les différences d'exposition du stade embryon (E), induites entre générations par le design expérimental (Schéma 2), peuvent largement expliquer à elles-seules la variation d'intensité observée dans les effets. Pour corriger l'éventuel biais expérimental causé, un nouveau schéma est mis en place sur deux générations (Schéma 6) dans le cas de U appauvri (Plaire et al., 2013). Cette fois, l'exposition

Schéma 6.

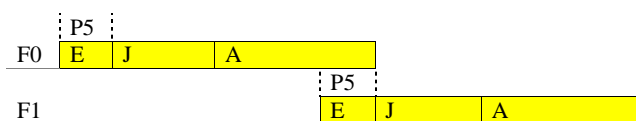


Schéma 7.

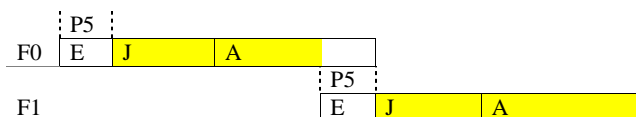


Schéma 8.

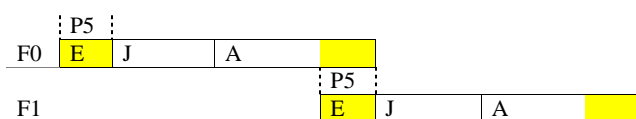


Schéma 9.

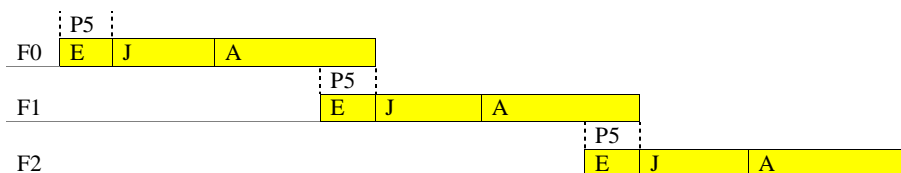


Schéma 10.

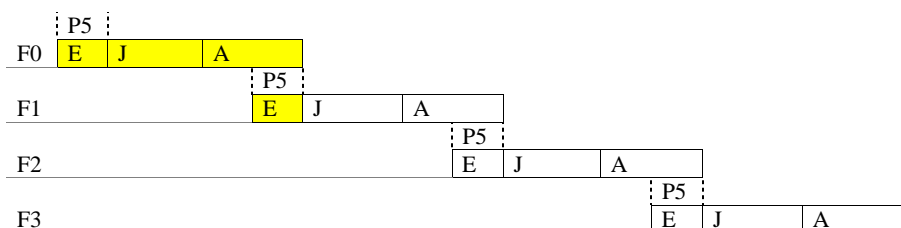


Figure 6 (suite). Schémas d'exposition de *D. magna* dans les études Plaire et al. (2013), Parisot et al. (2015) et Trijau et al. (2018).

début à l'aide d'œufs déposés depuis moins de 24h (ce qui implique l'exposition d'une génération parentale) et le stade embryon est exposé dans la génération F0 comme dans la génération F1. L'étude de Plaire et al. (2013) sur U appauvri cherche en outre à éclaircir l'influence de l'exposition du stade embryon sur les différences de toxicité entre générations. Pour ce faire, elle met en œuvre des schémas d'exposition sur deux générations, dans lesquelles le stade embryon n'est pas exposé (Schéma 7) ou est le seul stade exposé (Schéma 8).

Une exposition similaire au Schéma 6 est mise en place sur trois générations (Schéma 9) lors de l'étude multigénérationnelle des effets de Cs-137 (Parisot et al., 2015). Ce travail est enfin complété avec une étude (Trijau et al., 2018) dans laquelle le schéma d'exposition, similaire dans la génération F0, est suivi d'une récupération lors des générations F1, F2 et F3 (Schéma 10). Ce schéma permet d'examiner la réversibilité des effets du Cs-137 et de tester

l'hérédité épigénétique transgénérationnelle. Dans le cas des daphnies, la génération F3 est la première qui n'est jamais directement exposée et qui permet d'étudier la transmission des modifications épigénétiques de façon indiscutable (Skinner, 2008). Comme pour toutes les espèces chez lesquelles l'embryogénèse est interne (cas des femelles en gestation des mammifères et des poissons ovovivipares notamment), l'exposition directe des embryons (génération F1) et de leurs cellules germinales (génération F2) est en effet indissociable de celle de la génération F0. Chez les espèces ovipares ou en cas d'exposition des mâles seulement par contre, l'hérédité épigénétique transgénérationnelle peut être évaluée dès la génération F2.

2.2.3. Mesures

L'ensemble des mesures et analyses effectuées sont résumées dans le Tableau 7. On y retrouve les suivis quotidiens de la survie et de la reproduction qui ont été réalisés systématiquement dès 2006. Ceux concernant la physiologie et les marqueurs moléculaires sont l'objet des certaines des études seulement.

Tableau 7. Mesures et analyses réalisées lors des expérimentations sur *D. magna*.

Mesures	Temps	Alonzo et al. (2006)	Zeman et al. (2008)	Gilbin et al. (2008)	Alonzo et al. (2008a)	Massarin et al. (2010)	Plaire et al. (2013)	Parisot et al. (2015)	Trijau et al. (2018)
Survie									
Proportion de survivants	TLJ jusqu'à P5 ou P6	•	•	•	•	•	•	•	•
Reproduction									
Jour de ponte	TLJ jusqu'à P5 ou P6	•	•	•	•	•	•	•	•
Jour de libération									
Taille des pontes									
Masse sèche œuf	P1, P3, P5 ou P6	•	•	•	•	•	•	•	•
Croissance									
Taille somatique	Eclosion, P1, P3, P5 ou P6				•	•	•	•	•
Masse sèche	Eclosion, P1, P3, P5 ou P6	•	•	•	•	•	•	•	•
Physiologie									
Respiration	Eclosion, P1, P3, P5 ou P6	•	•	•	•	•			
Ingestion	Eclosion, P1, P3, P5 ou P6	•	•	•		•			
Assimilation	P1, P5					•			
Analyses moléculaires									
RAPD–qPCR	Eclosion, P1, P5						•	•	
Séquençage bisulfite	P4 ou P5								•

2.3. TOXICITE DU RAYONNEMENT ALPHA INTERNE (AM-241)

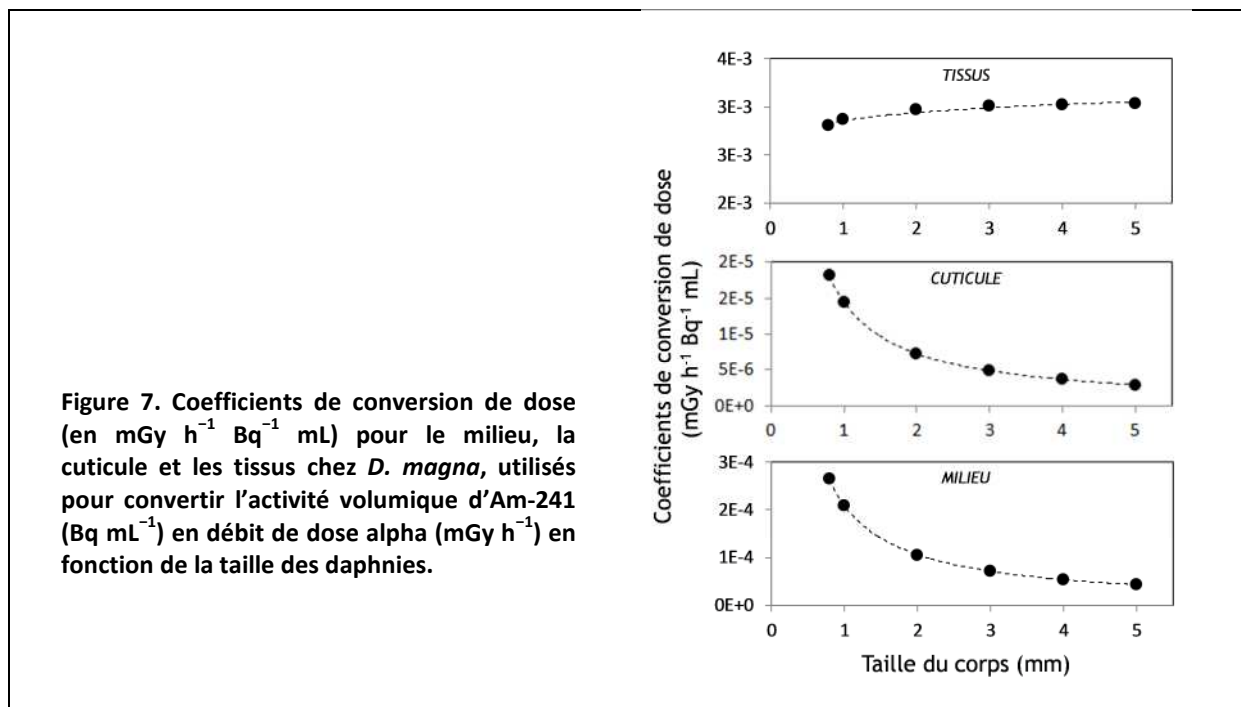
Avec les études publiées lors de mon post-doc (Alonzo et al., 2006, 2008a), *D. magna* devient la première, et à ce jour la seule, espèce animale non-humaine chez laquelle la toxicité chronique d'un rayonnement alpha est décrite en détail.

2.3.1. Expositions au rayonnement alpha (Am-241)

L'exposition au rayonnement alpha est basée sur une contamination à l'Am-241, dissous dans le milieu de culture et renouvelé tous les jours. Cet émetteur alpha est choisi en raison de sa très forte activité spécifique ($127 \times 10^9 \text{ Bq g}^{-1}$), qui va permettre d'exposer des daphnies à des niveaux où la toxicité chimique peut être considérée négligeable ($1,3 \text{ nM}$ à 40 Bq mL^{-1} , la plus forte concentration testée). Des prélèvements de milieu, d'exuvies et de daphnies sont effectués à différents temps pour mesurer l'activité de l'Am-241 et analyser les cinétiques d'internalisation dans les tissus et d'adsorption sur les cuticules au cours de l'exposition aux différentes concentrations. L'activité mesurée dans le milieu, les cuticules, les tissus et les œufs est ramené au volume, afin d'estimer les doses absorbées, selon la formule :

$$DR = \sum_k DCC_k \times [\text{Am-241}]_k \quad (\text{Equation 1})$$

où, dans le compartiment k , DCC_k est le coefficient de conversion de dose (en $\text{mGy h}^{-1} \text{ Bq}^{-1} \text{ mL}$) et $[\text{Am-241}]_k$, l'activité volumique de l'Am-241 (en Bq mL^{-1}). Les coefficients de conversion de dose (DCC pour « Dose Conversion Coefficients ») sont estimés à l'aide de calculs Monte Carlo (modèle MCNP-4C) sur le logiciel EDEN (Elementary Dose Evaluation for Natural Environment, EDEN 2.0) (Beaugelin-Seiller et al., 2006). Ces estimations prennent en compte les changements de taille des daphnies au cours du temps (Figure 7).

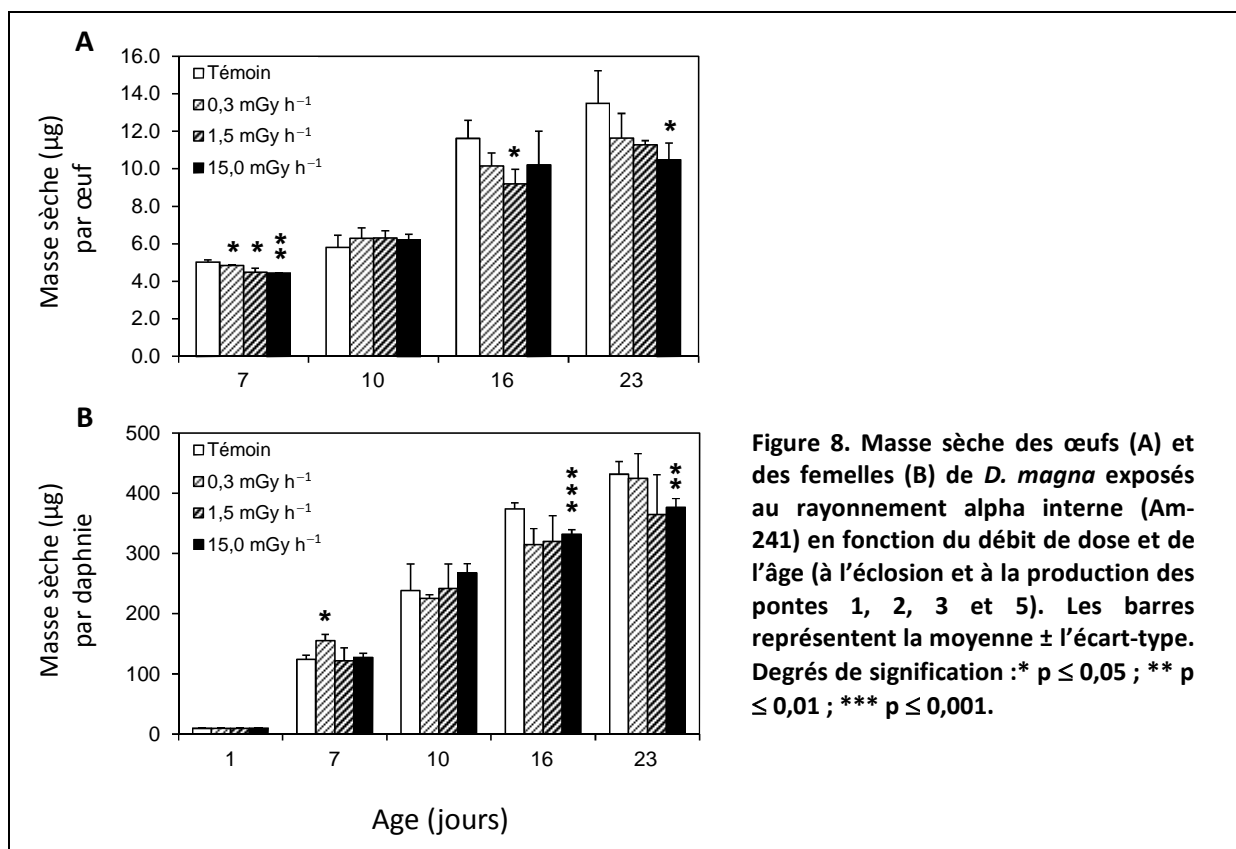


L'exposition est réalisée dans des flacons individuels contenant chacun une daphnie dans 50 mL de milieu M4 (à pH = 8), ce qui limite la quantité de milieu contaminé manipulée en même temps. L'ensemble des mesures est effectué sur un total de 24 réplicats par génération et par condition.

2.3.2. Toxicité chronique sur 23 jours

Suite à une exposition sur une seule génération, les effets induits par l'Am-241 dissous restent faibles mais significatifs sur 23 jours (Alonzo et al., 2006). La survie n'est pas affectée jusqu'à 15,0 mGy h⁻¹, le débit de dose estimé à la plus forte concentration testée. La masse corporelle (µg sec) est, pour sa part, réduite significativement ($p \leq 0,001$) de 13% au plus fort débit de dose (Figure 8). Il en résulte que certains traits physiologiques, comme le taux de respiration, augmentent significativement lorsqu'ils sont rapportés à la masse. Si la reproduction, en nombre d'œufs produits par daphnie reste inchangée (Figure 9), la masse de chaque œuf décline significativement ($p \leq 0,05$ à $p \leq 0,01$) d'environ 22% à 15,0 mGy h⁻¹ (Figure 8). Il s'ensuit que la masse totale d'œufs produite sur 23 jours est également réduite d'environ 10% (Figure 9).

Ces résultats suggèrent un impact possible sur les réserves énergétiques de la progéniture, ce qui est testé au travers de la résistance des larves à un jeûne prolongé. L'hypothèse est vérifiée avec une mortalité plus forte chez les larves à jeun exposées que chez le témoin, et ce quelque que soit le débit de dose (Figure 10). Il est toutefois à noter que les larves à jeun sont maintenues à la même concentration d'Am-241 que leurs parents, ce qui implique que la



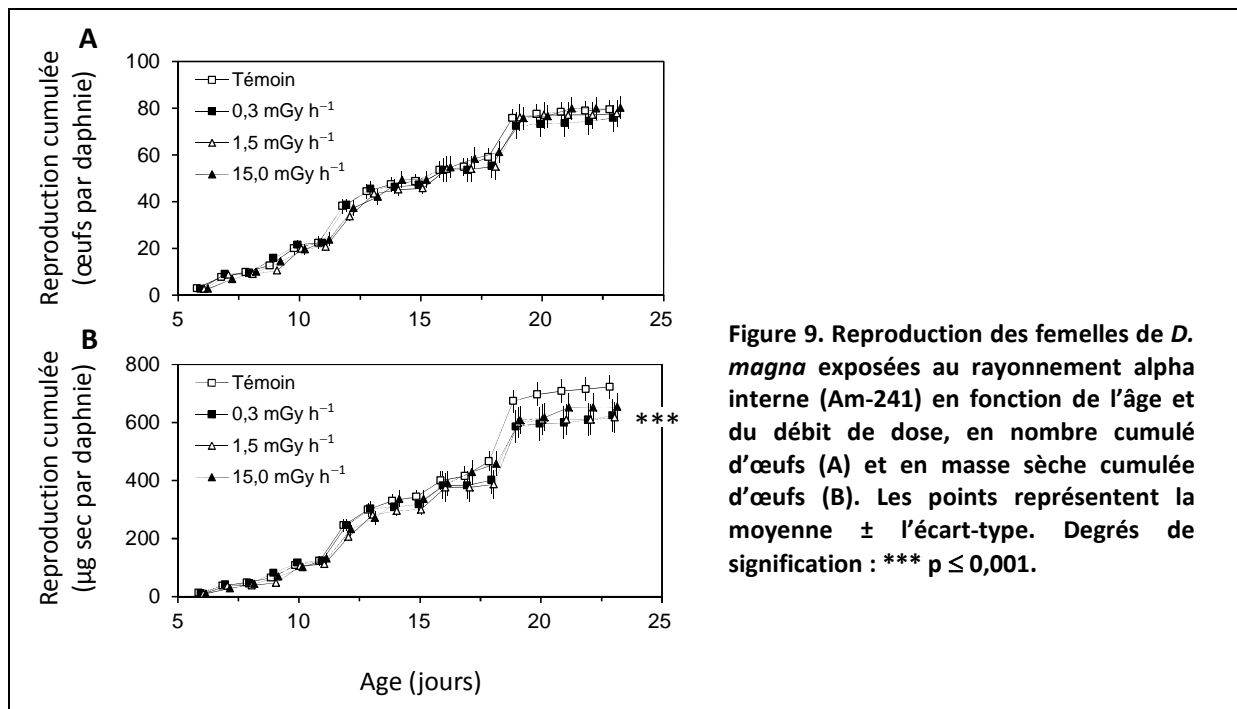


Figure 9. Reproduction des femelles de *D. magna* exposées au rayonnement alpha interne (*Am-241*) en fonction de l'âge et du débit de dose, en nombre cumulé d'œufs (A) et en masse sèche cumulée d'œufs (B). Les points représentent la moyenne ± l'écart-type. Degrés de signification : *** p ≤ 0,001.

différence de résistance au jeûne, imputable à la masse décroissante des réserves déposées dans chaque œuf, puisse également résulter d'un effet direct du rayonnement alpha sur la survie des larves.

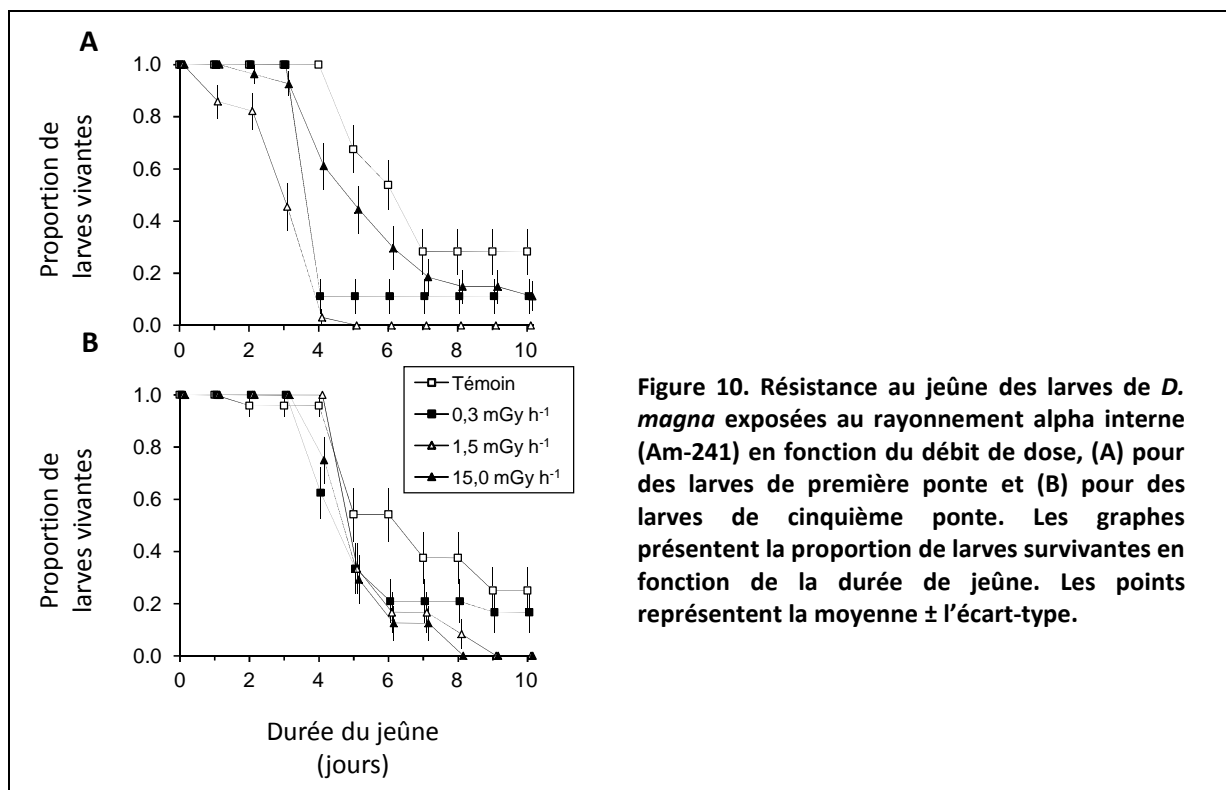
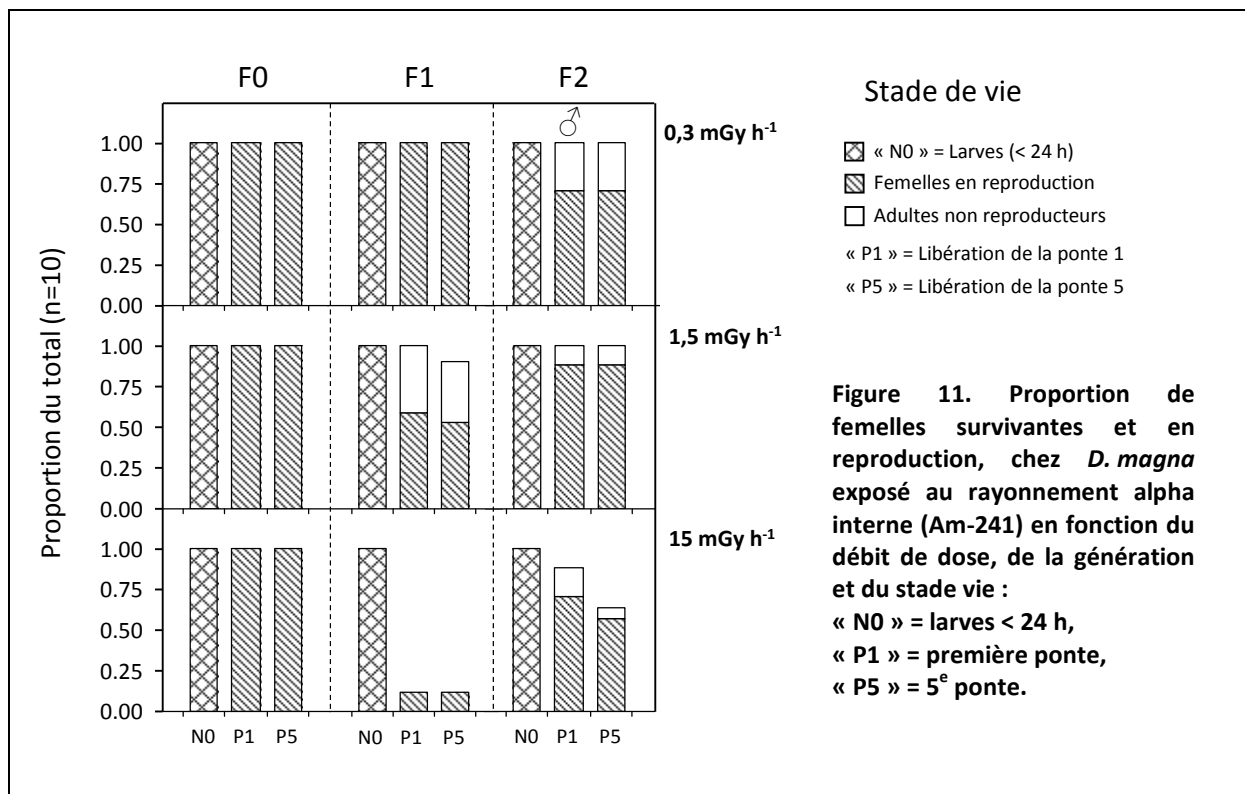
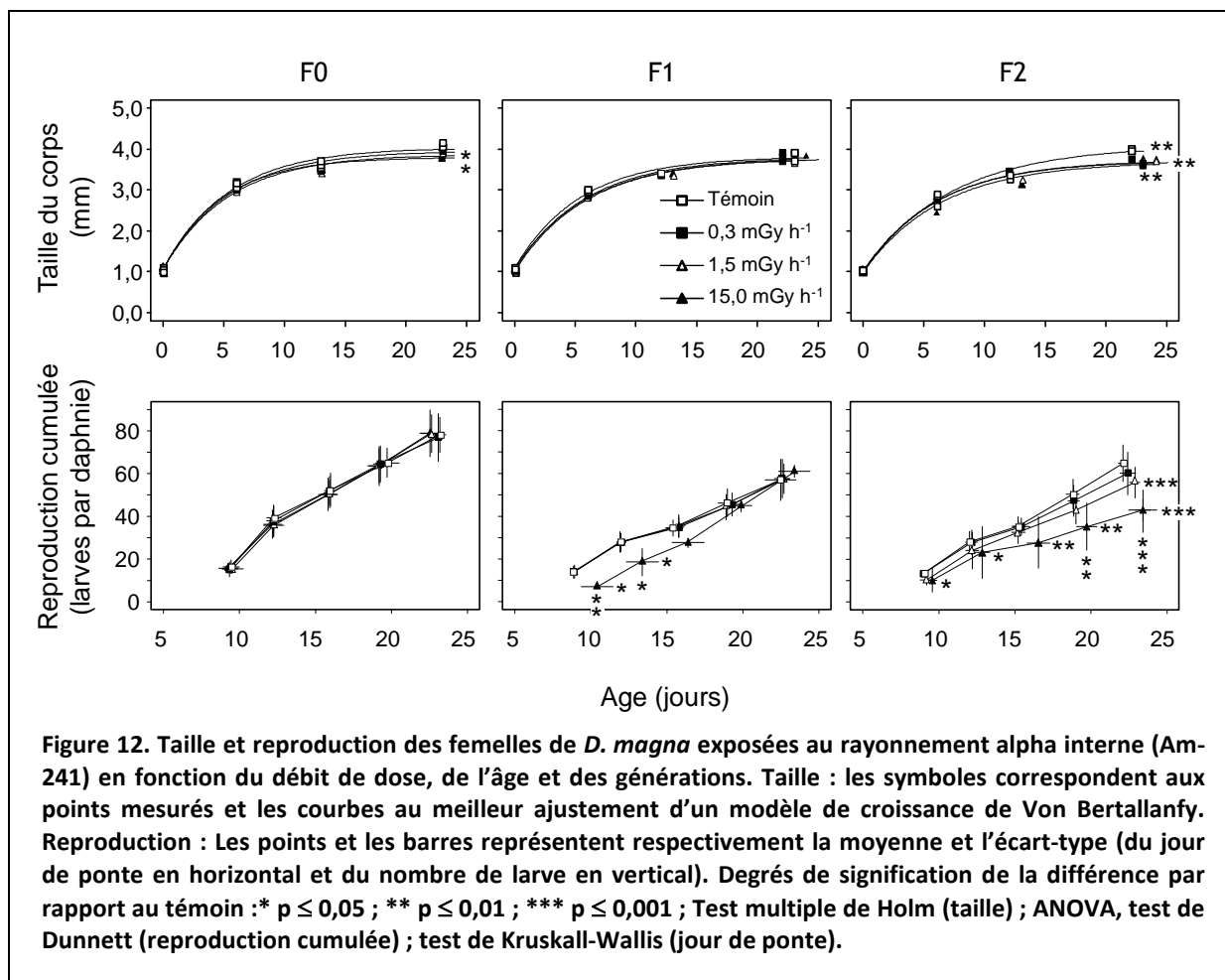


Figure 10. Résistance au jeûne des larves de *D. magna* exposées au rayonnement alpha interne (*Am-241*) en fonction du débit de dose, (A) pour des larves de première ponte et (B) pour des larves de cinquième ponte. Les graphes présentent la proportion de larves survivantes en fonction de la durée de jeûne. Les points représentent la moyenne ± l'écart-type.

2.3.3. Toxicité du rayonnement alpha au fil des générations

Les résultats de l'étude publiée en 2006 laisse pressentir, chez *D. magna*, une sensibilité au rayonnement alpha plus forte dans la progéniture que chez les parents exposés. Cette hypothèse est explorée dans cette première étude de la toxicité des radionucléides sur plusieurs générations (Alonzo et al., 2008a). Les résultats montrent que les effets de l'irradiation alpha interne sur la survie, la croissance et la reproduction s'aggravent lorsque l'exposition est prolongée dans les générations F1 et F2. Alors qu'aucun effet sur la survie n'est décelé dans la génération F0 exposée à partir de l'éclosion, une mortalité précoce touchant 90% des juvéniles est observé dans la génération F1 au débit de dose de 15 mGy h⁻¹ (Figure 11). Elle s'accompagne de l'apparition d'une fraction de femelles non reproductrices à 1,5 mGy h⁻¹. Dans la génération F2, la mortalité perdure à 15 mGy h⁻¹, touchant 40% des individus après 23 jours. On observe également, des femelles non reproductrices à tous les débits de dose testés et l'émergence de mâles à 0,3 mGy h⁻¹. Limités à une faible réduction de la taille dans la génération F0 (Figure 12), les effets sur la croissance sont de plus en plus significatifs dans les générations suivantes. La reproduction enfin, n'est pas affectée dans la génération F0 et présente un retard dans les jours de dépôt des pontes et un déclin du nombre d'œufs par ponte, dans les générations F1 et F2 (Figure 12). Les variations de masse sèche du corps et des œufs semblent principalement le résultat de la réduction de taille des femelles (Alonzo et al., 2008a).





2.4. TOXICITE CHIMIQUE DE U APPAUVRI

L'analyse de la toxicité de l'U appauvri représente, pour moi, le cas d'étude grâce auquel j'ai le plus appris. Les deux premières thèses que j'ai eu la chance de superviser comme tuteur IRSN, celles de Sandrine Massarin (2010) et de Delphine Plaire (2013), portaient toutes deux sur les effets de ce radioélément. Les avancées techniques réalisées, tant sur le plan expérimental que sur celui de la modélisation, ont pu être mises à profit et adaptées ultérieurement au cas de la toxicité des rayonnements gamma et alpha.

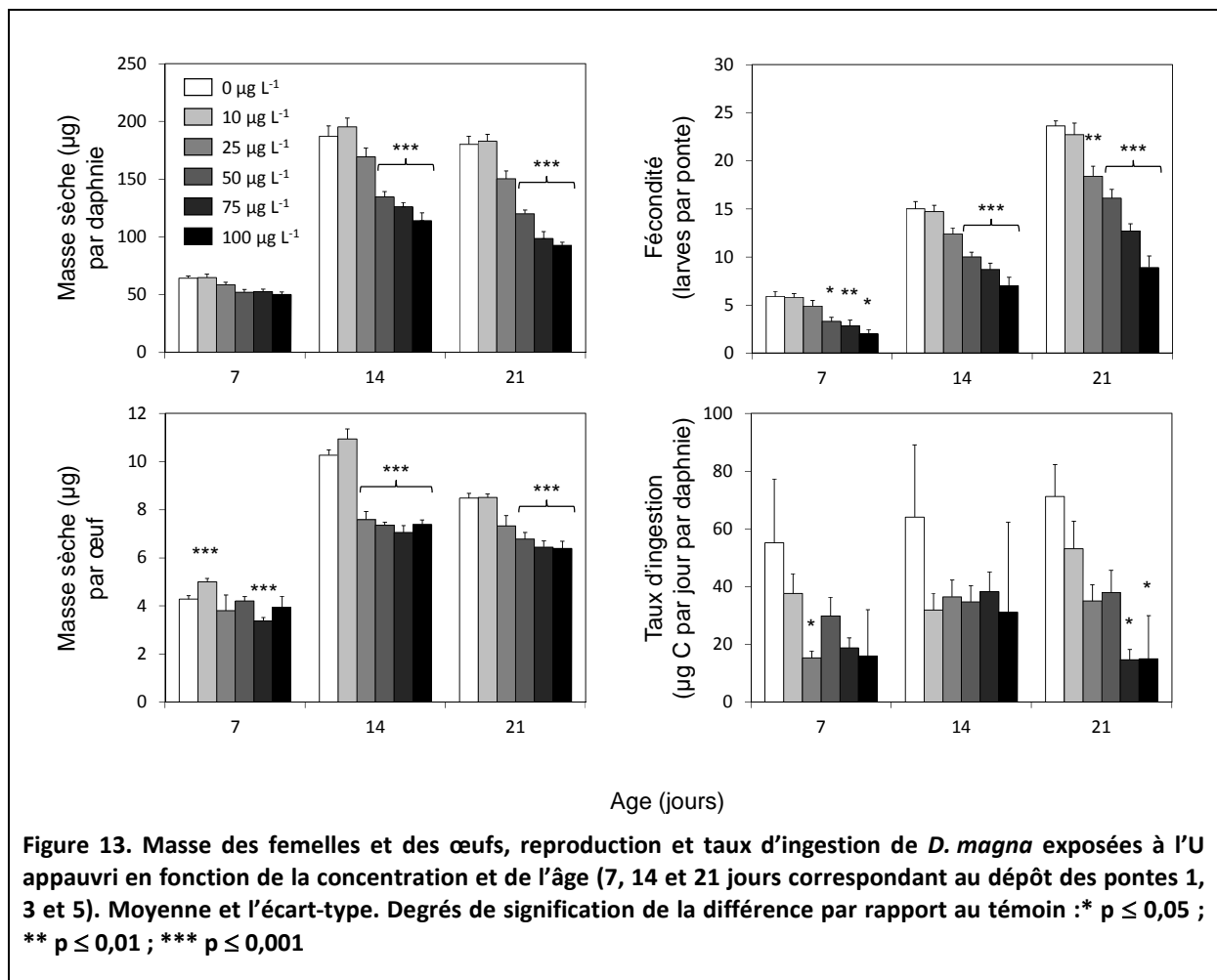
2.4.1. Expositions à l'U appauvri

L'exposition à l'U appauvri, sous forme d'ion uranyle UO_2^{2+} dissous, est réalisée dans le milieu M4 modifié (Zeman et al., 2008). Ce milieu propose un pH abaissé à 7, tout en restant compatible avec les limites physiologiques des daphnies, et entraîne une biodisponibilité de l'U accrue par rapport au milieu M4 standard (à pH 8). La différence de toxicité aiguë observée entre milieux à pH = 8 et pH = 7 (LC_{50} de $7,8 \text{ mg L}^{-1}$ et $390 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ respectivement), ne peut, toutefois, être expliquée par le seul effet de la concentration en ion libre et est imputable à d'autres processus, comme une compétition ou une inhibition du transport d'U par les ions H^+ et/ou l'implication d'autres espèces chimiques biodisponibles d'U.

Des prélèvements de milieu sont effectués immédiatement avant et après le renouvellement quotidien du milieu. La concentration en U dans le milieu fraîchement renouvelé ne diffère pas de plus de 8% des concentrations nominales. Les pertes en U par adsorption après 24h varient avec la concentration, de 23% (à $2 \mu\text{g L}^{-1}$) à 5% (à $50 \mu\text{g L}^{-1}$). Les gammes de concentration testées correspondent à 10, 25, 50, 75 et $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (Zeman et al., 2008), à 10, 25 et $75 \mu\text{g L}^{-1}$ (Massarin et al., 2010) et à 2, 9,9, 22,2 et $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (Plaire et al., 2013). Les expositions sont conduites dans des flacons en polycarbonate de 50 mL, 500 mL ou 1 L, contenant 1, 10 ou 20 daphnies – toujours à la densité d'un individu par 50 mL – les volumes variant en fonction des besoins pour les analyses.

2.4.2. Toxicité chronique sur 21 jours

L'étude menée sur la toxicité chronique de l'U appauvri sur 21 jours (Zeman et al., 2008) apporte de nombreux éléments de connaissance des plus intéressants (Figure 13). Une mortalité de 10% est observée à la plus forte concentration testée ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). La croissance en masse et la fécondité sont fortement affectées. Elles décroissent, de façon significative, de 50 et 65% respectivement après 7 jours à $50 \mu\text{g L}^{-1}$ et après 21 jours à $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Les valeurs d' EC_{10} et EC_{50} pour la reproduction sont estimées à 14 et $91 \mu\text{g L}^{-1}$. La masse sèche investie par œuf est éduite significativement dès 14 jours à $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Ces effets



sont vus comme le fruit d'un déclin de l'énergie disponible pour la croissance et la reproduction (ce qu'on appelle le *Scope for Growth*), du fait principalement de l'induction d'une forte réduction de la réponse ingestive. Cette interprétation est supportée par des mesures directes de taux d'ingestion décroissant avec la concentration d'U appauvri et par l'observation de dommages histologiques au niveau de la paroi épithéliale du tube digestif chez les daphnies exposées (Figures 13 et 14).

L'internalisation d'U appauvri dans les tissus des daphnies est mesurée et un débit de dose alpha peut être estimé. Sa valeur varie de 2,1 à 13 $\mu\text{Gy h}^{-1}$, ce qui, comparativement à l'absence d'effet rapportée à 300 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ lors d'une contamination à Am-241, suggère que les effets de l'U appauvri sont le fruit de sa toxicité chimique de métal, et non de sa radiotoxicité d'émetteur alpha.

2.4.3. Toxicité de l'U appauvri au fil des générations

Forts des résultats montrant l'aggravation des effets de l'Am-241 au fil des générations, nous envisageons de tester l'hypothèse d'une variation des effets sur trois générations successives de *D. magna* dans le cas d'une exposition à l'U appauvri, au cours du projet de doctorat de Sandrine Massarin. Dans son article (Massarin et al., 2010), les traits macroscopiques mesurés – la survie, la croissance et la reproduction – sont ceux qui permettent d'analyser les perturbations du budget énergétique, d'identifier les modes d'action métaboliques sous-jacents et de prédire les conséquences pour la dynamique de population. A nouveau, les résultats mettent en évidence l'accroissement de la sévérité des effets toxiques au travers des générations soulignant, ici encore, la nécessité de conduire des tests de toxicité multigénérationnel pour accroître la pertinence de l'évaluation du risque écologique sur le long terme – par rapport à des tests de toxicité chronique conduits sur une génération. En pratique, l'accroissement de la toxicité de l'U appauvri rend impossible, dans notre étude, l'acquisition de données dans une génération F2 exposée à 75 $\mu\text{g L}^{-1}$, toute reproduction cessant dès la génération F1 à cette concentration.

La survie est l'un des traits affectés par l'aggravation des effets (Figure 15). Alors que la génération F0 ne présente aucune mortalité aux concentrations testées (jusqu'à 75 $\mu\text{g L}^{-1}$), la proportion de survivants chute à 48% après 4 jours et 0 % après 16 jours dans la génération

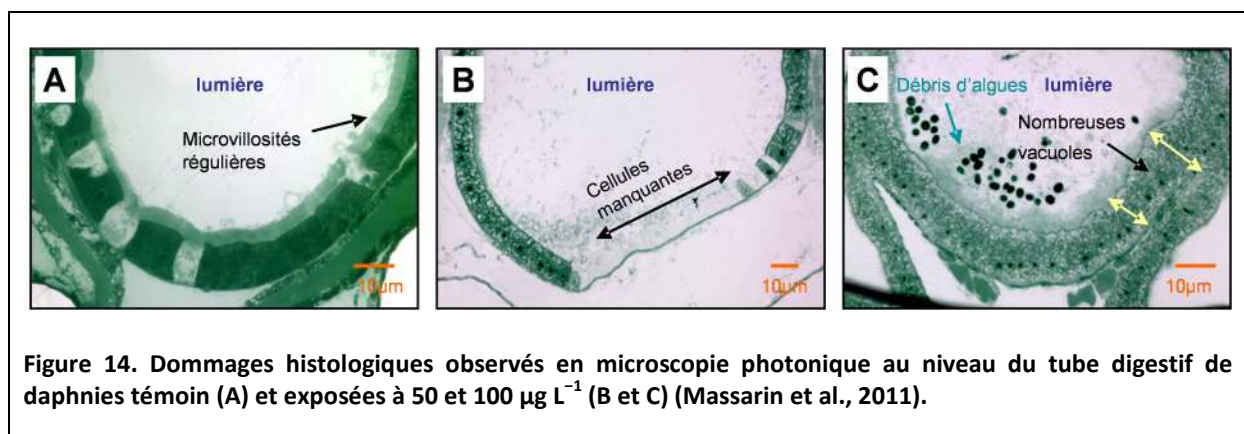


Figure 14. Dommages histologiques observés en microscopie photonique au niveau du tube digestif de daphnies témoin (A) et exposées à 50 et 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (B et C) (Massarin et al., 2011).

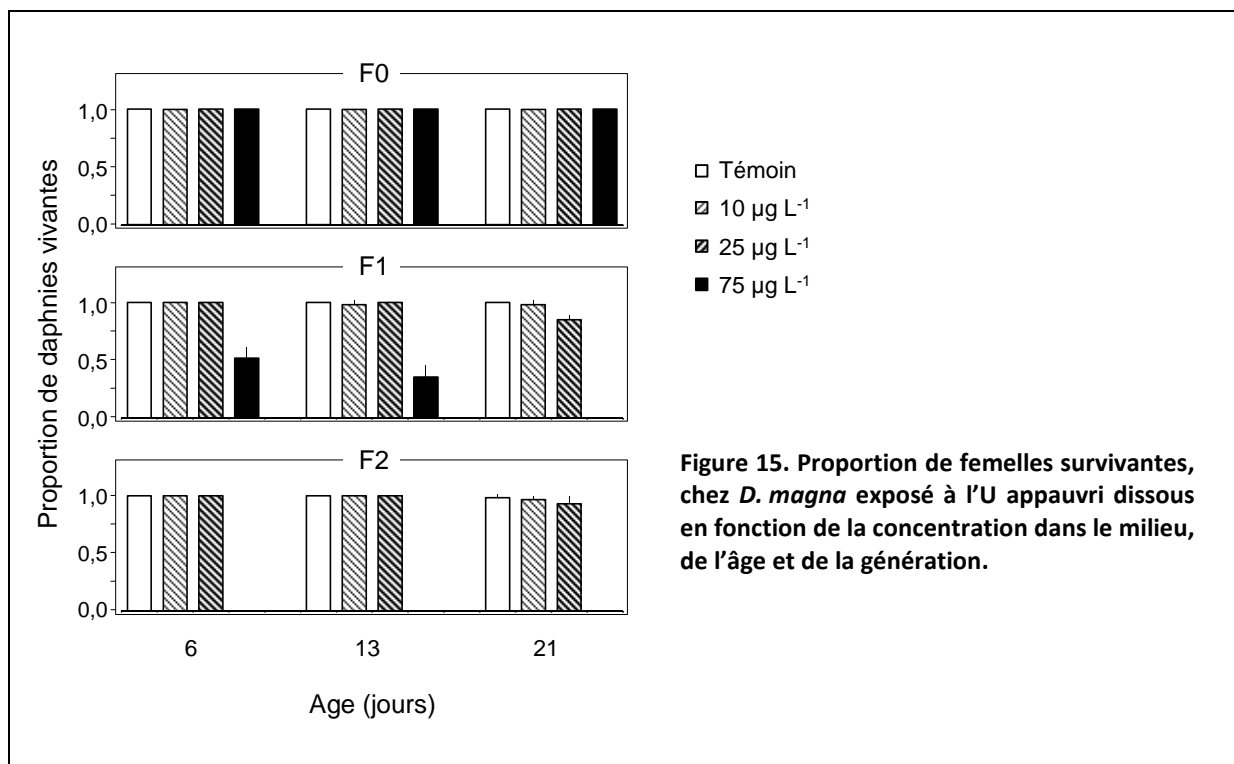
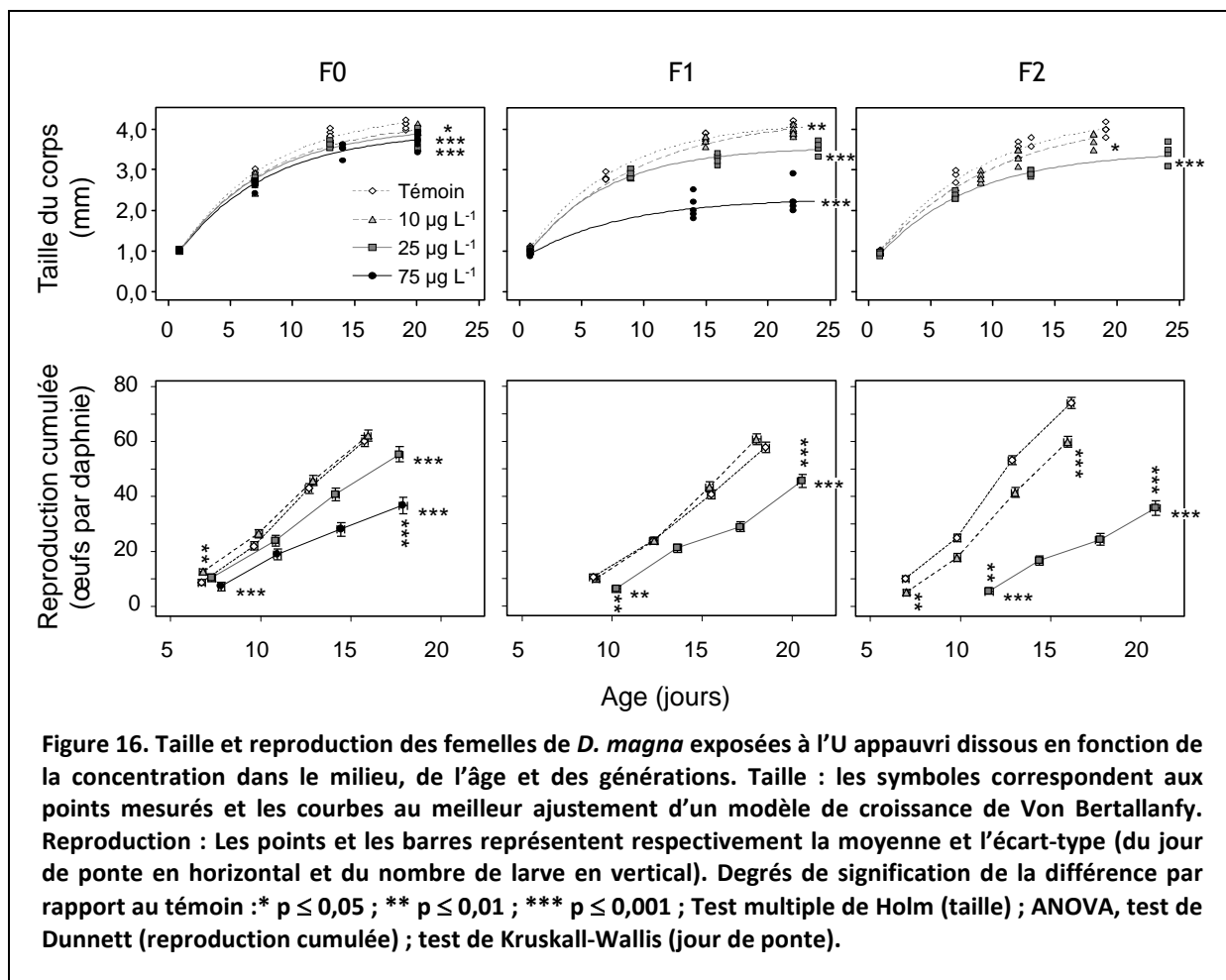


Figure 15. Proportion de femelles survivantes, chez *D. magna* exposé à l'U appauvri dissous en fonction de la concentration dans le milieu, de l'âge et de la génération.

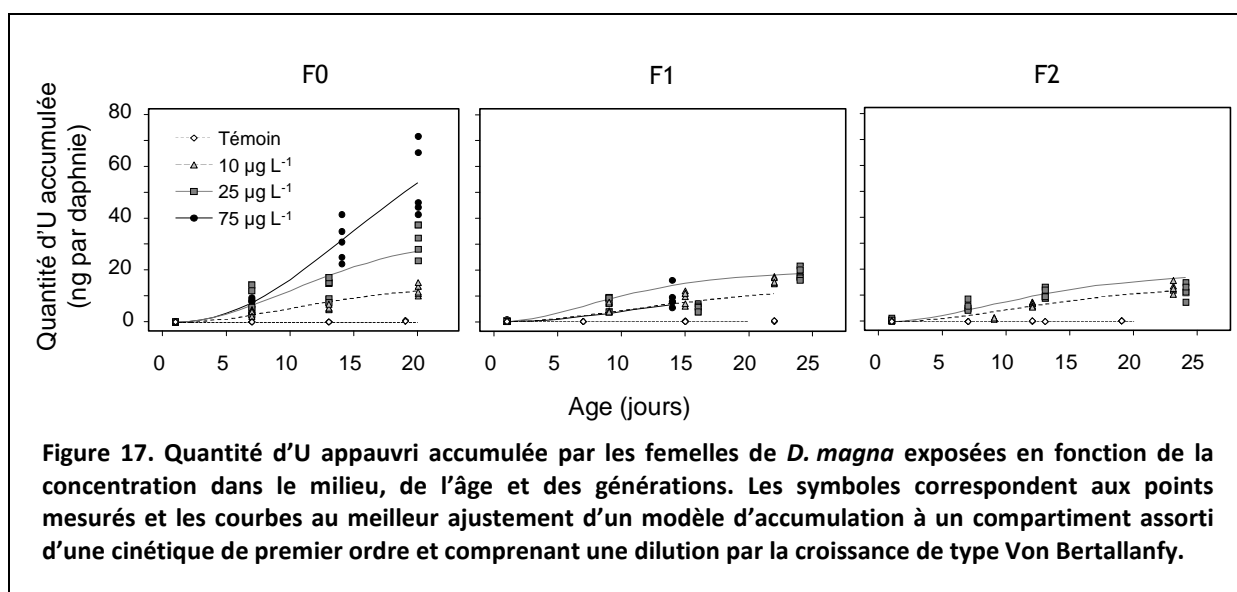
F1 à 75 µg L⁻¹. Cette mortalité est également observée lorsque les larves fraîchement écloses sont transférées dans un milieu non contaminé. Un déclin de la survie est également observée dans les générations F1 et F2 exposées à 10 et 25 µg L⁻¹ mais les effets sont moins sévères, avec des proportions de survivants de 97-98% et 85-93% après 23 jours d'exposition.

La sévérité des effets sur la croissance somatique et la reproduction augmente également d'une génération à l'autre (Figure 16). A 75 µg L⁻¹, la taille maximale est réduite de 11% dans la génération F0 et de 44% dans la génération F1. A 25 µg L⁻¹, la réduction passe de 9 à 23% entre les générations F0 et F2. A 10 µg L⁻¹, une réduction de 6%, faible mais statistiquement significative, demeure visible quelle que soit la génération. La reproduction à 21 jours est réduite de 48% dans la génération F0 exposée à 75 µg L⁻¹, en accord avec l'*EC*₅₀ de 91 µg L⁻¹ estimée dans Zeman et al. (2008). A 25 µg L⁻¹, la réduction passe de 27 à 71% entre les générations F0 et F2. A 10 µg L⁻¹, un effet de 20% est observé dans la génération F2. Le déclin de la croissance entraîne un retard dans la production de la première ponte, de 1,3 jour dans la génération F0 exposée à 75 µg L⁻¹ et de 1,9 à 5,0 jours dans les générations F1 et F2 exposées à 25 µg L⁻¹.

La quantité d'U accumulée par les organismes atteint des valeurs maximales de 17, 32 et 54 ng par daphnie à 10, 25 et 75 µg L⁻¹ (Figure 17). Celles-ci entraînent une exposition au rayonnement alpha interne estimée à 5, 12 et 20 µGy h⁻¹, des débits de dose auxquels, comparativement avec l'Am-241, aucun effet n'est attendu. Les quantités d'U accumulées ne présentent aucune tendance à l'augmentation d'une génération à la suivante, pouvant contribuer à l'accroissement observé de la sévérité des effets.



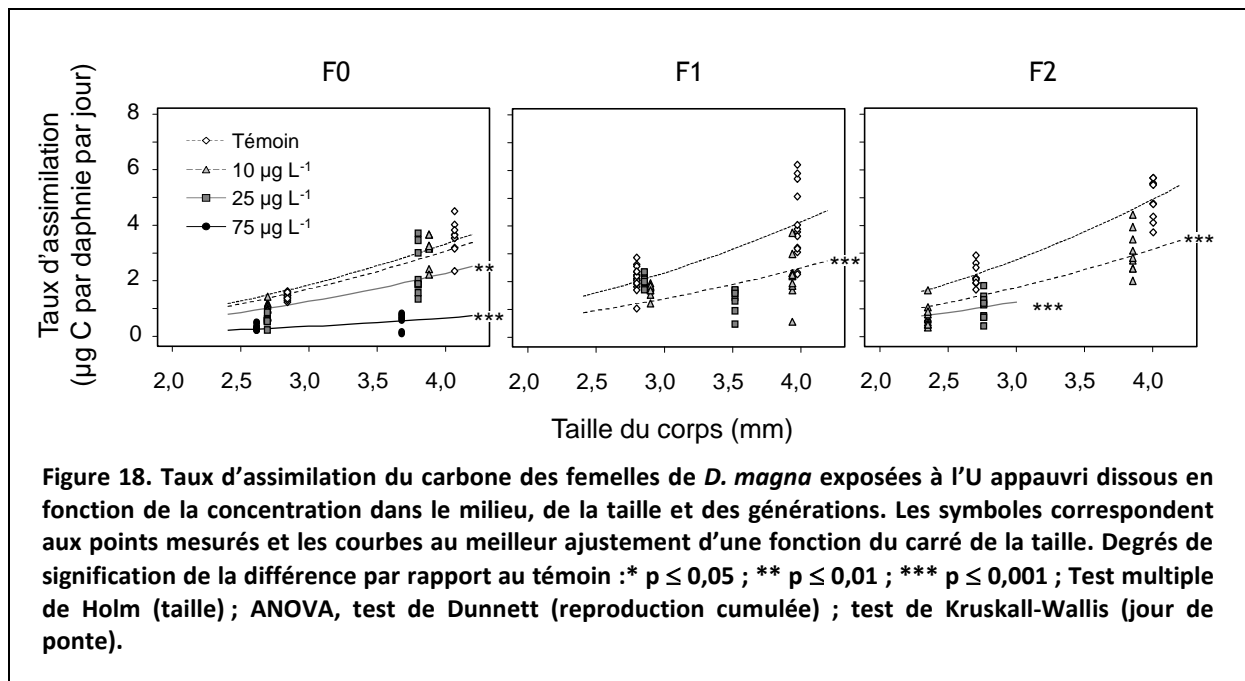
Il n'est pas question ici de montrer l'ensemble des résultats acquis dans la thèse de Sandrine Massarin (Massarin, 2010). D'autres expériences sont conduites, apportant leur lot de connaissances. Ainsi, des daphnies des générations F1 et F2 sont replacées au moment de



l'éclosion dans un milieu non contaminé, ce qui met en lumière la capacité de la progéniture à récupérer partiellement après une exposition parentale jusqu'à la concentration de $25 \mu\text{g L}^{-1}$. A $75 \mu\text{g L}^{-1}$, les effets sur la survie, la croissance et la reproduction semblent irréversibles et continuent d'être observés après un retour en milieu non contaminé. D'autres résultats, enfin, démontrent, sur deux générations successives (F0, F1), que des daphnies issues de 1ère ponte présentent une plus grande sensibilité à la toxicité de l'U appauvri que celles classiquement issues de 5ème ponte.

2.4.4. Une réduction d'assimilation comme mode d'action toxique

Les altérations importantes de la structure de la paroi du tube digestif, induites par l'U appauvri et révélées par microscopie optique laissent pressentir que la toxicité agit en perturbant la nutrition des daphnies. L'hypothèse est testée à l'aide d'une technique de marquage-traçage au ^{14}C de la nourriture (Massarin et al., 2010). L'assimilation est ainsi quantifiée chez les daphnies exposées aux différentes concentrations dans chaque génération et rapportée à la taille, ce qui permet de prendre en compte l'effet indirect causé par la réduction de croissance (Figure 18). L'étude montre que l'U appauvri affecte l'assimilation du carbone, dont le taux, pour des daphnies de même taille, est réduit entre conditions témoin et exposées. La réduction s'élève respectivement à 34 et 80% dans la génération F0 exposée à 25 et $75 \mu\text{g L}^{-1}$ et de 40 et 36% dans les générations F1 et F2 exposées à $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Ces résultats montrent que l'effet de l'U appauvri sur l'assimilation augmente en intensité d'une génération à l'autre. D'autres traits physiologiques, comme les taux de respiration ou la masse sèche des femelles et de leurs œufs sont également examinés. Leurs variations sont interprétées comme le résultat indirect de l'effet de l'U appauvri sur la taille.



2.4.5. Peut-on dire que la toxicité de l'U augmente au fil des générations ?

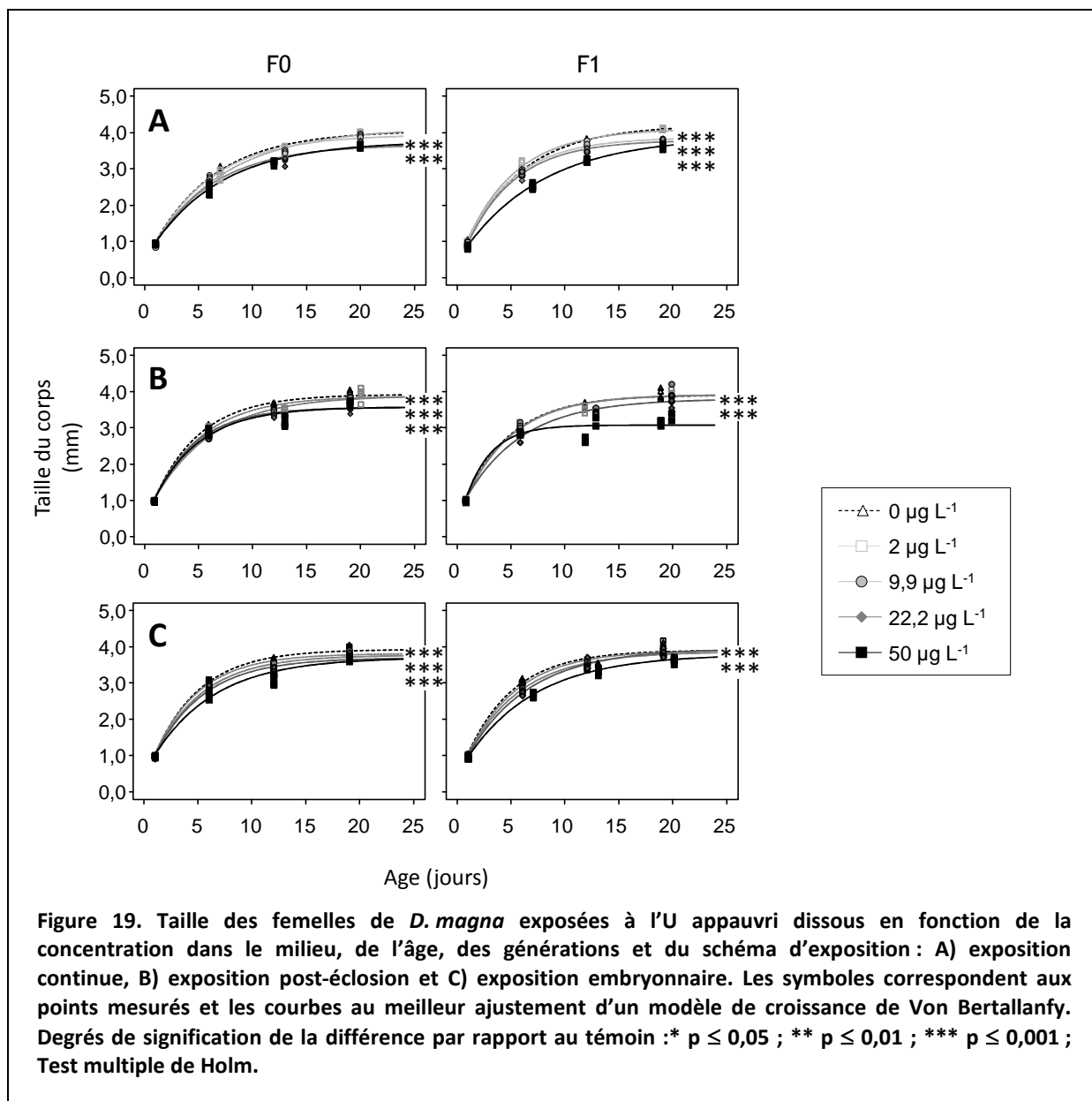
Voici l'une des principales questions posées dans l'étude de Delphine Plaire (Plaire et al., 2013). Les résultats publiés dans l'étude précédente (Massarin et al., 2010) mettent en évidence une augmentation de la sévérité des effets de l'U appauvri, mais celle-ci pourrait-elle n'être que le fruit d'une différence dans les scénarios d'exposition entre la génération F0 (exposée, sauf au stade embryonnaire) et les générations suivantes (exposées, y compris au stade embryonnaire) ?

Pour répondre à la question, la démarche expérimentale privilégie des tests sur deux générations successives, exposées de manière strictement identique au cours des mêmes stades de vie. Trois scénarios sont mis en place pour cerner l'influence de la sensibilité spécifique du stade embryonnaire : un premier test durant lequel les deux générations sont exposées au cours de tous les stades de vie (exposition *continue*), un deuxième test durant lequel les deux générations sont exposées à partir de l'éclosion, ce qui exclut le stade embryonnaire (exposition *post-éclosion*) et un troisième test durant lequel les deux générations sont exposées seulement au stade embryonnaire (exposition *embryonnaire*). La gamme de concentrations testées s'étend de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ – où l'on espère ne pas observer d'effet toxique – à $50 \mu\text{g L}^{-1}$ – où l'on espère éviter la mortalité dans la génération F1 observée à $75 \mu\text{g L}^{-1}$ (Massarin et al., 2010).

Les résultats concernant les effets à l'échelle de l'organisme révèlent plusieurs points des plus intéressants (Figures 19 et 20). Ils montrent :

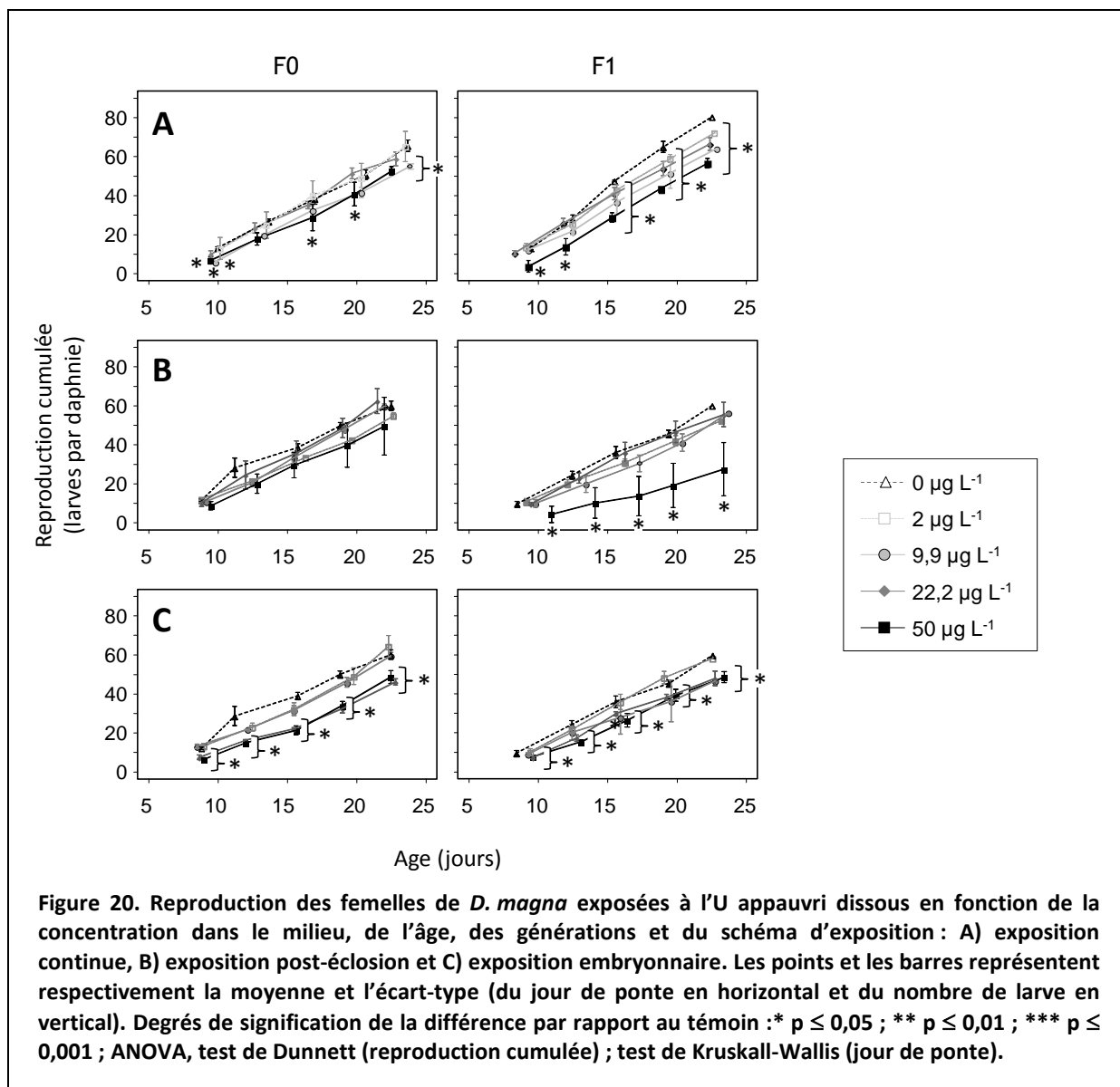
- 1) qu'un accroissement de la toxicité entre les générations reste visible lors des expositions continue et post-éclosion. Cet accroissement persiste malgré l'absence de différence d'exposition entre les générations F0 et F1 et on peut donc conclure que la toxicité de l'U appauvri augmente bel et bien. De plus, la réduction de fécondité devient statistiquement significative dans la génération F1 dès la concentration de $2 \mu\text{g L}^{-1}$.
- 2) que la sévérité des effets est plus importante lors de l'exposition continue (qui inclut le stade embryonnaire) que lors de l'exposition post-éclosion. L'exposition du stade embryonnaire influence donc l'intensité des effets et la différence d'exposition entre les générations contribue à l'augmentation apparente de la toxicité dans l'étude de Massarin et al. (2010).
- 3) que des effets sur la croissance et la reproduction restent visibles après un retour en milieu non contaminé à l'éclosion, quand le stade embryonnaire est exposé à des concentrations supérieures ou égales à $9,9 \mu\text{g L}^{-1}$, mais ces effets n'augmentent pas en intensité entre la génération F0 et F1.

L'hypothèse d'une simple différence d'exposition étant écartée et la réalité de l'aggravation des effets toxiques au fil des générations n'étant plus discutable, Delphine Plaire dispose d'une situation expérimentale pour répondre à la seconde grande question de son projet de thèse : par quel(s) mécanisme(s), la toxicité de l'U appauvri peut-elle accroître en intensité d'une génération à l'autre ? L'hypothèse qu'elle choisit de tester – qu'un dommage moléculaire, induit par la toxicité, est transmis entre un parent exposé et sa descendance – est traitée au chapitre 3.



2.5. TOXICITE DU RAYONNEMENT GAMMA EXTERNE (Cs-137)

Au-delà de la première étude menée très tôt dans le cadre du programme ERICA (Gilbin et al., 2008), les travaux concernant l'étude de la toxicité du rayonnement gamma, accomplis lors des deux doctorats les plus récents (Parisot, 2015 ; Trijau, 2018), sont ceux qui ont pu bénéficier des compétences acquises, en expérimentation, analyses moléculaires et modélisation, au cours des thèses et post-doc précédents. Après l'Am-241 et l'U appauvri, les travaux complètent, avec un 3^e radionucléide (Cs-137), le jeu de données sur les effets chroniques lors d'une exposition multigénérationnelle chez *D. magna*.



2.5.1. Expositions au rayonnement gamma (Cs-137)

L'exposition au rayonnement gamma du Cs-137 est basée sur une irradiation externe, réalisée à l'IRSN de Cadarache dans le dispositif MIRE (Mini Irradiator for Radio-Ecology). Ce dispositif inclut trois sources liquides (composées de Cs-137 en solution), présentant respectivement une activité de 1,73, 17,4 et 173 MBq, et deux sources solides (composées de crayons de carbone contenant du Cs-137), présentant une activité identique de 1,54 GBq (Parisot et al., 2015). Ces activités s'élèvent de 1,64 MBq à 1,93 GBq, après le renouvellement des sources de Cs-137 (Trijaud et al., 2018). Chaque source est positionnée dans une chambre thermoventilée abritant les unités expérimentales (Figure 21). Un château de plomb amovible, ouvert lors des phases d'irradiation, entoure chaque source pour permettre d'atténuer le rayonnement lors de la manipulation des unités expérimentales. Les chambres thermoventilées sont séparées les unes des autres par des murs de plomb de 10 cm d'épaisseur qui réduisent les irradiations croisées entre les conditions d'exposition.

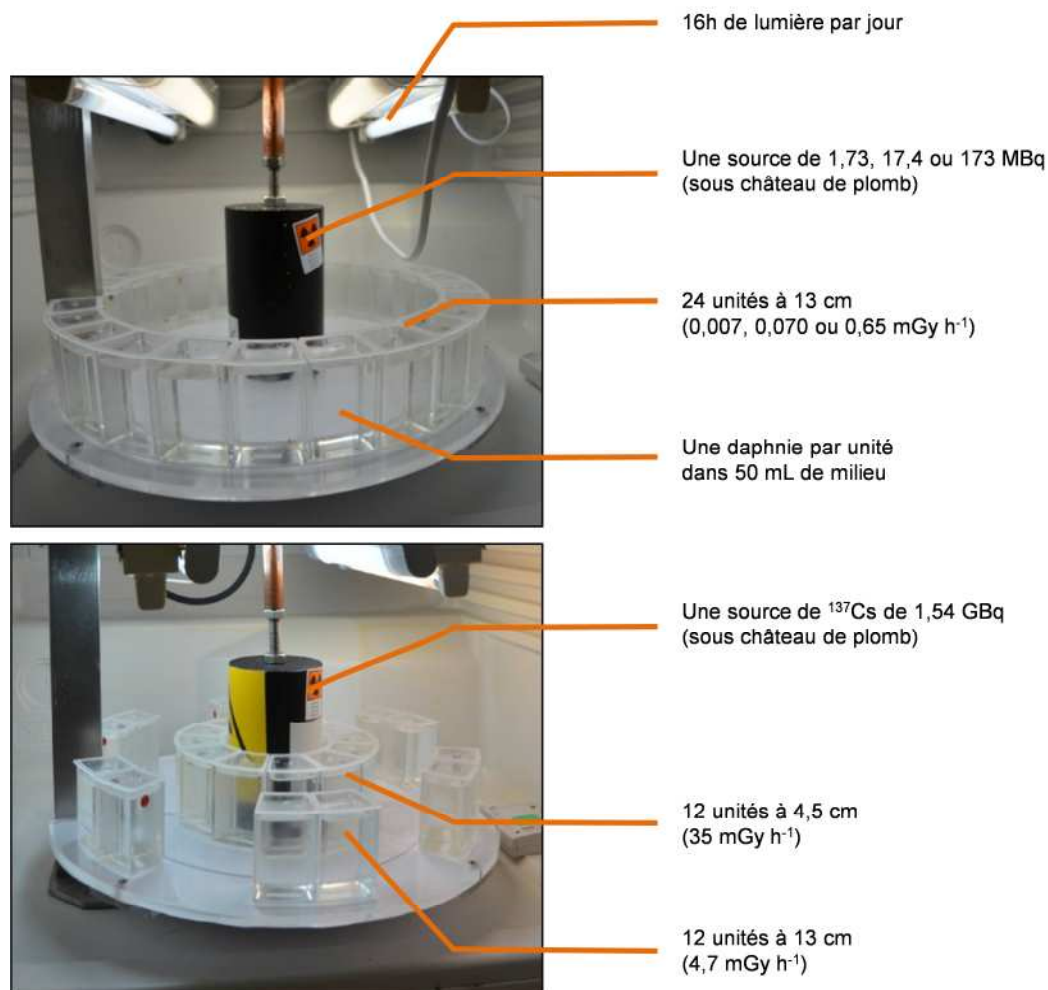


Figure 21. Dispositifs expérimentaux utilisés durant l'expérience d'irradiation gamma externe sur trois générations (Parisot et al., 2015). Vingt-quatre unités expérimentales (U.E.) sont disposées en cercle (à une distance de 13 cm) autour des sources de 1,73, 17,4 et 173 MBq. Vingt-quatre (12+12) unités expérimentales sont disposées en cercles concentriques (à une distance de 4,5 et 13 cm) autour des sources de 1,54 GBq. Le second dispositif est répété deux fois. Des dosimètres Radio Photo Luminescent sont placés sur les faces avant et arrière des unités expérimentales afin de valider les débits de dose nominaux durant l'expérience. Les unités expérimentales sont spécialement fabriquées pour notre expérience et permettent une irradiation sur 5 cm de hauteur dans 50 mL de volume.

Le premier dispositif (Gilbin et al., 2008) permettait d'irradier dix unités expérimentales, disposées en cercle autour de chaque source et contenant chacune une daphnie dans 50 mL de milieu M4 (à pH8), conformément au test de toxicité chronique (OECD, 2008). Par la suite (Parisot et al., 2015), un nouveau design expérimental est développé afin de réaliser toutes les analyses voulues, malgré les contraintes spatiales des mini-irradiateurs. Ce design est optimisé pour garantir le nombre de 24 réplicats par condition et par génération et le volume de 50 mL par daphnie (OECD, 2008), tout en limitant autant que possible la variabilité de la dose absorbée au sein des unités expérimentales. Celle-ci dépend du carré de la distance à la source radioactive et varie donc selon la position de la daphnie dans le volume. La valeur moyenne du débit de dose absorbé au centre des unités – jugée la plus représentative si l'on

suppose un déplacement aléatoire des daphnies dans le volume, sans différence de comportement entre les niveaux d'exposition – est calculée à l'aide du code MCNP (Monte Carlo N-Particle code) en tenant compte de la nature des milieux traversés (l'air, la paroi des unités expérimentales et le milieu de culture). Les valeurs théoriques de 0,007, 0,070, 0,65, 4,70 et 35,4 mGy h⁻¹ sont estimées. Les débits de dose mesurés pendant l'expérience, à l'aide de dosimètres radiophotoluminescent placés sur les faces avant et arrière de trois unités pour chaque traitement, représentent en moyenne 90 % des valeurs nominales (Tableau 8).

2.5.2. Toxicité chronique sur 21 jours

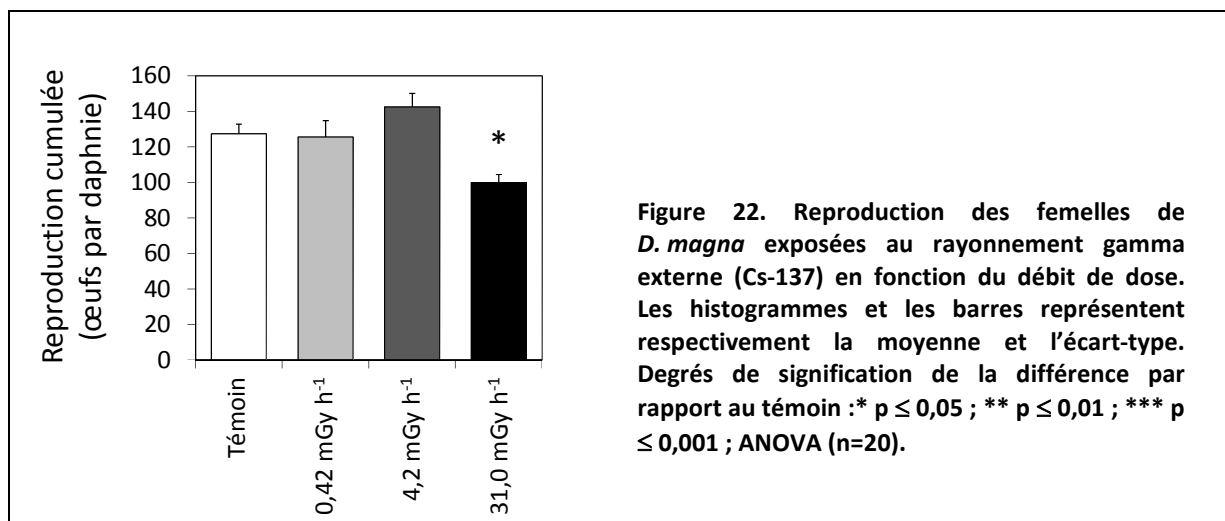
L'étude de Gilbin et al. (2008) sur la toxicité chronique du rayonnement gamma sur 21 jours met différents effets en lumière. Si la mortalité et la croissance en masse ne présente aucune tendance particulière sur la gamme de débits de dose testée, la fécondité est réduite de 22% après 21 jours au débit de dose de 31 mGy h⁻¹, le plus fort testé (Figure 22). Bien que la masse de la progéniture fraîchement éclos ne soit pas affectée, une réduction significative de leur résistance au jeûne est, comme dans le cas de l'Am-241, détectée à 31, 4,2 et 0,41 mGy h⁻¹ chez les larves issues des pontes 1, 3 et 5 (Figure 23), laissant pressentir la possibilité d'une plus grande sensibilité de la 2^e génération.

2.5.3. Toxicité du rayonnement gamma au fil des générations

Il faudra attendre le programme européen STAR et le doctorat de Florian Parisot (Parisot, 2015) pour que la toxicité du rayonnement gamma soit testée sur plusieurs générations. On se souvient que peu d'études de la littérature considèrent des doses suffisamment faibles pour être représentatives de l'exposition réelle des écosystèmes. Ici, l'irradiation externe sur trois générations successives (F0, F1 et F2, exposées de manière strictement identique au cours des

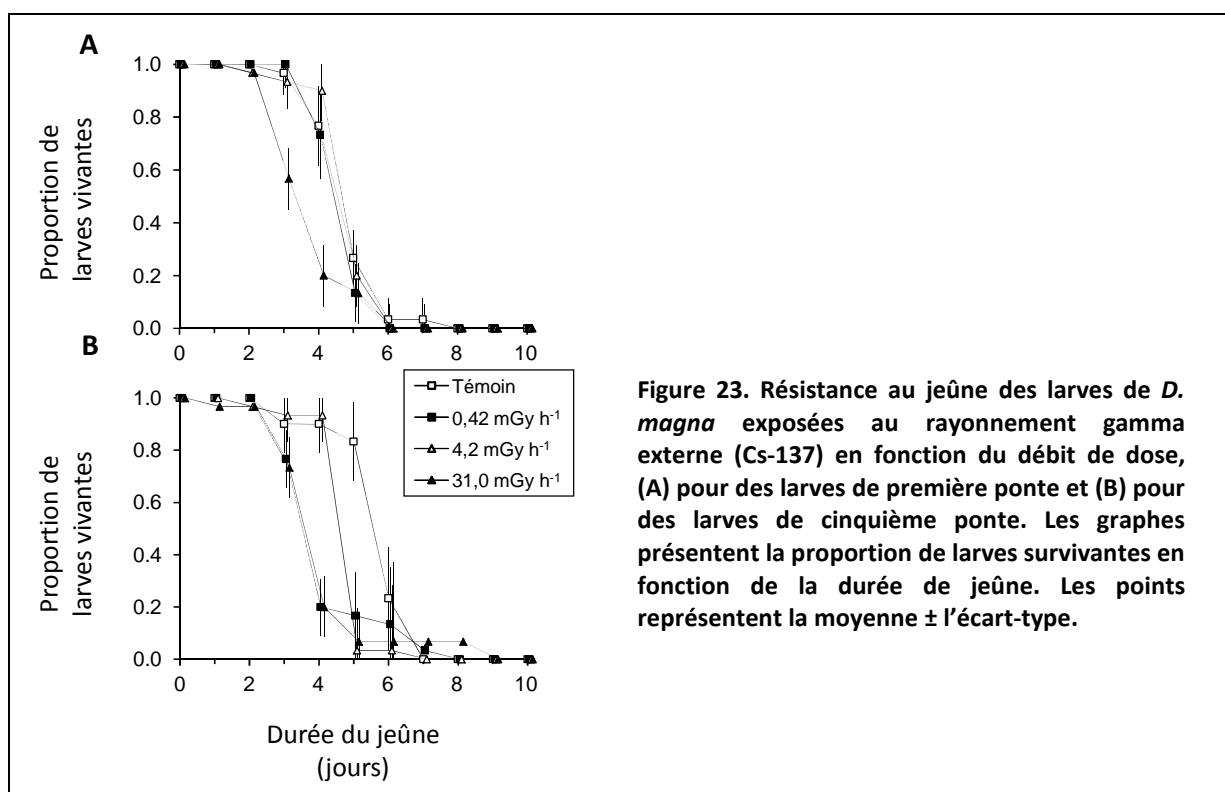
Tableau 8. Débits de dose absorbés par les daphnies au centre des unités expérimentales, estimés à l'aide de calculs de Monte Carlo N-Particle (MCNP) et mesurés avec des dosimètres radiophotoluminescent (RPL), selon l'activité de la source (en Bq) et la distance des unités expérimentales à la source (cm). Les valeurs représentent la moyenne ± la plage de variation calculée entre les parois proximales et distales des unités expérimentales. L'erreur relative est la différence (en %) entre les débits de dose estimés et mesurés.

Activité des sources	Distance des unités	Débits de dose (mGy h ⁻¹)		Erreur relative	Nombre d'unités
		Estimés	Mesurés		
1,54 GBq	4,5 cm	35,4 ± 21,2	31,9 ± 18,7	8%	2 × 12
1,54 GBq	13 cm	4,70 ± 1,34	4,45 ± 1,37	5%	2 × 12
173 MBq	13 cm	0,65 ± 0,20	0,76 ± 0,25	15%	1 × 24
17,4 MBq	13 cm	0,070 ± 0,020	0,075 ± 0,024	7%	1 × 24
1,73 MBq	13 cm	0,007 ± 0,002	0,008 ± 0,002	13%	1 × 24



mêmes stades de vie) est réalisée sur une gamme de $7 \mu\text{Gy h}^{-1}$ à $35,4 \text{ mGy h}^{-1}$, à des débits de dose pertinents du point de vue environnemental.

Les résultats mettent en évidence, comme dans le cas de l'U appauvri, une augmentation de la sévérité des effets sur la survie, la croissance et la reproduction entre les générations F0 et F2 (Parisot et al., 2015). Toutefois, les tendances s'avèrent plus complexes, avec l'observation d'effets moins prononcés au cours de la génération F1, ce qui pourrait être imputable à des processus de compensation transitoires. La mortalité après 21 jours passe de 20 à 30% entre les générations F0 et F2 exposées à $35,4 \text{ mGy h}^{-1}$ (Figure 24). A $4,70 \text{ mGy h}^{-1}$, la valeur demeure de 10% dans les générations F0 et F2. Enfin, la mortalité est



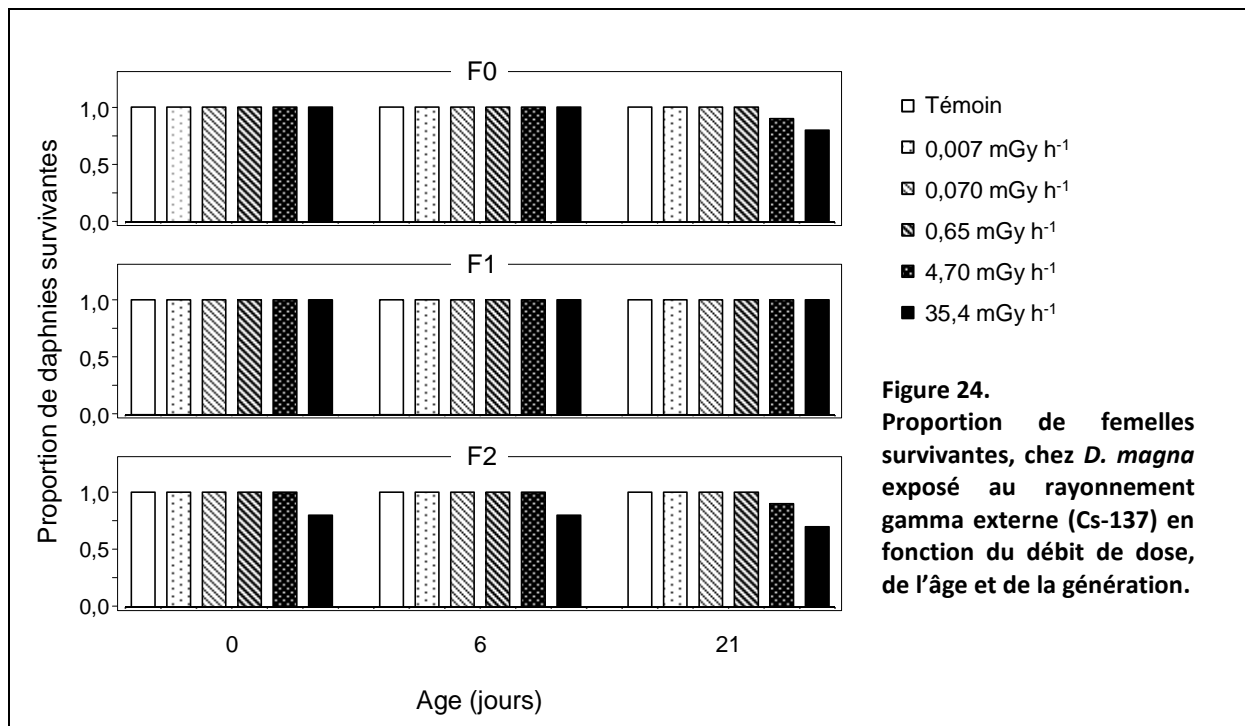


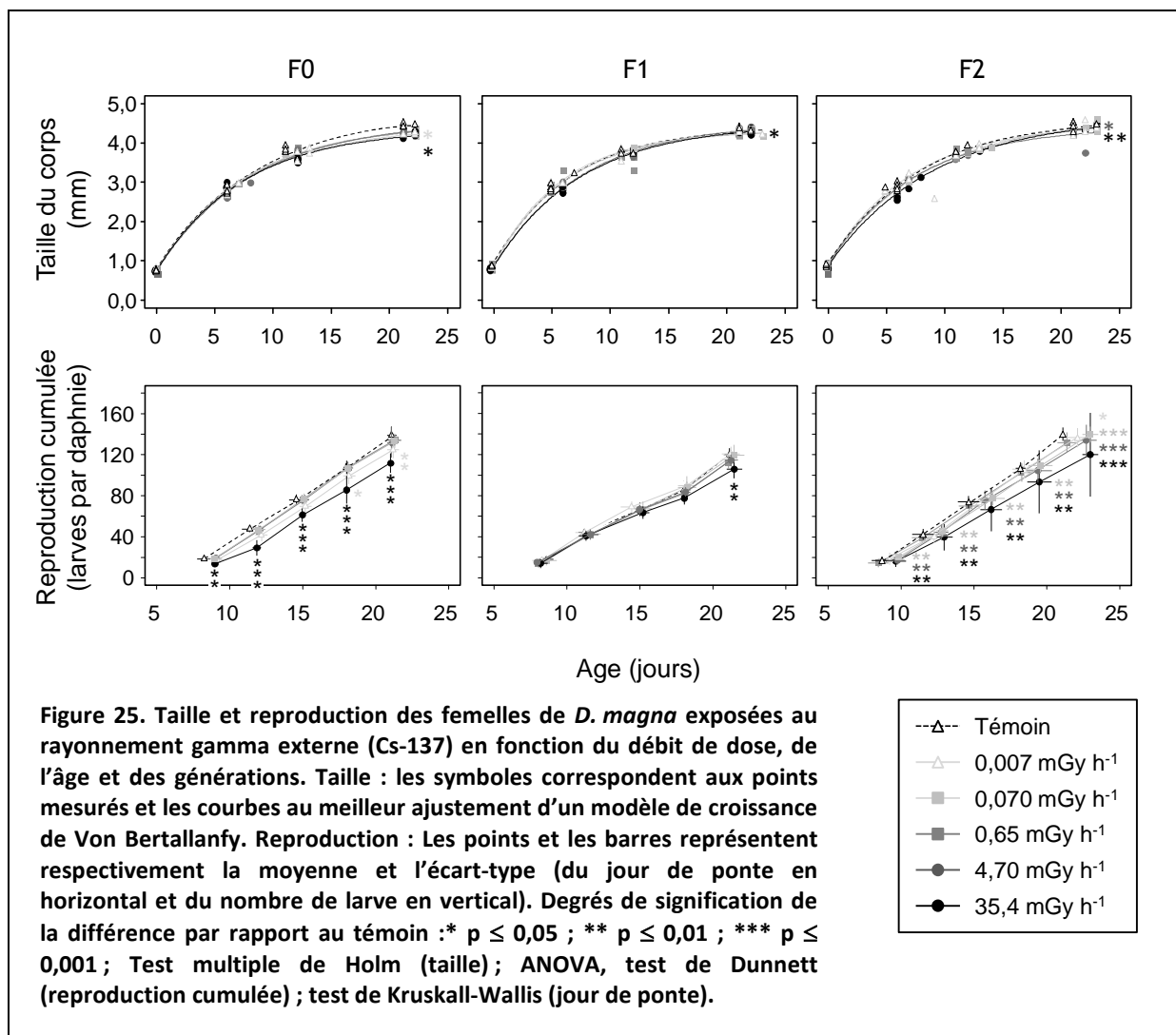
Figure 24. Proportion de femelles survivantes, chez *D. magna* exposé au rayonnement gamma externe (Cs-137) en fonction du débit de dose, de l'âge et de la génération.

absente aux autres débits de dose ($\leq 0,650 \text{ mGy h}^{-1}$). L'effet sur la survie dans la génération F0 est donc légèrement plus marqué que dans les résultats de Gilbin et al. (2008). La différence est très certainement liée à l'exposition du stade embryonnaire dans l'étude de Parisot et al. (2015). La croissance est impactée par une faible réduction de la taille maximale dans la génération F0 exposée à $35,4 \text{ mGy h}^{-1}$ (Figure 25). Des taux de croissance de Von Bertallanfy réduits de 5 et 13% sont rapportés dans la génération F2 exposée à 4,70 et $35,4 \text{ mGy h}^{-1}$. La reproduction présente, dans la génération F0, une réduction de 19% après 21 jours à $35,4 \text{ mGy h}^{-1}$, un résultat en accord avec Gilbin et al. (2008). Un certain degré de récupération est affiché de façon transitoire par la génération F1, qui n'affiche qu'une faible réduction de 12% dans la reproduction à 21 jours au débit de dose de $35,4 \text{ mGy h}^{-1}$. Dans la génération F2, la libération des pontes est retardée de 1,9 jour suite au retard de croissance, et ce à un débit de dose aussi faible que $70 \mu\text{Gy h}^{-1}$.

Tout comme lors de l'exposition à l'U appauvri, l'irradiation gamma sur 3 générations mise en place dans Parisot et al. (2015) offre une situation expérimentale dans laquelle une aggravation des effets toxiques est mise en évidence, même si les tendances observées sont plus complexes dans le cas du Cs-137. Les deux cas s'avèrent donc particulièrement propices à l'étude des dommages moléculaires, de leur accumulation éventuelle au fil des générations et de leur implication dans l'apparition de la toxicité à l'échelle de l'organisme. Ces aspects sont traités dans la partie 3.1.

2.5.4. Réversibilité des effets après une irradiation gamma parentale

L'étude expérimentale la plus récente (Trijaud et al., 2018) vise, avant tout, à démontrer l'implication des processus épigénétiques lors de la réponse transgénérationnelle de *D. magna* à l'irradiation gamma chronique et la transmission de leurs modifications à la descendance



non exposée. Un tel objectif, traité dans la partie 3.2, requiert la mise en place d'un scénario d'exposition spécifique (Skinner, 2008) impliquant l'exposition de la génération F0 au rayonnement gamma externe ($6,5 \mu\text{Gy h}^{-1}$ et $41,3 \text{ mGy h}^{-1}$) pendant 25 jours, suivie d'une phase de récupération lors des générations F1 (exposée au stade embryonnaire), F2 (exposée au stade cellule germinale) et F3 (première génération qui n'est jamais exposée). Des mesures de la survie, la croissance et la reproduction (données non présentées) sont cependant réalisées afin de tester si les effets perdurent malgré la fin de l'irradiation au moment de l'éclosion de la génération F1. Ce travail confirme la réduction de fécondité, déjà décrite par Gilbin et al. (2008) et Parisot et al. (2015), lors de l'exposition de la génération F0, et apporte de nouveaux résultats, montrant aucun effet à l'échelle de l'organisme dans les générations F1, F2 et F3. Tout semble donc indiquer une réversibilité des effets de l'irradiation gamma parentale, dès la génération F1 et ce jusqu'au débit de dose de $41,3 \text{ mGy h}^{-1}$.

2.6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

A l'issue de ce Chapitre 2, j'espère avoir démontré tout l'intérêt d'étudier, à l'aide d'un modèle biologique comme la daphnie, la toxicité des radionucléides au cours d'expositions

multigénérationnelles. Celles-ci permettent de montrer que les effets toxiques s'aggravent lorsque l'exposition se prolonge sur plusieurs générations et ce pour tous les radionucléides testés. D'une manière générale, les recherches menées ici ne remettent pas en cause la validité des tests de toxicité chroniques, trouvés dans la littérature et restreints dans la majorité des cas à une génération ou un stade de vie – en particulier ceux menés dans le cadre d'une évaluation du risque dans le cadre strictement réglementaire – mais ils interrogent quant à la capacité de leurs résultats à refléter la toxicité sur le long terme d'un contaminant, qu'elle soit chimique ou radiologique. Sachant qu'une exposition prolongée est plus représentative de la situation réelle d'une population, la question se pose de savoir dans quelle mesure, les effets mesurés lors de tests limités dans le temps permettent de répondre correctement à l'objectif de la radioprotection de l'environnement, qui est de protéger les espèces présentes dans le milieu à l'échelle des populations (et nous verrons dans le Chapitre 5, quelles implications supplémentaires cet objectif peut avoir, dès lors que l'on cherche à évaluer, pour un effet mesuré à l'échelle de l'organisme, les conséquences potentielles sur la dynamique de population). Même si les expositions multigénérationnelles sont plus représentatives de la réponse de la population, il n'en demeure pas moins que les conditions de nos expérimentations – nourriture *ad libitum*, concentration ou débit de dose constant – restent très éloignées de la situation réelle et on peut se demander comment la sensibilité des organismes serait influencée par une densité de nourriture ou un niveau d'exposition variables dans le temps, contraintes auxquelles les organismes doivent constamment faire face dans le milieu.

Appréhender la toxicité de façon intégrative, sur les principaux traits biologiques à l'échelle de l'organisme et sur le cycle de vie entier de l'espèce, représente un important gain de pertinence, tant il semble peu probable, pour une population dans l'environnement, qu'un stade de vie particulier soit exposé tandis que les autres ne le soient pas. De ce point de vue, nos résultats reflètent l'importance de bien prendre en compte le stade embryonnaire, dont l'exposition contribue à une plus grande sévérité des effets et à son augmentation transgénérationnelle lors des expositions à l'U appauvri et aux rayonnements alpha (Massarin et al., 2010 ; Alonzo et al., 2008a). Le stade embryonnaire est souvent décrit dans la littérature comme stade critique lors des expositions aux rayonnements ionisants – en cela que son exposition entraîne une réponse toxique plus sévère, en particulier aux débits de dose entraînant des malformations létales (Adam-Guillermin et al., 2012 ; Dallas et al., 2012). La sensibilité d'un stade de vie donné est – fort logiquement – testée en exposant ce stade seul. Or cette approche est remise en cause par les travaux de Plaire et al. (2013) qui montrent que l'exposition des embryons peut apparaître sans conséquence ultérieure lorsqu'elle est testée seule et montrer, aux mêmes concentrations, son influence significative lorsque l'exposition est élargie au cycle de vie entier.

Puisque les effets de l'U appauvri et des rayonnements gamma continue d'augmenter entre les générations F1 et F2, même quand toutes deux sont strictement exposées aux mêmes stades (Massarin et al., 2010 ; Parisot et al., 2015), on pourrait se demander, de la même manière, si l'intensité de la toxicité n'est pas liée à l'exposition des grands-parents – qui a lieu pour la génération F2 (génération F0) mais pas pour la génération F1. L'hypothèse pourrait

être testée en prolongeant l'exposition pour comparer les générations F2 et F3 strictement identiques de ce point de vue. La question demeure donc de savoir si l'exposition de tous les stades de vie et du plus grand nombre de générations contribue à un accroissement continu de l'intensité des effets ou si un maximum peut être atteint, et si oui après combien de générations exposées ? Assiste-t-on sur le long terme au développement d'une réponse adaptative, suite à la sélection des individus les plus résistants, telle qu'on l'observe chez le nématode *C. elegans* (Dutilleul et al., 2013, 2017 ; Goussen et al., 2013, 2015a), dans des populations qui présentent une plus grande diversité génétique ? Le cas échéant, à quel coût adaptatif intervient cette sélection ?

Ces travaux ouvrent finalement des perspectives innombrables, si l'on songe aux radionucléides dont la toxicité mériterait d'être testée par la même approche multigénérationnelle. Ceux-ci peuvent être classés par ordre d'importance en termes d'évaluation du risque écologique pour le milieu aquatique (Tableau 9), selon leur abondance dans les rejets, leur propension à contaminer les composants de l'écosystème et à y produire un débit de dose, etc. (Beaugelin-Seiller et al., 2019).

Tableau 9. Les dix plus importants radionucléides (et ceux qui ont été étudiés en gras), par ordre décroissant, pour le risque estimé aux écosystèmes aquatiques continentaux, lors de scénarios d'exposition chronique aux rejets d'effluents liquides par les CNPE (Beaugelin-Seiller et al., 2019).

Rang	Fonctionnement normal	Démantèlement
1	^{14}C	^{60}Co
2	$^{110\text{m}}\text{Ag}$	^{14}C
3	^{60}Co	^{244}Cm
4	^{58}Co	^{137}Cs
5	^3H	^{63}Ni
6	^{134}Cs	^{241}Am
7	^{137}Cs	^{237}Np
8	^{54}Mn	^{152}Eu
9	^{124}Sb	^3H
10	^{125}Sb	^{134}Cs

Chapitre 3

Etude des processus génétiques et épigénétiques

Sommaire

3.1. Une accumulation d'altérations de l'ADN	121
3.1.1. Quantification par la technique RAPD-qPCR	121
3.1.2. Suivi dynamique de la génotoxicité de l'U appauvri.....	122
3.1.3. Suivi dynamique de la génotoxicité du rayonnement gamma.....	124
3.2. Induction et hérédité des modifications épigénétiques	124
3.2.1. Analyse de la méthylation de l'ADN par séquençage bisulfite.....	124
3.2.2. Variations de la méthylation de l'ADN lors de l'irradiation gamma	127
3.3. Conclusions et perspectives	130
3.3.1. Dommages ADN et effets macroscopiques.....	130
3.3.2. Mécanismes de compensation	131
3.3.3. Conséquences des modifications épigénétiques	132

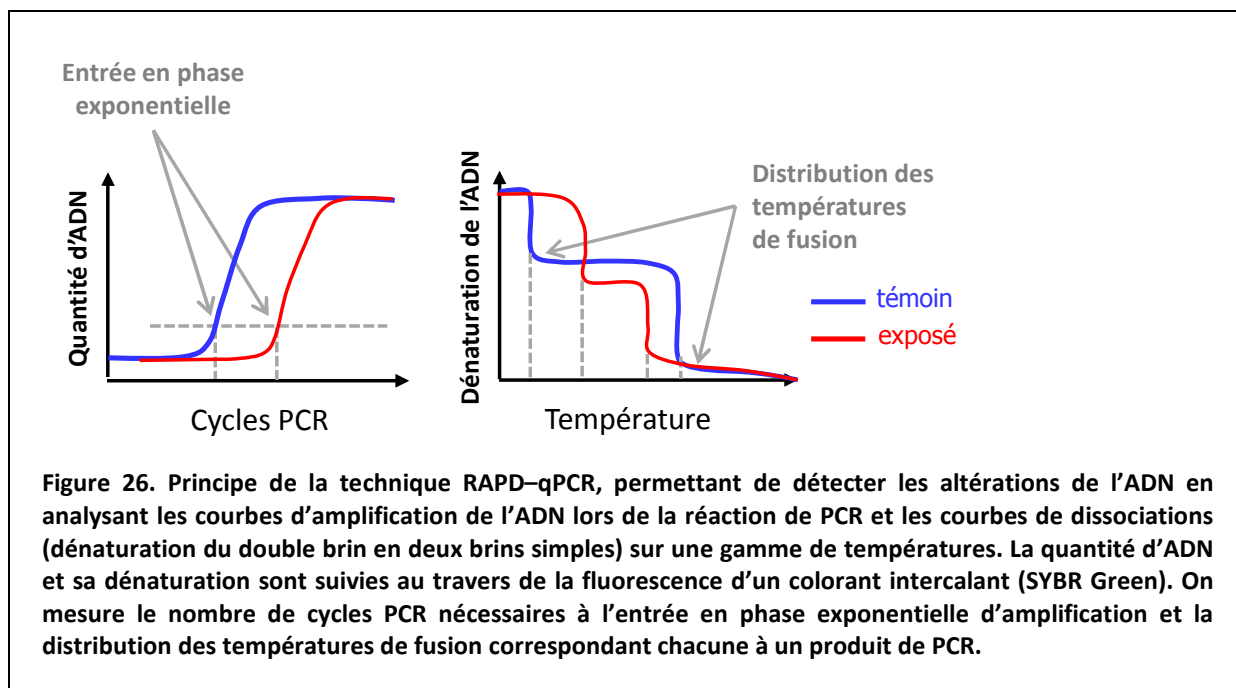
3.1. UNE ACCUMULATION D'ALTERATIONS DE L'ADN

3.1.1. Quantification par la technique RAPD–qPCR

L'ensemble des études portant sur les altérations de l'ADN chez les daphnies exposées à l'U appauvri et au rayonnement gamma (Plaire, 2013 ; Parisot, 2015) fait l'objet d'une collaboration avec le Pr. Jean-Paul Bourdineaud (UMR 5805) de l'Université Bordeaux 1. L'un des objectifs des thèses de Delphine Plaire et Florian Parisot est de mesurer les variations des dommages à l'ADN à différents niveaux et temps d'exposition, au cours de plusieurs générations exposées. Dans cette optique, la technique dite RAPD (pour *Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction*) s'est rapidement imposée comme l'outil idéal permettant d'analyser le grand nombre d'échantillons envisagé, et ce de façon rapide, reproductible, économique, et sur des quantités d'ADN aussi faibles que ~20 ng (Atienzar et Jha, 2006). La méthode, déjà utilisée avec succès chez *D. magna* pour caractériser les dommages à l'ADN induit par différents polluants chimiques (Atienzar et al., 1999 ; Atienzar et Jha, 2004), fait l'objet de tests préliminaires permettant d'ajuster le nombre et la taille des réplicats par traitement, pour extraire la quantité d'ADN nécessaire et obtenir la puissance statistique souhaitée. Ceux-ci s'élèvent à 7–8 réplicats (25 individus par réplicat) pour les échantillons de daphnies fraîchement écloses (< 24 h) et à 5 réplicats (un individu par réplicat, quel que soit son âge – 9 ou 21 jours) pour les échantillons de daphnies adultes.

La méthode RAPD détecte une large gamme d'altérations et de mutations de l'ADN sur l'ensemble du génome, sans que ce dernier nécessite d'être préalablement séquencé chez l'espèce étudiée. Elle repose sur le principe d'une analyse de fragments d'ADN amplifiés par PCR à l'aide d'amorces aléatoires – dans notre cas des oligonucléotides décarnères, OPA9 et OPB10, issus du poisson zèbre *D. rerio*. L'analyse des produits de PCR, initialement réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose (Atienzar et al., 1999), est critiquée pour l'interprétation difficile des bandes sur gels et pour les problèmes d'amplification qui entraînent un manque de reproductibilité (Atienzar et Jha, 2006). La méthode est significativement améliorée grâce à la PCR quantitative (Cambier et al., 2010). Celle-ci permet une meilleure efficacité d'hybridation des amorces sur l'ADN génomique et offre la possibilité de suivre la cinétique d'amplification de l'ADN à chaque pas de la réaction et de caractériser les profils des produits de PCR en examinant la distribution des températures de fusion. La sensibilité et la précision de la RAPD–qPCR permet d'évaluer la génotoxicité des polluants chez de nombreuses espèces telles que le poisson zèbre *D. rerio*, l'huître creuse *Crassostrea gigas*, le mollusque marin *Ruditapes phillipparum*, le polychète marin, *Hediste diversicolor*, et la daphnie *D. magna* (Cambier et al., 2010 ; Orioux et al., 2011 ; Geffroy et al., 2012 ; Lerebours et al., 2013 ; Mat et al., 2013 ; Dedeh et al., 2014).

La quantité d'ADN amplifié et la nature des produits de PCR obtenus (Figure 26) dépendent du nombre et de la position des sites d'hybridation des amorces sur l'ADN génomique amplifié. Toute modification, création ou de perte d'un ou plusieurs sites d'hybridation va entraîner une variation de la cinétique d'amplification et/ou de la composition en produits de PCR. On peut donc détecter la moindre altération dans l'ADN



génomique en comparant le nombre de cycles PCR nécessaires à l'entrée en phase exponentielle d'amplification (C_t) et la distribution des températures de fusion (T_m) caractérisant chacune un produit de PCR, entre les daphnies exposées et témoins. Le nombre de sites d'hybridation par unité de génome peut même être quantifié en réalisant une RAPD-qPCR de référence à l'aide du gène *Eno* de *D. magna* codant pour l'enzyme énoïase (Numéro d'accès à GenBank : JN994253).

L'idée des études de Plaire et al. (2013) et Parisot et al. (2015) est de réaliser, en fonction du niveau d'exposition, un suivi dynamique de la génotoxicité au fil des générations successives, en profitant donc à plein du faible coût des analyses RAPD-qPCR. Pour ce faire, des échantillons d'ADN sont collectés au cours de chaque génération, à l'éclosion et à la libération des pontes 1 et 5. Ce suivi couvre les générations F0 et F1, jusqu'à l'éclosion de la F2, dans le cas des expositions à l'U appauvri selon les trois scénarios décrits plus haut (Tableau 10) et les générations F0, F1 et F2, jusqu'à l'éclosion de la génération F3 dans le cas des rayonnements gamma (Tableau 11). D'autres échantillons (les F1', F2' et F3' issus de la ponte 1 par exemple) font également l'objet d'une analyse, dont on ne redécrit pas les résultats ici.

3.1.2. Suivi dynamique de la génotoxicité de l'U appauvri

Lors de l'exposition continue à l'U appauvri, les résultats de RAPD-qPCR reflètent une accumulation d'altérations de l'ADN au fil des générations (Tableau 10). On voit ainsi le nombre de différences significatives croître au fil des générations pour un niveau d'exposition donné. De plus, les altérations de l'ADN semblent s'accumuler avec une cinétique d'autant plus rapide que le niveau d'exposition est élevé. L'apparition des premières différences est plus précoce aux plus fortes concentrations – dès l'éclosion de la génération F0 à partir de $9,9 \mu\text{g L}^{-1}$ – qu'à la plus faible – à partir de l'éclosion de la génération F1 à $2 \mu\text{g L}^{-1}$. Si l'on

considère ce qui se passe à un moment donné de l'expérience – celui de la libération de la ponte 5, par exemple, dans la génération F0 ou F1 (colonnes « P5 ») – on constate le nombre croissant de différences significatives avec la concentration. Seul le nombre moins élevé d'altérations observé au moment de la libération des pontes 1 (colonnes « P1 ») dans les générations F0 et F1, vient nuancer ce schéma d'accumulation, ce qui pourrait être interprété comme l'effet de la dilution des altérations par la croissance des daphnies.

L'accumulation d'altérations de l'ADN au fil des générations s'observe aussi lors de l'exposition post-éclosion (Tableau 10), à cette différence près, que l'augmentation de génotoxicité semble moins rapide que lors de l'exposition continue. On voit par exemple que les premières différences apparaissent plus tardivement pour une concentration donnée : à l'éclosion de la génération F1 à 9,9 µg L⁻¹ quand on les observait dès l'éclosion de la génération F0 lors de l'exposition continue ; à l'éclosion de la génération F2 à 2 µg L⁻¹ quand on les observait à l'éclosion de la génération F1 etc. Enfin, lorsque l'exposition est limitée au stade embryonnaire, la génotoxicité semble beaucoup moins intense par rapport aux autres scénarios d'exposition. La tendance au cours des générations reflète même une décroissance. Les altérations, nombreuses au moment de l'éclosion de la génération de F0 (même à la concentration de 2 µg L⁻¹), deviennent non significatives en fin d'expérience.

Tableau 10. Synthèse des résultats RAPD–qPCR. Altérations de l'ADN significativement détectées ($p \leq 0,05$) entre les daphnies témoins et exposées, selon les différents scénarios (expositions continue, post-éclosion et embryonnaire) à la gamme de concentrations d'U appauvri, dans les générations F0, F1 et F2, à l'éclosion (colonne « N0 ») et au moment de la libération des pontes 1 et 5 (colonnes « P1 » et « P5 » respectivement). Les résultats obtenus avec chaque amorce (OPA9 ou OPB10) sont respectivement reportés à gauche et à droite des barres obliques : une seule astérisque ([*/] ou [/*]) indique la détection d'une différence significative sur Ct ou Tm de l'amorce considérée ; une double astérisque ([**/] ou [/]) indique la détection de deux différences significatives à la fois sur Ct et Tm de l'amorce considérée ; une barre oblique sans astérisque [/] indique que des altérations de l'ADN n'ont été détectées avec aucune des deux amorces ; « – » signifie qu'aucune analyse ne peut être conduite au moment de l'éclosion, puisque le stade embryonnaire n'est pas exposé.**

Scénario d'exposition Concentration	F0			F1			F2
	N0	P1	P5	N0	P1	P5	N0
Exposition continue							
2,0 µg L ⁻¹	/	/	/	*/*	*/*	**/	**/*
9,9 µg L ⁻¹	*/	/	*/	**/	/*	**/	**/*
22,2 µg L ⁻¹	*/	/	**/	/*	/	*/	**/*
50 µg L ⁻¹	*/	/	*/*	**/*	/	**/*	**/*
Exposition post-éclosion							
2,0 µg L ⁻¹	–	/*	/	/	/	/	*/**
9,9 µg L ⁻¹	–	/	/	/*	**/	*/**	/**
22,2 µg L ⁻¹	–	*/	*/	**/*	*/	**/**	**/**
50 µg L ⁻¹	–	/	*/	*/	/	*/	/**
Exposition embryonnaire							
2,0 µg L ⁻¹	**/*	/	*/	/	/	*/	/*
9,9 µg L ⁻¹	**/*	**/**	/	*/	/	/*	/
22,2 µg L ⁻¹	*/**	*/	/	/*	/*	/*	/*
50 µg L ⁻¹	*/	*/	**/*	**/*	/	/*	/*

3.1.3. Suivi dynamique de la génotoxicité du rayonnement gamma

Comme précédemment, l'exposition continue au rayonnement gamma entraîne une accumulation d'altérations de l'ADN au fil des générations, mais cette fois la cinétique s'avère beaucoup plus complexe (Tableau 11). On voit ainsi un nombre croissant de différences significatives apparaître au cours de la génération F0. Leur cinétique est d'autant plus rapide que le niveau d'exposition est élevé : les premières différences apparaissent dès l'éclosion aux plus forts débits de dose (4,70 et 35,4 mGy h⁻¹), à la libération de la ponte 1 au débit de dose intermédiaire (0,650 mGy h⁻¹) et à la libération de la ponte 5 aux plus faibles débits de dose (7 et 70 µGy h⁻¹). Au cours de la génération F1, les altérations de l'ADN, très nombreuses au moment de l'éclosion semblent temporairement se réparer pour devenir quasiment absentes au moment de la libération de la ponte 5. Au cours de la génération F2 enfin, les différences réapparaissent en nombre à partir de la libération de la ponte 1, et ce à tous les débits de dose. Au final, le schéma général reflète une augmentation des altérations entre les générations F0 et F2, avec une réparation transitoire au cours de la génération F1.

3.2. INDUCTION ET HEREDITE DES MODIFICATIONS EPIGENETIQUES

3.2.1. Analyse de la méthylation de l'ADN par séquençage bisulfite

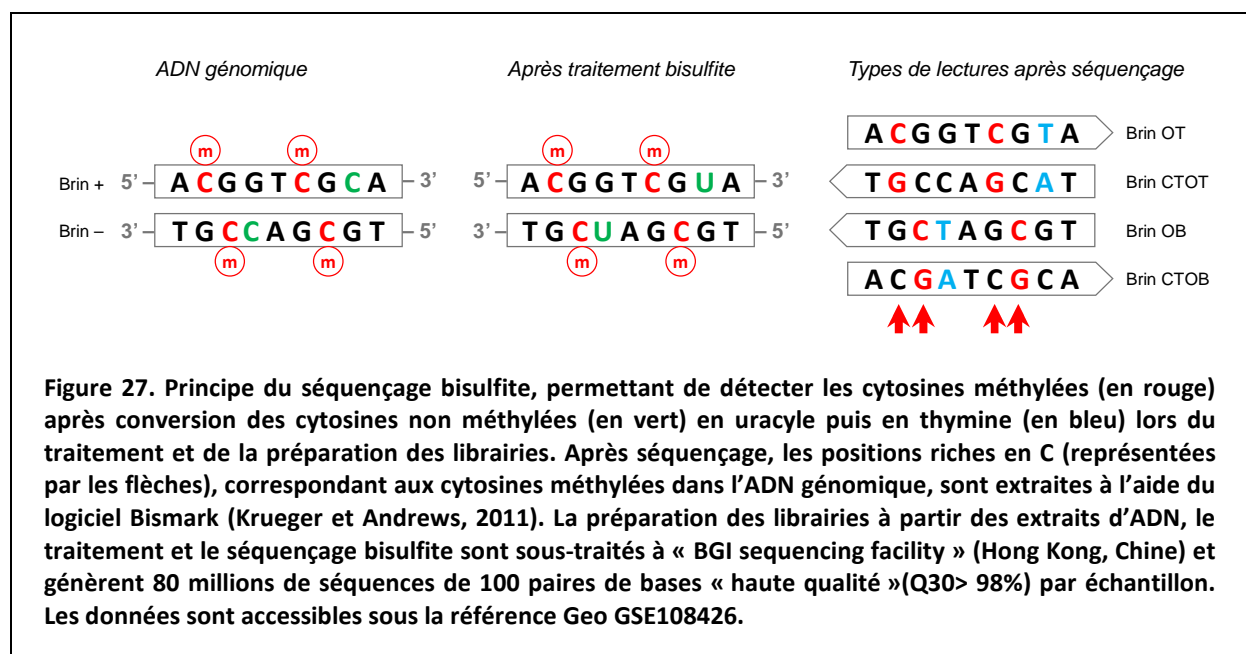
Au cours des dernières années, les progrès des méthodes d'analyse ont permis d'explorer le rôle de la méthylation de l'ADN chez les invertébrés, avec un nombre croissant de méta-analyses des séquences de génomes et de méthylomes disponibles (Regev et al., 1998 ; Lyko et al., 2010 ; Xiang et al., 2010 ; Bonasio et al., 2012 ; Falckenhayn et al., 2013 ; Rivière, 2014 ; Wang et al., 2014 ; Asselman et al., 2016, 2017). La méthylation a été examinée à l'échelle du génome entier, mettant en lumière les variations entre tissus, entre stades de développement, entre castes, entre espèces, ou encore lors d'exposition à un stress environnemental (Wilson et al., 2006 ; Maleszka, 2008 ; Elango et al., 2009 ; Vandegheuchte

Tableau 11. Synthèse des résultats RAPD-qPCR. Altérations de l'ADN significativement détectées ($p \leq 0,05$) entre les daphnies témoins et exposées à la gamme de débits de dose gamma (Cs-137), dans les générations F0, F1 et F2, à l'éclosion (colonne « N0 ») et au moment de la libération des pontes 1 et 5 (colonnes « P1 » et « P5 » respectivement). Les résultats obtenus avec chaque amorce (OPA9 ou OPB10) sont respectivement reportés à gauche et à droite des barres obliques : une seule astérisque ([*/] ou [/*]) indique la détection d'une différence significative sur Ct ou Tm de l'amorce considérée ; une double astérisque ([**/] ou [/]) indique la détection de deux différences significatives à la fois sur Ct et Tm de l'amorce considérée ; une barre oblique sans astérisque [/] indique que des altérations de l'ADN n'ont été détectées avec aucune des deux amorces.**

Débit de dose (mGy h ⁻¹)	F0			F1			F2			F3
	N0	P1	P5	N0	P1	P5	N0	P1	P5	N0
0,007	/	/	**/**	**/	/	/	/	**/**	*/	/*
0,070	/	/	**/*	/*	/	**/	/*	/*	**/**	/
0,650	/	*/	/*	/**	/	/	/	/**	**/**	/*
4,70	/**	*/	/**	**/*	/*	/	/	/*	**/**	/*
35,4	**/**	**/**	**/**	/*	/*	/*	/	/*	**/**	**/**

et al., 2009, 2010b ; Lyko et al., 2010 ; Bonasio et al., 2012 ; Ding et al., 2015 ; Oppold et al., 2015 ; Nilsen et al., 2016). Comme chez les vertébrés, la méthylation de l'ADN semble intervenir préférentiellement au niveau des sites CpG (c'est-à-dire, des cytosines immédiatement suivies d'une guanine) dans les zones géniques, tandis que la méthylation est moins souvent observée hors des CpG ou dans les zones intergéniques. (Bonasio et al., 2012 ; Ren et al., 2011 ; Manikkam et al., 2013). Tandis qu'une quantification du taux global de méthylation n'offre pas le niveau de précision nécessaire pour éclaircir les mécanismes de la réponse épigénétique (Ren et al., 2011 ; Bollati et Baccarelli, 2010 ; Asselman et al., 2015), l'analyse de la méthylation au niveau de chaque cytosine par séquençage du génome entier permet d'identifier les gènes impliqués dans la réponse aux stress environnementaux (Asselman et al., 2017). Parmi les méthodes couramment utilisées pour analyser la méthylation de l'ADN (immunoprécipitation de l'ADN méthylé, utilisation d'enzymes de restriction sensibles à la méthylation de l'ADN, etc.), le séquençage direct de l'ADN traité au sodium bisulfite a notre préférence lors de la thèse de Marie Trijau (Trijau, 2018) car la technique est déjà adaptée avec succès au cas de *D. magna* exposé aux cyanobactéries toxiques (Asselman et al., 2017). Ce travail donne lieu à une collaboration avec le Pr. Karel De Schamphelaere et le Dr. Jana Asselman (Laboratory of Environmental Toxicology and Aquatic Ecology) de l'Université de Gand.

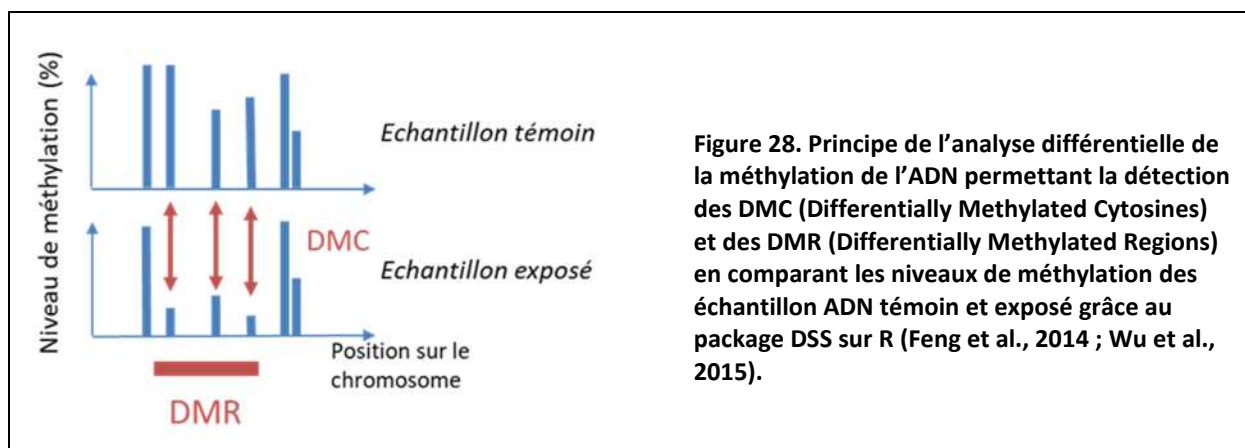
Le principe du séquençage bisulfite (Figure 27) repose sur la conversion des cytosines non méthylées en uracile suite au traitement de l'ADN au sodium bisulfite, conversion qui n'affecte pas les cytosines méthylées ou hydroxyméthylées. Les uraciles produits sont à leur tour convertis en thymines lors de l'amplification par PCR préalable au séquençage. Pour chaque fragment d'ADN génomique, le séquençage bisulfite des deux brins (+ et -) produit quatre lectures (OT, OB, CTOT et CTOB) qui peuvent être alignées sur un génome de référence annoté (dans notre cas, *D. magna* v2.4, Bioproject PRJNA298946 dans NBBI).



L'approche discrimine donc, dans la séquence du génome, les cytosines méthylées de celles qui ne le sont pas, et fournit le nom des gènes et des régions génomiques concernés par les modifications de méthylation et leur(s) fonction(s) associée(s). Parce que l'analyse de la méthylation repose sur la conversion, le séquençage préalable d'un échantillon d'ADN non traité au bisulfite (blanc) est nécessaire pour cartographier toutes les cytosines où s'observe une variabilité génétique entre individus témoins (non exposés) et le génome de référence. Ces cytosines ne sont pas prises en compte dans l'analyse pour ne pas risquer d'être confondues avec la conversion cytosine–thymine liée au traitement bisulfite (Li, 2011 ; Dac-Roszak et al., 2015).

L'analyse différentielle de la méthylation (Figure 28) vise à détecter, dans chaque traitement exposé, les cytosines et groupes de cytosines (DMC et DMR, pour differentially methylated cytosines et differentially methylated regions) dont le niveau de méthylation diffère significativement du traitement témoin de la même génération (avec une probabilité corrigée $\leq 5\%$). Les DMR sont définies comme des régions d'au moins 50 paires de bases, comportant au moins 5 sites CpG dont une fraction de 50% est différentiellement méthylée. Comme le séquençage bisulfite est mené sur l'ADN extrait de daphnies entières impliquant diversité significative entre les cellules, des cytosines méthylées et déméthylées peuvent être observées au niveau d'un même site CpG. La solution consiste à calculer le niveau moyen de méthylation de la cytosine. Il est obtenu en divisant le nombre de lectures correspondant à l'état méthylé sur le nombre total de lectures de la cytosine considérée. Différents critères de qualités sont pris en compte, conformément aux recommandations des différents auteurs (Bonasio et al., 2012 ; Huh et al., 2019). Une cytosine méthylée n'est ainsi prise en compte qu'à la condition d'être lue au moins 5 fois. L'efficacité de la conversion bisulfite (99.4 à 99.6% dans nos analyses) est estimée à partir d'un brin d'ADN viral (phage Lambda) non méthylé, afin de détecter les faux positifs, correspondant aux cytosines non méthylées qui n'auraient pas été converties par le traitement. Les cytosines qui ne présentent aucune variation dans leur niveau de méthylation entre les traitements sont exclues de l'analyse différentielle.

L'analyse fonctionnelle identifie, quand c'est possible, le type de région – intron, exon ou région intergéniques – auquel appartient chaque DMC et DMR détectée. Elle se base sur les annotations du génome de *D. magna* (daphmagna_2011pubfc8.gff3) disponibles sur



wFleabase.org (Orsini et al., 2017). Une analyse d'enrichissement examine à l'aide d'un test de Fisher si les différentes régions présentent un nombre significativement plus élevé de DMC par rapport à une distribution aléatoire sur l'ensemble des CpG. La probabilité est corrigée selon la méthode FDR (pour « *False Discovery Rate* ») de Benjamini et Hochberg (1995). L'information disponible est relativement pauvre chez *D. magna*, ce qui impose de limiter l'analyse à l'identification de la fonction des gènes, selon la classification KOG (pour « Eukaryotic orthologous genes ») des gènes orthologues issu d'une autre espèce de daphnie taxonomiquement proche (*D. pulex*) disponible sur le site internet du Joint Genomic Institute (<http://genome.jgi.doe.gov/cgi-bin/kogBrowser?db=Dappu1>) (Tatusov et al., 2003).

3.2.2. Variations de la méthylation de l'ADN lors de l'irradiation gamma

Dans l'étude de Trijau et al. (2018), les analyses par séquençage bisulfite sont conduites sur neuf échantillons : trois niveaux d'exposition – un témoin et les deux débits de dose – multiplié par trois générations – F0, F2 et F3. Le choix des débits de dose gamma se base sur les résultats de notre étude précédente (Parisot et al., 2015) : 41,3 mGy h⁻¹ est un niveau d'exposition auquel une génotoxicité et une reprotoxicité sont détectées dès la génération F0 ; et 6,5 µGy h⁻¹ un niveau d'exposition auquel une génotoxicité est détectée tardivement chez les adultes F0, sans effet observé sur la reproduction dans les générations F0, F1 et F2. L'idée est d'examiner si des modifications épigénétiques sont induites dans la génération F0, exposée tout au long de son cycle de vie, et de tester si des modifications sont susceptibles d'être transmises entre la génération F2, exposée au stade cellule germinale, et la génération F3 non exposée. L'extraction d'ADN est réalisée sur le génome entier à partir de daphnies adultes, de même âge, après élimination des œufs présents dans la poche incubatrice, afin d'éviter un mélange illisible de différents stades de vie. Deux à huit daphnies entières sont nécessaires pour fournir la quantité d'ADN requise par échantillon. L'utilisation de plusieurs individus au sein du même échantillon ne pose pas de problème, puisque les daphnies sont des clones génétiquement identiques. La taille des daphnies est trop petite pour permettre une séparation propre des différents tissus et types cellulaires, bien qu'ils puissent fortement différer par leur profil épigénétique. Six analyses différentielles de la méthylation sont menées à savoir entre chacun des deux débits de dose testés et le témoin, multiplié par les trois générations (F0, F2 et F3). Trois analyses différentielles complémentaires sont réalisées entre les témoins des différentes générations prises deux à deux, afin de déterminer quelles DMC sont vraisemblablement le fruit d'une variation entre les générations chez les daphnies non exposées plutôt qu'une réelle réponse aux rayonnements ionisants. Ces DMC représentent la moitié des DMC détectées dans plusieurs générations, ce qui est à prendre en compte dans les interprétations.

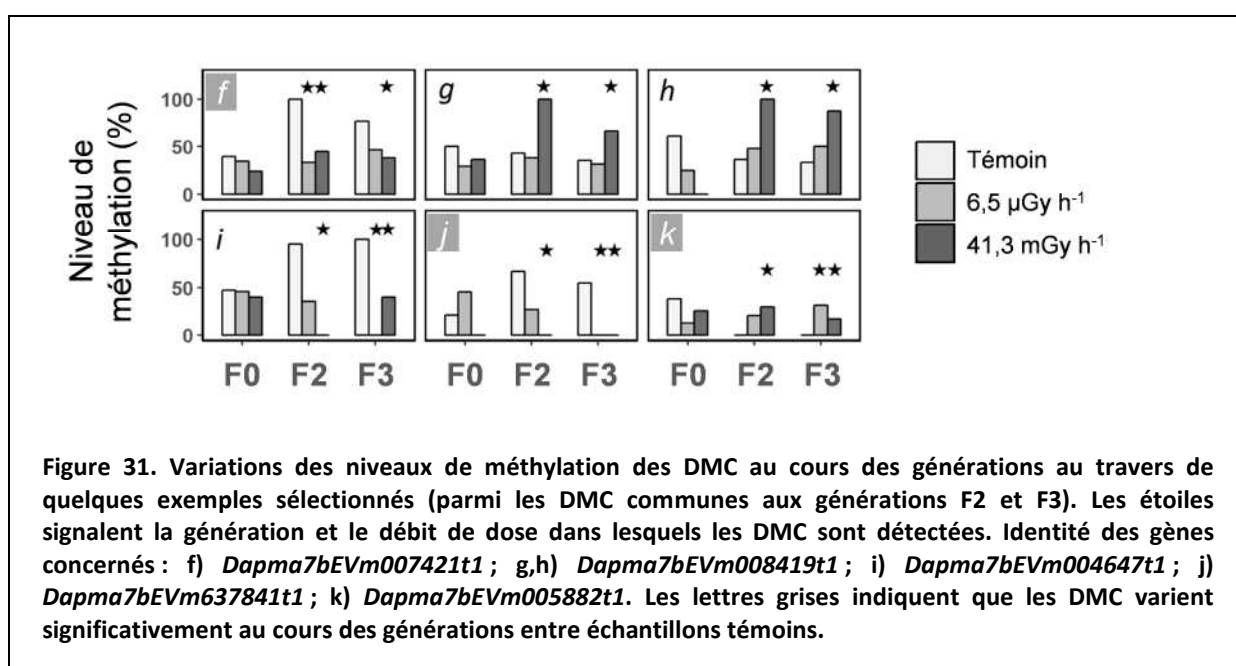
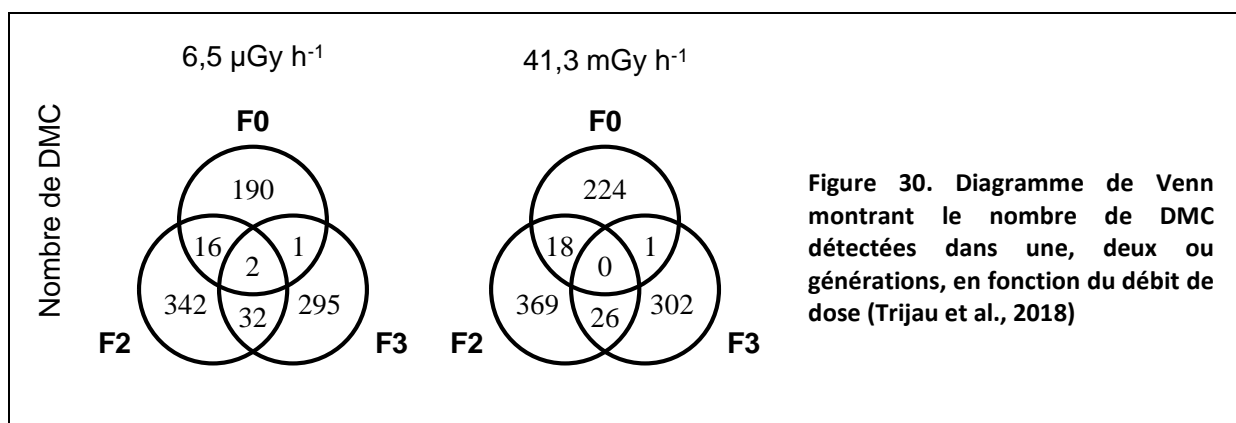
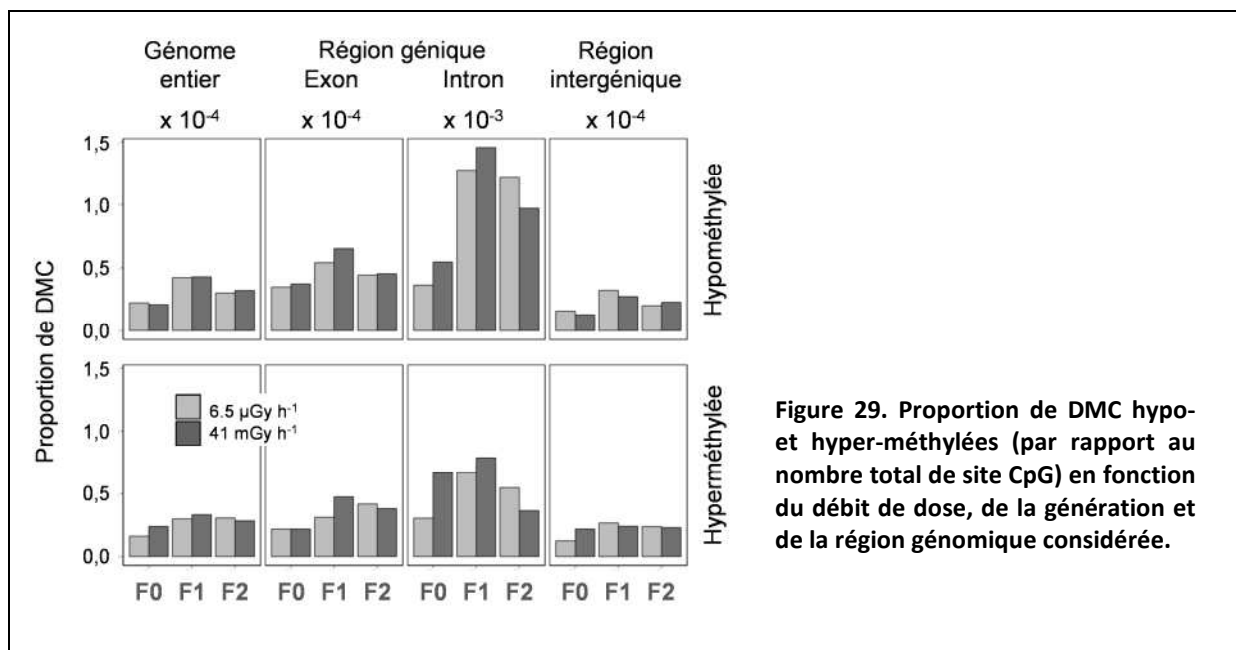
Parmi les 5,4 millions de CpG identifiés dans le génome des daphnies, plus de 98% ne présentent aucune variation de leur niveau de méthylation. Si l'on raisonne à l'échelle du génome entier, les résultats ne révèlent aucune variation significative de la méthylation de l'ADN entre les traitements, avec une valeur moyenne de 0,85%, tout à fait en accord avec les études antérieures sur *D. magna* et les invertébrés (Asselman et al., 2015, 2016 ; Vandegheuchte et al., 2009). Notre acuité change dès lors que l'on se penche plus précisément

sur ce qui se passe au niveau de chacun des 74 020 CpG, présentant une variation du niveau de méthylation et inclus dans l'analyse différentielle. Alors que les effets sur la reproduction, observés lors de l'irradiation gamma de la génération F0, sont absents dans la progéniture non exposée (voir paragraphe 2.5.4), un nombre important de DMC (cytosines différenciellement méthylées), de 209 à 413 selon les traitements, est observé dans toutes les générations (Tableau 12). Ces DMC correspondent pour une petite majorité (50 à 59%) à de l'hypométhylation – définie par un niveau de méthylation significativement plus faible que celui observé au même CpG chez le témoin. Leur abondance semble indépendante du débit de dose absorbé. Une petite fraction des DMC est commune aux différents débits de dose et est représentée pour 68 à 86% à des hypométhylations. Les DMR (régions de 50bp comprenant au moins trois DMC) sont détectées en très faible nombre, de 4 à 9 selon les traitements, ce qui est à rapprocher de la rareté des DMC dans le génome (moins de 2% des CpG). Pour autant, les DMC hypo- et hyperméthylées ne se distribuent pas au hasard : elles sont 20 fois plus abondantes dans les introns (parties codantes des gènes) que dans les autres régions génomiques (Figure 29), ce qui laisse pressentir un rôle fonctionnel essentiel.

Certaines des DMC sont communes à plusieurs générations et leur nombre est beaucoup plus élevé que ce qu'on pourrait attendre d'une distribution aléatoire et s'étend à la génération F3 non exposée (Figure 30). Cela signifie que les chances d'observer une modification de méthylation dans la progéniture sont beaucoup plus élevées dès lors que la variation a été observée chez le parent. En outre, une comparaison des niveaux de méthylation des DMC montre que ceux-ci sont similaires entre les générations (Figure 31). L'explication la plus simple à ces observations est que les DMC sont transmises d'une génération à la suivante, via la lignée germinale. Le fait que la génération F0 partage moins de DMC avec les autres générations peut être expliquée en supposant qu'une fraction significative des DMC induites lors de l'irradiation au cours du cycle de vie, se situe dans le génome des cellules somatiques et n'est pas transmise à la progéniture.

Tableau 12. Nombre total de DMC détectées, à chaque débit de dose et en commun entre les débits de dose, en fonction des générations. Proportions des DMC hypo- et hyper-méthylées.

	Nombre total de DMC	Proportion hypométhylée	Proportion hyperméthylée
Génération F0			
6,5 $\mu\text{Gy h}^{-1}$	209	58%	42%
41,3 mGy h^{-1}	243	47%	53%
en commun	50	86%	14%
Génération F2			
6,5 $\mu\text{Gy h}^{-1}$	392	59%	41%
41,3 mGy h^{-1}	413	56%	44%
en commun	86	78%	22%
Génération F3			
6,5 $\mu\text{Gy h}^{-1}$	330	50%	50%
41,3 mGy h^{-1}	329	53%	47%
en commun	74	68%	32%



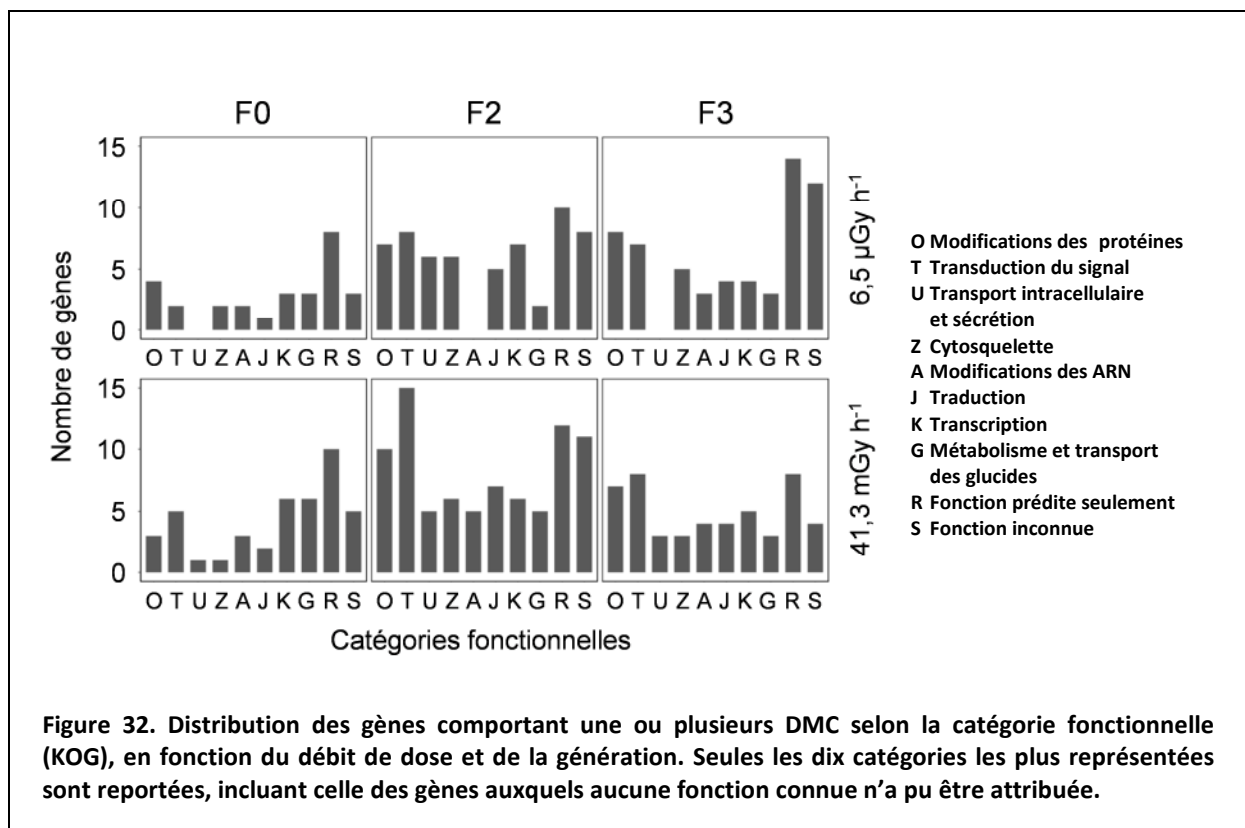
L'analyse fonctionnelle, enfin, révèle que les DMC concernent des familles de gènes remplissant des fonctions cellulaires importantes. Parmi les catégories de gènes impliqués (Figure 32), les « KOG » *T*, *O*, *K*, *A*, *Z* et *J*, ont précédemment été identifiées dans la réponse cellulaire au rayonnement ionisant (Sakamoto-Hojo et al., 2003). *A contrario*, d'autres catégories identifiées pour leur rôle lors de la réponse au rayonnement ionisant, à savoir les « KOG » *L* et *D* associées à la réplication et à la réparation (Li et al., 2001 ; Maier et al., 2016), ne font pas partie des catégories les plus représentées dans notre étude. Certains des gènes identifiés ont, de même, un rôle déjà connu lors de réponse *in vitro* ou *in vivo* au rayonnement ionisant (Lee et al., 2001 ; Zhou et Rigaud, 2001 ; Zhang et al., 2010 ; Landis et al., 2012 ; Bakshi et al., 2013) – par exemple ceux comportant des DMC communes aux débits de dose en génération F0 ou aux générations F2 et F3 :

- *Dapma7bEVm007629t1* codant pour une « X box-binding protein » ;
- *Dapma7bEVm003591t1* codant pour une sous-unité de l'Anaphase-promoting complex ;
- *Dapma7bEVm004770t1* codant pour la protéine ribosomale « L28 » ;
- *Dapma7bEVm636207t1* codant pour la protéine « heat-shock Hsp70 » (gène).

3.3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

3.3.1. Dommages ADN et effets macroscopiques

L'étude des processus moléculaires est des plus intéressantes pour comprendre la nature des mécanismes en jeu lors de l'induction de la toxicité. Pour autant, établir le lien entre des marqueurs moléculaires et leurs conséquences sur l'organisme demeure un défi – en cause, la



réponse de la plupart des biomarqueurs à des niveaux d'exposition où aucun effet macroscopique n'est observé – du moins sur une génération – ce qui remet leur pertinence en question (Forbes et al., 2006). L'originalité du travail réalisé dans les études de Plaire et al. (2013) et Parisot et al. (2015) est d'appréhender les réponses moléculaires par une approche dynamique dont l'objet est d'en décrire les variations au cours du temps et au fil des générations. Les résultats des analyses RAPD–qPCR quantitative mettent ainsi en lumière une accumulation et une transmission des dommages à l'ADN lors des expositions à l'U appauvri (continue et post-éclosion) et aux rayonnements gamma (continue). De plus, dans tous ces cas, les tendances sont très similaires entre les altérations moléculaires et l'intensité de la toxicité mesurée à l'échelle macroscopique, ce qu'on pourrait synthétiser simplement dans le Tableau 13. En d'autres termes, on confirme l'hypothèse qu'il existe d'une augmentation des dommages à l'ADN et que celle-ci accompagne l'aggravation des effets au fil des générations ou entre les scénarios d'exposition. L'exposition du stade embryonnaire entraîne plus de dommages moléculaires et des effets plus sévères au niveau de l'organisme. Quand les altérations à l'ADN décroissent (lors de l'exposition embryonnaire à l'U appauvri ou entre les générations F0 et F1 exposées aux rayonnements gamma), l'intensité des effets cesse de croître (U appauvri) ou décroît également (rayonnements gamma). En conclusion, qu'elles soient liées les unes aux autres par une relation de cause à effet ou qu'elles répondent simultanément à une cause commune encore non élucidée, les altérations moléculaires et l'intensité des effets toxiques suivent étroitement les mêmes tendances dans nos études, ce qui fait des mesures RAPD–qPCR un bon biomarqueur d'effet, à condition toutefois qu'une approche dynamique soit mise en œuvre, puisque ce sont les variations au cours du temps (en particulier à l'échelle de plusieurs générations) qui mettent cette corrélation en lumière.

3.3.2. Mécanismes de compensation

Les résultats des analyses moléculaires laissent pressentir l'induction de processus de compensation. Ceux-ci permettraient, durant l'exposition embryonnaire à l'U appauvri, la réduction des altérations moléculaires et un certain degré de récupération à l'échelle de l'organisme lors du retour en milieu non contaminé. Ils interviendraient également durant l'exposition aux rayonnements gamma pour expliquer des altérations à l'ADN et des effets

Tableau 13. Synthèse des tendances observées dans la sévérité des effets macroscopiques (survie, croissance et reproduction) et le niveau des altérations moléculaires (mesurées par RAPD–qPCR : « n.d. » quand les effets n'ont pas été mesurés ; « – » quand les altérations à l'ADN ne sont plus significatives aux niveaux d'exposition testés)(d'après Plaire et al., 2013 et Parisot et al., 2015).

Radionucléide	Effets macroscopiques			Altérations moléculaires		
	F0	F1	F2	F0	F1	F2
U appauvri – exposition continue	**	***	****	**	***	****
U appauvri – exposition post-éclosion	*	**	n.d.	*	**	***
U appauvri – exposition embryonnaire	*	*	n.d.	*	*	–
Rayonnement gamma – exposition continue	**	*	***	**	*	***

moins sévères dans la génération F1 que dans la génération F0. Dans tous les cas, les observations suggèrent de nombreuses hypothèses quant à la nature des processus entraînant une plus grande résistance à la toxicité, chacune présentant ses propres conséquences sur le budget énergétique, l'histoire de vie et la valeur adaptative d'un organisme. On peut ainsi envisager la mise en place de mécanismes de protection (évitant l'induction des dommages), de mécanismes de réparation (permettant que les altérations de l'ADN soient réparées plus efficacement) ou encore de mécanismes d'élimination (suppression des cellules les plus endommagées). Le lien entre différents mécanismes moléculaires et cellulaires gagnerait à être abordé selon la même approche dynamique, visant à préciser les cinétiques d'induction, les seuils à partir desquels se déclenchent les réponses aux différentes échelles et leur degré de rémanence après la fin de l'exposition. Les diverses hypothèses pourraient être testées à l'aide d'analyses complémentaires dont je liste ici quelques possibilités :

- mesures du stress oxydatif au travers d'une quantification des *ROS* ou de l'activité des enzymes antioxydantes telles que la glutathionine-S-transférase (GST), la glutathionine réductase (GR), la catalase (CAT) ou encore la superoxyde dismutase (SOD) (Xie et al., 2006 ; Kim et al., 2009, 2010b ; Gómez-Oliván et al., 2014), permettant à la fois de préciser l'origine des dommages moléculaires et de déterminer si des mécanismes de défenses cellulaires sont initiés ;
- mesures des taux de mutation de l'ADN, en particulier au niveau de l'ADN mitochondrial que l'on sait dénué de mécanismes de réparation (Xu et al., 2012 ; Schaack et al., 2013) ;
- mesures de l'expression de gènes codants pour certaines histones, comme γ -*H2AX* qui est spécialisée dans la réparation des cassures double-brin, ou des protéines chaperonnes comme *HSP70*, la plus petite des protéines de choc thermique (Hunt et al., 2013), dont Trijau et al. (2018) rapporte la méthylation lors d'une irradiation gamma ;
- quantification du vieillissement cellulaire et de l'apoptose, par imagerie ou via l'expression de certains gènes comme *egl-1* chez le nématode *C. elegans* ou *Caspase-3* chez la daphnie *D. pulex* (Tong et al., 2017).

3.3.3. Conséquences des modifications épigénétiques

L'étude Trijau et al. (2018) met pour la première fois en évidence, grâce à la daphnie, la transmission transgénérationnelle de modifications radio-induites de la méthylation de l'ADN. La reproduction clonale de *D. magna*, qui assure la plus faible diversité génétique entre les individus et entre les générations, est certainement en cause dans ce succès. Il serait intéressant de confirmer l'existence de modifications transgénérationnelles similaires dans le cas de la reproduction sexuée, chez un clone de *D. magna* produisant plus facilement des générations sexuées (*Xbin-3* par exemple) que le clone A utilisé ici, ou chez une espèce à reproduction exclusivement sexuée.

Si des modifications de la méthylation sont transmises aux générations non exposées, le lien entre ces modifications et des conséquences phénotypiques n'ont pas pu être établies dans notre étude. Un tel lien est pourtant crucial pour conforter l'utilisation de données d'épigénétique dans le cadre de l'évaluation du risque écologique. Celui-ci pourrait être précisé en examinant les conséquences des modifications de la méthylation sur l'expression

des gènes en quantifiant, par exemple, le niveau de transcription par séquençage d'ARN (RNA-seq) – méthode récemment adaptée à *D. magna* (Orsini et al., (2017)). Le rôle de la méthylation de l'ADN chez *D. magna* demande d'être éclairci plus avant – elle pourrait intervenir dans l'épissage alternatif lors de la transcription (Asselman et al., 2017). D'autres mécanismes épigénétiques pourraient également être explorés chez la daphnie, parmi lesquels la modification des histones (Robichaud et al., 2012). Les radiations ionisantes sont, par exemple, connues pour induire une phosphorylation de l'histone *H2AX* – la plus étudiée chez les vertébrés (Hunt et al., 2013). Certains auteurs suggèrent une implication de la modification des histones dans l'hérédité épigénétique transgénérationnelle chez les invertébrés (Heard et Martienssen, 2014).

La méthylation radio-induite de l'ADN et sa transmission aux générations non exposées gagneraient à être examinées au cours d'une plus longue exposition (sur quatre générations par exemple), afin d'accumuler un nombre plus important de modifications et d'espérer une réponse plus marquée à l'échelle des organismes. L'exposition conjointe aux radiations ionisantes et à d'autres contraintes environnementales (différents niveaux de nourriture par exemple) permettrait d'explorer les conséquences des modifications épigénétiques radio-induites dans des conditions plus représentatives des écosystèmes naturels. En particulier, ces modifications pourraient interférer dans la réponse des daphnies au stress environnemental, qui est régulée dans certains cas, par des mécanismes épigénétiques – comme l'adaptation morphologique à la présence de prédateurs (Harris et al., 2012).

Chapitre 4

Modélisations du budget énergétique dynamique

Sommaire

4.1. Budget Energétique Dynamique	137
4.1.1. Pourquoi le Budget Energétique Dynamique ?	137
4.1.2. Concepts fondamentaux	138
4.1.3. Modèle DEB standard	139
4.1.4. Un DEB simplifié pour la toxicologie	141
4.1.5. Toxicocinétique toxico-dynamique	143
4.1.6. Modes d'action métaboliques	144
4.1.7. Estimation des paramètres.....	146
4.1.8. Applications du modèle DEBtox	147
4.2. Première application du modèle DEBtox au cas de la radiotoxicité gamma	148
4.2.1. Contexte	148
4.2.2. Une métrique pour le stress radiologique chronique dans les modèles DEBtox.....	149
4.2.3. Modèles DEBtox pour les nématodes	149
4.2.4. Résultats	152
4.3. Première application du modèle DEBtox au cas de l'U appauvri	154
4.3.1. Un contexte d'exposition multigénérationnelle novateur	154
4.3.2. Résultats	155
4.3.3. Premières interprétations.....	157
4.4. Deuxième application du modèle DEBtox au cas de l'U appauvri	158
4.4.1. Contexte	158
4.4.2. Un dommage transmissible pour expliquer les effets transgénérationnels	159
4.4.3. Exposition du stade embryonnaire	160
4.4.4. Deux modes d'action pour décrire les effets de l'U appauvri.....	161
4.5. Analyse bayésienne des effets transgénérationnels (U, Cs-137, Am-241)	163
4.5.1. Application du modèle DEBtox au cas de la radiotoxicité gamma et alpha.....	163
4.5.2. Deux modes d'action pour décrire les effets des rayonnements ionisants.....	164
4.5.3. Analyses bayésiennes.....	165
4.5.4. Résultats	167
4.6. Conclusions et perspectives	173
4.6.1. La toxicité, une affaire de temps	173
4.6.2. Des modes d'action métaboliques similaires d'une espèce à l'autre	174
4.6.3. L'irradiation gamma comme outil d'étude ?.....	176

4.1. BUDGET ENERGETIQUE DYNAMIQUE

4.1.1. Pourquoi le Budget Energétique Dynamique ?

La nécessité de lier les effets observés aux différentes échelles d'organisation biologique à l'aide d'une approche mécaniste a été identifiée comme l'un des thèmes prioritaires de la recherche en radioécologie et toxicologie nucléaire (Hinton et al., 2013). L'Alliance Européenne en Radioécologie (www.er-alliance.org) a proposé dans son agenda stratégique de recherche que des modèles basés sur la théorie du Budget Energétique Dynamique (DEB) (Kooijman, 2010) soient appliqués afin de comprendre quels sont les modes d'action métaboliques impliqués par la radiotoxicité.

De manière générale, un budget énergétique décrit de façon formalisée, comment un organisme acquiert son énergie à partir de la nourriture et l'alloue à la réalisation de ses fonctions métaboliques majeures, à savoir la survie, la croissance et la reproduction, qui sont des processus critiques pour la dynamique de population (Nisbet et al., 2000 ; Jager et Zimmer, 2012). La théorie DEB, qui est utilisée pour décrire le fonctionnement métaboliques de plus d'un millier d'espèces, fournit un cadre conceptuel pour interpréter de façon mécaniste, les effets des contaminants chimiques sur les fonctions vitales des organismes. Les modèles DEBtox (modèles DEB appliqués à la toxicologie) reposent sur l'hypothèse que la toxicité s'opère en venant perturber différents processus physiologiques tels que (i) l'assimilation, (ii) la maintenance, (iii) la maturation et la croissance somatique, (iv) la production des œufs et leur viabilité. Suivant le principe de la conservation de la masse et de l'énergie, tout coût métabolique additionnel induit sur un processus du budget énergétique entraîne des répercussions sur les autres processus, au détriment de la survie, de la croissance et la reproduction. Cette capacité à intégrer le fonctionnement de l'organisme comme un tout permet de dériver des paramètres écotoxicologiques qui sont communs à l'ensemble des effets macroscopiques mesurés (survie, taille et reproduction). En tant que modèles toxicocinétiques/toxico-dynamiques (TKTD), les modèles DEBtox décrivent les variations du stress toxique au cours du temps en fonction du niveau et de la durée de l'exposition. Leurs prédictions peuvent donc être étendues à un grand nombre de situations d'exposition non testées. Ces propriétés les distinguent des relations statistiques empiriques de type « courbe dose-réponse » (DRC) dont la validité des prédictions (les NOEC et ECx, concentration sans effet et concentration effective entraînant x% d'effet, communément utilisées en écotoxicologie) se limite strictement au critère d'effet examiné et dans les conditions expérimentales et à la durée d'exposition testées (Kooijman et Bedaux, 1996 ; Jager et al., 2006 ; Jager, 2011). Au sein du modèle DEB, enfin, les sources de stress peuvent interagir entre elles, qu'elles soient d'origine naturelle (comme la température et la disponibilité de la ressource nutritive et tout autre facteur environnemental forçant) ou anthropogénique (comme la présence d'autres polluants chimiques ou radioactifs), ce qui fait de l'approche un outil puissant dans le contexte des multi-pollutions (Jager et al., 2010).

L'analyse de la toxicité à l'aide de théorie DEB est cruciale pour prédire les conséquences démographiques des réponses mises en évidence aux niveaux moléculaires, cellulaires et macroscopiques. Les simulations issus des modèles sont, en effet, de nature à alimenter des

modèles démographiques, de type matriciel ou individu-centrés, permettant une évaluation robuste du risque écologique associé aux radionucléides à l'échelle de la population (Billoir et al., 2007 ; Martin et al., 2013).

4.1.2. Concepts fondamentaux

Dans la littérature, les modèles de budget énergétique publiés peuvent être classés, pour le plus grand nombre, dans deux catégories qui diffèrent principalement par les hypothèses concernant l'allocation à la reproduction (Lika et Nisbet, 2000). Dans la première catégorie, celle des modèles de production nette, la maintenance de l'organisme, qui est critique pour la survie, est directement soustraite de l'acquisition d'énergie. Ainsi, la croissance et la reproduction sont prédites à partir de la différence entre l'assimilation et la respiration (Noonburg et al., 1998 ; Lika et Nisbet, 2000). Dans la deuxième catégorie, celle des modèles d'assimilation nette auquel appartient la théorie DEB, l'énergie consommée dans la respiration reflète les dépenses associées à la réalisation de toutes les fonctions biologiques, y compris de la croissance et de la reproduction. En conséquence, la croissance et la respiration sont prédites de la seule assimilation.

La théorie DEB repose sur l'hypothèse que la biomasse d'un organisme est partitionnée sous forme de réserve d'énergie – il ne s'agit pas ici des réserves graisseuses saisonnières – et de structure, qui peuvent être uniques ou multiples. La réserve permet à l'organisme de fonctionner indépendamment des fluctuations environnementales et d'assurer à l'organisme un approvisionnement continu en composés essentiels pour le métabolisme. Quelle que soit l'espèce considérée, le nombre d'éléments chimiques composant la biomasse est trop grand pour qu'un modèle mathématique n'en détaille la totalité. Le modèle DEB a recours à une simplification pour rendre la modélisation possible. Premièrement, seuls les éléments les plus abondants sont pris en compte en considérant que les autres ne jouent pas un rôle crucial. Deuxièmement, des pools d'élément sont définis dont on considère que la composition ne change pas, selon le principe de l'homéostasie, processus de régulation par lequel l'organisme maintient sa composition dans des limites des valeurs dites normales malgré les fluctuations environnementales.

La forme des organismes joue un rôle important dans les modèles DEB, en déterminant le rapport entre deux grandeurs clés : leur surface S et leur volume V , dont dépendent les processus tels que l'assimilation de la nourriture et les coûts métaboliques de maintenance. Il est donc crucial de considérer les changements de forme qu'un organisme est amené à revêtir au cours de son cycle de vie, à mesure que sa taille L augmente. Différents cas de figure sont proposés pour décrire l'ensemble des situations possibles. Dans le cas de *Daphnia* par exemple, la théorie DEB parle d'organisme « isomorphe » car la croissance est identique dans les trois directions. La forme des organismes reste alors inchangée, avec S proportionnelle à $V^{2/3}$.

Le modèle DEB standard décrit comment le métabolisme est modulé au cours du cycle de vie, en considérant que les flux d'énergie au sein d'un organisme sont dépendants du stade de

vie atteint. Trois stades de vie majeurs, caractérisés par divers changements métaboliques marquants, sont ainsi pris en compte :

- le stade embryonnaire, avant la naissance, est caractérisé par l'absence de nutrition, l'ensemble des besoins énergétiques étant couverts par les réserves de l'embryon héritées de la mère.
- le stade juvénile, qui se distingue de la phase embryonnaire par la nutrition (qui débute au moment de la naissance pour couvrir les besoins énergétiques) et par la maturation (définie comme l'accroissement de la maturité jusqu'à l'atteinte du niveau nécessaire à la puberté).
- le stade adulte, après la puberté, est caractérisé par l'arrêt de la maturation (la maturité maximale étant atteinte) et par la production de la progéniture.

4.1.3. Modèle DEB standard

Le modèle DEB standard (Kooijman, 2010) quantifie, sur la base de principes physico-chimiques et biologiques simples, le flux d'énergie et les interactions entre les processus clés incluant la nutrition, la maintenance, la croissance, la maturation et la reproduction (Figure 33). Le modèle fournit des équations différentielles qui décrivent la dynamique de la réserve d'énergie et de son allocation à la croissance et à la production de la progéniture.

Les taux métaboliques sont dépendants de l'environnement de l'organisme, et en particulier des variations de température. Le modèle DEB standard est basé sur une température de référence T_{ref} de 20°C (293 K). Un facteur de correction $C(T)$ est appliqué au flux d'énergie assimilée, au flux d'énergie mobilisée, aux flux d'énergie allouée à la maintenance somatique et à la maintenance de la maturité, lorsque la température ambiante s'écarte de la valeur de T_{ref} (Nisbet et al., 2012). Ce facteur de correction est donné par :

$$C(T) = e^{\left(\frac{T_A}{T_{ref}} - \frac{T_A}{T}\right)} \quad (\text{Equation 2})$$

où T_A est la température d'Arrhenius et T la température ambiante (en K).

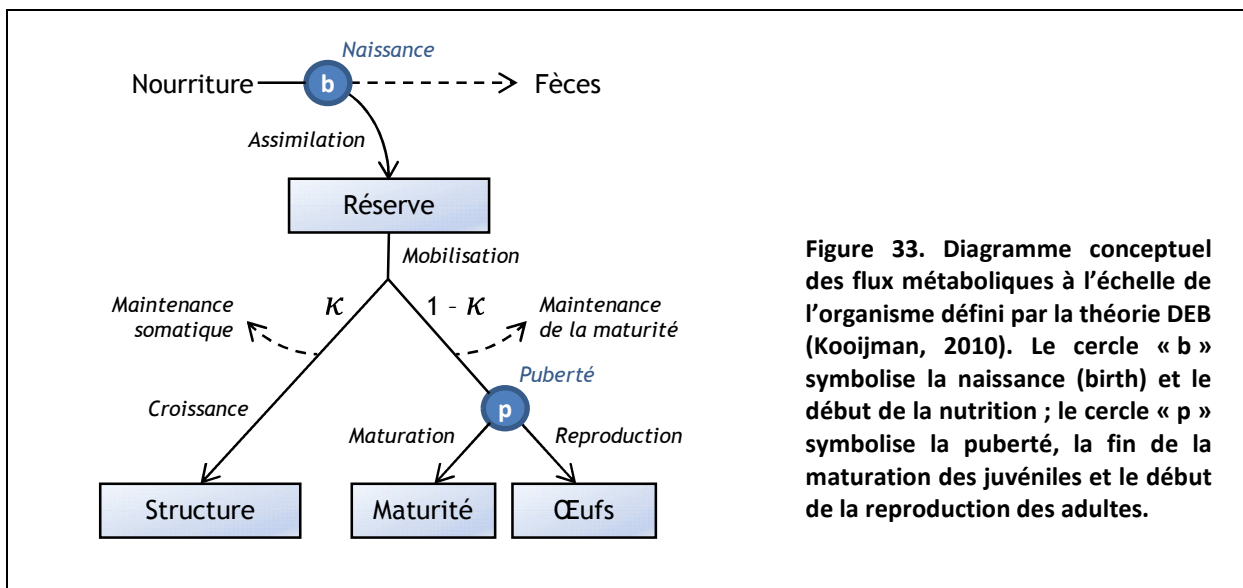


Figure 33. Diagramme conceptuel des flux métaboliques à l'échelle de l'organisme défini par la théorie DEB (Kooijman, 2010). Le cercle « b » symbolise la naissance (birth) et le début de la nutrition ; le cercle « p » symbolise la puberté, la fin de la maturation des juvéniles et le début de la reproduction des adultes.

Dans le modèle DEB standard (Kooijman, 2010), l'énergie est acquise via la nutrition. La manière dont l'ingestion répond aux variations de quantité de la nourriture disponible X est quantifiée au travers de la réponse fonctionnelle f (variant de 0 en l'absence d'assimilation à 1 lorsque l'organisme est nourri à satiété). Les variations théoriques de f avec la quantité de la nourriture disponible X peuvent, par exemple, être décrites chez un organisme filtreur à l'aide d'une fonction de Holling de type II (Holling, 1965). Cette réponse fonctionnelle $f(X)$ se caractérise par un plateau de satiété lorsque la saturation des organismes en nourriture est atteinte.

$$f(X) = \frac{X}{X + K} \quad (\text{Equation 3})$$

où K est la constante de demi-saturation (la quantité de nourriture disponible pour laquelle la réponse ingestive vaut la moitié de son maximum, soit 0,5).

Le taux d'ingestion de la nourriture est proportionnel à la réponse ingestive $f(X)$ et à la surface S de l'organisme – et donc au carré de sa taille L^2 . Plus l'organisme est grand, plus une grande quantité de nourriture peut donc être ingérée. Le flux de nourriture ingérée n'est qu'en partie assimilé par l'organisme, la partie non assimilée formant les fèces (Figure 33). Après assimilation, l'énergie est stockée dans la réserve E et peut être ensuite mobilisée pour assurer les différentes fonctions. Cette réserve E est une mémoire métabolique qui ne requiert pas de maintenance et permet aux organismes d'annuler ou de limiter les effets des fluctuations environnementales. Toute variation de disponibilité de la nourriture entraîne un changement du taux d'assimilation et de la densité de la réserve. La densité de la réserve joue un rôle central dans le comportement métabolique d'un organisme.

Le flux d'énergie mobilisée est séparé en deux fractions, κ et $(1 - \kappa)$ (avec $0 < \kappa < 1$), allouées respectivement au soma et à la reproduction :

- la fraction κ allouée au soma sert en tout premier lieu à la maintenance somatique. La maintenance somatique, processus obligé et indispensable à la survie de l'organisme, nécessite une quantité d'énergie dépendante du volume V de la structure (et donc du cube de la taille L^3). La partie restante est allouée à la croissance. La croissance, qui consiste à faire grandir la structure de l'organisme, a lieu seulement si l'énergie n'a pas entièrement été consommée par la maintenance somatique.
- la fraction $(1 - \kappa)$ allouée à la reproduction sert, de la même manière, en priorité à la maintenance de la maturité. La fraction qui n'a pas été consommée par la maintenance de la maturité est allouée à la maturation lors du stade juvénile, puis à la production de la progéniture lors du stade adulte, après que la maturité ait atteint le niveau nécessaire à la puberté.

La théorie DEB postule que les organismes respectent la « loi Kappa ». Celle-ci stipule que la valeur de κ , caractéristique de chaque espèce biologique, est constante tout au long du cycle de vie. Une violation de cette loi n'intervient qu'en cas de famine extrême modifiant profondément le schéma métabolique de l'organisme. En cas de jeûne prolongé conduisant à l'épuisement des réserves, l'énergie utilisée pour la reproduction peut ainsi être détournée vers la maintenance somatique afin de privilégier en ultime recours la survie de l'organisme.

4.1.4. Un DEB simplifié pour la toxicologie

Le modèle DEBtox est initialement développé par Kooijman et Metz (1984) et par Kooijman et Bedaux (1996). Une formulation révisée est introduite par Billoir et al. (2008a) et par Jager et Zimmer (2012). L'approche repose sur une version simplifiée du modèle DEB, fondée sur trois hypothèses qui tiennent pour les tests écotoxicologiques standards (conditions environnementales constantes, y compris la disponibilité de la nourriture) mais nécessitent d'être gardées à l'esprit quand on applique le modèle à un nouveau cas de figure. Ces hypothèses réduisent considérablement la complexité du modèle en limitant le nombre de paramètres à 7.

- Premièrement, on considère que la maturité représente une fraction constante de la structure. La maturité n'a, dès lors, plus besoin d'être suivie comme une variable d'état à part entière. Il en découle que la puberté est atteinte à une taille fixe indépendante de la disponibilité de la nourriture.

- Deuxièmement, on considère que le coût énergétique d'un œuf est toujours le même et que la progéniture a une taille constante à la naissance, ce qui est contraire aux hypothèses du DEB standard concernant les effets maternels, liés aux variations de ce coût. De surcroît, l'hypothèse est contraire à nos résultats expérimentaux qui montrent que la masse par œuf peut varier de 5 à 12,5 µg et la taille des néonates de 0,7 à 1 mm en fonction de la taille de leur mère, et indirectement en fonction du niveau d'exposition quand la croissance des daphnies est affectée (Alonzo et al., 2006, 2008a ; Massarin et al., 2010 ; Plaire et al., 2013 ; Parisot et al., 2015). Cet écueil est contourné dans notre modèle en simulant la production d'œufs en masse plutôt qu'en nombre.

- Troisièmement, on considère que la réserve est toujours à l'équilibre avec la quantité de nourriture, ce qui est réaliste lorsque les conditions nutritionnelles sont constantes.

Sous les conditions énoncées, un système d'équations différentielles permettent de décrire la croissance $\frac{dl}{dt}$ et la reproduction $\dot{R}(l)$ chez les individus non exposés :

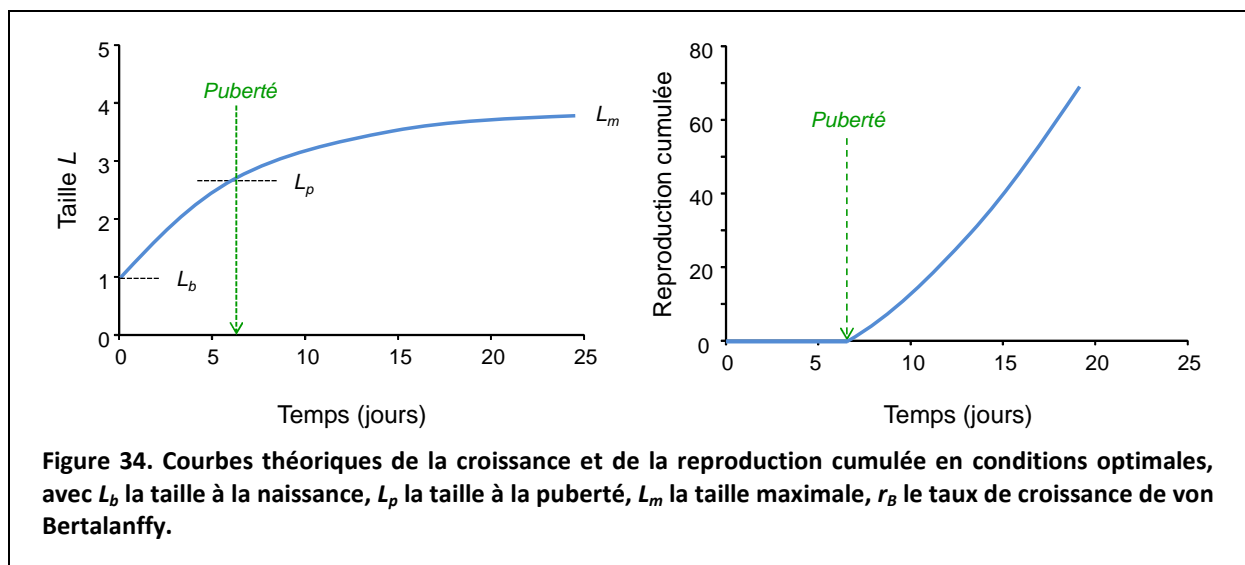
$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{dl}{dt} = \dot{r}_B(f - l) & \text{avec } l(0) = l_b \\ \dot{R}(l) = 0 & \text{si } l < l_p \\ \dot{R}(l) = \frac{\dot{R}_m}{1 - l_p^3} \left[fl^2 \left(\frac{g + l}{g + f} \right) - l_p^3 \right] & \text{si } l \geq l_p \end{array} \right. \quad (\text{Equation 4})$$

L'ensemble des paramètres du modèle est défini dans le Tableau 14. Ces équations délivrent des prédictions de croissance et de reproduction en conditions optimales constantes (Figure 34). L'augmentation de la taille L au cours du temps entraîne l'élévation du coût de la maintenance somatique (proportionnelle à L^3) et, dans une moindre mesure, de l'assimilation (proportionnelle à L^2). En conséquence, la croissance suit une loi de von Bertalanffy jusqu'à la taille maximale (L_m) qui est atteinte lorsque toute la fraction κ de l'énergie mobilisée est allouée pour assurer les coûts de maintenance somatique et qu'aucune énergie n'est plus disponible pour permettre une croissance supplémentaire. La puberté est atteinte quand la

Tableau 14. Paramètres et variables du modèle DEBtox.

Symbole	Unité	Interprétation
Paramètres		
g	–	Ratio de l'investissement d'énergie
f	–	Réponse ingestive fonctionnelle
L_m	mm	Taille maximale
L_b	mm	Taille à la naissance
L_p	mm	Taille à la puberté
l_b	–	$l_b = L_b/L_m$ taille à la naissance normalisée par L_m
l_p	–	$l_p = L_p/L_m$ taille à la puberté normalisée par L_m
\dot{r}_B	par jour	Taux de croissance de von Bertalanffy
\dot{R}_m	Œufs par jour	Taux de reproduction maximal (en nombre ou masse)
\dot{k}_a	par jour	Taux d'accumulation du contaminant toxique
\dot{k}_e	par jour	Taux d'élimination du contaminant toxique
\dot{k}_d	par jour	Taux d'accumulation du dommage
\dot{k}_r	par jour	Taux de réparation du dommage
C_w	$\mu\text{g L}^{-1}$	Concentration dans l'eau du contaminant toxique
C_0	$\mu\text{g L}^{-1}$	Concentration sans effet (NEC)
b	$\mu\text{g}^{-1} \text{L}$	Pente de la fonction de stress
Variables		
L	mm	Taille
l	–	$l = L/L_m$ taille normalisée par L_m
$\dot{R}(l)$	Œufs par jour	Taux de reproduction journalier (en nombre ou masse)
C_i	$\mu\text{g L}^{-1}$	Concentration interne du contaminant toxique
C_i^*	$\mu\text{g L}^{-1}$	Concentration interne normalisée du contaminant toxique
D	$\mu\text{g L}^{-1}$	Niveau du dommage
D^*	$\mu\text{g L}^{-1}$	Niveau normalisé du dommage
$s(C_i^*)$ ou $s(D^*)$	–	Fonction de stress

taille dépasse L_p (la taille à la puberté) et la fraction de l'énergie disponible pour la reproduction est réallouée de la maturation à la production de la progéniture.



4.1.5. Toxicocinétique toxico-dynamique

L'une des principales forces de l'approche DEBtox est d'appréhender les effets des contaminants toxiques comme des processus dynamiques. Pour décrire la variation de l'intensité des effets au cours du temps, le modèle combine la cinétique d'internalisation du contaminant dans les organismes et la dynamique des effets liés à cette internalisation à l'aide d'un modèle extrêmement simple. Pour ce faire, un compartiment unique assorti d'une cinétique de premier ordre est utilisé (Figure 35). Les vitesses d'accumulation et d'élimination sont proportionnelles à la surface de l'organisme et, aux concentrations C_i et C_w du contaminant dans l'eau et dans l'organisme, respectivement. L'équation différentielle décrivant la concentration du contaminant dans l'organisme au cours du temps prend la forme :

$$\frac{dC_i}{dt} = C_w \frac{k_a}{l} - C_i \frac{k_e}{l} - C_i \frac{3}{l} \frac{dl}{dt} \quad (\text{Equation 5})$$

avec k_a et k_e les taux d'accumulation et d'élimination surface-spécifique et le terme $\frac{3}{l} \frac{dl}{dt}$ correspondant à la dilution du contaminant internalisé via l'augmentation du volume lors de la croissance. Kooijman et Bedaux (1996) propose de normaliser la valeur de la concentration interne C_i par son facteur de bioconcentration afin de réduire le nombre de paramètres utilisés dans le modèle. En posant :

$$C_i^* = \frac{k_e}{k_a} C_i \quad (\text{Equation 6})$$

où C_i^* est la concentration interne normalisée, proportionnelle à la valeur – inconnue – de C_i , la concentration du contaminant dans l'organisme, et tendant à l'équilibre vers la valeur de C_w , la concentration du contaminant dans l'eau. Cette transformation élimine le paramètre k_a ,

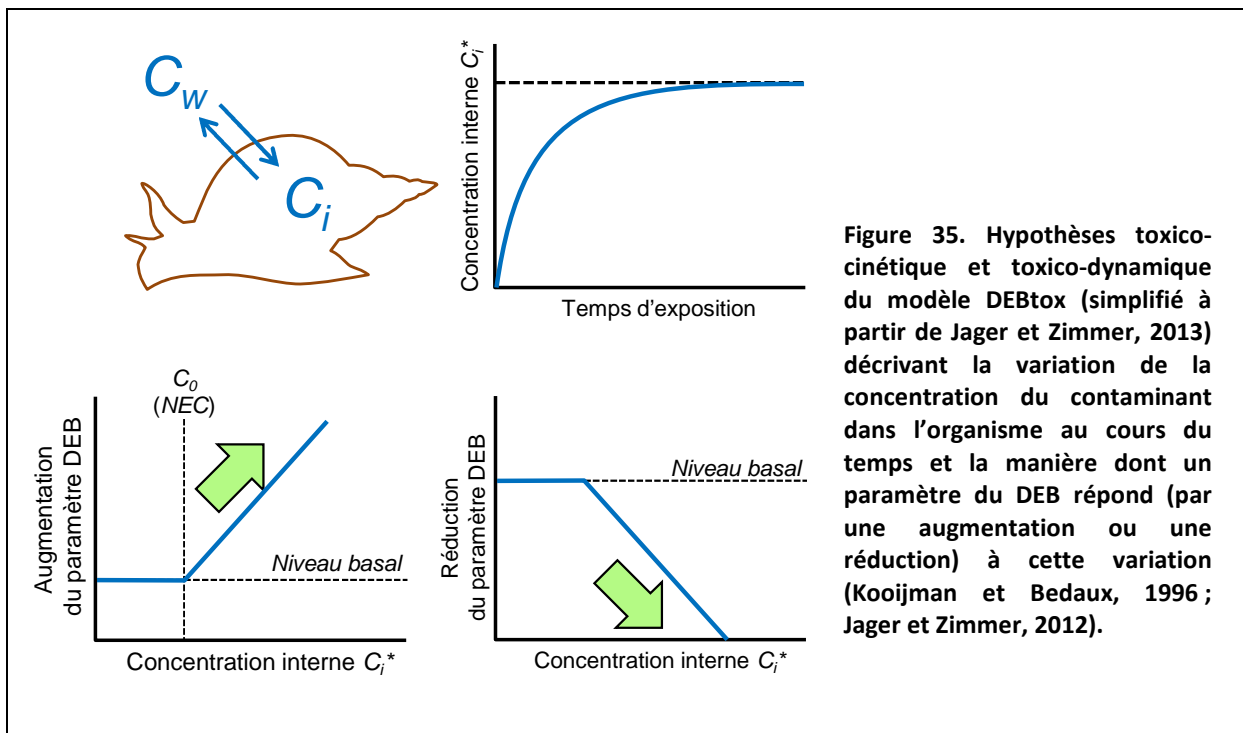


Figure 35. Hypothèses toxicocinétique et toxico-dynamique du modèle DEBtox (simplifié à partir de Jager et Zimmer, 2013) décrivant la variation de la concentration du contaminant dans l'organisme au cours du temps et la manière dont un paramètre du DEB répond (par une augmentation ou une réduction) à cette variation (Kooijman et Bedaux, 1996 ; Jager et Zimmer, 2012).

la cinétique du contaminant dans l'organisme étant décrite de façon simplifiée par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dC_i^*}{dt} = C_w \frac{k_e}{l} - C_i^* \left(\frac{k_e}{l} + \frac{3}{l} \frac{dl}{dt} \right) \quad (\text{Equation 7})$$

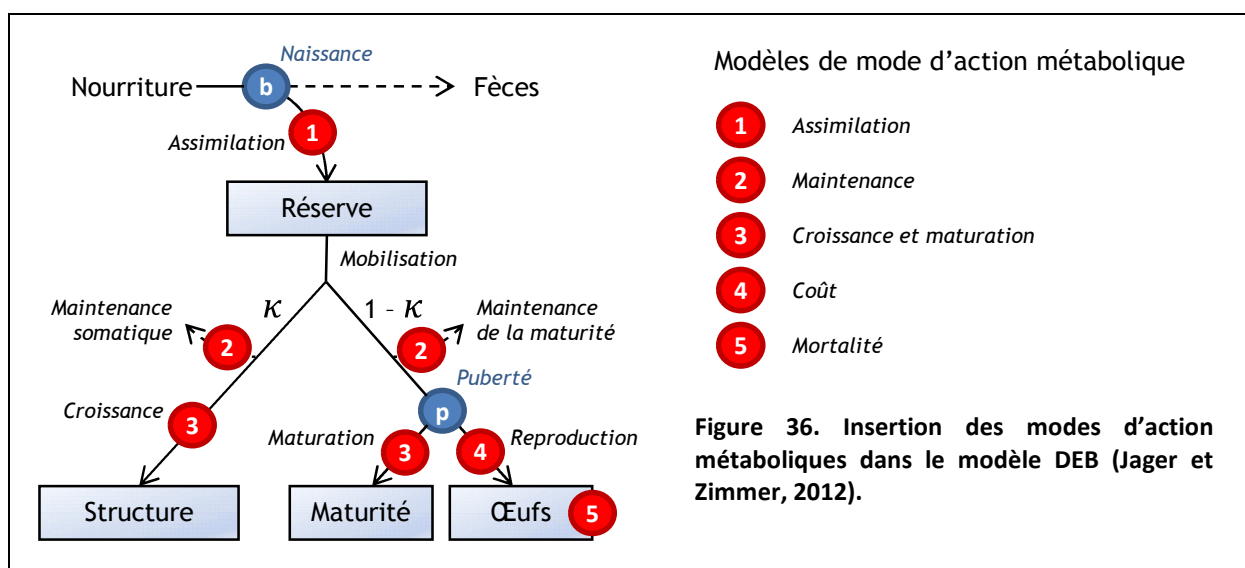
La toxicité du contaminant affecte le budget énergétique, au niveau de l'acquisition ou de l'allocation de l'énergie. L'intensité du stress toxique est donnée par la fonction de stress $s(C_i^*)$ dépendante de la concentration interne normalisée C_i^* (Kooijman et Bedaux, 1996) :

$$\begin{cases} s(C_i^*) = 0 & \text{si } C_i^* < C_0 \\ s(C_i^*) = b(C_i^* - C_0) & \text{si } C_i^* \geq C_0 \end{cases} \quad (\text{Equation 8})$$

où C_0 représente la concentration sans effet (Jager et Zimmer, 2012), plus connue sous le terme de « *NEC* » (Figure 35), au-delà de laquelle l'intensité du stress augmente de façon linéaire avec C_i^* . Dans certaines situations, toutefois, l'intensité du stress toxique peut aussi bien être corrélée à la concentration externe C_w (Massarin et al., 2011), quand la cinétique d'internalisation est beaucoup trop rapide pour être estimée par les données acquises ou lorsque le stress est causé par la présence du contaminant à la surface de l'organisme.

4.1.6. Modes d'action métaboliques

La façon dont le stress toxique agit sur le budget énergétique est décrite au travers du mode d'action métabolique (Figure 36). Cinq modes d'action standards sont initialement proposés pour interpréter les effets sur la reproduction (Kooijman et Bedaux, 1996). Plusieurs autres sont ajoutés dans la dernière version de la théorie DEB (Kooijman, 2010). Chacun de ces modes d'action s'accompagne d'un système d'équations différentielles qui lui est spécifique (Kooijman et Bedaux, 1996 ; Billoir et al., 2008a). Les trois premiers modes d'action sont dits indirects, parce qu'ils supposent que la toxicité affecte un processus du budget énergétique



avec des conséquences à la fois pour la croissance et la reproduction. Les deux autres modes d'action standards sont dits directs, parce qu'ils supposent que la toxicité affecte un processus du budget énergétique associé à l'intensité ou à la viabilité de la reproduction, sans conséquence sur la croissance. Les cinq modes d'action standards correspondent à :

- la réduction de l'assimilation, appelée « modèle Assimilation » (Assimilation model), agissant au travers du terme $(1 - s(C_i^*))$.

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{dl}{dt} = \dot{r}_B \frac{f+g}{f(1-s(C_i^*)) + g} (f(1-s(C_i^*)) - l) & \text{avec } l(0) = l_b \\ \dot{R}(l) = 0 & \text{si } l < l_p \\ \dot{R}(l) = \frac{\dot{R}_m}{1-l_p^3} \left[f(1-s(C_i^*))l^2 \left(\frac{g+l}{g+f(1-s(C_i^*))} \right) - l_p^3 \right] & \text{si } l \geq l_p \end{array} \right. \quad (\text{Equation 9})$$

- l'augmentation du coût de maintenance somatique et de la maturité, appelée « modèle Maintenance » (Maintenance model), agissant au travers du terme $(1 + s(C_i^*))$.

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{dl}{dt} = \dot{r}_B (f - l(1 + s(C_i^*))) & \text{avec } l(0) = l_b \\ \dot{R}(l) = 0 & \text{si } l < l_p \\ \dot{R}(l) = \frac{\dot{R}_m(1 + s(C_i^*))}{1-l_p^3} \left[fl^2 \left(\frac{g(1 + s(C_i^*))^{-1} + l}{g+f} \right) - l_p^3 \right] & \text{si } l \geq l_p \end{array} \right. \quad (\text{Equation 10})$$

- l'augmentation du coût de croissance et de maturation, appelée « modèle Croissance » (Growth model), agissant au travers du terme $(1 + s(C_i^*))$.

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{dl}{dt} = \dot{r}_B \frac{f+g}{f+g(1+s(C_i^*))} (f-l) & \text{avec } l(0) = l_b \\ \dot{R}(l) = 0 & \text{si } l < l_p \\ \dot{R}(l) = \frac{\dot{R}_m}{1-l_p^3} \left[fl^2 \left(\frac{g(1+s(C_i^*)) + l}{g(1+s(C_i^*)) + f} \right) - l_p^3 \right] & \text{si } l \geq l_p \end{array} \right. \quad (\text{Equation 11})$$

- l'augmentation du coût de production d'un œuf, appelée « modèle Coût » (Cost model), agissant au travers du terme $(1 + s(C_i^*))$.

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{dl}{dt} = \dot{r}_B (f - l) & \text{avec } l(0) = l_b \\ \dot{R}(l) = 0 & \text{si } l < l_p \\ \dot{R}(l) = \frac{\dot{R}_m}{1-l_p^3} \left[fl^2 \left(\frac{g+l}{g+f} \right) - l_p^3 \right] (1 + s(C_i^*))^{-1} & \text{si } l \geq l_p \end{array} \right. \quad (\text{Equation 12})$$

- l'augmentation de la mortalité pendant l'ovogénèse, appelée « modèle Mortalité » (Hazard model), agissant au travers du terme $\exp(-s(C_i^*))$.

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{dl}{dt} = \hat{r}_B(f - l) & \text{avec } l(0) = l_b \\ \dot{R}(l) = 0 & \text{si } l < l_p \\ \dot{R}(l) = \frac{\dot{R}_m}{1 - l_p^3} \left[fl^2 \left(\frac{g + l}{g + f} \right) - l_p^3 \right] \exp(-s(C_i^*)) & \text{si } l \geq l_p \end{array} \right. \quad (\text{Equation 13})$$

4.1.7. Estimation des paramètres

Les paramètres du modèle DEBtox sont estimés à partir des données expérimentales au cours d'une démarche statistique appelée inférence. L'inférence consiste à trouver la valeur des paramètres qui réduit autant que possible la différence entre les observations (Yobs) et la valeur simulée par le modèle aux mêmes points (Ysim).

Pour ce faire, un grand nombre d'auteurs utilisent une approche dite fréquentiste, basée sur le maximum de vraisemblance et, dans le cadre d'un modèle gaussien, sur la méthode des moindres carrés (Kooijman et Bedaux, 1996 ; Péry et al., 2003 ; Jager et al., 2004 ; Billoir et al., 2008a ; Massarin et al., 2011 ; Jager et Zimmer, 2012 ; Lecomte-Pradines et al., 2017). Cette approche considère que chaque paramètre θ a une valeur unique (c'est-à-dire non aléatoire), inconnue mais fixe, alors que les données observées sont aléatoires. Aucune distribution de probabilité n'est associée aux paramètres mêmes, seule étant considérée $P(Y|\theta)$, la probabilité des observations connaissant la valeur du paramètre θ . L'intervalle de confiance du paramètre θ avec le niveau de confiance $1 - \alpha$ (le plus souvent 95%) est associé au risque α (5% donc) que l'intervalle ne contienne pas la vraie valeur de θ . La valeur de ses bornes peut être estimée à l'aide d'une technique telle que le bootstrap. Certains auteurs ont toutefois pointé les difficultés rencontrées lors de l'estimation des paramètres du modèle DEBtox par l'approche fréquentiste, mettant en lumière les limitations liées à la complexité et à la non-linéarité du modèle (Billoir et al., 2008a). Les problèmes statistiques rencontrés se traduisent par des valeurs aberrantes pour certains paramètres estimés et une difficulté à calculer des intervalles de confiance pour des paramètres fortement corrélés.

C'est dans ce contexte qu'a été proposée l'inférence bayésienne, comme alternative à l'approche fréquentiste, pour l'estimation des paramètres du DEBtox (Billoir et al., 2008a, 2008b). L'approche donne la possibilité d'intégrer différents types d'observations sans recours à une pondération (ce qui facilite l'analyse des données de croissance et de reproduction dans l'approche DEBtox). L'inférence bayésienne considère que la valeur de chaque paramètre (θ) est aléatoire et suit une distribution de probabilité conditionnelle aux données observées, $P(\theta|Y)$, aussi appelée distribution *a posteriori* du paramètre. En simplifiant considérablement, le théorème de Bayes nous dit que cette distribution *a posteriori* est proportionnelle au produit de la vraisemblance des données $P(Y|\theta)$ et de la distribution des paramètres $P(\theta)$ – la distribution des données $P(Y)$ étant indépendante de θ . L'inférence bayésienne part donc du principe que tout expérimentateur possède des connaissances *a priori* sur le système étudié (sous la forme de lois de distribution de probabilité *a priori* $P(\theta)$ des paramètres du modèle) et que ces connaissances peuvent être révisées à la lumière des données acquises par l'expérimentation. Ainsi, là où l'inférence

fréquentiste n'a recours qu'aux observations, l'inférence bayésienne utilise également toutes formes de connaissances *a priori* – connaissances générales, issues de raisonnement biologique ou d'études antérieures – ce qui peut faciliter l'estimation lorsque les données expérimentales sont peu nombreuses. L'approche bayésienne est communément mise à profit dans les domaines de l'écologie et l'écotoxicologie (Ludwig, 1996 ; Ellison, 2004 ; Link et Barker, 2009 ; Johnson et al., 2013). La distribution *a posteriori* des paramètres permet, de façon très immédiate, de construire leur intervalle de crédibilité. L'intervalle de crédibilité d'un paramètre, par exemple au niveau de 95 %, signifie que la valeur de ce paramètre a 95% de chances de se trouver dans l'intervalle – une interprétation qui est souvent donnée à tort pour l'intervalle de confiance de l'approche fréquentiste.

4.1.8. Applications du modèle DEBtox

Depuis ses premiers développements (Kooijman et Bedaux, 1996), le modèle DEBtox a été appliqué dans un nombre croissant d'études en écotoxicologie pour analyser les effets de divers contaminants environnementaux, tels que les métaux lourds, les pesticides, ou les nanoparticules, au sein de divers groupes taxonomiques, en grande majorité des invertébrés – crustacées des annélides, des mollusques ou des nématodes – mais aussi des poissons et du phytoplancton (Kooijman et al., 1996 ; Klok et al., 1997 ; Arzul et al., 2006 ; Pieters et al., 2006 ; Jager et al., 2007 ; Péry et al., 2008 ; Miller et al., 2010, 2017 ; Billoir et al., 2011 ; Augustine et al., 2012 ; Holden et al., 2013 ; Barsi et al., 2014). L'enjeu, le plus souvent, est d'identifier les modes d'action métaboliques sous-jacents pour mieux comprendre l'apparition des effets à l'échelle de l'organisme. Le modèle DEBtox est également appliqué à l'analyse des effets sous différents scénarios de contamination, notamment des expositions pulsées (Pieters et al., 2006) et des mélanges de contaminants (Baas et al., 2010 ; Jager et al., 2010), ou en interaction avec différents stress environnementaux (Klok et al., 1997 ; Bontje et al., 2009 ; Cedergreen et al., 2016 ; Goussen et al., 2016).

L'application du modèle DEBtox au cas des radionucléides commence avec l'U appauvri, dont la toxicité est abordée d'abord chez *D. magna* (Massarin et al., 2011) puis chez le poisson zèbre *D. rerio* et le nématode *C. elegans* (Augustine et al., 2012 ; Goussen et al., 2015b) – lors de thèses encadrées par mes collègues du LECO. Le cas de l'irradiation gamma (Cs-137) est traitée plus récemment, chez le nématode *C. elegans* lors du programme européen STAR (Lecomte-Pradines et al., 2017). Avec *D. magna*, l'approche multigénérationnelle développée pour l'U appauvri est généralisée aux autres radionucléides testés (Cs-137 et Am-241) lors du programme européen STAR et du projet IRSN-CNRS (NEEDS-Environnement) DEB-RAD. Au fil des études, mes travaux revêtent plusieurs aspects des plus innovants :

- La plupart du temps, les échelles de temps auxquelles les analyses DEBtox sont conduites restent celles des données issues de tests écotoxicologiques standards, ce qui les rend peu pertinentes vis-à-vis de la réponse sur le long-terme des populations sur le terrain. Comme nous l'avons vu, l'échelle multigénérationnelle, qui explore les effets sur des durées supérieures à la longévité des organismes, est bien plus représentative de la situation réelle des expositions, mais reste rarement pris en compte. Dans ce contexte, nous avons cherché à

analyser les données acquises chez *D. magna* à l'aide de modèles DEBtox expliquant comment la toxicité chimique ou radiologique de l'U appauvri et des rayonnements ionisants, pouvait varier en sévérité d'une génération à l'autre.

- Le volet toxico-dynamique du modèle standard se base sur une fonction de stress simple pour convertir la concentration de contaminant internalisé (en g / L ou mol / L) en unités de stress chimique subi au niveau du budget énergétique. Lors des applications de l'approche DEBtox aux données de radiotoxicité, nous avons dû modifier le modèle, afin d'adapter spécialement la fonction de stress aux cas de l'irradiation gamma externe et de l'irradiation alpha interne. Dans ce dernier cas, nous avons tenu compte de la cinétique d'internalisation de l'Am-241 dissous, puisque tout émetteur alpha ne délivre une dose biologiquement efficace qu'une fois internalisé par l'organisme.

- Enfin, dans la lignée des études suggérant de coupler l'approche DEBtox aux réponses des biomarqueurs au niveau moléculaire – comme l'expression de certains gènes spécifiques chez *Caenorhabditis elegans* (Swain et al., 2010 ; Wren et al., 2011) – nous avons calqué la cinétique du stress subi par le budget énergétique sur celle des altérations de l'ADN mises en évidence lors des expositions à l'U appauvri et aux rayonnements gamma (Plaire et al., 2013 ; Parisot et al., 2015), et ce dans le but de préciser quel mode d'action métabolique sous-jacent était impliqué.

Pour ne pas rompre le fil logique, ma présentation ne suit pas l'ordre chronologique et débute par le cas de la radiotoxicité gamma chez le nématode *C. elegans*.

4.2. PREMIERE APPLICATION DU MODELE DEBTOX AU CAS DE LA RADIOTOXICITE GAMMA

4.2.1. Contexte

Lors du programme européen STAR, une série de tests d'irradiation gamma chronique est réalisée afin d'évaluer l'effet des rayonnements chez le nématode *C. elegans* (Lecomte-Pradines et al., 2017). Le modèle expérimental *C. elegans* a été choisi pour deux raisons : l'existence d'un modèle DEB spécifiquement formulé pour cet organisme (Jager et al., 2005 ; Goussen et al., 2015b) ; l'intérêt commun pour l'espèce au LECO et chez nos collègues norvégiens, ouvrant la possibilité de travaux en collaboration entre l'IRSN et l'Université Norvégienne des Sciences de la Vie (NMBU) (avec les Dr. Deborah Oughton, Turid Hertel-Aas et Claire Coutris). Tout comme chez la daphnie, la petite taille, la fécondité élevée et le cycle de vie court de *C. elegans* en font un modèle particulièrement séduisant pour suivre les effets des rayonnements au cours du temps, sur plusieurs critères simultanément – à savoir la survie, la croissance et la reproduction, comme le requiert l'approche DEBtox. En tant que décomposeurs, les nématodes jouent, en outre, un rôle clé dans l'écosystème terrestre et *C. elegans*, qui n'est pas une espèce clé en soi, est un organisme standard pour évaluer la toxicité pour la communauté du sol (Sochová et al., 2006 ; Hägerbäumer et al., 2015).

Le travail réalisé dans notre étude (Lecomte-Pradines et al., 2017) démontre principalement qu'un modèle DEBtox peut être appliqué au cas des rayonnements ionisants afin d'en améliorer la compréhension des mécanismes de toxicité. Pour ce faire, nous

analysons les effets chroniques de l'irradiation gamma, mesurés sur la croissance et la reproduction au cours d'un cycle de vie chez *C. elegans*, à l'aide d'un modèle DEBtox doté d'une métrique de dose spécifiquement définie pour le cas de la radiotoxicité.

4.2.2. Une métrique pour le stress radiologique chronique dans les modèles DEBtox

Dans le cas des contaminants chimiques, le modèle DEBtox exprime classiquement l'intensité du stress toxique comme une fonction de la concentration interne C_i (voir paragraphe 4.1.5). Dans le cas du rayonnement ionisant, toutefois, le modèle DEBtox requiert qu'une métrique appropriée soit introduite pour mesurer le niveau d'exposition à l'origine du stress radiologique. En radiobiologie, le débit de dose DR (en Gy par h), qui mesure la quantité d'énergie déposée par kg de tissu par unité de temps, est la métrique standard de la radiotoxicité chronique. Les études d'écotoxicité radiologique, telles que celles rassemblées dans la base de données FREDERICA durant les programmes européens FASSET et ERICA (Williams, 2004 ; Larsson, 2008), montrent, de façon tout à fait similaire, que l'intensité des effets induits durant des expositions radiologiques prolongées peut être corrélée au débit de dose DR . Des valeurs d' EDR_{10} , débits de dose effectifs produisant 10 % d'effet, l'équivalent des EC_{10} (concentrations effectives) pour les contaminants chimiques (voir paragraphe 2.6.2) sont estimées pour différents critères chez des espèces variées à partir des données d'effets des radiations chroniques (Garnier-Laplace et al., 2006). C'est ainsi que le débit de dose est envisagé comme l'équivalent de la concentration interne du facteur de toxicité (en J par volume corporel au lieu des moles) et utilisé comme métrique de dose dans un modèle DEBtox appliqué à la radiotoxicité.

Pour ce faire, le stress toxique est directement relié au débit de dose DR à l'aide de la fonction de stress $s(DR)$ selon le système d'équations suivants :

$$\begin{cases} s(DR) = 0 & \text{si } DR < DR_0 \\ s(DR) = b(DR - DR_0) & \text{si } DR \geq DR_0 \end{cases} \quad (\text{Equation 14})$$

où la radiotoxicité affecte le budget énergétique quand le débit de dose DR excède le débit de dose sans effet DR_0 et b est la pente de l'intensité du stress, exprimée en $\text{mGy}^{-1} \text{ h}$. Dans les tests d'irradiation gamma, le débit de dose DR absorbé par les nématodes ne varie pas au cours du temps, car la distance des unités expérimentales aux sources de radiation gamma est constante. En conséquence, l'intensité du stress est considérée comme constante, aucune équation toxico-cinétique n'étant nécessaire pour décrire les variations du débit de dose au cours du temps.

4.2.3. Modèles DEBtox pour les nématodes

L'un des objectifs de l'étude est d'identifier, pour la première fois, le ou les modes d'action métaboliques associés à la radiotoxicité. Notre objectif est atteint à l'aide de deux modèles DEBtox simplifiés, à savoir : la version initiale formulée spécifiquement pour les nématodes et sa récente révision (Jager et al., 2005 ; Goussen et al., 2015b). Les deux

modèles DEBtox tiennent compte, à l'aide de modifications semi-mécanistiques ajoutées au modèle standard (Tableaux 15 et 16), des spécificités observées dans les courbes de croissance et de reproduction du nématode, dont la traduction mathématique diffère légèrement entre les auteurs :

- La première spécificité réside dans la croissance réduite observées chez les stades précoces, qui est imputée à une limitation nutritionnelle des individus les plus petits (Byerly et al., 1976 ; Knight et al., 2002). Elle est prise en compte à l'aide d'une fonction S_f de limitation de l'ingestion, dépendante de la taille. Par rapport à Jager et al. (2005), Goussen et al. (2015b) propose un paramètre supplémentaire, noté α_f (mais que nous préférons rebaptiser $\alpha_f - l_f$ l'indice f étant ajouté pour éviter toute confusion avec le niveau de signification statistique α), afin de rendre le modèle applicable dans une plus large gamme de conditions nutritionnelles. Ainsi, des valeurs de α_f inférieures à 1 permettent aux nématodes d'accéder à une fraction $(1 - \alpha_f)$ de la nourriture quelle que soit leur taille et de croître même lorsque la disponibilité de la nourriture est partiellement limitante.
- La seconde spécificité concerne l'arrêt de la reproduction observé au cours du cycle de vie. Cet arrêt, associé au nombre fini de gamètes mâles, intervient lorsque la reproduction cumulée R , atteint un nombre maximal quantifié par le paramètre supplémentaire R_{max} . Il est pris en compte à l'aide d'une fonction S_R de limitation de la reproduction. Goussen et al. (2015b) propose d'utiliser un terme de la forme $\frac{R_{max}-R}{R_{max}}$ pour mimer l'arrêt progressif de la reproduction observé au voisinage de R_{max} (Byerly et al., 1976 ; Muschiol et al., 2009) de sorte à éviter la discontinuité induite par la fonction à seuil formulée par Jager et al. (2005).

Tableau 15. Paramètres supplémentaires du modèle DEBtox pour les nématodes

Symbole	Unité	Interprétation
α_f	–	Coefficient de limitation de l'ingestion
L_f	mm	Taille à laquelle la limitation de l'ingestion vaut la moitié de son maximum (1/2 ou $\alpha_f/2$)
l_f	–	$l_f = L_f/L_m$ taille L_f normalisée par L_m
R_{max}	Œufs	Reproduction cumulée maximale au cours du cycle de vie
k_2	–	Ratio du stress sur R_{max} par rapport au stress sur le DEB

Tableau 16. Fonctions additionnelles des modèles DEBtox pour les nématodes, à savoir $S_f(l)$ la fonction de limitation de l'ingestion et $S_R(R)$ la fonction de limitation de la reproduction.

Fonction	Jager et al. (2005)	Goussen et al. (2015b)
$S_f(l)$	$S_f(l) = 1 - \left(1 + \frac{l_f^3}{l^3}\right)^{-1}$	$S_f(l) = \alpha_f \left[1 - \left(1 + \frac{l_f^3}{l^3}\right)^{-1}\right]$
$S_R(R)$	$S_R(R) = 1$ si $R < R_{max}(DR)$ $S_R(R) = 0$ si $R \geq R_{max}(DR)$	$S_R(R) = \frac{R_{max}(DR) - R}{R_{max}(DR)}$

Les deux versions du modèle DEBtox (Jager et al., 2005 et Goussen et al., 2015b) sont ajustées aux données d'effet des radiations gamma chroniques pour chacun des cinq modes d'action standards (voir paragraphe 4.1.6) (Kooijman et Bedaux, 1996 ; Jager et Zimmer, 2012). Les résultats sont ensuite comparés afin de voir si nos conclusions dépendent du modèle choisi. A chaque fois, l'hypothèse que la toxicité affecte directement la gamétogénèse mâle est prise en compte en réduisant la quantité maximale d'œufs produits $R_{max}(DR)$ à chaque débit de dose DR grâce à l'équation :

$$R_{max}(DR) = \frac{R_{max}}{1 + k_2 \cdot s(DR)} \quad (\text{Equation 15})$$

où R_{max} est la reproduction cumulée maximale au cours du cycle de vie des témoins non exposés et k_2 correspond au ratio du stress sur R_{max} par rapport au stress $s(DR)$ sur le budget énergétique. Comme précédemment, on dispose de différents systèmes d'équations formulés pour chaque mode d'action :

• Modèle témoin pour les nématodes non exposés

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{dl}{dt} = \dot{r}_B (f(1 - s_f) - l) & \text{avec } l(0) = l_b \\ \dot{R}(l) = 0 & \text{si } l < l_p \\ \dot{R}(l) = \frac{\dot{R}_m}{1 - l_p^3} \left[f(1 - s_f) l^2 \left(\frac{g + l}{g + f(1 - s_f)} \right) - l_p^3 \right] \cdot S_R(R) & \text{si } l \geq l_p \end{array} \right. \quad (\text{Eq. 16})$$

• Modèle "Assimilation"

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{dl}{dt} = \dot{r}_B \frac{f(1 - s_f) + g}{f(1 - s_f)(1 - s(DR)) + g} (f(1 - s_f)(1 - s(DR)) - l) & \text{avec } l(0) = l_b \\ \dot{R}(l) = 0 & \text{si } l < l_p \\ \dot{R}(l) = \frac{\dot{R}_m}{1 - l_p^3} \left[f(1 - s_f)(1 - s(DR)) l^2 \left(\frac{g + l}{g + f(1 - s_f)(1 - s(DR))} \right) - l_p^3 \right] \cdot S_R(R) & \text{si } l \geq l_p \end{array} \right. \quad (\text{Eq. 17})$$

• Modèle "Maintenance"

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{dl}{dt} = \dot{r}_B (f(1 - s_f) - l(1 + s(DR))) & \text{avec } l(0) = l_b \\ \dot{R}(l) = 0 & \text{si } l < l_p \\ \dot{R}(l) = \frac{\dot{R}_m(1 + s(DR))}{1 - l_p^3} \left[f(1 - s_f) l^2 \left(\frac{g(1 + s(DR))^{-1} + l}{g + f(1 - s_f)} \right) - l_p^3 \right] \cdot S_R(R) & \text{si } l \geq l_p \end{array} \right. \quad (\text{Eq. 18})$$

• Modèle "Croissance"

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{dl}{dt} = \dot{r}_B \frac{f(1 - s_f) + g}{f(1 - s_f) + g(1 + s(DR))} (f(1 - s_f) - l) & \text{avec } l(0) = l_b \\ \dot{R}(l) = 0 & \text{si } l < l_p \\ \dot{R}(l) = \frac{\dot{R}_m}{1 - l_p^3} \left[f(1 - s_f) l^2 \left(\frac{g(1 + s(DR)) + l}{g(1 + s(DR)) + f(1 - s_f)} \right) - l_p^3 \right] \cdot S_R(R) & \text{si } l \geq l_p \end{array} \right. \quad (\text{Eq. 19})$$

• Modèle “Coût”

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dl}{dt} = \dot{r}_B(f(1-s_f) - l) \\ \dot{R}(l) = 0 \\ \dot{R}(l) = \frac{\dot{R}_m}{1-l_p^3} \left[f(1-s_f)l^2 \left(\frac{g+l}{g+f(1-s_f)} \right) - l_p^3 \right] \cdot (1+s(DR))^{-1} \cdot S_R(R) \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{avec } l(0) = l_b \\ \text{si } l < l_p \\ \text{si } l \geq l_p \end{array} \quad (Eq. 20)$$

• Modèle “Mortalité”

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dl}{dt} = \dot{r}_B(f(1-s_f) - l) \\ \dot{R}(l) = 0 \\ \dot{R}(l) = \frac{\dot{R}_m}{1-l_p^3} \left[f(1-s_f)l^2 \left(\frac{g+l}{g+f(1-s_f)} \right) - l_p^3 \right] \cdot \exp(-s(DR)) \cdot S_R(R) \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{avec } l(0) = l_b \\ \text{si } l < l_p \\ \text{si } l \geq l_p \end{array} \quad (Eq. 21)$$

4.2.4. Résultats

Les effets analysés chez les nématodes correspondent à des réductions significatives au plus fort débit de dose testé (26,8 mGy h⁻¹) de la taille à 3 jours et de la reproduction cumulée sur la vie entière (Figure 37) (Lecomte-Pradines et al., 2017). De manière générale, le modèle de Goussen et al. (2015b) parvient mieux à décrire les données que le modèle de Jager et al. (2005), avec une différence d’au moins 8,5 entre les scores d’AIC, le Critère d’Information

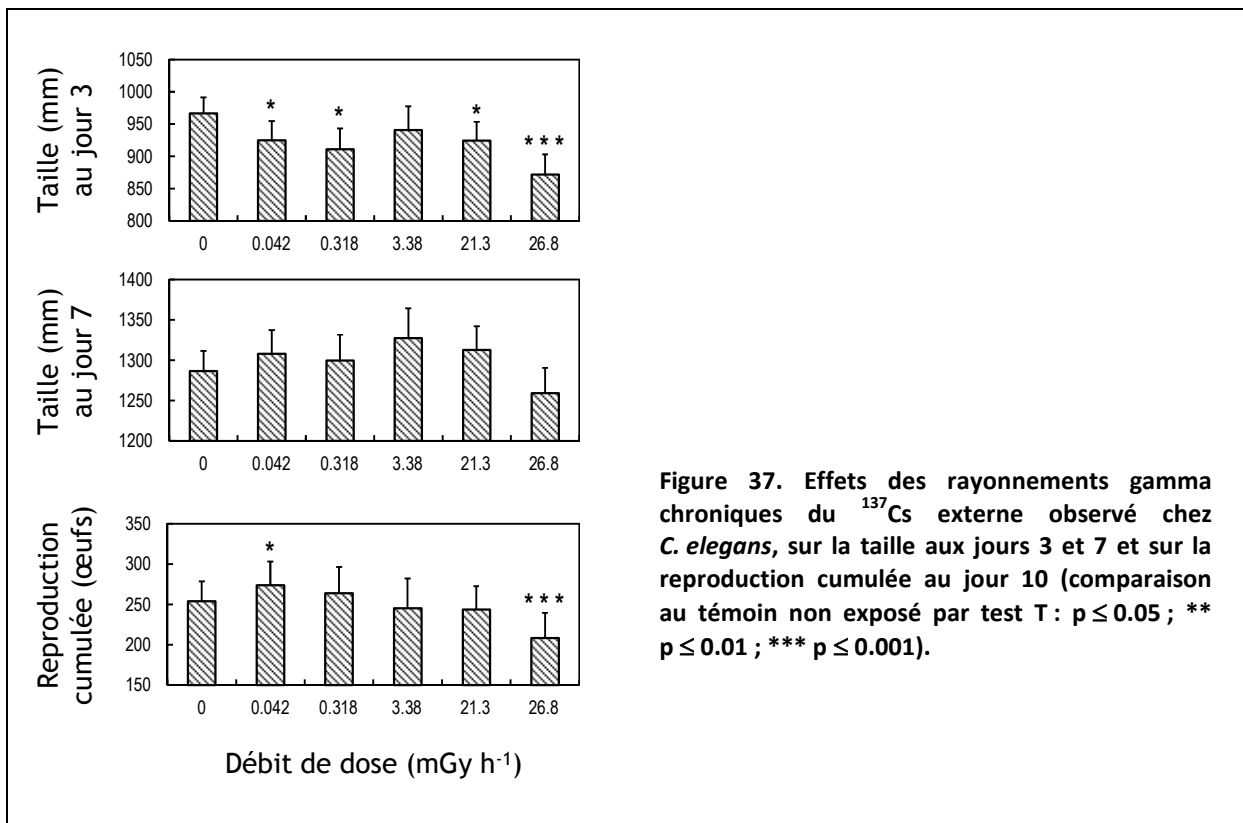
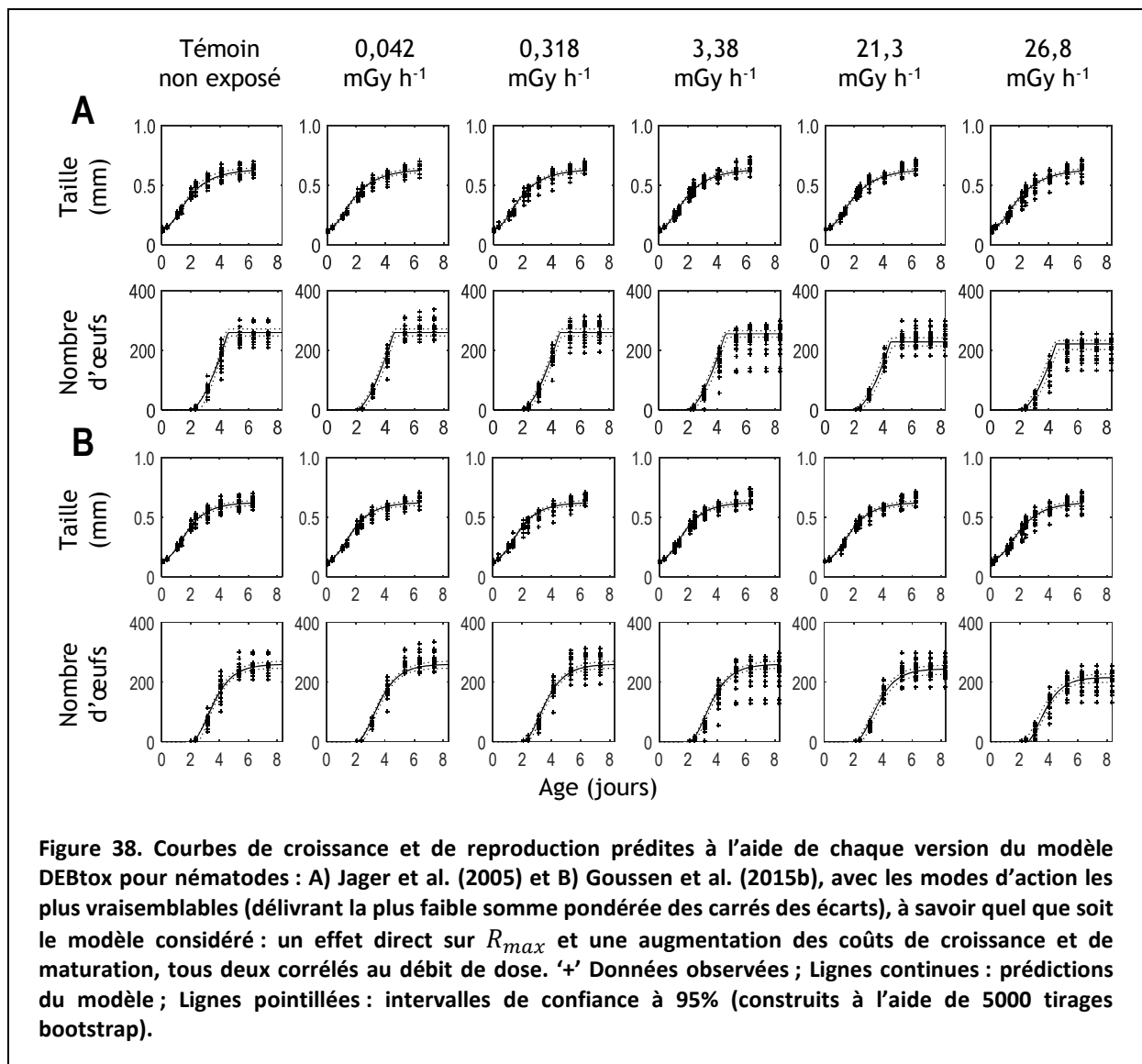


Figure 37. Effets des rayonnements gamma chroniques du ¹³⁷Cs externe observé chez *C. elegans*, sur la taille aux jours 3 et 7 et sur la reproduction cumulée au jour 10 (comparaison au témoin non exposé par test T : p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.01 ; *** p ≤ 0.001).

d'Akaike correspondant à la vraisemblance pénalisée par le nombre de paramètres de chaque modèle. La différence tient en partie à l'arrêt progressif de la reproduction introduite dans le modèle de Goussen et al. (2015b) qui décrit mieux les données observées au voisinage de R_{max} (Figure 38).

La conclusion la plus marquante de l'étude, au-delà du succès de l'application de l'approche DEBtox au cas des rayonnements ionisants, est que le mode d'action métabolique le plus vraisemblable correspond à une augmentation du coût de croissance et de maturation, avec une différence d'AIC d'au moins 75 par rapport aux autres modes d'action. Cet effet sur le budget énergétique n'est toutefois pas suffisant pour expliquer la réduction de la reproduction, qui doit être expliqué par un effet direct sur R_{max} . Ces modes d'action sont les mêmes, que l'on utilise le modèle de Goussen et al. (2015b) ou de Jager et al. (2005). L'effet sur R_{max} suggère que la toxicité du rayonnement gamma affecte le stock de gamètes mâles, ce qui est en accord avec l'observation d'une apoptose radio-induite dans les gonades de *C. elegans* (Gartner et al., 2000 ; Craig et al., 2012 ; Guo et al., 2013 ; Buisset-Goussen al., 2014).



Les paramètres dits « physiologiques, qui gouvernent le comportement basal du modèle DEB et dont on estime la valeur à partir des données issues des nématodes témoins, s’ajustent à des valeurs légèrement différentes selon le modèle utilisé (Tableau 17). Cependant, la valeur des paramètres toxicodynamiques, qui gouvernent la manière dont le modèle DEB répond à la radiotoxicité, ne diffère pas significativement entre les modèles de Goussen et al. (2015b) et de Jager et al. (2005). Ainsi, les conclusions de l’analyse DEBtox ne semblent pas dépendre du choix du modèle. Le débit de dose DR_0 , au-dessus duquel le budget énergétique est affecté, présente une valeur moyenne de $18,8 \text{ mGy h}^{-1}$, une valeur qui pourrait différer si les effets étaient analysés au-delà de la première génération exposée, à mesure que la radiotoxicité augmente (Buisset-Goussen al., 2014). Avec une valeur de k_2 supérieure à 1, le paramètre R_{max} apparaît plus radiosensible que le coût de croissance et de maturation sur le budget énergétique, ce qui est en accord avec l’idée, dans la littérature, que l’irradiation gamma affecte principalement la reproduction – tout du moins dans la première génération exposée.

4.3. PREMIERE APPLICATION DU MODELE DEBTOX AU CAS DE L’U APPAUVRI

4.3.1. Un contexte d’exposition multigénérationnelle novateur

Même si, pour des raisons de logique, j’ai d’abord présenté l’application du modèle au cas de la radiotoxicité gamma, c’est avec les daphnies exposées à l’U appauvri lors de la thèse de Sandrine Massarin (2010) qu’est réalisée la première application du modèle DEBtox au cas

Tableau 17. Paramètres DEBtox estimés à partir des données de croissance et de reproduction des nématodes témoins non exposés (paramètres dits « physiologiques », de g à R_{max}) et des nématodes exposés aux différents débits de dose (paramètres toxico-dynamiques, de DR_0 à k_2), à l’aide des modèles de Jager et al. (2005) et Goussen et al. (2015b). Seuls les modes d’action les plus vraisemblables (délivrant la plus faible somme pondérée des carrés des écarts) sont considérés, à savoir quel que soit le modèle considéré : un effet direct sur R_{max} et une augmentation des coûts de croissance et de maturation, tous deux corrélés au débit de dose. Intervalles de confiance à 95% entre crochets construits à l’aide de 5000 tirages bootstrap (Lecomte-Pradines et al., 2017).

Symbole	Unité	Modèle DEBtox utilisé	
		Jager et al. (2005)	Goussen et al. (2015b)
g	–	10,7 [8,84 – 39,5]	8,25 [2,05 – 13,7]
α_f	–	–	0,851 [0,807 – 0,871]
L_m	mm	1290 [1250 – 1334]	1290 [1250 – 1335]
l_b	–	0,194 [0,185 – 0,205]	0,194 [0,185 – 0,205]
l_f	–	0,262 [0,248 – 0,277]	0,335 [0,315 – 0,366]
l_p	–	0,677 [0,665 – 0,733]	0,723 [0,701 – 0,751]
\dot{r}_B	par jour	0,753 [0,686 – 0,853]	0,981 [0,858 – 1,12]
\dot{R}_m	Œufs par jour	203 [188 – 232]	339 [312 – 439]
R_{max}	Œufs	260 [248 – 272]	260 [248 – 272]
DR_0	mGy h^{-1}	18,9 [12,2 – 20,9]	18,8 [11,3 – 21,8]
b	$\text{mGy}^{-1} \text{ h}$	$1,42 [0,519 – 2,24] \times 10^{-2}$	$1,49 [0,521 – 2,30] \times 10^{-2}$
k_2	–	2,32 [1,31 – 4,85]	1,74 [0,932–4,63]

d'un radionucléide. L'étude publiée a fait l'objet d'une collaboration avec les Dr. Alexandre Péry et Rémy Beaudouin de l'INERIS (unité METO) représentée, en outre, ma première incursion dans le monde de la modélisation DEBtox (Massarin et al., 2011).

L'objectif est d'identifier le mode d'action associé à la toxicité de l'U appauvri en analysant les données issues de Massarin et al. (2010). Au regard des effets observés sur la croissance (voir paragraphe 2.4.3), seuls deux modes d'action vont être confrontés : une réduction d'assimilation (dont on se doute qu'elle a un rôle à jouer, puisque nous l'avons mesurée – voir paragraphe 2.4.4) et une augmentation des coûts de maintenance. L'hypothèse d'une augmentation des coûts de croissance et de maturation, troisième mode d'action standard affectant la croissance, est écartée car elle n'induit pas le type d'effet observé, à savoir une réduction de la taille maximale atteinte par les daphnies exposées. Etant donnée la nature de la toxicité en jeu, celle d'un métal radioactif majoritairement chimiotoxique, l'application du modèle DEBtox au cas de l'U appauvri reste classique dans son concept : la fonction de stress ne nécessite aucune transformation, avec une intensité corrélée à la concentration interne (paragraphe 4.1.5). De plus, les courbes de croissance et de reproduction des daphnies ne présentent pas de spécificité particulière qu'il serait nécessaire de prendre en compte et les équations à utiliser sont celles du DEBtox standard (paragraphe 4.1.6). Le véritable aspect novateur de l'étude réside dans le contexte d'exposition multigénérationnelle et l'analyse de données de toxicité révélant une aggravation au fil des générations. L'utilisation du DEBtox qui est faite dans ce contexte est la plus simple : on analyse les courbes de croissance et de reproduction pour chaque génération considérée séparément et on examine quelle(s) paramètre(s) varie(nt) entre les générations, suite à l'augmentation en intensité des effets.

4.3.2. Résultats

Avec la fonction de stress corrélée à la concentration interne normalisée, les valeurs estimées de \dot{k}_e (taux d'élimination de l'U appauvri dans les daphnies) sont celles d'une cinétique d'internalisation très rapide (> 18 par jour) quel que soit le mode d'action considéré. Elles reflètent l'atteinte quasi-immédiate de l'équilibre par C_i^* . En d'autres termes, la valeur de C_i^* ne varie pas au cours du temps et l'intensité du stress induit par l'U appauvri est directement proportionnelle à la concentration C_w d'U appauvri dans le milieu. Sur ces éléments, on tente de s'affranchir de l'équation toxico-cinétique pour faire l'économie du paramètre \dot{k}_e . A cette fin, on relie directement l'intensité du stress à la concentration externe :

$$\begin{cases} s(C_w) = 0 & \text{si } C_w < C_0 \\ s(C_w) = b(C_w - C_0) & \text{si } C_w \geq C_0 \end{cases} \quad (\text{Equation 22})$$

L'ajustement d'un modèle DEBtox aboutit aux mêmes valeurs de somme pondérée des carrés des écarts, que la fonction de stress soit associée à la concentration interne C_i^* ou à la concentration externe C_w . Suite à ce résultat, le principe de parcimonie veut qu'on valide le choix d'un modèle DEBtox sans équation toxico-cinétique. L'ajustement des différents

modèles aux données montre que la réduction d'assimilation est le mode d'action qui délivre la somme pondérée des carrés des écarts la plus faible (essentiellement par une meilleure description des courbes de croissance) et semble donc être le plus vraisemblable (Massarin et al., 2011). On en conclut qu'une réduction d'assimilation proportionnelle à la concentration externe d'U appauvri est suffisante pour expliquer les effets induits sur la croissance et la reproduction des daphnies (Figure 39). Ce résultat est en accord avec les données d'histologie et de physiologie (qu'on n'a pas utilisées pour l'ajustement du modèle), mettant en évidence des dommages à la surface de l'épithélium intestinal et une réduction du taux d'assimilation du carbone chez les daphnies exposées à l'U appauvri (paragraphe 2.4.2 et 2.4.4) (Massarin et al., 2010, 2011). Il l'est également avec les analyses DEBtox qui seront conduites plus tard chez le poisson-zèbre *D. rerio* et le nématode *C. elegans* chez qui l'exposition à l'U appauvri induit, de façon similaire, des réductions de l'assimilation (Augustine et al., 2012 ; Goussen et al., 2015b).

Grâce à cette étude, des résultats d'analyses DEBtox peuvent être comparés entre des générations successives (Tableau 18). Tout d'abord, on constate que les paramètres physiologiques (L_b , l_p , L_m , \dot{r}_B et \dot{R}_m), ceux qui gouvernent la croissance et la reproduction

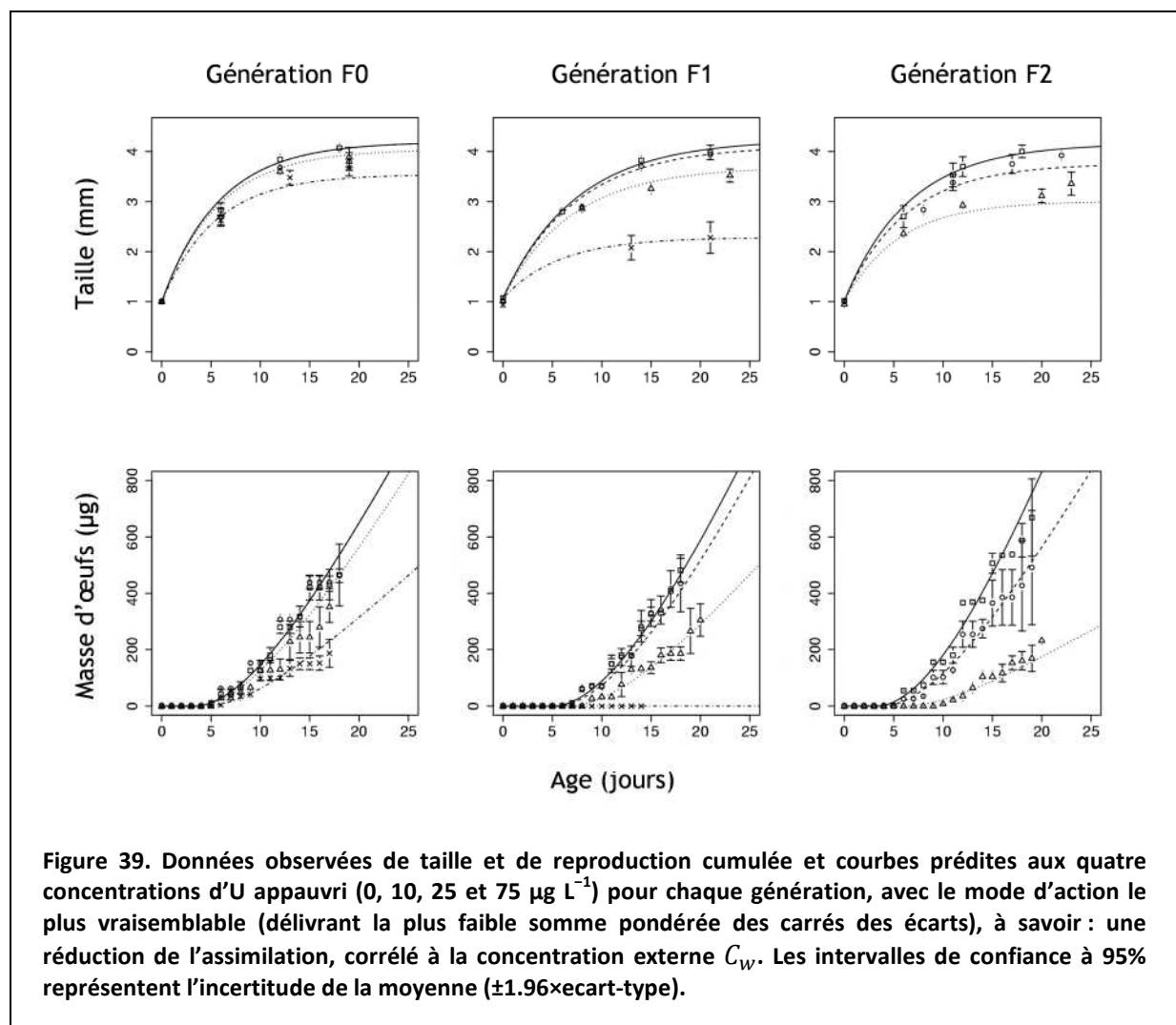


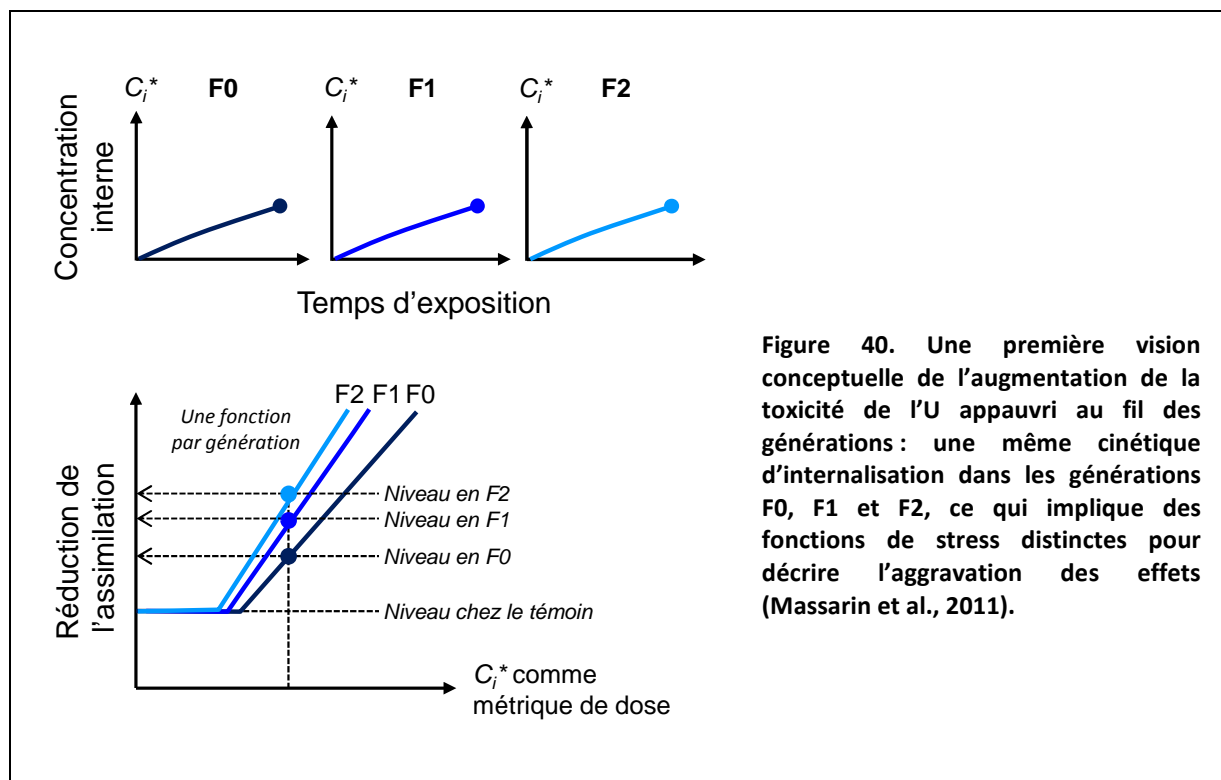
Tableau 18. Paramètres DEBtox estimés pour chaque génération, à partir des données de croissance et de reproduction des daphnies témoins non exposées (paramètres dits « physiologiques », de L_b à $\dot{R}_m - g$ étant fixé à 1) et des daphnies exposées aux différentes concentrations d'U appauvri (paramètres toxico-cinétiques et toxico-dynamiques, de C_0 à \dot{k}_e). Seuls le mode d'action le plus vraisemblable (délivrant la plus faible somme pondérée des carrés des écarts) est considéré, à savoir quel que soit la génération considérée : une réduction de l'assimilation, directement corrélée à la concentration dans l'eau C_w – l'équation toxico-cinétique du DEBtox n'est donc pas utilisée et le paramètre k_e n'est pas estimé. Intervalles de confiance à 95% entre crochets construits à l'aide de 10 000 tirages bootstrap (Massarin et al., 2010, 2011).

Symbole	Unité	Génération		
		F0	F1	F2
L_b	mm	1,00 [0,984-1,02]	1,08 [1,04-1,12]	1,02 [0,969-1,05]
L_m	mm	4,28 [3,56-4,94]	4,24 [3,90-4,59]	4,23 [3,58-4,84]
l_p	–	0,553 [0,265-0,874]	0,645 [0,543-0,748]	0,560 [0,350-0,788]
\dot{r}_B	jour ⁻¹	0,153 [0,0478-0,288]	0,134 [0,104-0,168]	0,147 [0,0671-0,249]
\dot{R}_m	µg œufs jour ⁻¹	66,7 [32,6-105]	74,4 [53,7-96,5]	87,3 [44,7-133]
C_0	µg L ⁻¹	10,0 [0,00-10,0]	5,76 [2,30-14,4]	2,03 [0,00-7,20]
b	µg ⁻¹ L	2,4 [1,6-3,6] × 10 ⁻³	6,7 [5,7-9,1] × 10 ⁻³	13,1 [8,2-16,5] × 10 ⁻³
\dot{k}_e	–	–	–	–

des conditions témoins ne peuvent être ajustés de façon commune entre les générations. En effet, de petites différences dans les conditions expérimentales entre les générations, induisent une variabilité chez les témoins et limite l'acuité du modèle à distinguer les effets de la toxicité dans les conditions exposées. On comprend donc qu'il est préférable d'ajuster ces paramètres dans chaque génération et on voit que ce sont l_p et \dot{R}_m , les paramètres associés à la reproduction, qui varient le plus entre les générations. La valeur ajustée des paramètres toxico-dynamiques (C_0 et b) reflète l'accroissement de la toxicité au fil des générations. On observe ainsi la décroissance de C_0 (respectivement 10, 5,8 et 2,0 µg L⁻¹ dans les générations F0, F1 et F2), qui indique que l'assimilation est affectée à des concentrations de plus en plus faibles. Les intervalles de confiance à 95% sont toutefois très larges et laissent cette décroissance statistiquement non significative. En parallèle, l'accroissement – significatif – de la pente b (respectivement 2,4 10⁻³, 6,7 10⁻³ et 13,1 10⁻³ µg⁻¹ L dans les générations F0, F1 et F2) traduit l'augmentation de l'intensité du stress sur l'assimilation (Massarin et al., 2011).

4.3.3. Premières interprétations

Les études de Massarin et al. (2010, 2011) démontrent que l'exposition à l'U appauvri affecte l'épithélium intestinal et l'assimilation de la nourriture chez les daphnies et entraîne des effets sur la survie, la croissance et la reproduction qui augmentent au fil des générations exposées. Les analyses DEBtox (Massarin et al., 2011) confirment la réduction d'assimilation comme mode d'action le plus vraisemblable et concluent qu'en l'absence de toute différence dans la concentration d'U appauvri internalisée par les daphnies (voir paragraphe 2.4.3), seules différentes fonctions de stress, spécifiques de chaque génération peuvent traduire l'aggravation observée des effets (Figure 40). Cette interprétation repose, en fait, sur



l'hypothèse que les générations successives sont toutes exposées de manière identique, à partir de l'éclosion comme c'est communément le cas dans un DEBtox standard, et sans tenir compte de ce qui pourrait se passer durant le stade embryonnaire. Le mécanisme causant les variations de stress toxique sur l'assimilation n'est, en fait, pas élucidé et l'augmentation en sévérité des effets entre les générations reste alors inexpliquée.

4.4. DEUXIEME APPLICATION DU MODELE DEBTOX AU CAS DE L'U APPAUVRI

4.4.1. Contexte

Pourquoi les paramètres de la fonction de stress de l'U appauvri varieraient-ils d'une génération à l'autre ? C'est dans la thèse de Delphine Plaire que les modélisations DEBtox des effets de l'U appauvri se doivent de répondre à la question cruciale qui est posée (Plaire, 2013). La recherche de la réponse passe par deux apports conceptuels des plus intéressants : la modélisation du stade œuf et le compartiment de dommage transgénérationnel.

Les nouveaux résultats acquis (Plaire et al., 2013) plaident pour une meilleure prise en compte des scénarios d'exposition et de l'influence de l'exposition du stade embryonnaire dont l'exposition contribue à une plus forte intensité des effets (voir paragraphe 2.4.5). Or cet aspect a été complètement négligé dans les premières analyses DEBtox (Massarin et al., 2011). Pourtant, les différences d'exposition existant entre la génération F0 et les générations suivantes dans les données de Massarin et al. (2010) doivent logiquement contribuer à l'accroissement observé de la toxicité. Ils doivent y contribuer, mais seulement en partie : le fait que l'aggravation perdure alors même que les générations sont exposées strictement aux mêmes stades de vie – entre les générations F1 et F2 dans Massarin et al. (2010) et entre les

générations F0 et F1 dans Plaire et al. (2013), implique l'existence d'un autre mécanisme. Ce mécanisme est forcément lié, directement ou indirectement, aux altérations de l'ADN mises en évidence. Leur transmission des parents à la progéniture et leur accumulation au fil des générations s'opèrent en même temps qu'augmente la sévérité des effets (Plaire et al., 2013). Dans l'un des scénarios d'exposition testés, les effets ne s'aggravent pas, ce qui s'accompagne d'une décroissance des altérations de l'ADN. En bref, tout ce passe comme si la sensibilité plus ou moins forte des daphnies à l'U appauvri était associée à un dommage cumulable et transmissible une génération à la suivante.

4.4.2. Un dommage transmissible pour expliquer les effets transgénérationnels

Les effets transgénérationnels représentent un cas particulier des situations d'exposition dans lesquelles l'intensité de la toxicité varie sans pouvoir être corrélée au niveau d'exposition. Dans certains tests de toxicité, les effets observés ne suivent pas la même cinétique que la concentration interne – quand celle-ci est mesurée au cours de l'exposition. Ces situations sont prises en compte à l'aide d'un compartiment de dommage, dont le concept est introduit dans la modélisation dite « GUTS » (General Unified Threshold model of Survival) qui vise à analyser les données de survie par une approche mécaniste (Jager et al., 2011). Le dommage est défini comme un compartiment toxico-dynamique additionnel, « ne pouvant être mesuré directement, qui intègre les processus biochimiques et physiologiques de tous types, impliqués dans la toxicité ». Dans un modèle GUTS, le niveau dans le compartiment de dommage, noté D , augmente proportionnellement à la concentration interne et décroît proportionnellement à son niveau courant. Si l'on suppose une cinétique du premier ordre, similaire à celle de la concentration interne C_i :

$$\frac{dD}{dt} = k_d C_i - k_r D \quad (\text{Equation 23})$$

avec k_d et k_{er} les taux d'endommagement et de réparation (par unité de temps). Comme précédemment, la valeur de D peut être normalisée par son facteur de bioconcentration selon l'équation :

$$D^* = \frac{k_r}{k_d} D \quad (\text{Equation 24})$$

avec D^* le niveau normalisé de dommage doté des mêmes unités que la concentration interne, ce qui aboutit à l'équation simplifiée suivante pour la cinétique du dommage :

$$\frac{dD^*}{dt} = k_r (C_i - D^*) \quad (\text{Equation 25})$$

L'idée est de décorréler les effets de la concentration interne en reliant l'intensité du stress au niveau de dommage :

$$\begin{cases} s(D^*) = 0 & \text{si } D^* < C_0 \\ s(D^*) = b(D^* - C_0) & \text{si } D^* \geq C_0 \end{cases} \quad (\text{Equation 26})$$

Dans nos études, le modèle DEBtox, classiquement appliqué sur un cycle de vie unique, est rendu transgénérationnel afin de décrire l'accroissement des effets au fil des générations exposées. Pour ce faire, on introduit un compartiment de dommage dont le niveau est transmis d'une génération à la suivante – ce qui revient, très simplement, à assigner la valeur atteinte par la femelle au moment de la ponte comme valeur initiale dans l'œuf fraîchement pondu. Le niveau de dommage (toujours normalisé par le facteur de bioconcentration et exprimé dans l'unité de mesure correspondante : en $\mu\text{g L}^{-1}$) peut ainsi continuer d'augmenter au fil des générations et expliquer pourquoi les effets de l'U appauvri observés chez *D. magna* sont plus forts dans la progéniture que chez les parents (Figure 41).

4.4.3. Exposition du stade embryonnaire

Là où l'approche DEBtox ne considère l'exposition qu'à partir de l'éclosion (ce qui correspond à la situation des tests de toxicité standards), le modèle proposé dans la thèse de Delphine Plaire cherche, pour sa part, à prendre en compte l'influence de l'exposition du stade embryonnaire en incluant, pour la première fois, le stade œuf. Ce stade est caractérisé par l'absence de nutrition et de croissance. Pour simplifier, on néglige les coûts de maintenance et de maturation qui sont pris sur les réserves énergétiques déposées au moment de la ponte. On considère simplement que la taille est constante et égale à celle à l'éclosion. Le stade œuf (qui dure trois jours chez *D. magna*) partage avec les autres stades de vie les mêmes paramètres toxico-cinétiques. Ainsi, le contaminant – l'U appauvri en l'occurrence – peut être internalisé avec la même cinétique (à ceci près qu'il n'y subit pas de dilution par la croissance) et le dommage être accumulé, tout comme dans le reste du cycle de vie. Au moment de l'éclosion, un niveau de stress peut donc être présent ou rester nul, selon que le stade œuf était exposé ou non.

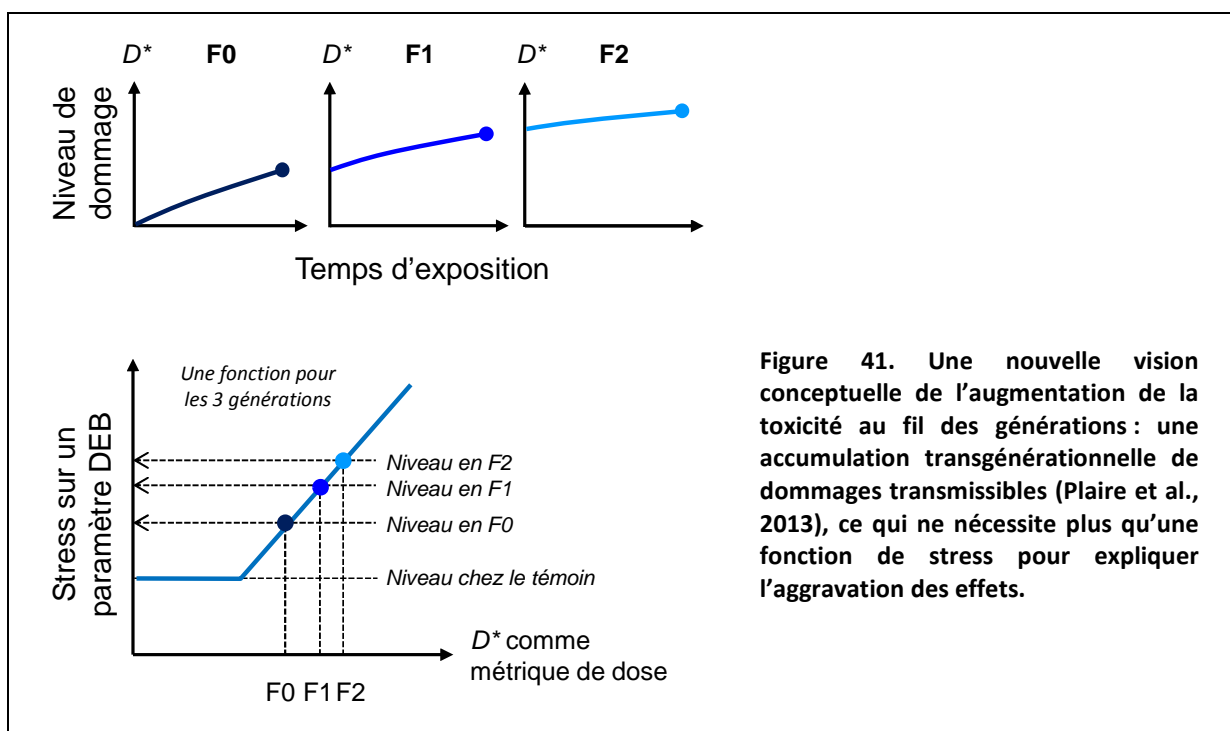
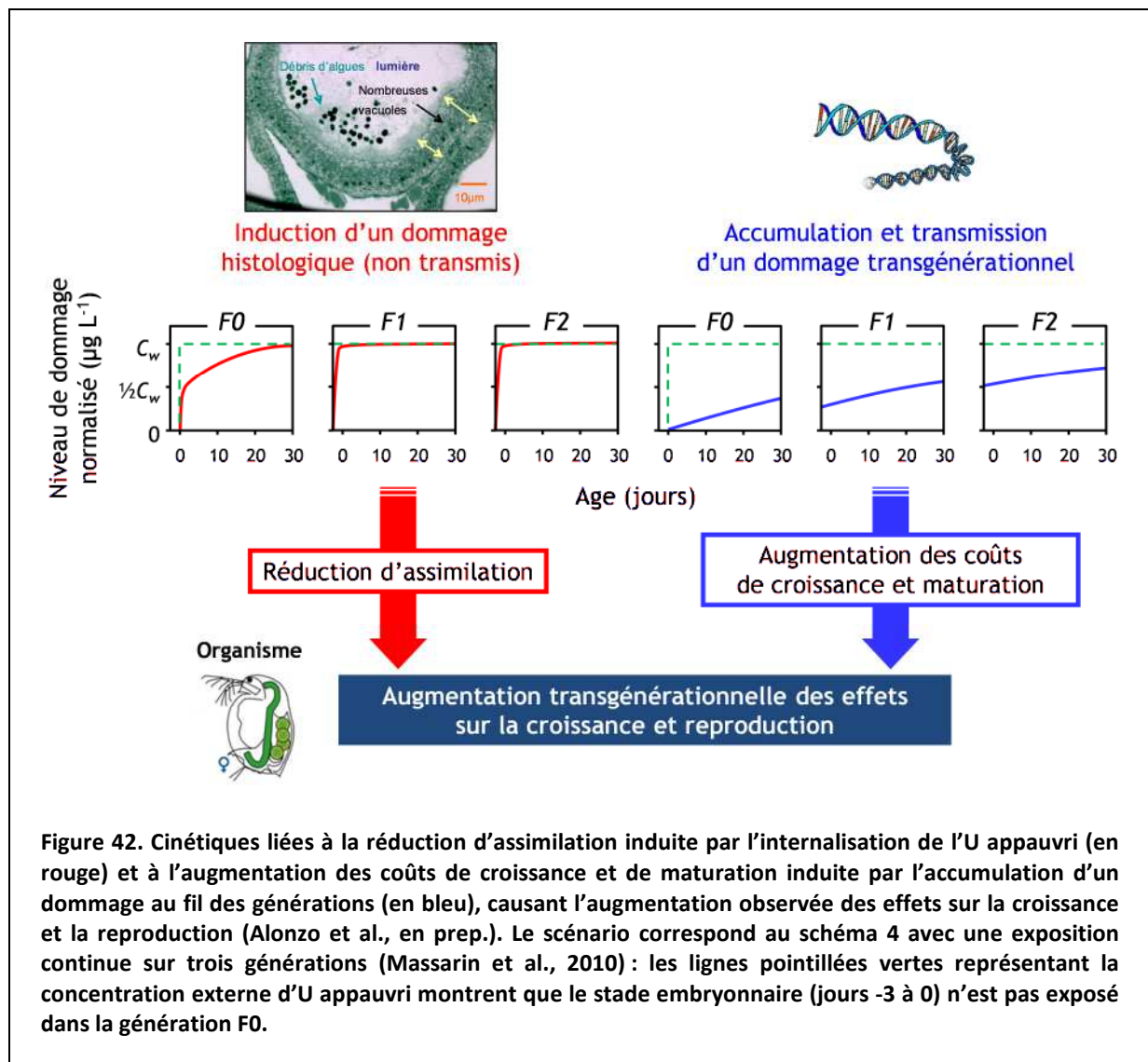


Figure 41. Une nouvelle vision conceptuelle de l'augmentation de la toxicité au fil des générations : une accumulation transgénérationnelle de dommages transmissibles (Plaire et al., 2013), ce qui ne nécessite plus qu'une fonction de stress pour expliquer l'aggravation des effets.

4.4.4. Deux modes d'action pour décrire les effets de l'U appauvri

La combinaison potentielle de deux modes d'action, suivant chacun leur cinétique propre – l'une liée à la concentration d'exposition et l'autre au niveau de dommage transgénérationnel – est très vite pressentie. L'implication d'une réduction de l'assimilation, démontrée lors des études antérieures, est indéniable (Massarin et al., 2010, 2011). La question est alors d'identifier quel mode d'action supplémentaire intervient en parallèle lors de l'accumulation transgénérationnelle de dommage. Les données montrent que la toxicité augmente à la fois pour la croissance et la reproduction, ce qui permet d'écarter les modes d'action n'agissant que sur la reproduction (modèles « Coûts » et « Mortalité »). C'est la vraisemblance des trois modes d'action restants (Modèles « Assimilation », « Maintenance » et « Croissance ») qui est donc comparée. Les premiers ajustements, réalisés avec la méthode fréquentiste lors de la thèse de Delphine Plaire (2013), pointent une augmentation des coûts de croissance et de maturation (Modèle « Croissance ») comme second mode d'action le plus vraisemblable agissant en parallèle de la réduction d'assimilation (Figure 42).



Au-delà de l'identification des deux modes d'action en jeu, l'estimation des paramètres du modèle (Tableau 19) aboutit à des cinétiques prédites des plus intéressantes pour la compréhension de la contribution de chaque mode d'action à l'apparition des effets et le rôle joué par l'exposition du stade embryonnaire :

- On retrouve (en bleu à droite) la cinétique lente associée au dommage transmissible qui, grâce à un taux de réparation \dot{k}_r de 0,015 par jour, s'accumule progressivement au fil des générations. L'accumulation transgénérationnelle de dommage induirait alors le retard grandissant de croissance et de reproduction, observé au fil des générations dans Massarin et al. (2010) et Plaire et al. (2013).

- La cinétique associée à la réduction d'assimilation (en rouge à gauche) souligne tout l'intérêt de la modélisation du stade œuf. Avec un taux d'élimination \dot{k}_e de 0,33 par jour, cette cinétique s'avère extrêmement sensible à l'exposition du stade embryonnaire : dans la génération F0 où le stade embryonnaire n'est pas exposé, l'internalisation est fortement ralentie par la dilution par la croissance, aboutissant à une concentration maximale ($C_i^* = C_w$) vers le jour 30 ; dans les générations F1 et F2 où le stade embryonnaire est exposé, l'internalisation rapide aboutit à une concentration maximale ($C_i^* = C_w$) dès l'éclosion. Qu'en conclure ? Premièrement, que le modèle confirme l'importance du stade embryonnaire dont la différence d'exposition dans les générations F0 et F1 contribue fortement à l'augmentation de l'effet sur l'assimilation dans les données de Massarin et al. (2010). Deuxièmement, que le modèle prédit un même niveau d'effet sur l'assimilation entre les générations F1 et F2 exposées de façon identique. Il se trouve que cette prédiction peut donc être examinée puisqu'on a mesuré l'assimilation des daphnies exposées à l'U appauvri et que les données n'ont pas servi à paramétrer le modèle (paragraphe 2.4.4.). La Figure 18 (page 108) montre (en particulier à la concentration de $10 \mu\text{g L}^{-1}$) que la prédiction du modèle est effectivement supportée par les observations : l'effet sur l'assimilation augmente entre les générations F0 et F1 mais n'augmente plus entre les générations F1 et F2 – détail qui nous avait échappé jusque-là !

Tableau 19. Paramètres toxico-cinétiques et toxico-dynamiques estimés du modèle DEBtox, à partir des données de croissance et de reproduction des daphnies exposées aux différentes concentrations d'U appauvri (Massarin et al., 2010 et Plaire et al., 2013). Seuls la combinaison de modes d'action la plus vraisemblable (délivrant la plus faible somme pondérée des carrés des écarts) est considérée, à savoir : une réduction de l'assimilation, corrélée à la concentration interne C_i^* , combinée à une augmentation des coûts de croissance et de maturation corrélée au dommage transgénérationnel D^* .

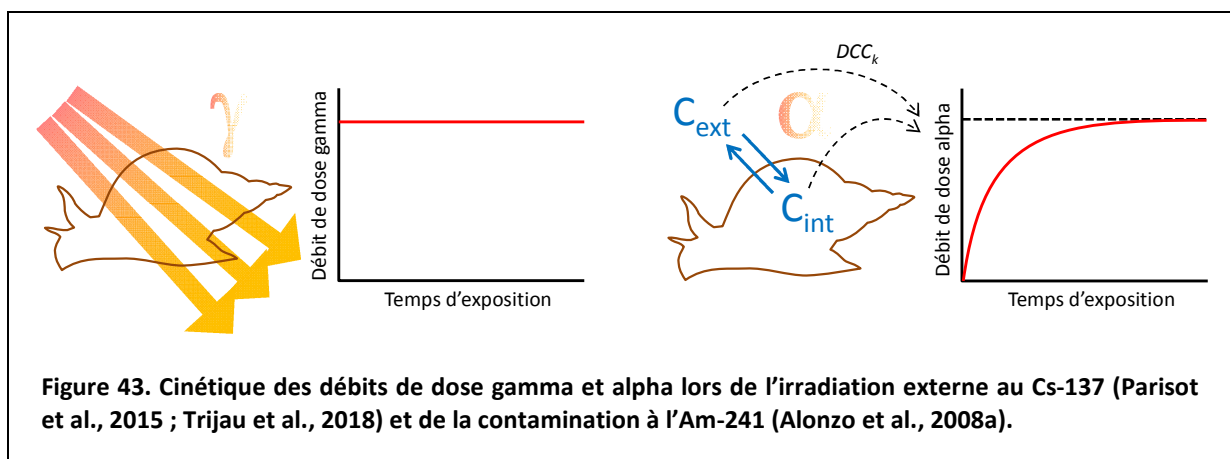
Symbole	Unité	Mode d'action	
		Assimilation	Croissance
Métrique	$\mu\text{g L}^{-1}$	C_i^* (non transmis)	D^* transgénérationnel
C_0	$\mu\text{g}^{-1} \text{L}$	5,3	0,04
b	$\mu\text{g}^{-1} \text{L}$	$0,3 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-2}$
\dot{k}_e	par jour	0,33	–
\dot{k}_r	par jour	–	0,015

Avec une concentration sans effet C_0 de $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ pour le dommage transgénérationnel, le modèle prédit une aggravation des effets dès la plus faible concentration testée, en accord avec la détection tardive d'altérations de l'ADN et la faible réduction de taille et de reproduction observées dans la génération F1 à $2 \mu\text{g L}^{-1}$ (Plaire et al., 2013) – voir les Figures 19 et 20 (pages 110 et 111) et Tableau 10 (page 123). Avec une concentration sans effet C_0 de $5,3 \mu\text{g L}^{-1}$ pour la réduction d'assimilation, le modèle prédit un effet sur l'assimilation, très faible dans la génération F0 à $10 \mu\text{g L}^{-1}$ – ce qui peut être confirmé dans la Figure 18 – et absent à la concentration de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ – une prédiction qui pourrait être testée dans une future expérience.

4.5. ANALYSE BAYESIENNE DES EFFETS TRANSGENERATIONNELS (U APPAUVRI, Cs-137, AM-241)

4.5.1. Application du modèle DEBtox au cas de la radiotoxicité gamma et alpha

Lors du programme européen STAR et de la thèse de Florian Parisot (2015), le modèle DEBtox est utilisée afin d'analyser les données multigénérationnelles de croissance et de reproduction de *D. magna* exposé à l'irradiation gamma par le Cs-137 externe et à la contamination alpha par l'Am-241 dissous (Parisot et al., 2015 ; Alonzo et al., 2008a). Cette application requiert que le modèle toxico-cinétique soit adapté aux deux situations d'exposition très contrastées (Figure 43). La métrique de dose choisie est le débit de dose DR (en mGy h^{-1}), qui a précédemment fait ses preuves avec *C. elegans* exposé au rayonnement gamma (Cs-137) (Lecomte-Pradines et al., 2017). Dans le cas du rayonnement gamma, ici encore, le débit de dose absorbé par les daphnies dépend seulement de la distance aux sources de Cs-137 et ne varie pas au cours du temps (Figure 43). La situation est éminemment différente dans le cas de la contamination à l'Am-241, les émetteurs alpha délivrant principalement leur dose quand ils sont internalisés par les organismes. La modélisation DEBtox implique de mettre en place un modèle toxico-cinétique simple, décrivant la variation de la concentration interne d'Am-241 chez les daphnies (dans les tissus essentiellement et dans la cuticule et le milieu dans une bien moindre mesure). Les concentrations d'Am-241 étant mesurées (Alonzo et al., 2008a), c'est l'équation cinétique de la concentration interne



(non normalisée) qui est appliquée (Equation 5). On utilise les coefficients de conversion de dose (DCC_k), variables selon la taille des daphnies, pour convertir les concentrations simulées dans chaque compartiment k en débit de dose alpha, à l'aide de l'Equation 1 (voir paragraphe 2.3.1).

4.5.2. Deux modes d'action pour décrire les effets des rayonnements ionisants

Quel que soit le radionucléide considéré (Cs-137 ou Am-241), les effets observés sur la croissance et la reproduction ne suivent pas les mêmes cinétiques. En particulier, les fortes réductions de fécondité dans la génération F0 lors de l'irradiation gamma et dans la génération F2 lors de la contamination alpha ne peuvent être expliquées par les faibles réductions de taille associées. Il faut donc, comme dans le cas de l'U appauvri, considérer l'implication conjointe de deux modes d'action distincts, l'un parmi les modèles « Assimilation », « Maintenance » ou « Croissance » (qui agissent à la fois sur la croissance et la reproduction – je rappelle qu'on ne peut pas réduire la taille sans affecter la fécondité aussi) et l'autre entre les modèles « Coût » ou « Mortalité » (qui agissent sur la reproduction seulement). Nous comparons donc, au total, six combinaisons de modes d'action.

Chaque mode d'action est associé à un compartiment de dommage transgénérationnel, tel qu'introduit dans la thèse de Delphine Plaire (2013), et assorti d'une cinétique propre. Les niveaux de dommage sont, comme précédemment, normalisés et exprimés dans l'unité correspondant au niveau d'exposition, soit en $mGy h^{-1}$ puisque l'on considère la radiotoxicité gamma ou alpha, dépendante du débit de dose DR . D'une manière générale, on peut décrire la cinétique de chaque compartiment de dommage suivant l'équation :

$$\frac{dD_i^*}{dt} = \dot{k}_{ri}(DR - D_i^*) \quad (\text{Equation 27})$$

où le niveau de dommage normalisé D_i^* est associé au mode d'action i et au taux de réparation \dot{k}_{ri} .

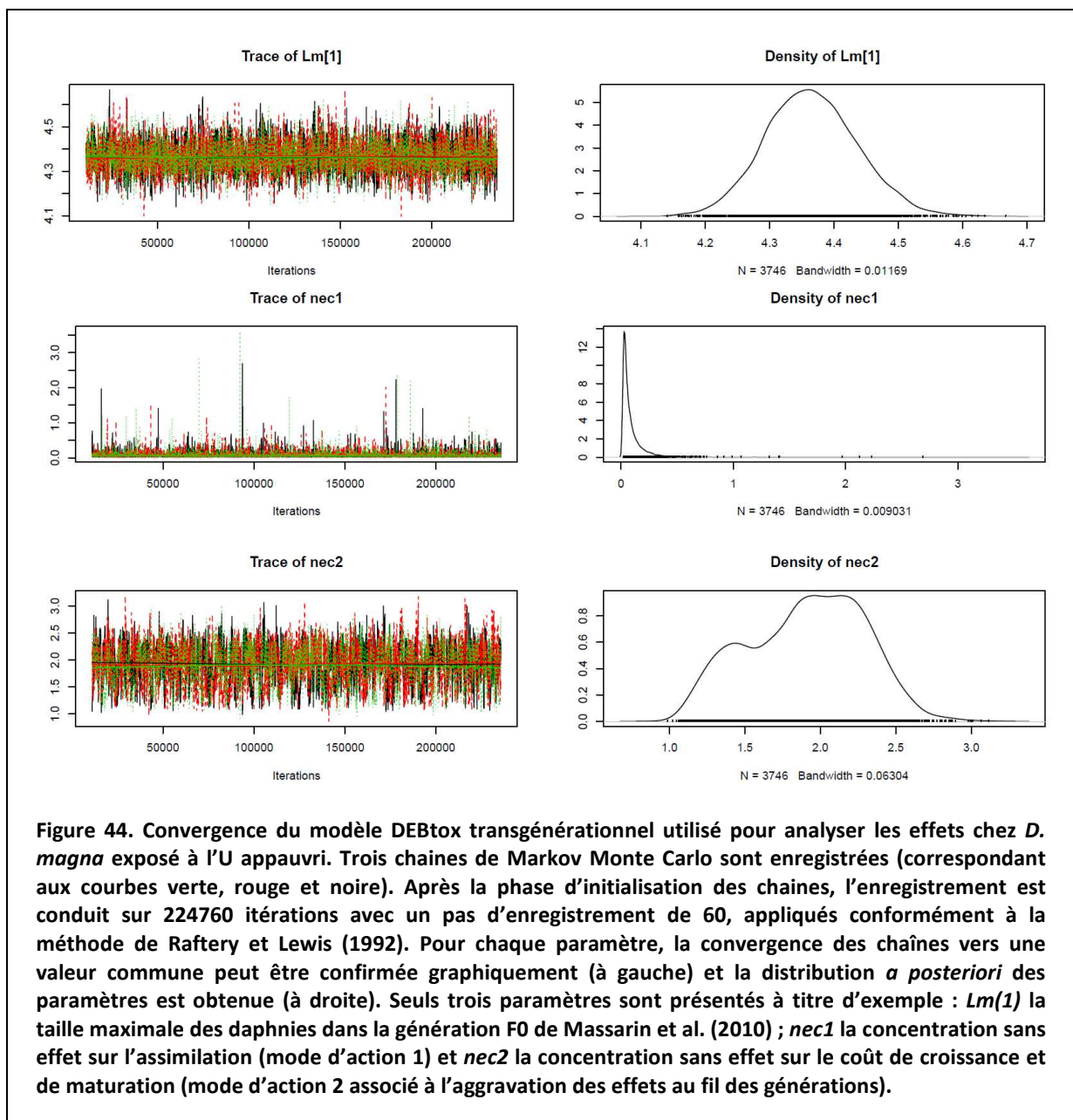
Dans le cas de l'irradiation gamma, l'effet sur la fécondité, significatif dans la génération F0, s'atténue dans la génération F1 (Parisot et al., 2015). Parmi les explications possibles, l'hypothèse d'une réparation plus efficace du dommage semble la plus plausible, car elle implique une réduction du niveau de dommage en accord avec le déclin observé des altérations de l'ADN entre les générations F0 et F1. Dans le modèle, elle se traduit par une augmentation du taux de réparation \dot{k}_{r1} entre la génération F0 et les générations suivantes. On peut alors exprimer les cinétiques de D_1^* , le niveau de dommage normalisé par le facteur de bioconcentration $\frac{\dot{k}_{d1}}{\dot{k}_{r1,0}}$:

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{dD_1^*}{dt} = \dot{k}_{r1,0}(DR - D_1^*) & \text{dans la génération F0} \\ \frac{dD_1^*}{dt} = \dot{k}_{r1,0}DR - \dot{k}_{r1,1}D_1^* & \text{dans les générations F1 et F2} \end{array} \right. \quad (\text{Equation 28})$$

où $\dot{k}_{r1,0}$ et $\dot{k}_{r1,1}$ sont les valeurs du taux de réparation \dot{k}_{r1} , dans la génération F0 et dans les générations F1 et F2 respectivement, avec $\dot{k}_{r1,0} < \dot{k}_{r1,1}$.

4.5.3. Analyses bayésiennes

Avec le projet DEB-RAD réalisé en collaboration avec le Dr. Elise Billoir (UMR 7360) de l'Université de Lorraine, l'inférence bayésienne vient, dans la thèse de Marie Trijau (2018) et le DESU d'Antoine Alonzo, remplacer l'approche fréquentiste. L'idée est d'analyser les données multigénérationnelles acquises chez *D. magna* (U appauvri et rayonnements gamma et alpha) à l'aide de modèles DEBtox transgénérationnels et de quantifier l'intervalle de crédibilité des paramètres et des prédictions. Les analyses bayésiennes sont réalisées sous R (R Core team, 2012) à l'aide des packages Rjags et Coda permettant de piloter JAGS (Just Another Gibbs Sampler)(Plummer, 2003) et d'en évaluer les sorties. Trois chaînes de Markov sont calculées simultanément (Figure 44). Le nombre d'itérations nécessaires pour atteindre la convergence des chaînes est déterminé grâce à la méthode de Raftery et Lewis (1992),



appliquée à tous les modèles à partir d'un échantillon de 5000 itérations obtenu après une phase préliminaire d'initialisation des chaînes (5000 itérations). La convergence des simulations vers une solution est vérifiée graphiquement sur l'enregistrement des chaînes de Markov Monte Carlo (MCMC) puis évaluée quantitativement à l'aide des tests de Gelman et Rubin (1992) modifié par Brooks et Gelman (1998) et Geweke (Geweke, 1992). Pour chaque radionucléide, toutes les combinaisons de modes d'action parviennent à converger vers une solution. La Figure 44 illustre le cas de chaînes de Markov Monte Carlo ayant convergé et la distribution a posteriori des paramètres obtenus.

Les jeux de données sont scindés en plusieurs parties, lorsque leur taille est suffisamment conséquente pour le permettre (ce qui est le cas pour U appauvri et Cs-137). Une première partie des données est utilisée pour alimenter les distributions a priori utilisées dans l'inférence bayésienne (priors). Une seconde partie sert pour ajuster les paramètres du modèle, selon la méthode décrite ci-dessus (étape d'apprentissage). La dernière partie des données est utilisée pour valider les ajustements en comparant les prédictions du modèle à des données n'ayant pas servi à l'ajustement (étape de validation). Cette étape est accomplie en comptant la proportion de données observées (taille et reproduction confondues) comprises dans l'intervalle de crédibilité des prédictions pour différents niveaux de crédibilité (50%, 80%, 95%, 99%). Le Tableau 20 résume la manière selon laquelle sont utilisés les jeux de données issues des différents articles publiés (Alonzo et al., 2006, 2008a ; Gilbin et al., 2008 ; Zeman et al., 2008 ; Massarin et al., 2010 ; Plaire et al., 2013 ; Parisot et al., 2015 ; Trijau et al., 2018).

La valeur de DIC (Deviance Information Criterion), qui correspond à la déviance pénalisée par le nombre de paramètres du modèle, est utilisée pour comparer la vraisemblance des différentes combinaisons de modes d'action (Spiegelhalter et al., 2002, 2003).

Tableau 20. Résumé de l'utilisation des données selon les publications et les scénarios d'exposition.

Radionucléide	Jeux de données	Utilisation
U appauvri	Test chronique F0 (Zeman et al., 2008)	Priors
	Exposition continue F0 – F2 (Massarin et al., 2010)	Apprentissage
	Exposition continue F0 – F1 (Plaire et al., 2013)	Apprentissage
	Exposition post-éclosion F0 (Plaire et al., 2013)	Apprentissage
	Récupération F1 – F2 (Massarin et al., 2010)	Validation
	Exposition embryonnaire F0 – F1 (Plaire et al., 2013)	Validation
	Exposition post-éclosion F1 (Plaire et al., 2013)	Validation
Cs-137	Test chronique F0 (Gilbin et al., 2008)	Priors
	Exposition continue F0 – F2 (Parisot et al., 2010)	Apprentissage
	Exposition continue F0 (Trijau et al., 2018)	Validation
	Récupération F1 – F2 (Trijau et al., 2018)	Validation
Am-241	Test chronique F0 (Alonzo et al., 2006)	Priors
	Exposition continue F0 – F2 (Alonzo et al., 2008a)	Apprentissage

4.5.4. Résultats

Les premières conclusions sont les suivantes :

- Dans le cas de l'U appauvri, on confirme la combinaison de modes d'action la plus vraisemblable (délivrant la valeur de DIC la plus faible parmi les hypothèses testées) correspondant à une réduction de l'assimilation corrélée à la concentration et une augmentation des coûts de croissance et maturation corrélée au dommage transgénérationnel (Tableau 21). Les effets persistants observés après un retour en milieu non contaminé chez les daphnies exposés durant le stade œuf suggèrent un certain degré d'irréversibilité des effets qui est doit être testé en rendant l'un, l'autre ou chacun des deux modes d'action irréversible. De nouveaux ajustements testent les différentes hypothèses, suggérant que l'irréversibilité de l'effet sur l'assimilation est le plus vraisemblable, ce qui pourra dans le futur être validé à la lumière d'analyses complémentaires (des mesures du taux d'assimilation de daphnies replacées en milieu non contaminé, par exemple).
- Dans le cas de l'irradiation gamma externe (Cs-137), deux combinaisons de modes d'action apparaissent aussi vraisemblables, en délivrant les valeurs de DIC les plus faibles parmi les hypothèses testées (Tableau 21). Ces deux combinaisons pointent, l'une comme l'autre, une augmentation des coûts de croissance et de maturation comme mode d'action corrélé au dommage transgénérationnel de la radiotoxicité gamma. C'est la deuxième fois, après l'U appauvri, que ce mode d'action est associé à une augmentation transgénérationnelle des altérations de l'ADN, mesurée par RAPD-qPCR (Plaire et al., 2013 ; Parisot et al., 2015). Les données ne sont pas assez informatives pour identifier le deuxième mode d'action en lien avec

Tableau 21. Comparaison de la qualité de la convergence et de la vraisemblance entre les modèles (la flèche indique, pour chaque radionucléide, le DIC significativement le plus faible, correspondant à l'hypothèse la plus vraisemblable).

Radionucléide / toxicité	Modes d'action testés	Gelman	DIC
U appauvri / chimique (métal)	Assimilation + Croissance	1.01	12328 ←
	Assimilation + Maintenance	1.01	12339
	Assimilation + Assimilation	1.01	12339
Cs-137 / radiologique (gamma)	Coût + Croissance	1.00	6461 ←
	Coût + Maintenance	1.00	6492
	Coût + Assimilation	1.00	6488
	Mortalité + Croissance	1.00	6461 ←
	Mortalité + Maintenance	1.01	6491
	Mortalité + Assimilation	1.01	6488
Am-241 / radiologique (alpha)	Coût + Croissance	1.03	3299 ←
	Coût + Maintenance	1.03	3299 ←
	Coût + Assimilation	1.02	3300 ←
	Mortalité + Croissance	1.02	3313
	Mortalité + Maintenance	1.04	3312
	Mortalité + Assimilation	1.01	3305
	Coût	1.01	3304 ←
	Mortalité	1.02	3302 ←

la réduction transitoire de fécondité observée en génération F0, entre une augmentation du coût de l'œuf ou de la mortalité des ovocytes, tous deux délivrant de bons ajustements du modèle aux données (Figure 45). Des observations complémentaires dans les ovaires des daphnies exposées pourraient permettre de confirmer l'un ou l'autre de ces modes d'action, le premier impliquant un nombre décroissant d'ovocytes entrant en maturation, le second l'observation d'ovocytes dégénérés après leur entrée en maturation.

- Dans le cas de la contamination alpha interne (Am-241), trois combinaisons de modes d'action semblent aussi vraisemblables sachant qu'une différence de DIC inférieure à 5 est considérée comme non significative. Celles-ci impliquent à chaque fois une augmentation transgénérationnelle du coût de l'œuf (corrélée à un dommage) sans qu'il soit possible à partir des données, de discriminer la nature du second mode d'action (entre les modèles

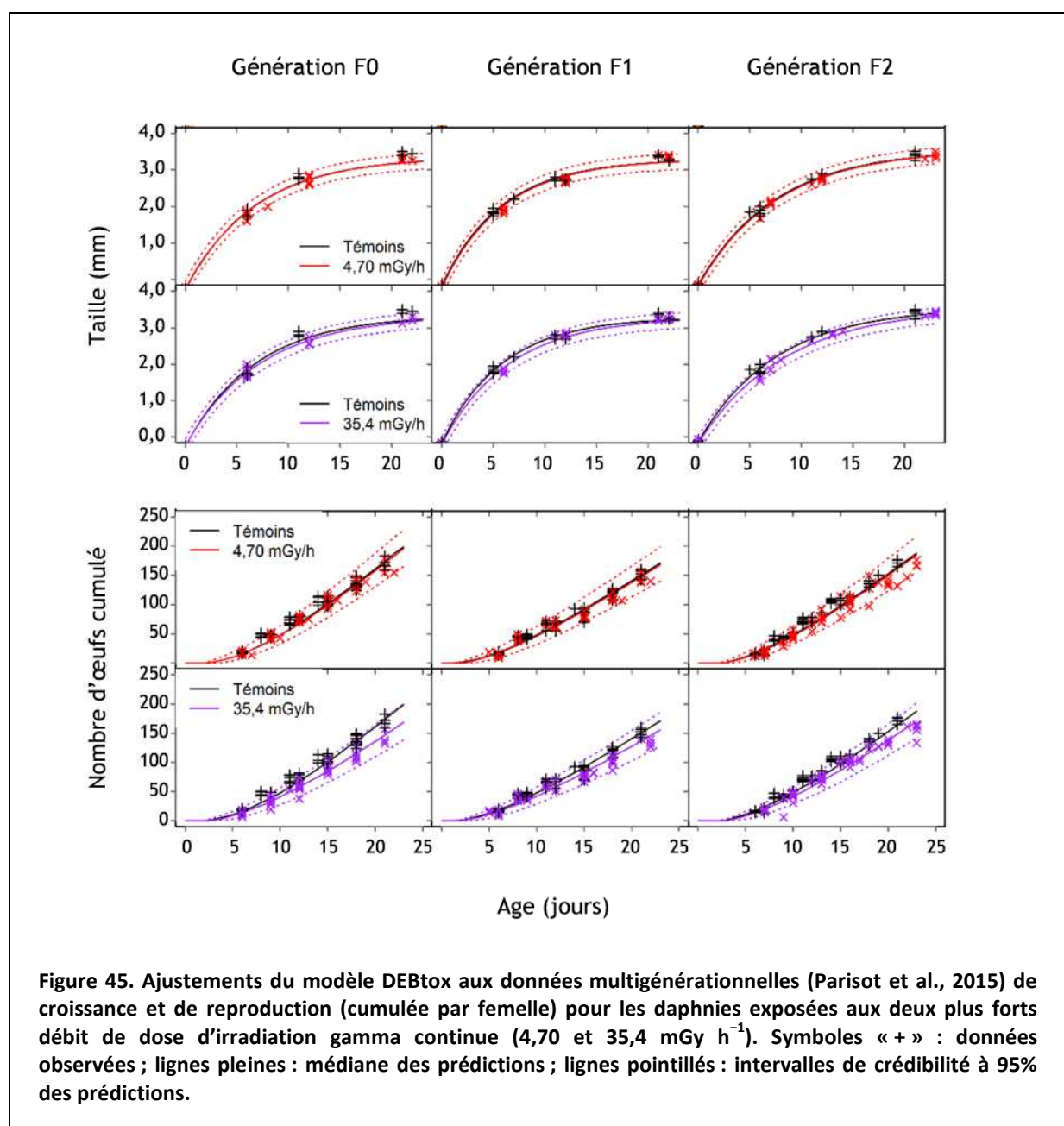


Figure 45. Ajustements du modèle DEBtox aux données multigénérationnelles (Parisot et al., 2015) de croissance et de reproduction (cumulée par femelle) pour les daphnies exposées aux deux plus forts débit de dose d'irradiation gamma continue (4,70 et 35,4 mGy h⁻¹). Symboles « + » : données observées ; lignes pleines : médiane des prédictions ; lignes pointillés : intervalles de crédibilité à 95% des prédictions.

« Assimilation », « Maintenance » ou « Croissance » censés expliquer les effets sur la croissance) (Tableau 21). Toutefois, au vu de la faiblesse des réductions de taille prédites par les modèles à deux modes d'action, l'hypothèse plus parcimonieuse d'un mode d'action seul, agissant directement sur la reproduction via les modèles « Coût » ou « Mortalité », est testée. Celle-ci apparaît tout aussi vraisemblable et le principe de parcimonie voudrait qu'on considère le modèle le moins complexe (un effet direct sur la reproduction, sans qu'il soit possible à partir des données de discriminer le mode d'action en jeu).

La distribution a posteriori des paramètres et leur intervalle de crédibilité peuvent être obtenus (Tableau 22). Dans le cas de l'U appauvri (Alonzo et al., en prep.), il est intéressant de noter que :

- les valeurs de C_0 pour les modes d'action 1 et 2 – les concentrations sans effet en dessous

Tableau 22. Estimation a posteriori de la moyenne et de l'intervalle de crédibilité des paramètres toxicocinétiques toxico-dynamiques du modèle DEBtox avec les modes d'action les plus vraisemblables pour chaque radionucléide.

Description	Symbole (unité)	Moyenne ± Ecart-type	Intervalle de crédibilité à 95%
U appauvri			
Mode d'action 1 « Assimilation »			
Concentration sans effet	$C_{0,1}$ (µg / L)	$0,10 \pm 0,14$	[0,02 – 0,42]
Pente du stress	b_1 (L / µg)	$(3,76 \pm 0,27) 10^{-3}$	[3,18 – 4,25] 10^{-3}
Taux d'élimination (de la concentration interne)	k_{e1} (/ jour)	$(0,99 \pm 0,10) 10^{-1}$	[0,91 – 1,26] 10^{-1}
Mode d'action 2 « Croissance »			
Concentration sans effet	$C_{0,2}$ (µg / L)	$1,88 \pm 0,37$	[1,19 – 2,54]
Pente du stress	b_2 (L / µg)	$(2,13 \pm 0,17) 10^{-1}$	[1,77 – 2,45] 10^{-1}
Taux de réparation (du dommage)	k_{r2} (/ jour)	$(0,66 \pm 0,05) 10^{-2}$	[0,61 – 0,79] 10^{-2}
Cs-137			
Mode d'action 1 « Coût de l'œuf »			
Débit de dose sans effet	$DR_{0,1}$ (mGy / h)	$0,66 \pm 2,32$	[0,001 – 6,68]
Pente du stress	b_1 (h / mGy)	$(0,77 \pm 0,85) 10^{-2}$	[0,21 – 3,52] 10^{-2}
Taux de réparation (du dommage 1)	(en F0) k_{r1} (/ jour)	$0,38 \pm 0,45$	[0,01 – 1,68]
Taux de réparation (du dommage 1)	(en F1 – F2) k_{r1} (/ jour)	$0,81 \pm 0,65$	[0,02 – 2,46]
Mode d'action 2 « Croissance »			
Débit de dose sans effet	$DR_{0,2}$ (mGy / h)	$0,27 \pm 1,12$	[0,001 – 1,83]
Pente du stress	b_2 (h / mGy)	$(0,66 \pm 0,21) 10^{-2}$	[0,41 – 1,14] 10^{-2}
Taux de réparation (du dommage 2)	k_{r2} (/ jour)	$0,18 \pm 0,10$	[0,02 – 0,35]
Am-241			
Mode d'action « Coût de l'œuf »			
Débit de dose sans effet	DR_0 (mGy / h)	$0,11 \pm 0,22$	[0,02 – 1,01]
Pente du stress	b (h / mGy)	$8,53 \pm 19,0$	[0,72 – 73,7]
Taux de réparation (du dommage)	k (/ jour)	$0,14 \pm 0,34$	[0,02 – 1,28]
Am-241			
Mode d'action « Mortalité »			
Débit de dose sans effet	DR_0 (mGy / h)	$0,09 \pm 0,12$	[0,02 – 0,48]
Pente du stress	b (h / mGy)	$9,46 \pm 1,12$	[0,51 – 79,7]
Taux de réparation (du dommage)	k (/ jour)	$0,14 \pm 0,32$	[0,02 – 1,16]

desquelles le modèle ne prédit aucun effet sur l'assimilation ni aucune aggravation de la toxicité au fil des générations – sont toutes deux inférieures à $2 \mu\text{g L}^{-1}$, la plus faible concentration testée (Plaire et al., 2013), ce qui implique une validation au moyen d'expérimentations supplémentaires.

- la valeur de \dot{k}_e le taux d'élimination de l'U appauvri suggère que l'effet sur l'assimilation peut atteindre son intensité maximale en moins d'une génération mais que sa cinétique est susceptible d'être fortement ralentie du fait de la dilution par la croissance. On retrouve donc le comportement décrit plus haut (Figure 42 page 161) : la réduction d'assimilation contribue à l'aggravation de la toxicité d'U appauvri entre les générations F0 et F1 (car les deux générations ne sont pas exposées aux mêmes stades de vie, ce qui conduit à des cinétiques différentes) mais pas entre les générations F1 et F2 (car les deux générations sont exposées aux mêmes stades de vie).

- la valeur de \dot{k}_r le taux de réparation du dommage indique que l'effet sur le coût de la croissance et de la maturation nécessite plusieurs générations pour atteindre son intensité maximale, ce qui confère à ce mode d'action un rôle moteur dans l'aggravation de la toxicité observée entre les générations.

Dans le cas du Cs-137 (Trijau et al., en prep.), il est intéressant de noter que :

- bien que les intervalles de crédibilité de DR_0 , en dessous desquelles le modèle ne prédit aucun effet et aucune aggravation de la radiotoxicité au fil des générations, couvrent plusieurs ordres de grandeurs, leur borne inférieure est située à $1 \mu\text{Gy h}^{-1}$, en dessous du plus petit débit de dose testé. La possibilité que les débits de dose sans effet ne soit pas significativement différents de 0 nécessite d'être conforté par des données supplémentaires acquises sur un plus grand nombre de générations exposées. Le résultat est supporté par l'effet significatif détecté à $7 \mu\text{Gy h}^{-1}$ dans les générations F0 et F2 (Parisot et al., 2015).

- l'atténuation de l'effet sur la fécondité entre les générations F0 et F1 est bien décrite au travers de l'augmentation du taux de réparation \dot{k}_r du dommage, ce qui est en accord avec les résultats de génotoxicité obtenus à l'aide de la RAPD-qPCR (Parisot et al., 2015). Reste à expliquer cette augmentation, qui pourrait être le fruit d'une sélection des individus dotés d'une meilleure capacité de réparation (moins touchés par la mortalité et la réduction de fécondité observée) – ce qui est possible dans la mesure où la valeur de \dot{k}_r prédite dans la génération F1 se situe dans l'intervalle de crédibilité obtenu dans la génération F0.

Dans le cas de Am-241 (Billoir et al., en prep.), il est intéressant de noter que :

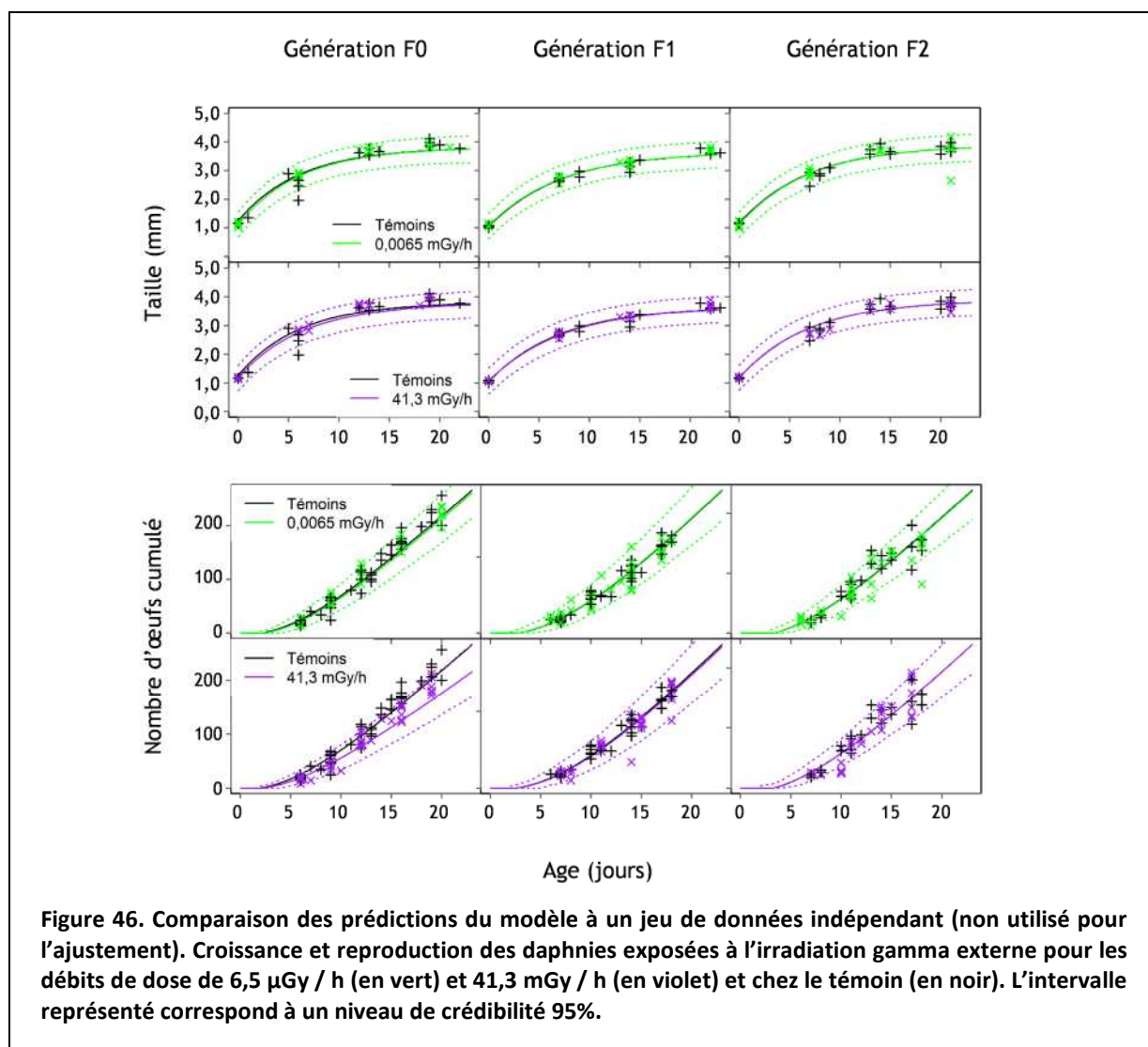
- la valeur de DR_0 – le débit de dose sans effet en dessous desquelles le modèle ne prédit aucun effet sur la fécondité – est, quel que soit le mode d'action considéré, inférieure à $0,3 \text{ mGy h}^{-1}$, le plus faible débit de dose testé (Alonzo et al., 2008a), ce qui nécessite, ici encore, une validation au travers d'expérimentations supplémentaires.

- dans le cas où, par analogie avec le cas du Cs-137, on considère un deuxième mode d'action indirect (modèle « Maintenance » ou « Croissance » non présentés dans le tableau), des valeurs élevées de \dot{k}_r le taux de réparation du dommage suggèrent une cinétique rapide, le stress radiotoxique atteignant rapidement un niveau maximal proportionnel au débit de dose (ce qui remet en question la nécessité de recourir au compartiment de dommage).

Le Tableau 23 et la Figure 46 résument la qualité prédictive du modèle. Celle-ci est soulignée par la correspondance étroite entre le pourcentage de données observées incluses dans l'intervalle de crédibilité des prédictions et le niveau de crédibilité considéré. Les

Tableau 23. Comparaison des prédictions du modèle à un jeu de données indépendant (non utilisé pour l'ajustement).

Modes d'action testés	Niveau de crédibilité	Pourcentage des données incluses dans l'intervalle
Coût de l'œuf + Croissance	50%	50 %
	80%	79%
	95%	91%
	99%	98%
Mortalité ovogénèse + Croissance	50%	51%
	80%	79%
	95%	92%
	99%	98%



résultats ne sont reportés que dans le cas de l'irradiation gamma externe (Cs-137) avec les modèles les plus vraisemblables (une augmentation des coûts de croissance et maturation couplée à une augmentation transitoire en génération F0 de la mortalité des ovocytes ou du coût de l'œuf) ajustés aux données issues de Parisot et al. (2015) et comparés aux données issues de Trijau et al. (2018).

Comme précédemment pour l'U appauvri, on peut tracer la cinétique prédite des dommages induits par le Cs-137 (Figure 47). Ceux-ci sont associés à la réduction de fécondité observée en génération F0 (Modèle « Coût » ou « Mortalité » en rouge à gauche) et à l'augmentation du retard sur la croissance et la reproduction (Modèle « Croissance » en bleu à droite). Ces cinétiques calquent les variations des altérations de l'ADN détectées par RAPD-qPCR (Parisot et al., 2015), marquées par un niveau de dommage transitoire plus faible au début de la génération F1. Elles reflètent également une forte incertitude dans les niveaux de dommage, ce qui pourrait être amélioré en acquérant de nouvelles données de croissance et de reproduction plus informatives et en utilisant les données de RAPD-qPCR pour calibrer les cinétiques des compartiments de dommage.

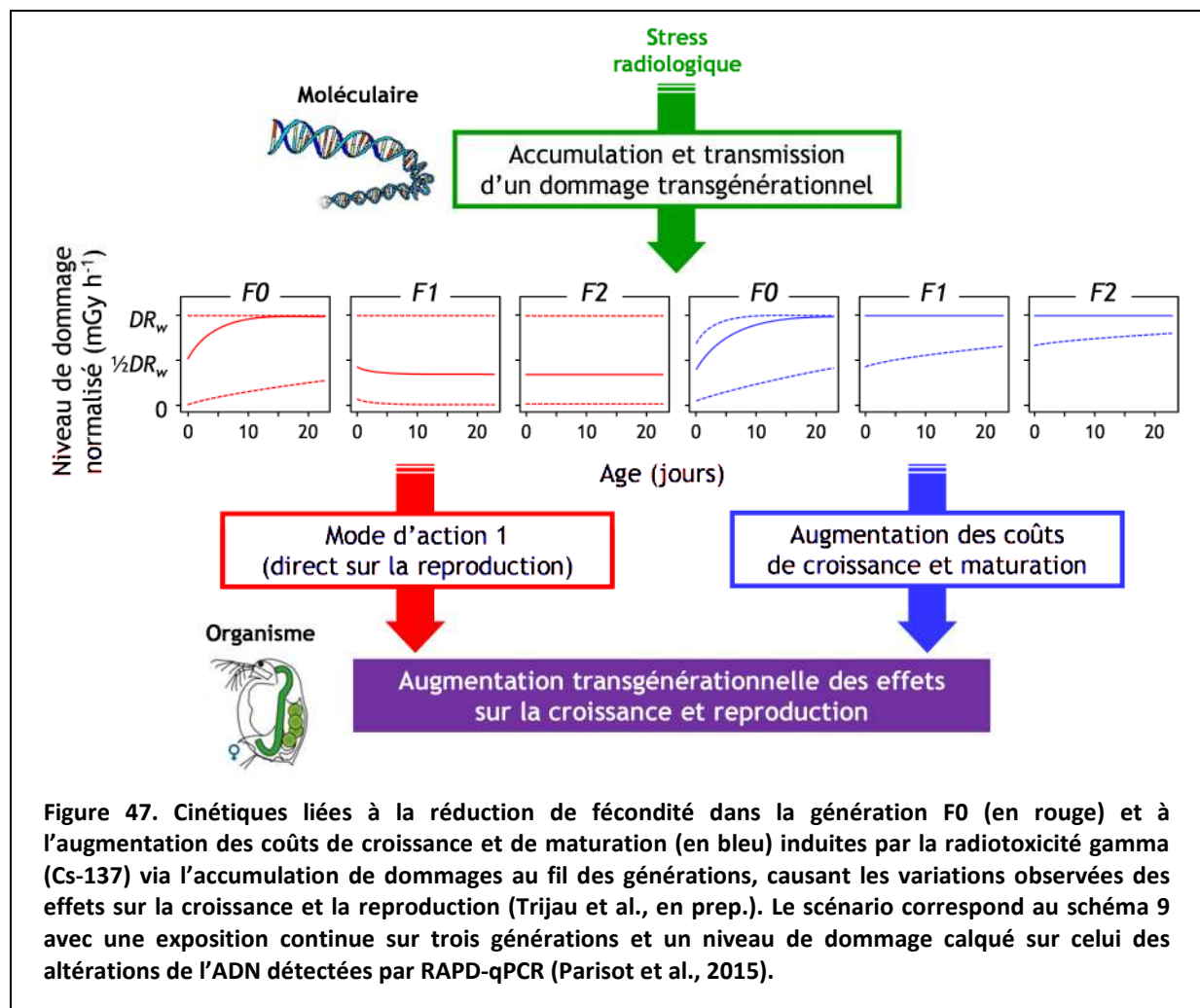


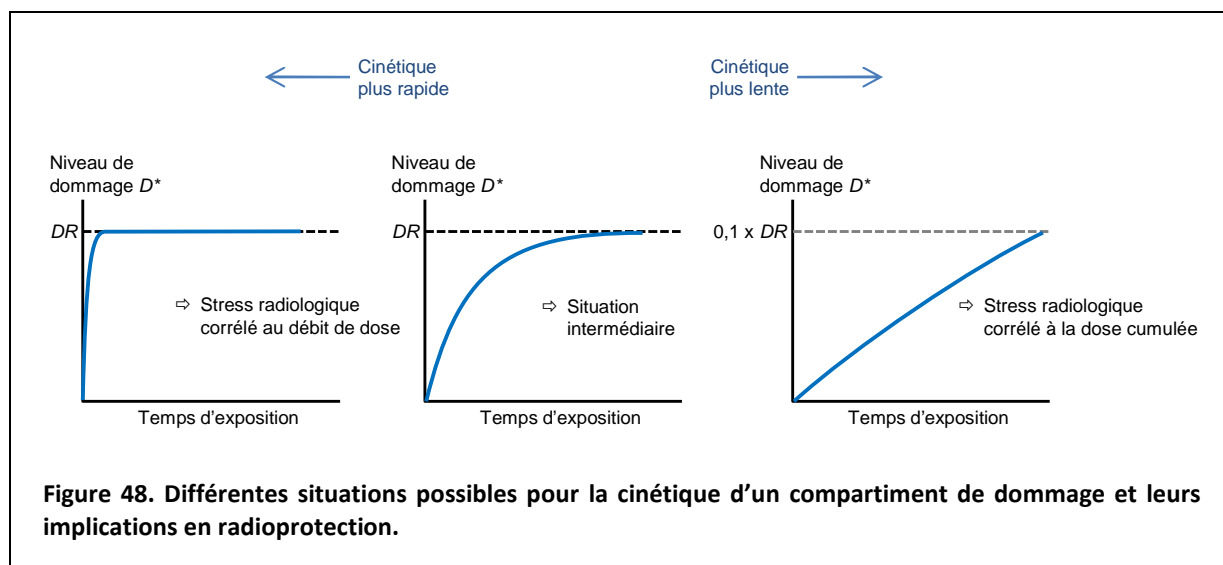
Figure 47. Cinétiques liées à la réduction de fécondité dans la génération F0 (en rouge) et à l'augmentation des coûts de croissance et de maturation (en bleu) induites par la radiotoxicité gamma (Cs-137) via l'accumulation de dommages au fil des générations, causant les variations observées des effets sur la croissance et la reproduction (Trijau et al., en prep.). Le scénario correspond au schéma 9 avec une exposition continue sur trois générations et un niveau de dommage calqué sur celui des altérations de l'ADN détectées par RAPD-qPCR (Parisot et al., 2015).

4.6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

4.6.1. La toxicité est aussi une affaire de temps

En présentant l'ensemble de ces travaux, j'espère démontrer l'intérêt de l'analyse toxicocinétique-toxicodynamique des effets offerte par l'approche DEBtox qui permet de donner sens aux données d'écotoxicité, en considérant leur dimension temporelle. L'usage fait chez *Daphnia* du compartiment de dommage, dont le niveau peut être hérité d'un parent à sa descendance, montre, sur le cas des radionucléides, que l'approche DEBtox peut être appliquée dans un cadre multigénérationnel. En modifiant la métrique du stress toxique, on constate que le modèle, initialement développé pour les polluants chimiques, est tout à fait adéquate pour analyser et interpréter des données de radiotoxicité, en contamination alpha comme en irradiation gamma. L'un des grands enjeux de la radioprotection est de préciser le rôle du débit de dose ou de la dose absorbée dans l'apparition et l'intensité des effets radiologiques chez les organismes. Les deux métriques sont utilisées dans des modèles distincts selon que l'on traite d'une exposition aiguë ou chronique. Il est crucial de souligner que les modèles toxico-cinétiques toxico-dynamiques à compartiment de dommage décrits dans ce chapitre 4 ouvrent la possibilité d'appréhender les deux types de situations et peuvent ainsi largement contribuer à cerner la contribution relative du débit de dose, de la dose totale accumulée ou de toute situation intermédiaire dans un modèle unifié de la réponse des organismes (Figure 48).

Conceptuellement, un stress radiologique corrélé au débit de dose, situation plus représentative des expositions chroniques à faible dose, peut être associé à une cinétique rapide du dommage. Or-celle-ci dépend d'un taux plus élevé de réparation, qui signifie que l'organisme est capable de faire face au dommage et de le réparer à mesure qu'il est induit (atteinte d'un niveau d'équilibre dynamique). A l'inverse, un stress radiologique corrélé à la dose cumulée est plus représentatif des expositions aiguës. Or la cinétique plus lente du dommage qui lui est associée reflète une efficacité de réparation beaucoup plus faible, ce qui



est en accord avec l'idée que les capacités de réparation de l'organisme sont dépassées. Plus généralement, chaque compartiment de dommage (induit par une toxicité chimique ou radiologique) est, selon son taux de réparation, plus ou moins étroitement inféodé au niveau d'exposition ambiant (concentration, débit de dose) ou à son intégration dans le temps (concentration passée, dose totale absorbée) à l'échelle d'une ou plusieurs générations. Pour décrire les effets observés, nos modèles doivent allier plusieurs compartiments gouvernés par des cinétiques qui diffèrent dans le temps, ce qui supporte l'hypothèse que la réponse d'un organisme est liée à la fois aux conditions ambiantes et à leur historique (Figure 49).

Dans nos dernières analyses, la méthode d'inférence bayésienne fournit une image de l'incertitude autour de chaque prédiction des modèles. Elle met ainsi en lumière le large intervalle de crédibilité autour de la cinétique du dommage. Au-delà de l'incertitude liée à l'utilisation de données qui ne sont pas suffisamment informatives, il est fort à parier que chaque mode d'action est induit au travers de plusieurs cinétiques en même temps, ce qui reflète la diversité des dommages qui lui sont associés (entre les cellules d'un même individu, entre différents individus maintenus dans la même condition d'exposition). De fait, la nature mosaïque des altérations moléculaires induites chez *D. magna* est déjà largement pressentie (Trijau et al., 2018), en particulier dans la génération F0 exposée tout au long de son cycle de vie. Cette hypothèse nécessiterait d'être explorée à l'aide de nouvelles données d'effet macroscopique, issues d'un éventail de situations d'exposition plus informatif (permettant de réduire l'incertitude), ainsi que des analyses moléculaires complémentaires précisant la nature du dommage accumulé et ses répercussions sur le budget énergétique (permettant d'en caractériser la composition). Dans la littérature, plusieurs études illustrent comment des modèles toxico-cinétiques toxico-dynamiques peuvent servir à établir des liens entre certains marqueurs moléculaires ou cellulaires (expression génique, croissance cellulaire) et la réponse de l'organisme (survie, croissance, reproduction) (Swain et al., 2010 ; Wren et al., 2011 ; Jager et Hansen, 2013 ; Stadnicka-Michalak et al., 2015).

4.6.2. Des modes d'action métaboliques similaires d'une espèce à l'autre

La toxicité de l'U appauvri, du Cs-137 et de l'Am-241 a été analysée à l'aide de modèles DEBtox chez différentes espèces au cours des travaux relatés dans ce chapitre ou lors des

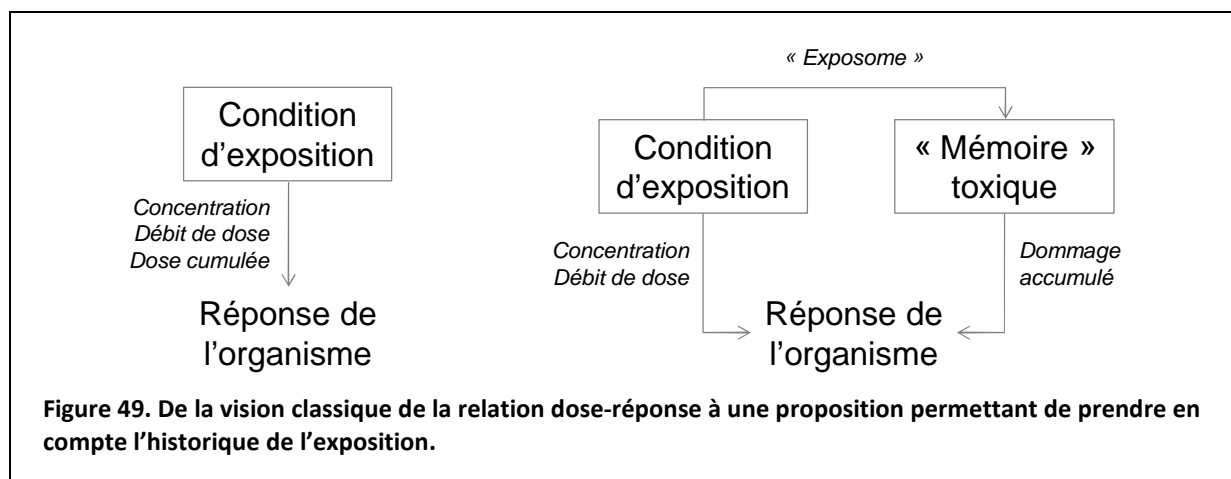


Figure 49. De la vision classique de la relation dose-réponse à une proposition permettant de prendre en compte l'historique de l'exposition.

autres thèses réalisées au LECO (Tableau 24). Chez *D. magna*, des analyses complémentaires pourraient être conduites afin de préciser, dans les cas du Cs-137 et de l'Am-241, quel mode d'action agit directement sur la reproduction. Notre connaissance de la toxicité de l'Am-241 chez *D. magna* gagnerait à être complétée par un test multigénérationnel au cours duquel les différents stades de vie (en particulier le stade embryonnaire) seraient exposés de façon strictement identique dans toutes les générations. Chez les autres espèces, la première perspective que l'on peut entrevoir est la nécessité d'acquérir les données complémentaires dans les cas où les jeux de données disponibles ne sont pas suffisants à l'identification des modes d'action métaboliques. On peut signaler l'absence de données d'effet adéquates concernant la toxicité du Cs-137 chez le poisson-zèbre *D. rerio* et dans des conditions d'expositions entraînant un effet plus marqué sur la croissance chez le nématode *C. elegans* (exposition multigénérationnelle ou à un débit de dose plus élevé). Une collaboration avec les Dr. D. Brede et E. Monti du NMBU (Université d'Oslo, Norvège) est envisagée dans ce sens.

L'identification des modes d'action métaboliques des polluants et la caractérisation de leur cinétique d'induction associée est la clé de nombreuses prédictions. En analysant systématiquement les effets toxiques des radionucléides à l'aide de modèles DEBtox, il doit être possible d'établir des règles générales et à partir de ces règles, de développer des principes fondamentaux permettant : (i) de comprendre pourquoi la radiosensibilité diffère entre les espèces et (ii) d'extrapoler les connaissances des espèces du laboratoire dans des conditions contrôlées à des espèces d'intérêt non testées dans des conditions représentatives de l'environnement. Le but ultime de cette recherche doit être de fournir des prédictions robustes, précises et utiles à l'évaluation du risque écologique. Sur la base des connaissances déjà acquises, on peut discerner plusieurs points des plus intéressants. Si l'on compare la

Tableau 24. Principaux modes d'action métaboliques identifiés à l'aide de modèles DEBtox chez différentes espèces (Massarin et al., 2011 ; Augustine et al., 2012 ; Goussen et al., 2015b ; Lecomte-Pradines et al., 2017 ; Alonzo et al., en prep. ; Billoir et al., en prep. ; Trijau et al., en prep.). « n.d. » quand aucune donnée adéquate n'est disponible.

Espèce / Radionucléide	U appauvri Chémotoxicité	Cs-137 Radiotoxicité gamma	Am-241 Radiotoxicité alpha
Cladocère <i>Daphnia magna</i>	Réduction de l'assimilation	Coût de croissance et maturation	Effet direct sur la reproduction (coût ou mortalité)
	Coût de croissance et maturation	Effet direct sur la reproduction (coût ou mortalité)	
Nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	Réduction de l'assimilation	Coût de croissance et maturation	n.d.
	Effet direct sur la reproduction (gamètes mâles)	Effet direct sur la reproduction (gamètes mâles)	
Poisson-zèbre <i>Danio rerio</i>	Réduction de l'assimilation	n.d.	n.d.
	Coût de croissance et maturation		

sensibilité entre les espèces, on constate de prime abord que la toxicité de chaque radionucléide est caractérisée par des modes d'action métaboliques similaires d'une espèce à l'autre. L'exemple le plus frappant est celui de l'U appauvri qui induit systématiquement une réduction de l'assimilation chez les trois espèces étudiées, ainsi qu'un coût de croissance et de maturation chez la daphnie *D. magna* et chez le poisson-zèbre *D. rerio*. De même, la radiotoxicité gamma du Cs-137 induit un coût de croissance et de maturation doublé d'un effet direct sur la reproduction chez la daphnie *D. magna* et chez le nématode *C. elegans*. Le second point crucial que l'on peut noter chez *D. magna* est l'induction d'un coût de croissance et de maturation chaque fois qu'on a observé une accumulation transgénérationnelle de dommages moléculaires, à savoir dans les cas de l'U appauvri et de la radiotoxicité gamma du Cs-137. Le travail entamé dans le projet DEB-RAD est loin d'être achevé. Il doit être poursuivi afin de : (i) comparer la toxicité des rayonnements alpha et gamma (Efficacité Biologique Relative) sur une base mécaniste, toxico-cinétique toxico-dynamique ; (ii) de calculer des valeurs robustes d' EC_{10} ou EDR_{10} pour l'U appauvri les rayonnements alpha et gamma pour l'ensemble des effets à l'échelle de l'organisme dans les générations testées et ultérieures ; (iii) d'estimer les risques à l'échelle de la population plus pertinente d'un point de vue écologique (voir le Chapitre 5).

4.6.3. L'irradiation gamma comme outil d'étude ?

L'irradiation gamma peut être vue comme un outil des plus intéressants pour étudier la réponse du budget énergétique au stress toxique dans une situation expérimentale simplifiée. Celle-ci ne nécessite pas que l'émetteur radioactif soit internalisé ce qui permet un contrôle des plus précis dans l'application d'un stress oxydatif. Par rapport à l'exposition à un contaminant chimique, l'irradiation gamma permet donc d'étudier plus étroitement certains rouages de la réponse des organismes, comme la cinétique d'induction et de réparation du dommage ou la mise en œuvre des mécanismes de défense, en assurant, dans le modèle DEBtox, l'économie d'une description de la cinétique d'internalisation associée. Comparer la radiosensibilité et comprendre pourquoi elle diffère entre différentes espèces seront facilités d'autant plus que la sensibilité des organismes est indépendante de toute cinétique d'internalisation (et de ses spécificités associées comme la biodisponibilité, la capacité d'accumulation et de dépuration etc. qui sont autant de processus qu'il faut avoir quantifiés dans le cas de la toxicité chimique). En outre, elle permet d'étudier comment la disponibilité de la nourriture influence la réponse des organismes au stress toxique, là où l'abondance des apports nutritionnels a tôt fait d'altérer l'internalisation d'un contaminant chimique (voie trophique) et d'en modifier l'intensité de la toxicité.

Chapitre 5

Modélisations de la dynamique de population

Sommaire

5.1. Extrapolation individu – population	179
5.1.1. Contexte	179
5.1.2. Propager les effets de la radiotoxicité de l'organisme à la population	179
5.2. Modèles de population	180
5.2.1. Populations structurées en âge	180
5.2.2. Matrices de Leslie	181
5.2.3. Traits démographiques simulés.....	182
5.2.4. Combiner la radiosensibilité des traits biologiques	183
5.2.5. Espèces biologiques modélisées	185
5.2. Analyses de sensibilité	185
5.3. Radiotoxicité à l'échelle de la population	187
5.3.1. Retard de croissance des populations exposées aux rayonnements ionisantes..	187
5.3.2. Radiosensibilité des traits démographiques	188
5.4. Risques pour la population dans quatre groupes taxonomiques	190
5.4.1. Quels niveaux de risques évaluer ?	190
5.4.2. Débits de dose causant des risques pour la population	192
5.4.3. Contre quel risque les populations sont-elles finalement protégées ?.....	194
5.5. NEC plus ultra : un couplage DEBtox-Matrices de Leslie (U appauvri)	194
5.5.1. Contexte	194
5.5.2. Une vision de la toxicité multigénérationnelle à l'échelle de la population	196
5.6. Conclusions et perspectives	198

5.1. EXTRAPOLATION INDIVIDU – POPULATION

5.1.1. Contexte

L'incertitude en évaluation du risque écologique tient, en outre, aux hypothèses clés sur lesquelles se fondent les approches méthodologiques telles que la SSD (voir paragraphe 2.6.2). En comparant entre elles des valeurs d' EC_{10} ou d' EDR_{10} , on admet de façon implicite 1) que les effets de la toxicité observés chez les organismes peuvent être directement comparés entre différentes espèces et entre différents traits biologiques, et 2) que n'importe quel niveau d'effet mesuré à l'échelle de l'individu est directement représentatif de l'impact sur la population. En particulier, le second point rejoint le besoin reconnu d'une plus grande pertinence écologique, en protégeant les espèces aux niveaux de la population, de la communauté, voire de l'écosystème, échelles d'organisation biologiques difficiles à appréhender en évaluation du risque écologique (De Mott et al., 2005).

Afin de réduire cette incertitude et son conservatisme associé, et d'éviter une évaluation inexacte du risque écologique, un nombre croissant d'études ont proposé d'utiliser des modèles de population des espèces représentatives du milieu naturel. Ces modèles permettent d'explorer la réponse des populations aux contaminants chimiotoxiques, comme les pesticides (Forbes et Calow, 2002 ; Stark et al., 2004 ; Hanson et Stark, 2011 ; Ibrahim et al., 2014) ou plus récemment, aux radionucléides et aux rayonnements ionisants (Alonzo et al., 2008b ; Biron et al., 2012 ; Lance et al., 2012). Un des objectifs de ces études est d'extrapoler mathématiquement les effets toxiques de l'échelle de l'individu – où ils sont observés expérimentalement – à celle de la population et de tester si les populations sont plus sensibles à la toxicité que les organismes. Les approches requièrent communément : 1) une revue des effets toxiques, issus des tests expérimentaux ou des données terrain, induits par le contaminant chimique ou radioactif considéré, et 2) un exercice de modélisation pour simuler la dynamique de population chez les espèces d'intérêt, en posant l'hypothèse que la réponse des populations à la pollution doit dépendre à la fois de la manière dont les fonctions biologiques clés, comme la survie et la reproduction, sont affectées par la toxicité et de la manière dont la dynamique de population répond aux changements de ces fonctions biologiques. Dans le cas des polluants chimiques, les prédictions de modèles de population simples ont très tôt montré que les effets à l'échelle de individu peuvent avoir des conséquences extrêmement différentes pour la population en fonction de la nature du critère individuel affecté et de la réponse démographique examinée, et en fonction de l'espèce considérée (Stark et al., 2004 ; Raimondo et al., 2006). Ces prédictions contredisent le postulat que les EC_{10} – ou les EDR_{10} dans notre cas – ont des conséquences comparables en termes de protection malgré la multitude des traits biologiques concernés (survie, longévité, âge de puberté, fécondité, morbidité etc).

5.1.2. Propager les effets de la radiotoxicité de l'organisme à la population

La population peut-elle être plus radiosensible que l'organisme ? C'est la question à laquelle on tente de répondre avec les recherches conduites dans le cadre des projets

européens ERICA et STAR en collaboration avec de nombreux instituts (Dr. Deborah Oughton et Dr. Turid Hertel-Aas du NMBU ; Prof. Jordi Vives i Batlle du SCK•CEN ; Dr. Almudena Real du CIEMAT ; Dr. Clare Bradshaw de l'Université de Stockholm ; Dr. Mike Gilek de l'Université de Södertörn). L'hypothèse considérant que, puisque qu'une population n'est qu'un groupe d'individus, il faut d'abord que l'individu soit affecté pour que la population soit affectée à son tour, demande d'être validée ou invalidée. Diverses modélisations de population sont ainsi réalisées et publiées. L'étude Alonzo et al. (2008b) évalue à l'aide de modèles simples l'effet des radiations ionisantes sur la croissance de population chez les deux espèces d'invertébrés, *D. magna* et *E. fetida*, à l'aide des données acquises lors des expériences d'exposition chroniques conduites pendant le programme ERICA (Hertel et al., 2007 ; Alonzo et al., 2008a). Une approche plus approfondie est menée à l'aide de modèles matricielles dits « matrices de Leslie » (Leslie, 1945 ; Caswell, 2001), utilisées de plus en plus couramment pour étudier la dynamique de population en réponse à divers contaminants toxiques affectant la survie et la reproduction. Cette approche est d'abord appliquée chez trois espèces d'invertébrés aquatiques (Lance et al., 2012) chez lesquelles des données d'effets sur la radiotoxicité gamma chronique sont disponibles en quantité et qualité suffisante dans la base de données FREDERICA (Coplestone et al., 2008). Ces données correspondent aux relations dose-réponse établies sur divers traits biologiques et divers stades de vie. La méthode est ensuite généralisée à neuf autres espèces animales (incluant des invertébrés du sol, des poissons et des mammifères terrestres) pour lesquelles quelques données pertinentes de radiotoxicité chroniques sont décrites dans FREDERICA (Alonzo et al., 2016). Nous simulons ainsi, au fil des années, les variations des traits biologiques à l'échelle de l'organisme et des traits démographiques prédits pour la population sur une gamme de débits de dose. L'objectif est d'utiliser ces modèles théoriques : 1) pour identifier les critères qui, au niveau individuel, ont la plus forte influence sur la dynamique de population ; 2) pour comparer la radiosensibilité entre les échelles de l'organisme et de la population et ; 3) pour examiner si les niveaux de référence reconnus internationalement pour la radioprotection des écosystèmes, basés sur l'analyse des effets au niveau individuel, protègent aussi les espèces au niveau population. Ces prédictions, fondées sur des hypothèses sujettes à caution, restent pleines d'incertitude. Nous montrons au travers d'un cas d'étude précis que la méthode la plus robuste pour extrapoler les effets toxiques de l'organisme à la population est basé sur un couplage des modèles DEBtox et des matrices de Leslie (Biron et al., 2012). Ce dernier travail fait l'objet d'une collaboration avec le Pr. Sandrine Charles et le Dr. Elise Billoir (UMR 5558 LBBE) de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

5.2. MODELES DE POPULATION

5.2.1. Populations structurées en âge

Les premiers modèles mis en place lors du programme européen ERICA (Alonzo et al., 2008b) sont basés sur une population structurée en âge et décrivent la distribution en âge des individus au temps t , où $n_i(t)$ est le nombre d'individus dans la classe d'âge i . En supposant un système clos, sans immigration ou émigration, les simulations permettent de calculer le nombre total d'individus dans la population au temps t , selon :

$$N(t) = \sum_i n_i(t) \quad (\text{Equation 29})$$

Les simulations démarrent au temps t_0 avec 10 individus, comme suit :

$$\begin{cases} n_1(t_0) = 10 \\ n_i(t_0) = 0 \quad \forall i > 1 \end{cases} \quad (\text{Equation 30})$$

Les individus progressent ensuite d'une classe d'âge à la suivante au cours d'intervalles de temps Δt , équidistants et discrets. Parce que les cycles de vie modélisés peuvent présenter une longévité et un temps de génération très variables d'une espèce à l'autre, différents pas de temps sont considérés lors des simulations : un jour chez *D. magna* et une semaine chez *Eisenia fetida*. Comme dans une matrice de Leslie (1945), les changements dans la population au cours du temps sont gouvernés pas des taux de survie et de fécondité, P_i et F_i , dépendants de l'âge. On définit P_i comme la probabilité qu'un individu survive de la classe d'âge i à la classe d'âge $i + 1$ et F_i comme le nombre descendants survivant jusqu'à l'âge 1 engendrés par un individu de la classe d'âge i . Les individus commencent à se reproduire après avoir atteint l'âge de puberté noté i_p : $\forall i \leq i_p \quad F_i = 0$. Entre les temps t et $t + 1$, le nombre d'individus dans chaque classe d'âge est calculé selon les équations suivantes :

$$\begin{cases} n_{i+1}(t+1) = P_i \cdot n_i(t) & \forall i < 1 \\ n_1(t+1) = P_{repro} \cdot \sum_i F_i \cdot n_i(t) \end{cases} \quad (\text{Equation 31})$$

où P_{repro} est un terme additionnel permettant de prendre en compte la proportion d'individus participant activement à la reproduction ou le taux d'éclosion des pontes, etc. La reproduction de toutes les classes d'âge est sommée pour calculer le nombre d'individus d'âge $i = 1$. Au fil du temps, les individus sont retirés de la population quand ils atteignent un âge maximal, noté i_{max} : $\forall i > i_{max} \quad n_i(t) = 0$. Dans notre étude (Alonzo et al., 2008b), l'ensemble des paramètres de l'histoire de vie (i_p , i_{max} , P_i , F_i etc.) est obtenu pour chaque niveau d'exposition à partir des expérimentations sur *D. magna* et *E. fetida* au laboratoire et d'une recherche bibliographique complémentaire (Alonzo et al., 2008a ; Hertel-Aas et al., 2007). A l'aide de ces modèles simples, on étudie ainsi le retard de croissance de la population, $\delta_t = t_x - t_1$, défini comme le laps de temps supplémentaire nécessaire pour qu'une population exposée croisse de la taille $N(t_0)$ à la taille $N(t_1)$ en comparaison de la population témoin non exposée. Avec N et N_x la taille des populations témoin et exposée, on a donc :

$$\begin{cases} N_x(t_x - 1) < N(t_1) \\ N_x(t_x) \geq N(t_1) \end{cases} \quad (\text{Equation 32})$$

5.2.2. Matrices de Leslie

Durant le programme européen STAR, l'approche adoptée (Lance et al., 2012 ; Alonzo et al., 2016) repose sur les modèles dits matrices de Leslie (Leslie, 1945 ; Caswell, 2001). Comme précédemment, la population est structurée en classes d'âge (ou en stade de vie), et représentée, cette fois, à l'aide d'un vecteur $\vec{n}(t)$ contenant les nombres $n_i(t)$ d'individus de chaque classe d'âge au temps t , i variant toujours de 1 à i_{max} :

$$\vec{n}(t) = \begin{bmatrix} n_1(t) \\ \vdots \\ n_i(t) \\ \vdots \\ n_{i_{max}}(t) \end{bmatrix} \quad (\text{Equation 33})$$

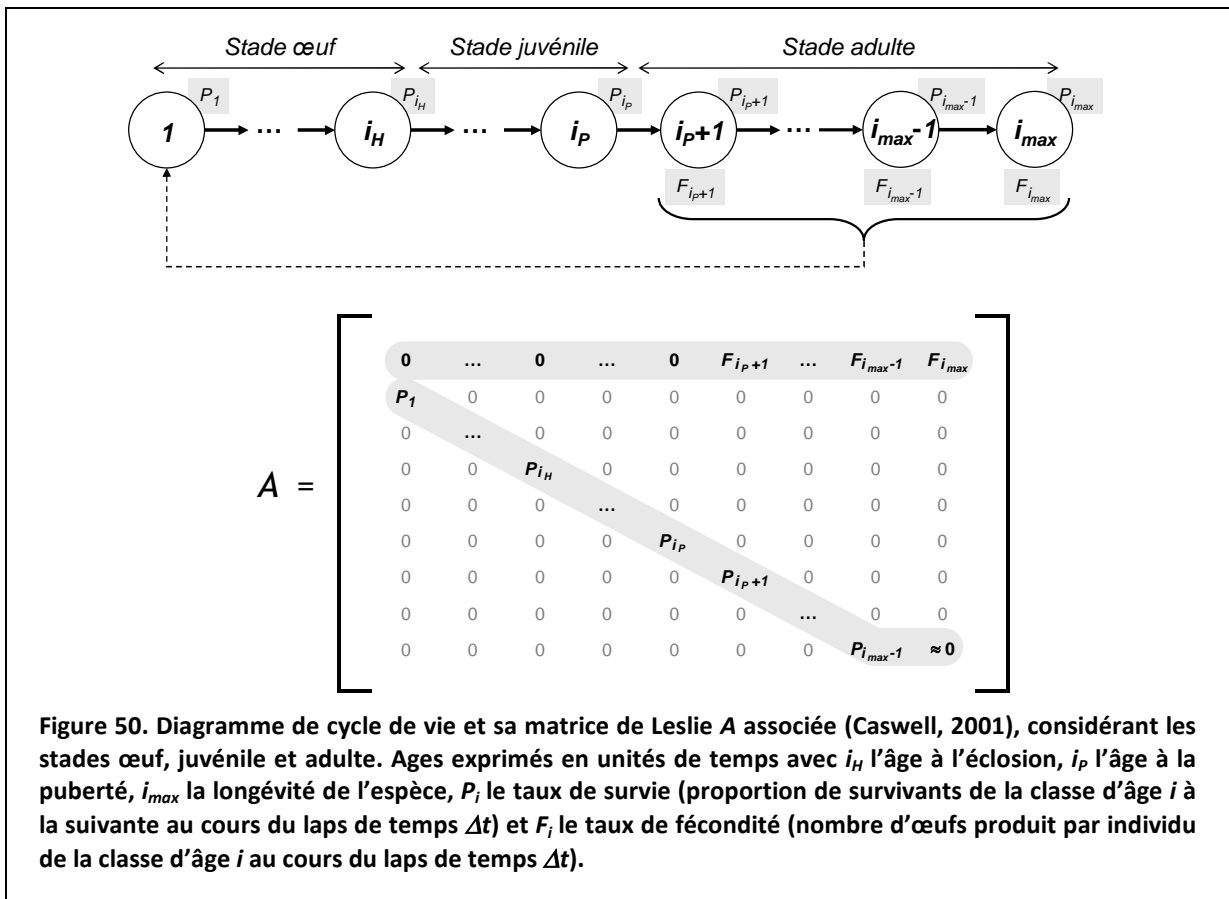
On introduit la matrice de Leslie A de taille $i_{max} \times i_{max}$, dont les éléments incluent les taux de survie P_i rangés sur la sous-diagonale et les taux de fécondité F_i rangés sur la première ligne (Figure 50). Cette matrice permet de calculer le vecteur de la population au temps $t + 1$ à l'aide de l'équation :

$$\vec{n}(t + 1) = A \cdot \vec{n}(t) \quad (\text{Equation 34})$$

La matrice de Leslie A s'obtient assez aisément à partir du diagramme de cycle de vie (Figure 50), construit à l'aide des connaissances sur l'histoire de vie des espèces abordées, acquises au travers d'une recherche bibliographique (Lance et al., 2012 ; Alonzo et al., 2016).

5.2.3. Traits démographiques simulés

Le comportement dynamique d'un modèle de population tel que ceux décrits dans nos études (Alonzo et al., 2008b, 2016 ; Lance et al., 2012) varie fortement en fonction de l'état initial mais tend, après un nombre suffisant de pas de temps, vers un état asymptotique stable dans de nombreux cas (Caswell, 2001). Cet état asymptotique dépend considérablement des hypothèses de travail formulées et – entre autres – de la densité-dépendance, qui détermine



comment les taux de survie et de fécondité seront affectés à mesure que croît la taille de la population (Neubert et Caswell, 2000 ; Caswell, 2001). En l'absence de densité dépendance – une hypothèse de travail théorique très éloignée de la plupart des situations réelles – la population continue de croître quelle que soit l'abondance des individus vers un taux de croissance λ asymptotique constant. Avec l'introduction d'une règle de densité dépendance, la population tend vers un état d'équilibre dynamique marqué par un taux de croissance égal à 1 quand la taille de la population atteint une valeur maximale N_{eq} (taille à l'équilibre). Dans la littérature, différentes hypothèses sont proposées pour décrire comment est appliqué l'effet de la densité (Neubert et Caswell, 2000 ; Caswell, 2001). Notre objectif est seulement d'explorer différentes situations (croissance illimitée ou équilibre dynamique) et d'examiner si l'effet de la toxicité varie en fonction de l'hypothèse considérée (Hayashi et al., 2009) – toute considération quant à la pertinence d'un modèle de densité-dépendance par rapport à un autre étant en dehors du cadre de notre étude. Les matrices de Leslie permettent d'évaluer la dynamique de population au travers de nombreux traits démographiques dont quelques exemples sont décrits dans le Tableau 25.

5.2.4. Combiner la radiosensibilité des traits biologiques

Les matrices de Leslie nous permettent de propager la radiotoxicité de l'échelle des organismes et à celle de la population. Leur principal force est à la fois de combiner plusieurs réponses observées simultanément sur différents traits biologiques et différents stades de vie, d'en pondérer l'importance pour la population en fonction des spécificités et des fragilités du cycle de vie de chaque espèce et d'en agréger une conséquence unique à un niveau d'organisation plus pertinent en terme de risque écologique. Dès lors qu'elle affecte la survie, la fécondité, l'âge de puberté et/ou la longévité, la toxicité peut modifier un ou plusieurs éléments a_{jk} d'une matrice de Leslie (j et k correspondant aux lignes et aux colonnes), ce qui implique que la réponse de la population est la résultante de tous les effets induits. La dérivée totale du trait démographique y vis-à-vis un quelconque facteur x peut alors être calculée approximativement à l'aide de la formule :

$$\frac{dy}{dx} \approx \sum_{j,k} \left(\frac{\partial y}{\partial a_{jk}} \cdot \frac{da_{jk}}{dx} \right) \quad (\text{Equation 35})$$

Dans nos études, on souhaite construire la courbe dose-réponse du taux reproductif net $R_0(dr)$, du taux de croissance asymptotique $\lambda(dr)$ et de la taille à l'équilibre $N_{eq}(dr)$, ce qui implique en pratique d'exprimer la matrice de la population exposée A_{dr} pour tout débit de dose dr variant de 10^{-3} to 10^5 mGy h⁻¹ (Lance et al., 2012 ; Alonzo et al., 2016). Pour ce faire, on calcule à l'aide des courbes dose-réponse de l'éclosion, de la fécondité et de la survie, les niveaux d'effet $x_H(dr)$, $x_F(dr)$ et $x_S(dr)$ qui seront appliqués aux taux de survie et de fécondité P_i et F_i dans la matrice de population. Plusieurs hypothèses sont formulées au préalable : 1) toute réduction du taux d'éclosion s'applique à la survie durant le stade œuf ; 2) toute réduction du taux de survie s'applique uniformément à toutes les classes d'âge du stade juvénile et/ou du stade adulte (de façon spécifique si des données plus précises sont

Tableau 25. Traits démographiques simulés à l'aide des modèles de population.

Nom, symbole	Définition	Commentaires
Taux de croissance asymptotique de la population, λ	Soit \vec{w} , la structure asymptotique de la population : $A \cdot \vec{w} = \lambda \cdot \vec{w}$ λ correspond donc à une valeur propre de la matrice de transition A et \vec{w} est son vecteur propre associé	Si $\lambda > 1$, la population croît sur le long terme. Si $\lambda < 1$, la population décroît et tend vers l'extinction.
Taux reproductif net, R_0	$R_0 = \sum_i f_i \cdot l_i$	où l_i est la probabilité de survivre jusqu'à l'âge i , soit $l_i = \prod_{j=1}^{i-1} S_j$
Probabilité d'extinction	$P(\lambda < 1)$	Sur une distribution des valeurs de λ calculées selon un scénario d'exposition donné
Temps à l'extinction, t_{ε}	$\lambda^{t_{\varepsilon}} \leq \varepsilon$	Laps de temps nécessaire pour que la taille d'une population, dont $\lambda < 1$, décline jusqu'à la proportion ε de sa valeur initiale $N(t_0)$
Taille à l'équilibre de la population, N_{eq}	Dans les populations densité-dépendantes, $\sum_i n_i(t)$ de sorte que $\lambda = 1$	Différentes formes de densité-dépendance possibles avec leurs tailles à l'équilibre respectives (N_U, N_F, N_J, N_A) selon que la densité affecte la survie et la reproduction uniformément, ou seulement la reproduction, seulement la survie juvénile ou adulte etc.

disponibles) ; 3) toute réduction de fécondité s'applique uniformément à toutes les classes adultes. :

$$\begin{cases} P_i(dr) = P_i \cdot [x_H(dr)]^{1/i_H} & \text{pour } i \leq i_H \\ P_i(dr) = P_i \cdot [x_S(dr)]^{1/t_{obs}} & \text{pour } i > i_H \\ F_i(dr) = F_i \cdot x_F(dr) & \text{pour } i > i_P \end{cases} \quad (\text{Equation 36})$$

où $P_i(dr)$ et $F_i(dr)$ sont les taux de survie et de fécondité de la classe d'âge i au débit de dose dr (avec i_H l'âge à l'éclosion et t_{obs} le temps auquel la survie est mesurée).

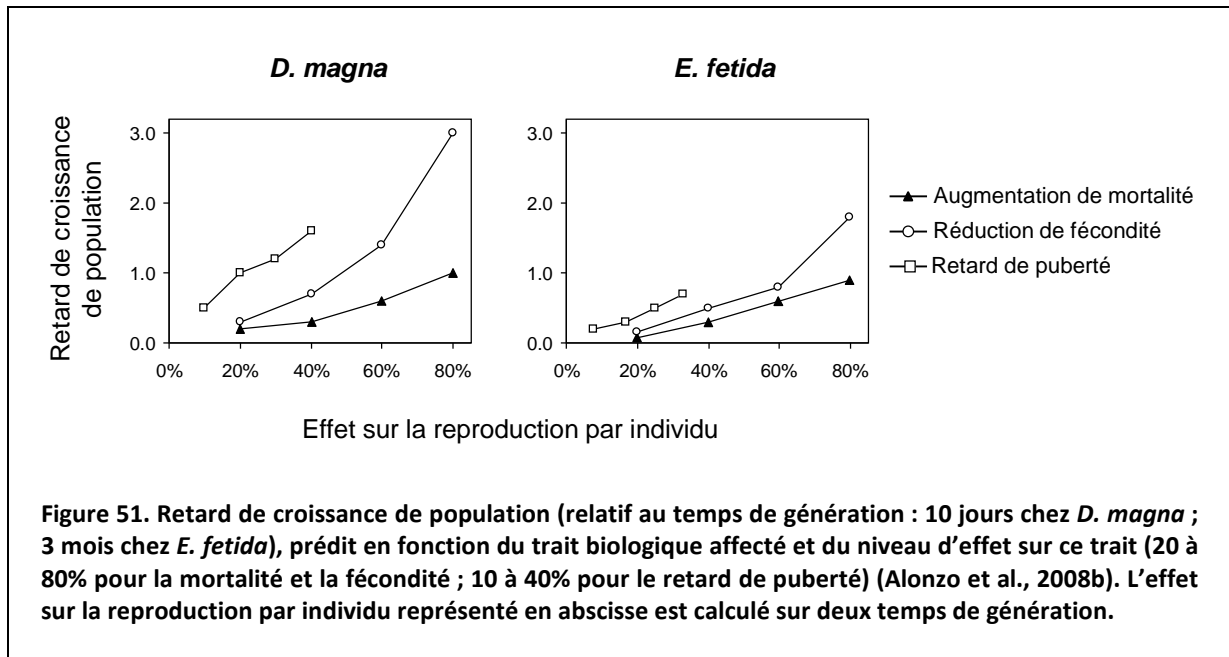
Ces hypothèses sont nécessaires quand on ne dispose que de la courbe dose-réponse pour un temps d'exposition donné afin d'extrapoler l'effet mesuré à toutes les classes d'âge mais on pressent bien sûr qu'elles sont discutables dans la mesure où l'on sait que les effets sont des processus qui varient avec le temps et donc au cours du cycle de vie. De ce point de vue, un modèle dynamique tel que l'approche DEBtox reste la méthode la plus rigoureuse pour décrire comment les effets varient au fil du cycle de vie entier d'une espèce et la seule pour extrapoler de façon robuste les réponses toxiques, de l'échelle de l'organisme à celle de la population (Billoir et al., 2007).

5.2.5. Espèces biologiques modélisées

Les premières espèces modélisées (Alonzo et al., 2008b) sont *D. magna* et *E. fetida*, les invertébrés utilisés lors des expériences d'exposition chroniques conduites pendant le programme ERICA (Hertel et al., 2007 ; Alonzo et al., 2008a). Lors du programme européen STAR, l'approche basée sur les matrices de Leslie est appliquée aux espèces chez lesquelles des données sur la radiotoxicité gamma chronique sont disponibles en quantité et qualité suffisante dans la base de données FREDERICA (Coppstone et al., 2008). Les données relatives aux dommages génétiques, biochimiques ou histologiques ne pouvant directement alimenter un modèle de population, seuls sont d'abord retenus trois invertébrés aquatiques, pour lesquels l'effet des radiations gamma chroniques sur la survie, la fécondité et l'éclosion est décrit (Lance et al., 2012). Les espèces en questions sont les annélides polychètes marins *Neanthes arenaceodentata* et *Ophryotrocha diadema*, et le gastéropode d'eau douce *Physa heterostropha*. La méthode est ensuite généralisée à neuf autres espèces pour lesquelles quelques données pertinentes de radiotoxicité chroniques sont décrites dans FREDERICA, ce qui inclut trois nouveaux groupes taxonomiques des invertébrés terrestres (avec les annélides oligochètes *E. fetida* et *Lumbricus terrestris* et le cloporte *Porcellio scaber*), des poissons (avec le guppy *Poecilia reticulata*, le medaka japonais *Oryzias latipes*, le saumon pacifique *Oncorhynchus tshawytscha*) et des mammifères terrestres (avec la souris *Mus musculus*, le chien *Canis familiaris* et la chèvre *Capra hircus*) (Alonzo et al., 2016).

5.2. ANALYSES DE SENSIBILITE

Dans l'étude Alonzo et al. (2008b), on examine, chez le ver *E. fetida* et la daphnie *D. magna* lors du programme européen ERICA, comment les modèles de population répondent à une variation graduée touchant différents traits biologiques (incluant la survie, la fécondité et l'âge de puberté). On constate alors que les deux espèces d'invertébrés simulées ne répondent pas de façon égale à un même niveau de variation (Figure 51). *D. magna* semble ainsi beaucoup plus sensible que *E. fetida* à une réduction de la taille des pontes ou à un retard dans la reproduction. Cette différence serait liée aux caractéristiques du cycle de vie, beaucoup plus rapide chez les daphnies que chez les vers. Pour illustrer ce point sur un seul exemple criant, on constate chez *D. magna*, qu'un retard relatif de l'âge de puberté de 20%, une réduction de fécondité de 50% ou une augmentation de la mortalité de 80% causent tous les trois un même retard de croissance équivalent à 10 jours (un temps de génération). De plus, ces mêmes



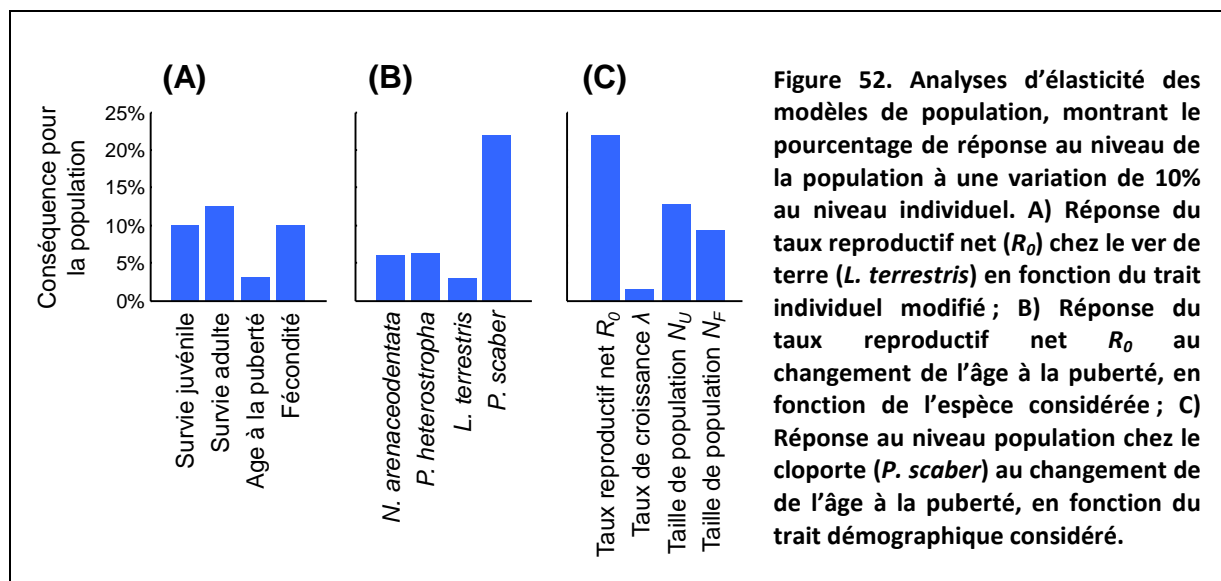
variations sont perçues respectivement comme des réductions de la reproduction par individu de 14%, 50% et 60% (calculées sur deux temps de générations, soit approximativement la durée du test chronique de 21 jours). On voit donc bien que rien n'est moins comparable – à l'échelle de la population comme à celle de l'organisme – qu'un niveau donné d'effet. *A fortiori*, la valeur de 10% d'effet, qui sert de fondement à l'appréciation du risque écologique, peut avoir des conséquences très variables selon le trait biologique qu'il impacte et l'espèce chez laquelle on le mesure !

On essaie, lors du programme européen STAR, de comparer de manière plus formelle, à l'aide des matrices de Leslie, les variations de sensibilité prédites entre l'échelle des organismes et celle des populations. On conduit pour ce faire une analyse d'élasticité (Alonzo et al., 2016). L'élasticité $\varepsilon_{y,x}$ est définie comme la réponse relative $\left(\frac{\partial y}{y}\right)$ vis-à-vis d'une perturbation relative $\left(\frac{\partial x}{x}\right)$ (Caswell, 2001). On l'obtient donc par la formule :

$$\varepsilon_{y,x} = \frac{x}{y} \cdot \frac{\partial y}{\partial x} = \frac{\partial \ln(y)}{\partial \ln(x)} \quad (\text{Equation 37})$$

où y va représenter le taux reproductif net R_0 , le taux de croissance asymptotique λ ou la taille à l'équilibre N_{eq} , et x une réduction des taux de survie P_i aux stades œuf et juvénile ($i \leq i_p$) ou au stade adulte ($i > i_p$), des taux de fécondité F_i ou un décalage de puberté δi_p de sorte que $F_{i+\delta i_p} = F_i$.

Les résultats de cette analyse démontrent, encore une fois, que les effets mesurés à l'échelle de l'organisme peuvent avoir des conséquences prédites très différentes pour la dynamique de population. L'avantage, cette fois, est qu'on peut quantifier les conséquences d'un effet de 10% pour différents traits biologiques et démographiques et différentes espèces. La Figure 52 relate quelques-uns des résultats obtenus, pour illustrer toute l'amplitude de la variabilité couverte par nos modèles. Ainsi dans le graphe A, pour une espèce donnée (le ver



de terre *L. terrestris*), on voit que 10% de perturbation a une conséquence sur un trait démographique donné (le taux reproductif net R_0) qui varie de 2,5% à 12,5% selon le trait affecté au niveau de l'organisme. Un recul de l'âge à la puberté paraît dans cet exemple très peu impactant par rapport aux autres traits biologiques – ce qui est très différent de ce qu'on observait précédemment chez *D. magna*. Regardons comment la même situation (la réponse de R_0 à un recul de 10% de l'âge à la puberté) varie entre les espèces (graphe B) : si chez les vers terrestres ou marins, les conséquences demeurent entre 2,5 et 7%, celle chez le cloporte (*P. scaber*) s'envole à 22%, soit approximativement un ordre de grandeur dans la variabilité de la réponse. Qu'en est-il de la réponse des autres traits démographiques calculée chez cette espèce (*P. scaber*), toujours pour un recul de 10% de l'âge à la puberté (graphe C) ? On voit là encore que la réponse de la population varie entre 2 et 22% entre les traits démographiques, indépendamment des hypothèses de travail formulées (les valeurs asymptotiques de R_0 et λ correspondant au régime non limité, celles de N_U et N_F à l'équilibre dynamique contraint par la densité).

5.3. RADIOTOXICITE A L'ECHELLE DE LA POPULATION

5.3.1. Retard de croissance des populations exposées aux rayonnements ionisantes

On s'intéresse ici aux deux espèces d'invertébrés servant aux expérimentations durant le programme européen ERICA (Larsson, 2008), à savoir l'annélide terrestre *E. fetida* exposé aux rayonnements gamma (irradiation au Co-60) et le cladocère *D. magna* exposé aux rayonnements alpha (contamination à l'Am-241). Chez *E. fetida*, le modèle prédit un retard de croissance de la population augmentant avec le débit de dose gamma (Figure 53). Ce retard correspond à 50 jours (soit approximativement 0,6 temps de génération chez *E. fetida*) au débit de dose de 11 mGy h⁻¹. L'extinction de la population est prédite à 43 mGy h⁻¹. Chez *D. magna*, le modèle prédit un retard de croissance seulement lorsque l'exposition aux rayonnements alpha se poursuit sur plusieurs générations. Ce retard augmente avec le débit de dose pour atteindre 8 jours (soit 0,8 temps de générations chez *D. magna*) à 15 mGy h⁻¹, le

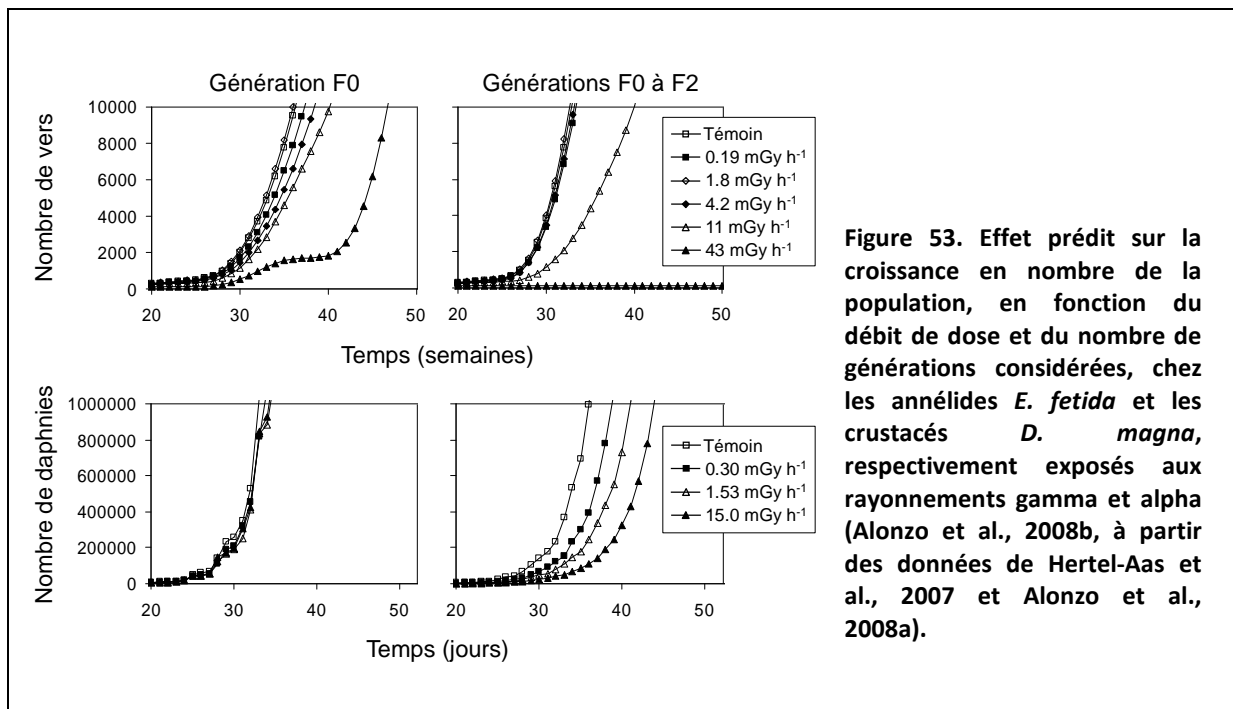


Figure 53. Effet prédit sur la croissance en nombre de la population, en fonction du débit de dose et du nombre de générations considérées, chez les annélides *E. fetida* et les crustacés *D. magna*, respectivement exposés aux rayonnements gamma et alpha (Alonzo et al., 2008b, à partir des données de Hertel-Aas et al., 2007 et Alonzo et al., 2008a).

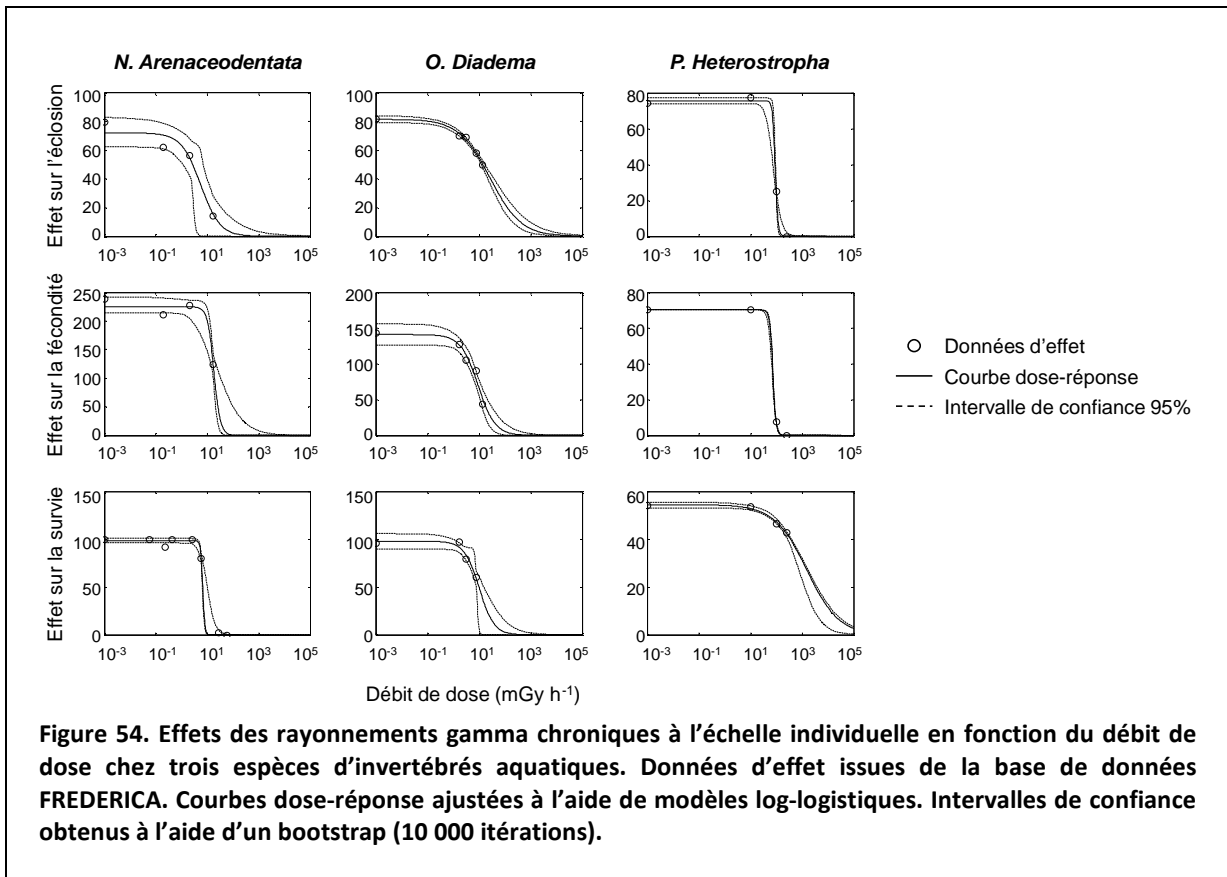
niveau testé d'exposition le plus élevé dans les expériences (0,30 à 15 mGy h⁻¹). On illustre bien, dans le cas présent, l'importance d'étudier la réponse sur plusieurs générations pour prédire les conséquences démographiques à l'échelle de temps la plus pertinente.

5.3.2. Radiosensibilité des traits démographiques

On s'intéresse, dans l'étude de Lance et al. (2012), à la dynamique de population d'invertébrés aquatiques : deux polychètes marins, *N. arenaceodentata* et *O. diadema*, et un gastéropode d'eau douce, *P. heterostropha*. Les espèces ont été retenues car on dispose dans FREDERICA des données propres à établir les courbes dose-réponse de l'éclosion, de la reproduction et de la survie lors d'une irradiation gamma chronique en conditions contrôlées (Figure 54). Ces courbes dose-réponses sont combinées au sein des matrices de Leslie de chaque espèce afin de modéliser les variations du taux reproductif net R_0 et du taux de croissance asymptotique λ sur la même gamme de débit de dose (Figure 55).

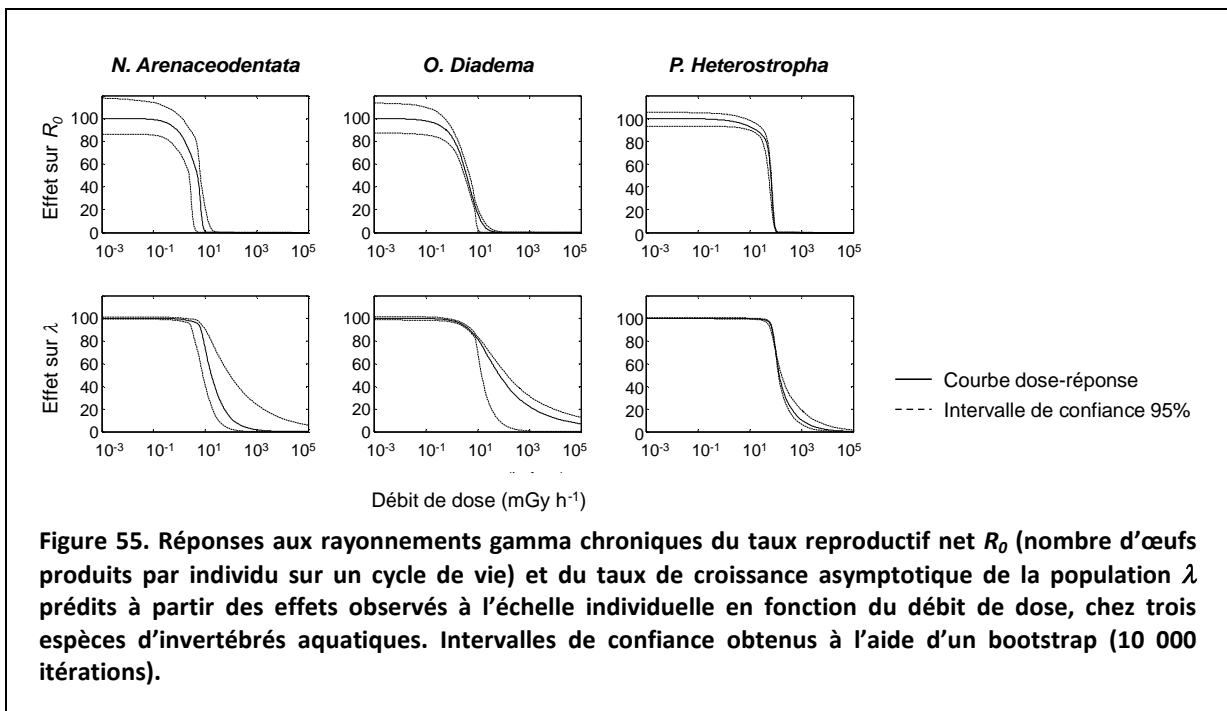
L'exercice permet de comparer la radiosensibilité entre l'échelle de l'organisme et celle de la population, sur la base des valeurs d' EDR_{10} estimées pour les différents traits biologiques et démographiques. A l'échelle de l'organisme, la valeur d' EDR_{10} la plus faible par espèce vaut 830 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ chez *N. arenaceodentata*, 1300 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ chez *O. diadema* et 55 mGy h⁻¹ *P. heterostropha* – le trait biologique le plus radiosensible correspond à l'éclosion chez les deux polychètes et à la fécondité chez la physe. Au niveau de la population, R_0 et λ délivrent respectivement des EDR_{10} de 830 et 6900 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ chez *N. arenaceodentata*, de 620 et 5000 $\mu\text{Gy h}^{-1}$ chez *O. diadema* et à 17 et 74 mGy h⁻¹ chez *P. heterostropha*. Ces résultats permettent de tirer quelques observations des plus intéressantes :

- premièrement, pour chaque espèce, le taux reproductif net R_0 est le trait démographique le plus radiosensible, en délivrant toujours une EDR_{10} plus faible que celle du taux de croissance



asymptotique λ ;

- deuxièmement, pour chaque espèce, le taux reproductif net R_0 est au moins aussi radiosensible que le trait biologique le plus radiosensible à l'échelle individuelle.
- troisièmement, l'ordre de radiosensibilité des espèces diffère entre les échelles, avec



N. arenaceodentata comme espèce la plus radiosensible à l'échelle de l'organisme et *O. diadema* comme espèce la plus radiosensible à celle de la population.

L'étude Alonzo et al. (2016) prolonge chez neuf espèces (invertébrés du sol, poissons et mammifères terrestres), le travail abordé chez les invertébrés aquatiques (Lance et al., 2012). L'objectif est de généraliser la comparaison de la radiosensibilité entre les échelles de l'organisme et de la population, d'estimer les débits de dose causant différents niveaux de risque pour la population et de les comparer vis-à-vis des valeurs de référence proposées au niveau international pour la radioprotection des écosystèmes. Pour ce faire, on modélise à l'aide des matrices de Leslie, la réponse de la dynamique de population (au travers du taux reproductif net R_0 , du taux de croissance asymptotique λ et de la taille à l'équilibre N_{eq}) sur une gamme de débits de dose gamma externe (10^{-3} à 10^5 mGy h⁻¹). Parmi les traits démographiques simulés, le taux reproductif net R_0 délivre, encore une fois, les EDR_{10} les plus faibles par espèce, avec des valeurs variant de 26 μ Gy h⁻¹ chez la souris *M. musculus* à 38 mGy h⁻¹ chez le medaka japonais *O. latipes* (Tableau 26). Comme chez les invertébrés aquatiques, les valeurs d' EDR_{10} délivrées par R_0 sont toujours inférieures (pour 3 espèces) ou égales (pour les six autres) à la plus faible EDR_{10} calculée pour les différents traits biologiques.

5.4. RISQUES POUR LA POPULATION DANS QUATRE GROUPES TAXONOMIQUES

5.4.1. Quels niveaux de risques évaluer ?

Comme expliqué dans le Tableau 25, le taux de croissance asymptotique λ renseigne sur le devenir à long terme de la population exposée, une valeur inférieure à 1 signifiant que la population décroît et tend vers l'extinction. Avec des valeurs de λ dans la population non exposée variant de 1,3 chez *N. arenaceodentata* et *P. scaber* à 5,6 chez *O. latipes*, on comprend qu'une réduction de 10% de λ représente une situation plus ou moins proche du seuil d'extinction – l'extinction étant même atteinte avec une réduction de 10% pour toute espèce dont le taux λ est inférieur à 1,1 dans la population témoin. Ainsi, selon que la croissance des espèces soit lente ou rapide, la réduction de λ entraînant l'extinction de la population varie, dans notre étude, de 22% chez *N. arenaceodentata* et *P. scaber* à 82% chez *O. latipes*. Il nous apparaît qu'évaluer des impacts pour la population comparables entre les espèces serait plus pertinent. C'est la tâche à laquelle nous nous attelons dans l'étude Alonzo et al. (2016).

L'extinction de la population – caractérisée par une valeur du taux de croissance asymptotique inférieure à 1 (Caswell, 2001) – ne peut, de toute évidence, pas servir de critère pour évaluer si la population est protégée ou non. Dans ce contexte, d'autres niveaux de risques dits « de pseudo-extinction », de sévérité moindre pour la population, sont explorés dans Alonzo et al. (2016). Ces risques sont définis comme la probabilité qu'un trait démographique décline sous une certaine limite prédéfinie (Hanson et Stark, 2012). Le concept de risque cible un niveau donné d'impact et lui combine la probabilité que cet impact advienne. Calculer des risques pour la population implique donc que l'intervalle de confiance

Tableau 26. Débits de dose effectifs ($\mu\text{Gy h}^{-1}$) les plus faibles par espèce induisant 10% d'effet sur les critères au niveau individuel et population chez les invertébrés aquatiques et du sol, les poissons et les mammifères terrestres. Les valeurs sont reportées avec leur intervalle de confiance entre crochets (5^e et 95^e percentiles) construits à l'aide d'un bootstrap (5 000 itérations).

Invertébrés aquatiques	<i>Neanthes arenaceodentata</i>	<i>Ophryotrocha diadema</i>	<i>Physa heterostropha</i>
Critère au niveau individuel Plus faible EDR_{10}	Eclosion 830 [130 – 3 500]	Eclosion 1 300 [830 – 1 900]	Fécondité 55 000 [47 000 – 57 000]
Critère au niveau population Plus faible EDR_{10}	R_0 830 [130 – 3 100]	R_0 620 [320 – 960]	R_0 17 000 [13 000 – 37 000]
Invertébrés du sol	<i>Eisenia fetida</i>	<i>Lumbricus terrestris</i>	<i>Porcellio scaber</i>
Critère au niveau individuel Plus faible EDR_{10}	Fécondité 3 400 [2 000 – 5 400]	n.d.	Fécondité 2 600 [1 500 – 5 400]
Critère au niveau population Plus faible EDR_{10}	R_0 3 200 [2 000 – 4 500]	R_0 3 200 [2 000 – 4 500]	R_0 2 600 [1 500 – 5 400]
Poissons	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	<i>Oryzias latipes</i>	<i>Poecilia reticulata</i>
Critère au niveau individuel Plus faible EDR_{10}	Eclosion 710 [360 – 1 200]	Eclosion 42 000 [37 000 – 47 000]	Fécondité 280 [52 – 730]
Critère au niveau population Plus faible EDR_{10}	R_0 630 [260 – 1 100]	R_0 38 000 [27 000 – 43 000]	R_0 280 [52 – 730]
Mammifères terrestres	<i>Mus musculus</i>	<i>Canis familiaris</i>	<i>Capra hircus</i>
Critère au niveau individuel Plus faible EDR_{10}	Fréquence de portée 26 [7,2 – 92]	Fécondité 1 800 [1 700 – 1 900]	Fécondité 2 000 [2 000 – 2 000]
Critère au niveau population Plus faible EDR_{10}	R_0 26 [7,2 – 86]	R_0 1 800 [1 400 – 1 900]	R_0 2 000 [2 000 – 2 000]

des courbes dose-réponse soit construit pour chaque trait démographique simulé, ce qui est réalisé à l'aide d'une méthode de bootstrap paramétrique conduite au niveau individuel (échantillonnant de nouvelles données d'effet dans l'intervalle $[-3\sigma, +3\sigma]$, où σ est l'écart-type des résidus) (Lance et al., 2012 ; Alonzo et al., 2016). En considérant un niveau de risque de 5%, on peut calculer les débits de dose suivants (Figure 56) :

- $ExDR$, le débit de dose causant un risque d'extinction (où 5% de la distribution des valeurs de λ est inférieure à 1).

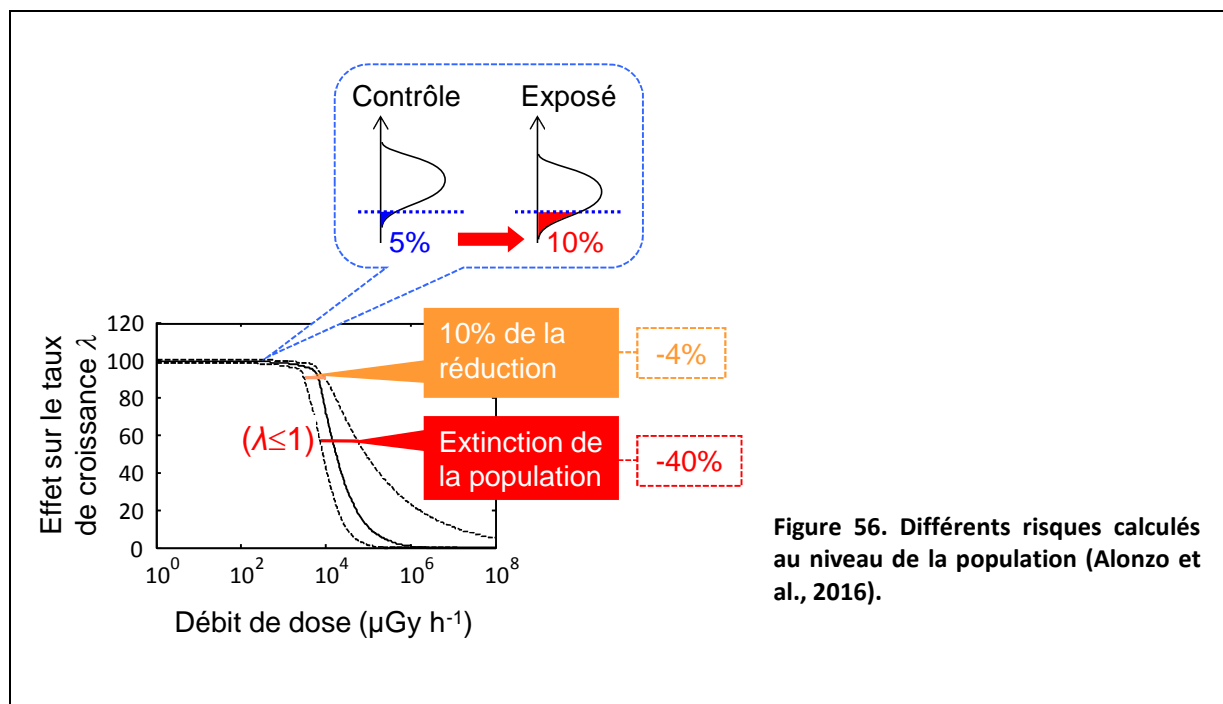


Figure 56. Différents risques calculés au niveau de la population (Alonzo et al., 2016).

- $ExDR_{10}$, le débit de dose causant un risque que le déclin de λ atteigne 10% de la réduction correspondant à l'extinction (où 5% de la distribution des valeurs de λ décline sous une valeur seuil définie pour chaque espèce). Par exemple : chez le cloporte *P. scaber* dont la population atteint l'extinction suite à une réduction de λ de 22%, la réduction considérée équivaut à 2,2% ; chez le medaka *O. latipes* dont la population atteint l'extinction suite à une réduction de λ de 82%, la réduction considérée équivaut à 8,2% etc.
- $DR_{10\%}$, l'équivalent de la concentration $C_{10\%}$ propose par Hanson et Stark (2012), le débit de dose auquel le risque de pseudo-extinction atteint 10%, en prenant comme valeur seuil, le 5^e percentile de la distribution de λ dans la population non exposée (c'est-à-dire que 5% des valeurs de λ de la population témoin et 10% des valeurs de λ de la population exposée est inférieure à ce seuil défini pour chaque espèce). Ce risque de pseudo-extinction est calculé par rapport au déclin du taux de croissance asymptotique λ mais on aurait également pu en introduire son équivalent par rapport au déclin de la taille à l'équilibre N_{eq} , ce qui aurait permis d'explorer deux situations différentes pour la population (la croissance asymptotique illimitée et l'équilibre dynamique).

5.4.2. Débits de dose causant des risques pour la population

Un risque de 5% d'extinction de la population est prédit pour des gammes de débits de dose qui diffèrent selon les groupes taxonomiques : de 7,9 à 112 mGy h⁻¹ chez les invertébrés aquatiques, de 13 à 15 mGy h⁻¹ chez les invertébrés du sol, de 2,8 to 115 mGy h⁻¹ chez les poissons et de 3,5 to 8,3 mGy h⁻¹ chez les mammifères terrestres (Tableau 27). A ces débits de dose, la taille à l'équilibre de la population (indépendamment de la règle de densité dépendance considérée) est réduite de plus de 50% dans toutes les espèces, avec aucune capacité de croissance pour récupérer après l'irradiation. En conséquence, l'extinction de la population reste un marqueur qui indique un impact écologique très sévère et ne devrait

Tableau 27. Débits de dose prédits ($\mu\text{Gy h}^{-1}$) causant un risque d'extinction ou de pseudo-extinction chez les invertébrés aquatiques et du sol, les poissons et les mammifères terrestres : débit de dose Ex-DR, induisant un risque de 5% d'extinction de la population ; débit de dose Ex10-DR, induisant un risque de 5% d'un déclin du taux de croissance de population correspondant à 10% de la réduction menant à l'extinction ; débit de dose DR10%, induisant un risque de 10% de pseudo-extinction. Les probabilités sont construites à l'aide d'un bootstrap (5 000 itérations).

Invertébrés aquatiques	<i>Neanthes arenaceodentata</i>	<i>Ophryotrocha diadema</i>	<i>Physa heterostropha</i>
Risque d'extinction			
Réduction de λ	22%	48%	39%
<i>ExDR</i>	7 900	15 000	110 000
<i>ExDR₁₀</i>	870	1 600	47 000
Pseudo-extinction			
<i>DR_{10%}</i>	220	220	2 000
Invertébrés du sol	<i>Eisenia fetida</i>	<i>Lumbricus terrestris</i>	<i>Porcellio scaber</i>
Risque d'extinction			
Réduction de λ	71%	33%	22%
<i>ExDR</i>	15 000	12 000	14 000
<i>ExDR₁₀</i>	4 000	3 700	1 800
Pseudo-extinction			
<i>DR_{10%}</i>	970	1 800	2 700
Poissons	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	<i>Oryzias latipes</i>	<i>Poecilia reticulata</i>
Risque d'extinction			
Réduction de λ	59%	82%	81%
<i>ExDR</i>	2 700	110 000	56 000
<i>ExDR₁₀</i>	600	43 000	150
Pseudo-extinction			
<i>DR_{10%}</i>	410	25 000	66
Mammifères terrestres	<i>Mus musculus</i>	<i>Canis familiaris</i>	<i>Capra hircus</i>
Risque d'extinction			
Réduction de λ	56%	56%	28%
<i>ExDR</i>	3 400	8 300	5 100
<i>ExDR₁₀</i>	24	2 000	2 000
Pseudo-extinction			
<i>DR_{10%}</i>	2,0	1 200	1 900

jamais être utilisé pour calculer des niveaux de protection.

Pour prendre en compte un risque moins sévère, 10% de la réduction de λ causant l'extinction est atteint pour des débits de dose qui s'échelonnent de 0,87 à 48 mGy h⁻¹ chez les invertébrés aquatiques, de 1,8 à 4,1 mGy h⁻¹ chez les invertébrés du sol, de 0,15 to 44 mGy h⁻¹ chez les poissons et de 0,24 to 2,0 mGy h⁻¹ chez les mammifères terrestres (Tableau 27). A ces débits de dose, la réduction de tous les traits démographiques restent en dessous de

10%, laissant les espèces avec plus de 90% de leur taille à l'équilibre et de leur capacité de croissance pour récupérer après l'irradiation.

Enfin, le risque de 10% de pseudo-extinction apparaît comme le plus protecteur (Tableau 27) avec une valeur de $DR_{10\%}$ la plus faible par groupe taxonomique variant de $2.0 \mu\text{Gy h}^{-1}$ chez les mammifères terrestres (*M. musculus*), $66.0 \mu\text{Gy h}^{-1}$ chez les poissons (*P. reticulata*), $120 \mu\text{Gy h}^{-1}$ chez les invertébrés aquatiques (*O. diadema*) à $977 \mu\text{Gy h}^{-1}$ chez les invertébrées du sol (*E. fetida*).

5.4.3. Contre quel risque les populations sont-elles finalement protégées ?

Les débits de dose associés aux différents risques prédits par nos modèles de population peuvent être comparés avec les valeurs de référence issues de la littérature pour la radioprotection des écosystèmes. L'idée est d'examiner contre quel niveau de risque les populations simulées sont protégées par ces valeurs de référence, reconnues au niveau international (Tableau 28). L'exercice montre que la valeur de référence générique de $10 \mu\text{Gy h}^{-1}$ (Garnier-Laplace et al., 2006 ; Beresford et al., 2007 ; Larsson, 2008) protègent toutes les espèces contre tous les risques, à l'exception de la souris *M. musculus*, chez laquelle seule la valeur provisoire de $2 \mu\text{Gy h}^{-1}$ proposée pour la radioprotection des mammifères par Garnier-Laplace et al. (2010) est à même de protéger contre tous les risques explorés dans notre étude. Le niveau de 10% de risque de pseudo-extinction est aussi dépassé chez *M. musculus* à la valeur de référence de $4 \mu\text{Gy h}^{-1}$, proposée dans ICRP (2008) pour la radioprotection des mammifères. Ce même niveau de risque est également dépassé chez les polychètes marins à la valeur de référence de $400 \mu\text{Gy h}^{-1}$, proposée respectivement dans ICRP (2008) et UNSCEAR (2008) pour la radioprotection des invertébrés et du milieu aquatique. Certaines espèces de poissons et de mammifères terrestres (*P. reticulata* et *M. musculus*) ne sont pas protégées, à un niveau de risque de 5%, contre 10% de la réduction de λ causant l'extinction de la population aux valeurs de références respectives de 400 et $100 \mu\text{Gy h}^{-1}$, proposées dans UNSCEAR (2008) pour la radioprotection du milieu aquatique et des mammifères. Enfin, toutes les valeurs de références proposées protègent les espèces simulées contre un risque de 5% d'extinction de la population. Les niveaux de risque évoqués représentent un déclin statistiquement significatif de populations théoriques, dont l'importance écologique nécessiterait d'être évaluée en situation réelle.

5.5. NEC PLUS ULTRA : UN COUPLAGE DEBTOX-MATRICES DE LESLIE (U APPAUVRI)

5.5.1. Contexte

Les paragraphes précédents ont montré que les modèles matriciels de Leslie (Caswell, 2001) sont des outils relativement simples, qui décrivent au cours du temps les transitions démographiques au sein d'une population structurée en stades ou classes d'âge. Ces modèles de Leslie sont également des plus utiles en écotoxicologie, puisqu'à partir de cette hypothèse de structure, ils délivrent de nombreux indicateurs de l'état d'une population (taux de

Tableau 28. Rapports entre différents débits de dose de référence (UNSCEAR, 2008 ; ICRP, 2008 ; Beresford et al., 2007 ; Larsson, 2008 ; Garnier-Laplace et al., 2010) et les débits de dose prédits causant différents risques au niveau population pour les espèces simulées. Les valeurs inférieures à 1 (rapport à $DR_{10\%}$) indiquent que la valeur de référence est en-dessous de $DR_{10\%}$, le débit de dose induisant un risque de 10% de pseudo-extinction. Les valeurs supérieures à 1 indiquent que la valeur de référence excède : en gras, $DR_{10\%}$, le débit de dose induisant un risque de 10% de pseudo-extinction (rapport à $DR_{10\%}$) ; en gras souligné, $ExDR_{10}$, le débit de dose induisant un risque de 5% d'un déclin du taux de croissance de population correspondant à 10% de la réduction menant à l'extinction (rapport à $ExDR_{10}$) ; Aucune valeur de référence n'excède $ExDR$, le débit de dose induisant un risque de 5% d'extinction de la population (aucun rapport à $ExDR$ n'est indiqué).

Groupe taxonomique et espèce	UNSCEAR	ICRP	ERICA / PROTECT
Invertébrés aquatiques	Aquatic: 400 $\mu\text{Gy h}^{-1}$	Invertebrates: 400 $\mu\text{Gy h}^{-1}$	Generic: 10 $\mu\text{Gy h}^{-1}$
<i>Neanthes arenaceodentata</i>	1.8	1.8	0.05
<i>Ophryotrocha diadema</i>	3.3	3.3	0.08
<i>Physa heterostropha</i>	0.2	0.2	0.005
Invertébrés du sol	Terrestrial: 100 $\mu\text{Gy h}^{-1}$	Invertebrates: 400 $\mu\text{Gy h}^{-1}$	Generic: 10 $\mu\text{Gy h}^{-1}$
<i>Eisenia fetida</i>	0.10	0.4	0.01
<i>Lumbricus terrestris</i>	0.06	0.2	0.006
<i>Porcellio scaber</i>	0.04	0.15	0.004
Poissons	Aquatic: 400 $\mu\text{Gy h}^{-1}$	Fish: 40 $\mu\text{Gy h}^{-1}$	Generic: 10 $\mu\text{Gy h}^{-1}$
<i>Oryzias latipes</i>	0.02	0.002	< 0.001
<i>Poecilia reticulata</i>	<u>2.7</u>	0.6	0.15
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	1.0	0.10	0.02
Mammifères terrestres	Terrestrial: 100 $\mu\text{Gy h}^{-1}$	Mammals: 4 $\mu\text{Gy h}^{-1}$	Generic: 10 $\mu\text{Gy h}^{-1}$
<i>Mus musculus</i>	<u>4.2</u>	2.0	5.0
<i>Canis familiaris</i>	0.08	0.003	0.008
<i>Capra hircus</i>	0.05	0.002	0.005

croissance, distribution en classes d'âge stable, valeurs reproductives, etc.), permettant une évaluation des risques à une échelle d'organisation écologiquement plus pertinente et – quand des données multigénérationnelles sont utilisées – à plus long terme. Toutefois, la qualité des prédictions réalisées dépend de la robustesse des données d'entrée utilisées. Or, sur ce plan, rares sont les études qui fournissent une description exhaustive des effets de la toxicité, chimique ou radiologique, étendue à l'ensemble du cycle de vie. Ainsi le plus souvent – en particulier dans la base de données FREDERICA – on ne dispose au mieux pour un trait biologique donné, que d'une seule courbe dose-réponse décrivant l'effet à un instant t précis dans une classe d'âge donnée – quand l'information sur la classe d'âge existe ! On doit alors recourir aux extrapolations décrites au paragraphe 5.2.4 pour compléter le manque de connaissances et tenter de deviner l'intensité de l'effet, dans les classes d'âge qui ne sont pas testées. Il ne doit cependant échapper à personne que les règles d'extrapolation mises en place sont des plus discutables. L'importance cruciale du facteur temps en toxicologie abordée paragraphe 4.1.1 signifie que ce qui est observé à un moment donné n'est plus vrai à d'autres temps, ou dans d'autres générations.

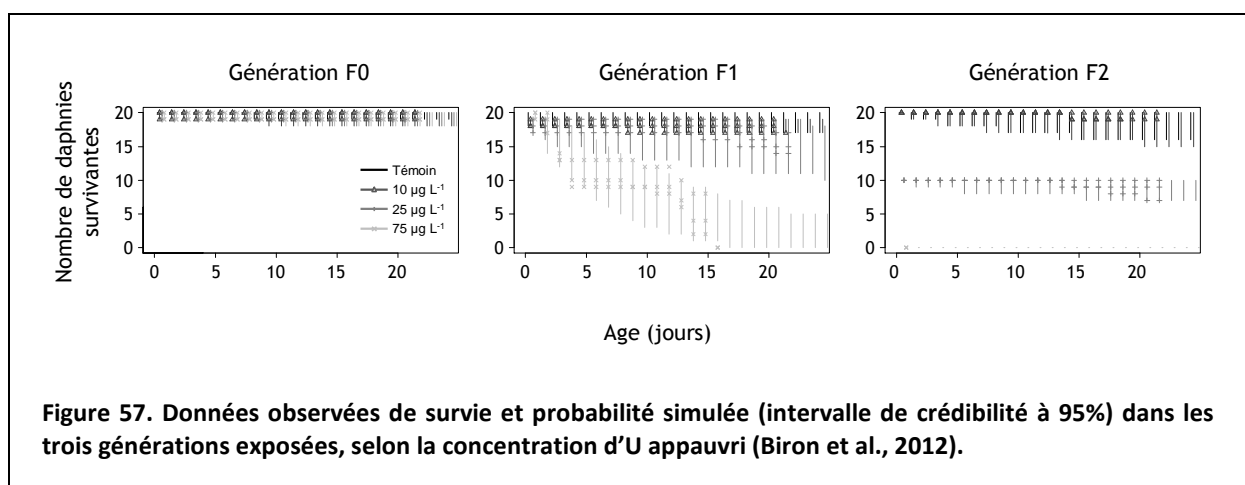
Dans ce contexte, il devient évident que l'approche DEBtox, en décrivant les effets sur le cycle de vie entier d'une espèce, ouvre finalement la voie à une extrapolation robuste des réponses, de l'organisme à la population (Billoir et al., 2007). Sur le cas de *D. magna* exposé à l'U appauvri, l'étude Biron et al. (2012) réalisée en collaboration vise à combiner modèles DEBtox et modèles matriciels de population, en distinguant, de surcroît, la variation des effets selon l'âge des organismes et selon la génération. L'approche bayésienne qui l'accompagne, proposée dans le cadre de la théorie DEBtox (Billoir et al., 2008b), présente l'avantage de fournir des résultats systématiquement accompagnés de leur amplitude d'incertitude. Les distributions d'incertitude obtenues au niveau individuel grâce à l'approche bayésienne sont ensuite répercutées pour assortir les indicateurs d'effets prédits au niveau population d'une incertitude de lecture (Ducrot et al., 2010).

5.5.2. Une vision de la toxicité multigénérationnelle à l'échelle de la population

Dans l'étude Biron et al. (2012), on ré-analyse, à l'aide de l'inférence bayésienne, les effets décrits chez *D. magna* lors de l'exposition multigénérationnelle à l'U appauvri (Massarin et al., 2010). Nul mécanisme transgénérationnel de l'aggravation de la toxicité : cela se passe avant la thèse de Delphine Plaire (2013) et on décrit les effets dans chaque génération (F0, F1 et F2, considérées séparément), à l'aide d'un modèle DEBtox standard à un seul mode d'action, dont on sait qu'il correspond à une réduction d'assimilation (Massarin et al., 2011). A la description des effets sublétaux (croissance et reproduction) s'ajoute celle de la mortalité (Figure 57), qu'on considère indépendante de l'âge (les expériences sont interrompues dans chaque génération avant la sénescence) et dont le taux n'augmente qu'avec la concentration C_w d'U appauvri dans le milieu. La probabilité d'être vivant au temps t s'exprime alors :

$$S(t, C_w) = \left((1 - m)(1 - s_S(C_w)) \right)^t \quad (\text{Equation 38})$$

où m est le taux de mortalité quotidien chez le témoin et $s_S(C_w)$ est la fonction de stress de la survie, donnée par :



$$\begin{cases} s_S(C_w) = 0 & \text{si } C_w < C_{0,S} \\ s_S(C_w) = b_S(C_w - C_{0,S}) & \text{si } C_w \geq C_{0,S} \end{cases} \quad (\text{Equation 39})$$

où $C_{0,S}$ représente la concentration sans effet et b_S la pente de la fonction de stress sur la survie.

L'inférence bayésienne permet d'aboutir à l'estimation des paramètres présentée dans le Tableau 29. On y note que les concentrations sans effet, $C_{0,A}$ et $C_{0,S}$, pour l'assimilation et la survie ne varient pas significativement entre les générations, au contraire de la pente de la fonction de stress b_A qui est significativement plus forte dans les générations F1 et F2.

Le couplage du modèle DEBtox aux matrices de Leslie revient à exprimer les taux de fécondité et de survie, $P_i(C_w)$ et $F_i(C_w)$, en fonction des sorties du modèle :

$$\begin{cases} P_i(C_w) = S(i+1, C_w)/S(i, C_w) \\ F_i(C_w) = P_1(C_w) \int_i^{i+1} \dot{R}(t, C_w) dt \end{cases} \quad (\text{Equation 40})$$

où l'on retrouve le taux de reproduction du modèle DEBtox $\dot{R}(t, C_w)$ au temps t et à la concentration C_w . Le terme $P_1(C_w)$ est introduit pour tenir compte de la mortalité entre la ponte et le comptage de la progéniture selon le principe du « *prebreeding census* » (Caswell, 2001).

La combinaison DEBtox-matrice de Leslie permet d'extrapoler les conséquences de la toxicité de l'U appauvri sur le taux de croissance asymptotique de la population (λ) dans chaque génération exposée (Figure 58). Les simulations prédisent, sans surprise, une augmentation de l'impact de l'U appauvri au travers des générations avec différentes issues selon la concentration : pour des concentrations inférieures à $26 \mu\text{g L}^{-1}$, aucune extinction de la population n'est observée ; celle-ci intervient à partir de $26 \mu\text{g L}^{-1}$ selon divers scénarios. Entre 26 et $68 \mu\text{g L}^{-1}$, l'extinction intervient seulement dans la génération F2, entre 68 et $72 \mu\text{g L}^{-1}$, elle se produit dans les générations F1 ou F2 et au-delà de $72 \mu\text{g L}^{-1}$, exclusivement en génération F1. Les simulations soulignent aussi l'importance de prendre en considération

Tableau 29. Estimation *a posteriori* (mode et [intervalle de crédibilité 95%]) des paramètres toxico-cinétiques toxico-dynamiques pour les modèles assimilation et survie.

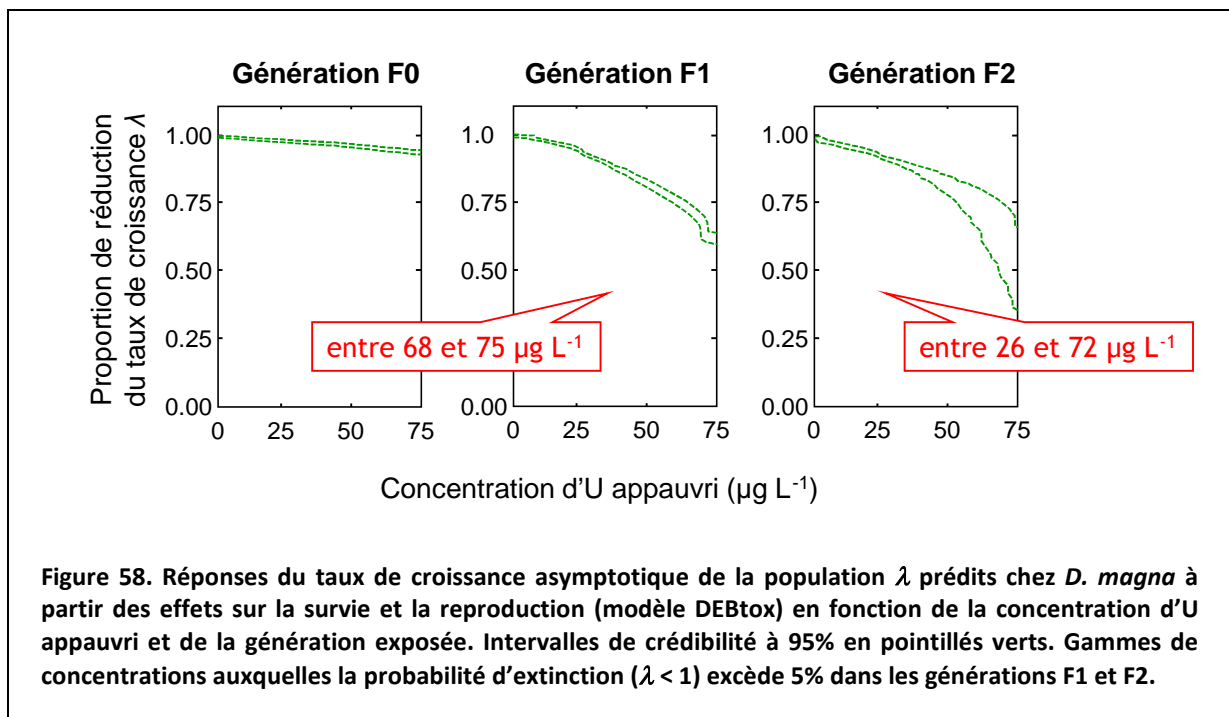
Description	Symbole (unité)	Génération F0	Génération F1	Génération F2
Mode d'action « Assimilation »				
Concentration sans effet	$C_{0,A}$ ($\mu\text{g / L}$)	0,1 [0,02 – 4,0]	7,1 [1,1 – 7,8]	0,04 [0,02 – 0,87]
Pente du stress	b_A ($\text{L / } \mu\text{g}$)	$1,8 [1,5 – 2,0] 10^{-3}$	$6,1 [5,5 – 6,6] 10^{-3}$	$5,7 [5,2 – 6,4] 10^{-3}$
Mortalité				
Mode d'action « Survie »				
Concentration sans effet	$C_{0,S}$ ($\mu\text{g / L}$)	–	23 [18 – 24]	2,4 [0,2 – 53]
Pente du stress	b_S ($\text{L / } \mu\text{g}$)	–	$2,2 [1,7 – 2,9] 10^{-3}$	$0,4 [0,0 – 12] 10^{-3}$

l'ensemble des stades de vie dans la détermination de la réponse des populations.

5.6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'analyse de sensibilité des modèles produit des résultats peu innovants en soi, tant les implications pour la protection des populations sont déjà bien connues des écotoxicologistes des polluants chimiques. A ma connaissance, ils apportent par contre un éclairage nouveau en radioprotection de l'environnement. Le message le plus marquant est, comme pour la toxicité chimique, que la sensibilité d'une population au stress radiologique ne peut être appréciée sur la seule base d'un effet mesuré à l'échelle de l'organisme – fût-ce t-il sur le trait biologique le plus radiosensible. Puisqu'un même niveau d'effet entraîne des conséquences différentes selon que le trait affecté est la survie, la croissance, la reproduction, il est indispensable d'évaluer à quel degré la dynamique de population est sensible aux variations de chacun de ces traits, ce qui varie en fonction des caractéristiques du cycle de vie de chaque espèce.

La simulation des dynamiques de population en fonction du débit de dose sur une gamme d'espèces biologiques valide l'hypothèse que le trait démographique simulé le plus radiosensible – le taux reproductif net – est aussi radiosensible que le trait biologique affecté à l'échelle de l'organisme ou plus radiosensible quand plusieurs traits biologiques sont affectés simultanément. L'approche promeut donc une vision intégrative de la toxicité, examinant parallèlement tous les effets susceptibles d'affecter la dynamique de population. De plus, parce que la dynamique de population doit intégrer l'intensité des effets sur l'ensemble du cycle de vie, elle promeut également une vision dynamique de la toxicité, décrivant la variation des effets au cours du temps.



L'approche intégrative et dynamique la plus à même de fournir cette vision à l'échelle de l'organisme est celle du DEBtox et du GUTS dont on comprend la complémentarité avec les modèles de population. A ce titre, le travail n'est pas terminé puisque le projet DEB-RAD a vocation à être poursuivi par une analyse toxico-cinétique toxico-dynamique des effets létaux des radionucléides chez *D. magna*. Des prédictions concernant la survie des organismes exposés sont nécessaires pour compléter le couplage aux matrices de Leslie et estimer le risque d'extinction et pseudo-extinction à l'échelle de la population dans les générations testées et ultérieures, dans les cas de l'U appauvri et des rayonnements ionisants alpha et gamma. Si les résultats déjà obtenus aboutissent à une meilleure compréhension de l'induction sur le long terme des effets toxiques à l'échelle de l'organisme et de leur lien avec un biomarqueur moléculaire, ils doivent également continuer d'alimenter notre évaluation des conséquences à l'échelle de la population, plus pertinente d'un point de vue écologique.

Chapitre 6

Perspectives générales

Sommaire

6.1. Intégrer la toxicité des échelles moléculaire et cellulaire jusqu'à l'organisme.....	203
6.1.1. Un modèle conceptuel pour les réponses moléculaires et cellulaires	203
6.1.2. Couplage des modèles DEB-AOP	203
6.2. Analyser la radiosensibilité des espèces et modéliser sa variabilité interspécifique	205
6.2.1. Une variabilité mal comprise de la radiosensibilité	205
6.2.2. Conférer du sens aux données écotoxicologiques.....	205
6.2.3. Vers une approche mécaniste de la radiosensibilité.....	206
6.3. Promouvoir un plus grand réalisme dans l'évaluation du risque écologique.....	207
6.3.1. Perspectives	207
6.3.2. Effets indirects	208
6.3.3. Conditions variables.....	208
6.3.4. Systèmes multi-espèces.....	209

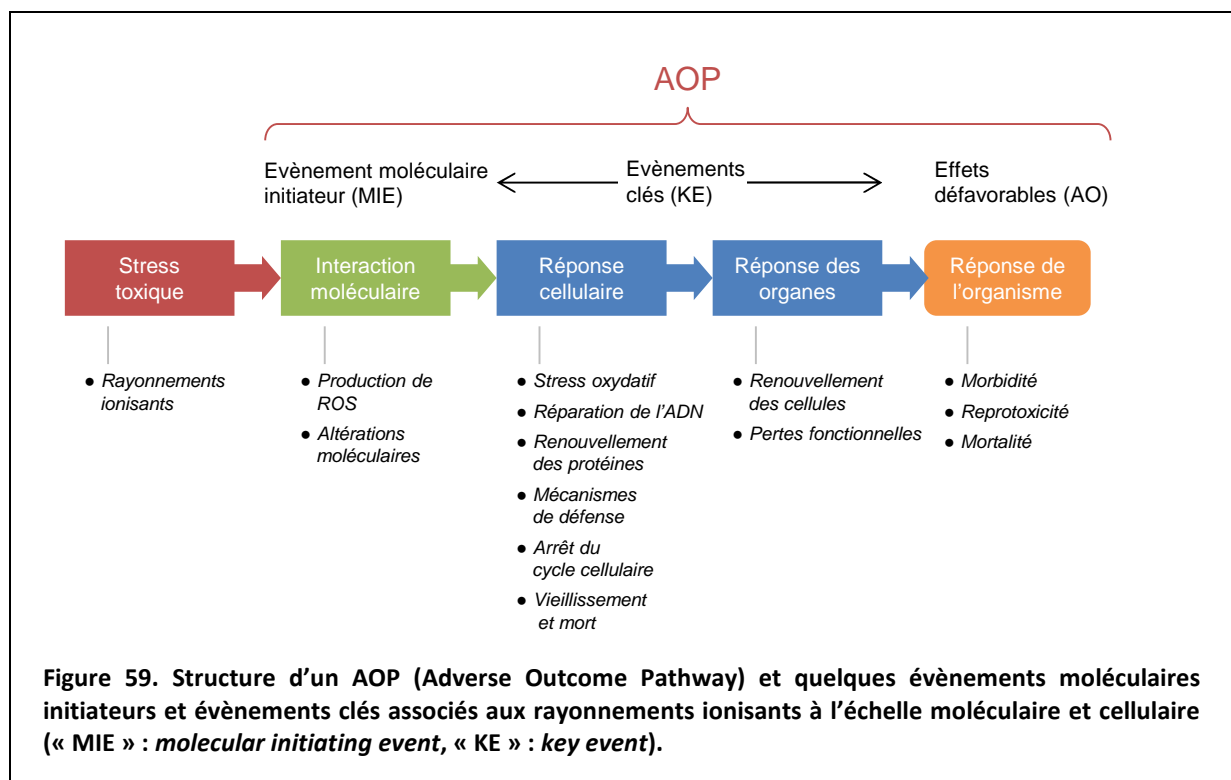
6.1. INTEGRER LA TOXICITE DES ECHELLES MOLECULAIRE ET CELLULAIRE JUSQU'A L'ORGANISME

6.1.1. Un modèle conceptuel pour les réponses moléculaires et cellulaires

L'un des défis en évaluation du risque écologique demeure de lier la masse croissante de données acquises aux échelles moléculaires et cellulaires (données de génomiques, transcriptomiques, protéomiques, métabolomiques etc.) aux processus écologiquement pertinents à l'échelle de l'organisme et à leurs conséquences adverses pour les populations, les communautés, et les écosystèmes. Au cours de la dernière décennie, une approche propose de répondre à ce défi en examinant les « adverse outcomes pathways » (AOP) (Ankley et al., 2010 ; Kramer et al., 2011). Son principe repose sur une description conceptuelle des liens de cause à effet qui unissent différents « évènements clés » (KE pour Key Events en anglais) biologiquement mesurables à chaque échelle d'organisation biologique. Ces évènements clés sont déclenchés par un « évènement moléculaire initiateur » (MIE, Molecular Initiating Event) et aboutissent aux effets défavorables (AO pour Adverse Outcomes) sur la reproduction, la croissance ou la survie à l'échelle de l'organisme (Figure 59), effets qui, à leur tour, peuvent être reliés quantitativement à la dynamique de population, échelle d'organisation biologique pertinente pour l'évaluation du risque.

6.1.2. Couplage des modèles DEB-AOP

L'application transgénérationnelle que nous faisons du modèle DEBtox fournit une représentation du mécanisme moléculaire à l'origine des différences de sensibilité des



organismes observées entre les générations : un pool de dommage dont le niveau variable – corroboré par les données de RAPD–qPCR – détermine l’intensité de la toxicité. Toutefois, les variations des paramètres gouvernant ce mécanisme demandent d’être éclaircies davantage et de gagner en signification biologique. Pour ce faire, un couplage des modèles DEB et AOP pourrait s’avérer des plus intéressants (Figure 60). Chez *Daphnia*, un tel couplage permet de révéler des connections entre les données d’expression génique, collectées à l’aide d’une revue de la littérature (concernant en particulier la réponse transcriptomique de gènes impliqués dans l’assimilation et l’utilisation de l’énergie) et certains paramètres du DEB gouvernant le stress toxique lors d’exposition à différents contaminants, et les variations de croissance et de reproduction (Ananthasubramaniam et al., 2015 ; Murphy et al., 2018). Dans le cadre des expositions multigénérationnelles aux radionucléides, l’approche couplée DEB et AOP aurait pour objectif d’identifier, au sein d’un compartiment de dommage spécifique de la lignée germinale, les mécanismes moléculaires impliqués dans l’hérédité transgénérationnelle et de lier les processus moléculaires, cellulaires et histologiques aux variations de la réponse des organismes au fil des générations (Garcia-Reyero et Murphy, 2017).

Si une approche couplée DEB-AOP peut conférer une pertinence écologique bien supérieure à certaines altérations moléculaires, elle offre en outre un cadre conceptuel générique permettant de caractériser des réponses comparables entre les espèces, de comprendre les différences de sensibilité aux différentes échelles d’organisation biologique et d’extrapoler le risque de façon plus robuste aux espèces sauvages non-testées, cibles de la

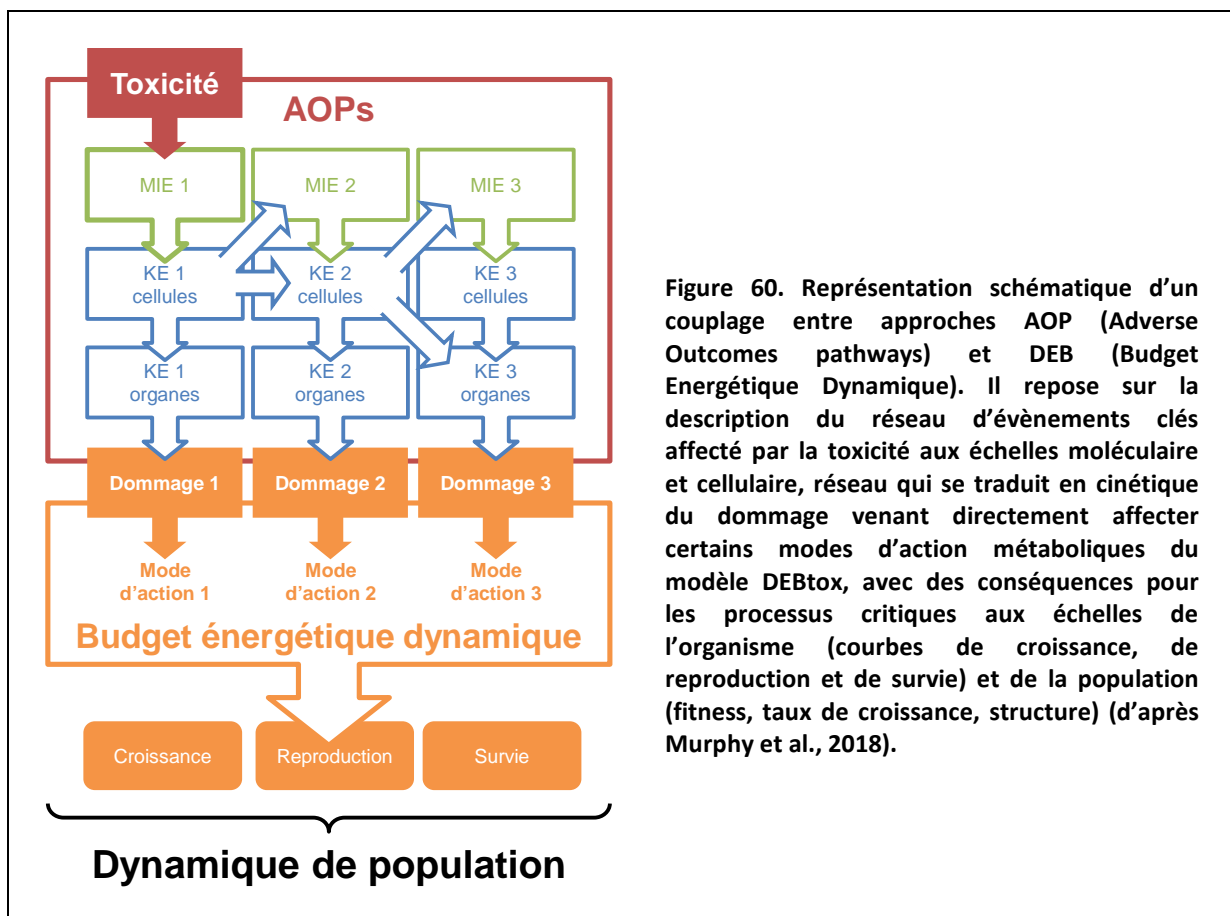


Figure 60. Représentation schématique d'un couplage entre approches AOP (Adverse Outcomes pathways) et DEB (Budget Énergétique Dynamique). Il repose sur la description du réseau d'évènements clés affecté par la toxicité aux échelles moléculaire et cellulaire, réseau qui se traduit en cinétique du dommage venant directement affecter certains modes d'action métaboliques du modèle DEBtox, avec des conséquences pour les processus critiques aux échelles de l'organisme (courbes de croissance, de reproduction et de survie) et de la population (fitness, taux de croissance, structure) (d'après Murphy et al., 2018).

protection environnementale (Gergs et al., 2015 ; Adam-Guillermin et al., 2018).

6.2. ANALYSER LA RADIOSENSIBILITE DES ESPECES ET MODELISER SA VARIABILITE INTERSPECIFIQUE

6.2.1. Une variabilité mal comprise de la radiosensibilité

Les tests de radiotoxicité aigue ou chronique réalisées à ce jour sont, pour leur grande majorité, conduits sur un nombre restreint d'espèces biologiques maintenues au laboratoire. Si les connaissances acquises montrent que la radiosensibilité peut varier d'une espèce à l'autre sur plusieurs ordres de grandeur, la question demeure de comprendre quels facteurs gouvernent cette variabilité. Jusqu'à présent, des relations empiriques de type allométrique (Higley et Bytwerk, 2007), qui décrivent – plus qu'elles n'expliquent – les variations de radiosensibilité en fonction de la masse des organismes, ont été utilisées pour prédire la sensibilité des espèces non testées (Vives-i-Batlle, 2012 ; Alonzo et al., 2016), sans que la cause des variations interspécifiques observées soit clairement élucidée. Pourtant, cette compréhension est indispensable au développement de méthodes prédictives permettant une extrapolation plus robuste de la radiosensibilité des espèces du laboratoire à celles réellement présentes dans l'environnement. Une telle extrapolation s'avère cruciale pour une bonne évaluation du risque écologique in situ (Garnier-Laplace et al., 2013).

6.2.2. Conférer du sens aux données écotoxicologiques

Mieux comprendre les variations de sensibilité à la toxicité chimique entre espèces est, de façon similaire, un enjeu pour les écotoxicologistes. La question est d'autant plus ardue, que cette sensibilité est généralement comparée sur la base des valeurs d' EC_{10} ou de LC_{50} , dont on a vu plus haut qu'elles étaient profondément inféodées aux conditions du test dans lequel elles sont évaluées. Dans ce contexte, les modèles TKTD permettent de mieux expliquer l'influence de la taille des organismes sur la variabilité intra- et interspécifique de la sensibilité aux contaminants chimiques (Jager, 2013 ; Gergs et al., 2015). En considérant communément la toxicité comme un processus dynamique dont l'intensité varie en fonction de la concentration interne d'un polluant, les deux approches mécanistes GUTS et DEBtox (Jager et al., 2011 ; Jager et Zimmer, 2012) montrent que les effets létaux et sub-létaux ne peuvent être appréhendés indépendamment du temps d'exposition et de la physiologie des organismes, puisque la cinétique d'internalisation du toxique est fortement influencée par les variations de taille au cours de la croissance, au sein d'une espèce et entre les espèces. Ayant résolu la variabilité liée aux cinétiques d'internalisation, une étude a récemment réussi à corrélérer, dans le cas de quatre pesticides, les valeurs de NEC (les no-effect-concentration qui évaluent la sensibilité à long-terme) des espèces à certains des paramètres du budget énergétique dynamique (DEB) (Baas et Kooijman, 2015). Les NEC létales sont, ainsi, particulièrement bien corrélées au taux spécifique de maintenance somatique, $[p_M]$ (Figure 61). Ce paramètre, défini dans la théorie DEB comme la quantité d'énergie nécessaire pour maintenir une unité de masse, régit le coût de la survie et détermine la taille maximale L_m

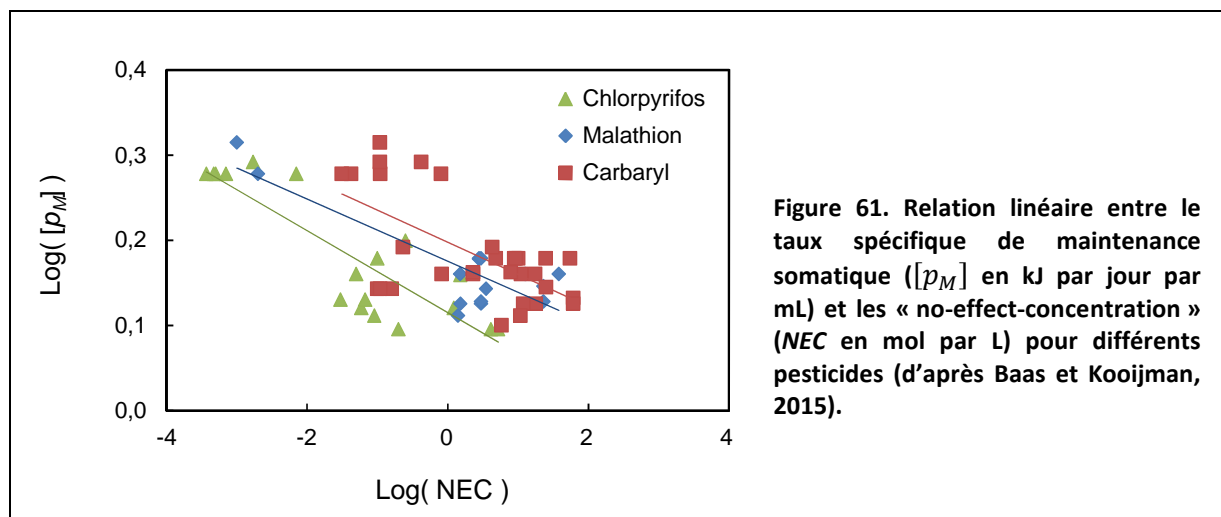


Figure 61. Relation linéaire entre le taux spécifique de maintenance somatique ($[p_M]$ en kJ par jour par mL) et les « no-effect-concentration » (NEC en mol par L) pour différents pesticides (d'après Baas et Kooijman, 2015).

atteinte par les organismes (Kooijman, 2013) – la raison de la variation allométrique de la sensibilité aux polluants s'en trouve dès lors expliquée. Cette étude offre de nombreuses implications et permet de réaliser des prédictions de sensibilité chez des organismes non testés sur la base de leurs paramètres métaboliques, plus de mille espèces étant désormais décrites à l'aide du modèle DEB (VU-Theoretical Biology, 2019).

6.2.3. Vers une approche mécaniste de la radiosensibilité

Explorer la relation entre la radiosensibilité et les paramètres du budget énergétique des espèces à l'aide des modèles GUTS et DEBtox et élucider l'une des causes possibles des différences interspécifiques de radiosensibilité constitue une perspective des plus ambitieuses. A ce jour, la radiosensibilité d'une espèce se mesure au travers de sa valeur de LD_{50} – la dose entraînant la mort de 50% des individus lors d'un test d'irradiation aiguë (paragraphe 2.4.1.). La mortalité étant mesurée au terme d'une période de temps variable selon les études et les espèces testées, un effort d'harmonisation a été proposé par Bytwerk (2006). Il consiste à prédire la « $LD_{50/30}$ » correspondant à 50% de mortalité au terme d'une période standard de 30 jours. La comparaison reste cependant discutable, 30 jours – ou toute autre durée d'ailleurs – représentant une période de temps difficilement comparable entre des espèces dont la longévité peut varier de quelques semaines à plusieurs années. Notre idée est d'étudier, à l'aide des modèles GUTS et DEBtox, la relation entre la radiosensibilité et certains paramètres du budget énergétique (et en particulier le taux spécifique de maintenance somatique $[p_M]$) à l'aide de plusieurs espèces animales. Les espèces en question seraient sélectionnées selon deux critères : soit parce qu'elles présentent des caractéristiques qui les rendent intéressantes sur le plan pratique pour l'acquisition de nouvelles données dans le dispositif *MICADO-Lab* (IRSN, Cadarache) – y compris par des techniques de mesures automatisées (Jager et Ashauer, 2018) ; soit parce que des données d'effet acquises sur une gamme de temps et de dose (à minima sur la survie en situation d'exposition aiguë) sont déjà disponibles dans la base de données FREDERICA (Copplestone et al., 2008). Une analyse dynamique serait conduite pour estimer les valeurs spécifiques de NED ou de $NEDR$ pour les effets létaux et sublétaux à l'aide du modèle TKTD adéquat (GUTS pour les données survie et DEBtox pour les données reproduction). Le travail fournirait une base robuste de

comparaison de la radiosensibilité entre les espèces et permettrait de confirmer, dans le cas des rayonnements ionisants, si la radiosensibilité d'une espèce (quantifiée par la valeur de *NED* ou *NEDR*) est, comme dans le cas des polluants chimiques, corrélée au taux spécifique de maintenance somatique. Cette approche viendrait s'ajouter à celle utilisée pour les réponses moléculaires et cellulaires (AOP) pour mieux cerner les variations de la radiosensibilité entre les espèces aux différentes échelles d'organisation biologique.

Plus fondamentalement, plusieurs auteurs ont cherché à comprendre pourquoi, dans la théorie DEB, le taux spécifique de maintenance somatique peut varier sur trois ou quatre ordres de grandeur à l'issue d'une large étude comparative incluant des représentants de la plupart des grands phylums et des treize classes de chordés (Kooijman, 2013). Ce résultat est surprenant dans la mesure où le coût de la maintenance est considéré constant au cours du cycle de vie et devrait rester approximativement constant d'une espèce à l'autre. En effet, 80–90% des coûts de maintenance somatique sont supposés alloués au renouvellement de la masse et les espèces animales varient peu en termes de composition biochimique (proportions de protéines, lipides et glucides). La première interprétation suggère un avantage adaptatif pour les petites espèces herbivores à gaspiller l'énergie disponible afin de conserver une taille limitée, se multiplier rapidement et répondre dans un délai court aux pics locaux et saisonniers d'abondance de la nourriture phytoplanctonique. Très récemment, une nouvelle proposition a été formulée pour expliquer la variation, interprétée comme un véritable biais dans la théorie DEB (Maury et al., 2019). Pour ce faire, les auteurs proposent d'explicitier le renouvellement de la masse endommagée par le métabolisme aérobie et la production des *ROS*, dont le coût décroît avec la taille au cours de la croissance d'un organisme et avec la taille maximale L_m d'une espèce à l'autre. Le modèle développé par Maury et al. (2019) apparaît particulièrement intéressant pour lier les variations de la production de *ROS* et du stress toxique sur le budget énergétique induit lors d'une exposition aux radiations ionisantes, à la fois au niveau intra- et interspécifique. Il suggère également que des mesures du niveau des *ROS* et du taux de renouvellement des protéines pourraient servir à l'estimation du niveau de la radiotoxicité et de son coût sur la maintenance somatique. L'acquisition de telles données permettrait aussi d'alimenter les modèles couplés DEB-AOP.

6.3. PROMOUVOIR UN PLUS GRAND REALISME DANS L'EVALUATION DU RISQUE ECOLOGIQUE

6.3.1. Perspectives

A quelques exceptions près, nos connaissances des effets des rayonnements ionisants sont exclusivement issues de tests de toxicité conduits sur une seule espèce à la fois, maintenue par ailleurs dans des conditions expérimentales constantes et optimales, ce qui reflète mal la situation réelle dans laquelle les écosystèmes sont exposés. Au cours de la dernière décennie, de nombreux auteurs en radioécologie comme en écotoxicologie, ont plaidé pour un plus grand réalisme dans l'évaluation du risque écologique. Ces appels concernent, entre autres, la prise en compte 1) des conditions d'exposition variables dans le temps (Ashauer et al., 2016) et 2) des processus écologiques intervenant à l'échelle des communautés, et en particulier des

effets indirects de la toxicité chimique ou radiologique (Preston, 2002 ; Rohr et al., 2006 ; Relyea et Hoverman, 2006 ; Bradshaw et al., 2014 ; Bréchnac et al., 2016). Une façon d'accroître ce réalisme écologique sans se heurter à la difficulté et la complexité des études de terrain et à leur cortège de conditions non contrôlées et de facteurs confondants (Garnier-Laplace et al., 2013 ; Geras'kin et al., 2016), est de progresser graduellement vers des expérimentations plus complexes, visant à tester :

- si, chez une espèce donnée, la radiosensibilité estimée est influencée par une variabilité des apports alimentaires ou par celle du niveau d'exposition (scénarios implémentables dans une modélisation toxico-cinétique toxico-dynamique de type DEBtox en faisant varier les facteurs f et DR) ;
- si la réponse d'une chaîne trophique simple (à deux composantes – proie et prédateur) peut être prédite sur la base des connaissances de la radiosensibilité des espèces isolées ;
- si les prédictions d'une modélisation couplée DEBtox-matrices de Leslie peuvent être validées expérimentalement à l'aide d'un système multi-espèces de type microcosme (Odum, 1985), exposé aux rayonnements gamma chroniques à des débits de dose représentatives des milieux contaminés.

6.3.2. Effets indirects

Si les tests monospécifiques sont parfaitement adéquats pour caractériser les effets directs des rayonnements ionisants sur les organismes, ils ne permettent, par contre, en aucun cas d'en étudier les effets indirects. Il existe de nombreux exemples d'effets indirects de toutes natures dans la littérature écotoxicologique (Hansen et Garton, 1982 ; Fleeger et al., 2003 ; Friberg-Jensen et al., 2003 ; Wendt-Rasch et al., 2003 ; Rohr et al., 2006 ; Fitzgerald et al., 2007 ; Wallace et al., 2010). Les effets indirects concernent toutes les perturbations causées par la toxicité au travers des interactions qu'entretient un organisme donné avec les autres organismes qui peuplent son environnement, qu'ils soient de la même espèce ou d'espèces différentes. Selon la nature des interactions en jeu, ces perturbations donnent naissance à des effets positifs – si une pression de compétition ou de prédation est amoindrie par la toxicité par exemple – ou négatifs – si la ressource qu'il exploitait entre en déclin ou si sa vulnérabilité aux parasites augmente. Parce que la radiosensibilité varie d'une espèce à l'autre, les effets indirects peuvent intervenir, chez un organisme, à des niveaux d'exposition où il n'est, lui-même, pas directement affecté par la toxicité. De plus, effets directs et indirects peuvent cohabiter simultanément pour modifier à la hausse ou à la baisse, l'impact de la toxicité tel qu'on l'a évalué expérimentalement sur des organismes pris isolément. Dans un système aussi complexe qu'un écosystème, cet ensemble d'interactions entre les multiples échelons trophiques, produit des réponses non linéaires imprédictibles par des modèles mathématiques simplistes (Burkett et al., 2005 ; Poff et Zimmerman, 2010), ce qui peut conduire à une sous-estimation ou une surestimation du risque écologique réel.

6.3.3. Conditions d'exposition variables

Dans les sites contaminés, évaluer le risque écologique est d'autant plus difficile que la dose réellement absorbée par les organismes, au travers de l'irradiation externe et de la

contamination interne (via l'absorption, l'ingestion et l'inhalation de substance radioactives) est complexe à estimer (Hinton et al., 2015). En effet, cette dose absorbée varie selon l'habitat occupé, les ressources alimentaires consommées, les modes de vie et de comportement qui diffèrent entre les espèces et entre les stades de vie au sein des espèces. Elle varie également pour l'organisme, en fonction de l'hétérogénéité spatiale de la contamination sur le terrain et des types de rayonnements émis (alpha, beta, gamma). La variabilité temporelle du niveau d'exposition aux rayonnements ionisants n'est pas prise en compte dans les tests de radiotoxicité.

Une étude récente (Ashauer et al., 2016) montre pourtant que la variabilité temporelle du niveau d'exposition a une forte influence sur la sensibilité des organismes et l'évaluation du risque écologique. Pour ce faire, les auteurs utilisent le modèle GUTS pour réaliser des prédictions de survie chez les invertébrés aquatiques exposés à divers pesticides selon des scénarios qui diffèrent au cours du temps (exposition constante, exposition unique suivie d'une récupération, exposition pulsée etc.). L'approche toxico-cinétique toxico-dynamique proposée par le modèle GUTS est particulièrement adéquate à la prise en compte d'une exposition variable au cours du temps. Les résultats identifient ainsi quelles données sont nécessaires à une bonne estimation de tous les paramètres du modèle. Ils montrent comment une calibration sur des données acquises lors d'expositions de courte durée permettent néanmoins de réaliser des prédictions robustes sur le long-terme, y compris pour des niveaux d'exposition variables dans le temps. Ils mettent enfin en évidence que la sensibilité relative des espèces peut différer en fonction du scénario choisi (Figure 62), ce qui souligne l'importance de prendre en compte des expositions variables dans le temps pour accroître la robustesse lors de l'évaluation du risque écologique.

6.3.4. Systèmes multi-espèces

Les microcosmes (Odum, 1985) sont des systèmes expérimentaux multi-espèces offrant la possibilité de mimer la complexité des communautés et de leurs interactions trophiques, tout en garantissant un niveau important de contrôle sur les conditions et la possibilité de répliquer l'échantillonnage. En établissant un pont entre le laboratoire et le terrain, les microcosms sont extrêmement utiles pour explorer comment les écosystèmes répondent au stress (Beyers et Odum, 1993). Les microcosmes sont communément utilisés en écotoxicologie pour étudier

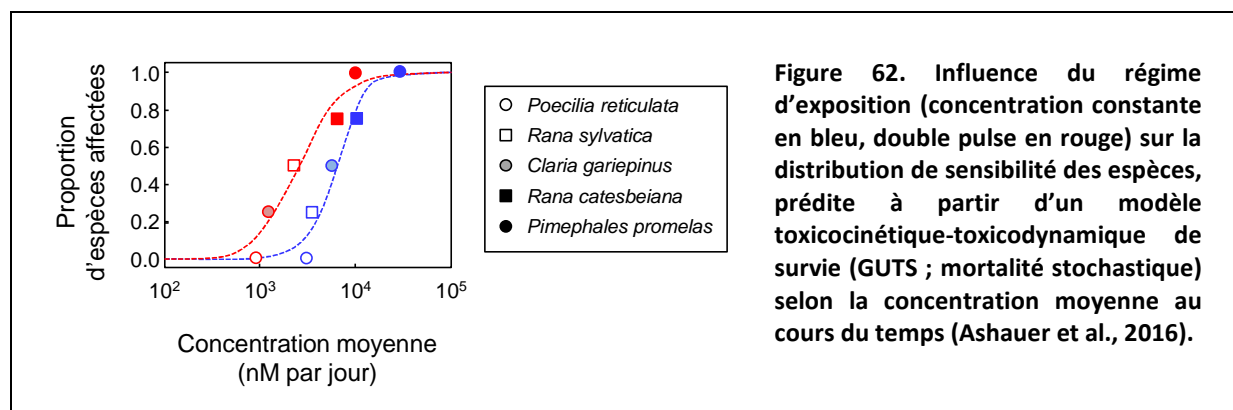


Figure 62. Influence du régime d'exposition (concentration constante en bleu, double pulse en rouge) sur la distribution de sensibilité des espèces, prédite à partir d'un modèle toxicocinétique-toxicodynamique de survie (GUTS ; mortalité stochastique) selon la concentration moyenne au cours du temps (Ashauer et al., 2016).

l'importance relative des effets directs et indirects de la toxicité (Clements et Kiffney, 1994 ; Preston, 2002 ; Fleeger et al., 2003). Jusqu'à ce jour en radioécologie, des microcosmes aquatiques n'ont servi à étudier la radiosensibilité d'un écosystème qu'exposé à de très forts débits de dose (1 à 5000 Gy h⁻¹) (Fuma et al., 1998, 2009, 2010, 2012), alors que les réponses à des niveaux d'exposition plus représentatifs de la situation réelle n'ont jamais été explorées.

Références

Aarkrog, A., 2003. Input of anthropogenic radionuclides into the World Ocean. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 50:2597–2606.

Adam C., Larno V., Giraudo M., Barillet S., Gania Y., Devaux A., 2006. Génotoxicité des radionucléides chez les organismes aquatiques : état de l’art et résultats préliminaires. Association pour la Recherche en Toxicologie-Actualités, Numéro spécial “Effets des toxiques chimiques/radioactifs sur le vivant”, 103–118

Adam-Guillermin, C., Pereira, S., Della-Vedova, C., Hinton, T., Garnier-Laplace, J., 2012. Genotoxic and reprotoxic effects of tritium and external gamma irradiation on aquatic animals. Rev Environ Contam Toxicol 220:67–103.

Adam-Guillermin C., Hertal-Aas T., Oughton D., Blanchard L., Alonzo F., Armant O., Horemans N., 2018. Radiosensitivity and transgenerational effects in non-human species. Annals ICRP, 47:327–341.

Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A., 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. Joint, Bone, Spine 74:324–329.

Agapkina G.I., Tikhomirov F.A., Shcheglov A.I., Kracke W., Bunzl K., 1995. Association of Chernobyl-derived $^{239+240}\text{Pu}$, ^{241}Am , ^{90}Sr and ^{137}Cs with organic matter in the soil solution. J Environ Radioact 29:257–269

Aigueperse J., Bouvier C., Chambrette V., Chazel V., Cossonnet C., Donnadiou-Claraz M., Frank D., Gourmelon P., Houpert P., Jourdan J.-R., Lorthior S., Paquet F., Rannou A., Telle Lambert M. et Tirmarche M. (2001) Etat des connaissances sur les risques potentiels associés à l’uranium appauvri utilisé dans les armes. Rapport IRSN DPHD/2001–01. 25 pp.

Akimoto S.I., 2014. Morphological abnormalities in gall-forming aphids in a radiation-contaminated area near Fukushima Daiichi: selective impact of fallout?, 2014. Ecol. Evol., 4:355–369.

Alonzo F., Gilbin R., Bourrachot S., Floriani M., Morello M., Garnier-Laplace J., 2006. Effects of chronic internal alpha irradiation on physiology, growth, and reproductive success of *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol., 80:228–236.

Alonzo F., Gilbin R., Zeman F.A., Garnier-Laplace J., 2008a. Increased effects of internal alpha irradiation on *Daphnia magna* after chronic exposure over 3 successive generations. Aquat. Toxicol., 87:146–156.

Alonzo F., Hertel-Aas T., Gilek M., Gilbin R., Oughton D., Garnier-Laplace J., 2008b. Modelling the propagation of effects of chronic exposure to ionising radiation from individuals to populations. *J. Environ. Rad.*, 99:1464–1473.

Alonzo F., Hertel-Aas T., Réal A., Lance E., Garcia-Sanchez L., Bradshaw C., Vives i Batlle J., Oughton D.H., Garnier-Laplace J., 2016. Population modelling to compare chronic external radiotoxicity between individual and population endpoints in four taxonomic groups. *J. Environ. Rad.*, 152:46–59.

Alonzo F., Trijau M., Plaire D., Massarin S., E. Billoir. (en prep.) An energy-based model with a transgenerational damage compartment to explain the increase in toxicity over generations in *Daphnia magna* exposed to depleted uranium.

Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Nat Acad. Sci.*, 90:7915–7922.

Ananthasubramaniam B., McCauley E., GUST K.A., Kennedy A.J., Muller E.B., Perkins E.J., Nisbet R.M., 2015. Relating suborganismal processes to ecotoxicological and population level endpoints using a bioenergetic model. *Ecol. Appl.*, 25:1691–1710.

Andersen T.H., Tjørnhøj R., Wollenberger L., Slothuus T., Baun A., 2015. Acute and chronic effects of pulse exposure of *Daphnia magna* to dimethoate and pirimicarb. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25:1187–1195.

Andersson P., Garnier-Laplace J., Beresford N.A., Copplestone D., Howard B.J., Howe P., Oughton D., Whitehouse P., 2009. Protection of the environment from ionising radiation in a regulatory context (PROTECT): proposed numerical benchmark values. *J. Environ. Radioact.*, 100:1100–1108.

Andres A.C., Muellener D.B. Ryffel G.U., 1984. Persistence, methylation and expression of vitellogenin gene derivatives after injection into fertilized eggs of *Xenopus laevis*. *Nucl. Acids Res.*, 12:2283–2302.

Ankley G.T., Bennett R.S., Erickson R.J., Hoff D.J., Hornung M.W., Johnson R.D., Mount D.R., Nichols J.W., Russom C.L., Schmieder P.K., Serrano J.A., Tietge J.E., Villeneuve D.L., 2010. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ Toxicol Chem.* 29:730–741.

Antunes S., Pereira R., Gonçalves F., 2007. Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 53:207–213.

Anway M.D., Cupp A.S., Uzumcu M., Skinner M.K., 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 308:1466–1469.

Arndt D.A., Chen J., Moua M., Klaper R.D., 2014. Multigeneration impacts on *Daphnia magna* of carbon nanomaterials with differing core structures and functionalizations. *Environ. Toxicol. Chem.*, 33:541–547.

- Arzul G., Quiniou F., Carrie C., 2006. In vitro test-based comparison of pesticide-induced sensitivity in marine and freshwater phytoplankton. *Toxicol. Mech. Meth.*, 16:431-437.
- Ashauer R., Albert C., Augustine S., Cedergreen N., Charles S., Ducrot V., Focks A., Gabsi F., Gergs A., Goussen B., Jager T., Kramer N.I., Nyman A.-M., Poulsen V., Reichenberger S., Schäfer R.B., Van den Brink P.J., Veltman K., Vogel S., Zimmer E.I., Preuss T.G., 2016. Modelling survival: exposure pattern, species sensitivity and uncertainty. *Sci. Reports*, 6:e29178.
- Asselman J., De Coninck D.I., Vandegheuchte M.B., Jansen M., Decaestecker E., De Meester L., Vanden Bussche J., Vanhaecke L., Janssen C.R., De Schamphelaere K.A.C., 2015. Global cytosine methylation in *Daphnia magna* depends on genotype, environment, and their interaction. *Environ. Toxic. Chem.*, 34:1056–1061.
- Asselman J., De Coninck D.I., Pfrender M.E., De Schamphelaere K.A., 2016. Gene body methylation patterns in *Daphnia* are associated with gene family size. *Genome Biol. Evol.*, 8:1185–1196.
- Asselman J., De Coninck D.I. M., Beert E., Janssen C.R., Orsini L., Pfrender M.E., Decaestecker E., De Schamphelaere K. A. C., 2017. Bisulfite sequencing with *Daphnia* highlights a role for epigenetics in regulating stress response to *Microcystis* through preferential differential methylation of serine and threonine amino acids. *Environ. Sci. Technol.*, 51:924–931.
- ASTM, 1998. Standard practice for conducting toxicity tests with fishes, microinvertebrates and amphibians. *Annual Book of ASTM Standards*, pp 271–296.
- Atienzar F.A. et Jha A.N., 2004. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 552:125–140.
- Atienzar F.A., Jha A.N., 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, 613:76–102.
- Atienzar F.A., Conradi M., Evenden A.J., Jha A.N., Depledge M.H., 1999. Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: Comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18:2275–2282.
- Atienzar F.A., Cheung V.V., Jha A.N., Depledge M.H., 2001. Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicol. Sci.*, 59:241–250.
- Augustine S., Gagnaire B., Adam-Guillermin C., Kooijman S.A., 2012. Effects of uranium on the metabolism of zebrafish, *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.*, 118:9-26.

- Baas J., Kooijman S.A.L.M., 2015. Sensitivity of animals to chemical compounds links to metabolic rate. *Ecotoxicol.*, 24:657–663.
- Baas J., Jager T., Kooijman S.A.L.M., 2010. A review of DEB theory in assessing toxic effects of mixtures. *Sci. Tot. Environ.*, 408:3740–3745.
- Bakshi M.V., Barjaktarovic Z., Azimzadeh O., Kempf S.J., Merl J., Hauck S.M., Eriksson P., Buratovic S., Atkinson M.J., Tapio S., 2013. Long-term effects of acute low-dose ionizing radiation on the neonatal mouse heart: a proteomic study. *Radiat. Environ. Biophys.*, 52:451–461.
- Barata C., Baird D. J., Markich S. J., 1998. Influence of genetic and environmental factors on the tolerance of *Daphnia magna* Straus to essential and non-essential metals. *Aquat. Toxicol.*, 42:115–137.
- Barber, R.C., Dubrova, Y.E., 2006. The offspring of irradiated parents, are they stable? *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 598:50–60.
- Barber, R., Plumb, M.A., Boulton, E., Roux, I., Dubrova, Y.E., 2002. Elevated mutation rates in the germ line of first-and second-generation offspring of irradiated male mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 99:6877–6882.
- Barber, R.C., Hickenbotham, P., Hatch, T., Kelly, D., Topchiy, N., Almeida, G.M., Jones, G.D., Johnson, G., Parry, J., Rothkamm, K., 2006. Radiation-induced transgenerational alterations in genome stability and DNA damage. *Oncogene* 25:7336–7342.
- Barillet S., 2007. Toxicocinétique, Toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine de Metz.
- Barillet S., Buet A., Adam C., Devaux A., 2005. Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprot.*, 40 suppl.:175–181.
- Barillet S., Adam C., Palluel O., Devaux A., 2007. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26:497–505.
- Barsi A., Jager T., Collinet M., Lagadic L., Ducrot V., 2014. Considerations for test design to accommodate energy budget models in ecotoxicology: A case study for acetone in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 33:1466–1475.
- Beasley D.E., Bonisoli-Alquati A., Welch S.M., Møller A.P., Mousseau T.A., 2012. Effects of parental radiation exposure on developmental instability in grasshoppers. *J. Evol. Biol.*, 25:1149–1162.
- Beaugelin-Seiller K., Jasserand F., Garnier-Laplace J., Gariel J.C., 2006. Modeling radiological dose in non-human species: principles, computerization, and application. *Health Phys.*, 90:485–493.

Beaugelin-Seiller K., Howard B., Garnier-Laplace J., 2019. An approach to identifying the relative importance of different radionuclides in ecological radiological risk assessment: Application to nuclear power plant releases. *J. Environ. Radioact.*, 197:116–126

Belanger S., Barron M., Craig P., Dyer S., Galay-Burgos M., Hamer M., Marshall S., Posthuma L., Raimondo S., Whitehouse P., 2017. Future needs and recommendations in the development of species sensitivity distributions: Estimating toxicity thresholds for aquatic ecological communities and assessing impacts of chemical exposures. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 13:664-674.

Benjamini Y., Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Stat. Soc. Ser. B Methodol.*, 57:289–300.

Beresford N., Wright S., Barnett C., Hingston J., Vives i Batlle, J., Coplestone D., Kryshev I., Sazykina T., Pröhl G., Arkhipov A., 2005. A case study in the Chernobyl zone Part 2: Predicting radiation induced effects in biota. *Radioprotect.*, 40 suppl.:299–305.

Beresford N.A., Brown J., Coplestone D., Garnier-Laplace J., Howard B., Larsson C.M., Oughton D., Pröhl G., Zinger I., 2007. D-ERICA: An integrated approach to the assessment and management of environmental risks from ionising radiation. ERICA project FI6R-CT-2004-508847. pp. 88.

Beresford N.A., Barnett C.L., Beaugelin-Seiller K., Brown J.E., Cheng J.-J., Coplestone D., Gaschak S., Hingston J. L., Horyna J., Hosseini A., Howard B.J., Kamboj S., Kryshev A., Nedveckaite T., Olyslaegers G., Sazykina T., Smith J.T., Telleria D., Vives i Batlle J., Yankovich T.L., Heling R., Wood M.D., Yu C., 2009. Findings and recommendations from an international comparison of models and approaches for the estimation of radiological exposure to non-human biota. *Radioprot.*, 44:565–70.

Bergonie J., Tribondeau L., 1906. De quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. *Comptes-Rendus des Séances de l'Académie des Sciences* 143:983–985.

Bernhard, W.A., Close, D.M., 2003. DNA damage dictates the biological consequences of ionizing irradiation: The chemical pathways, Chapter 15. In: Charged particle and photon interactions with matter chemical, physicochemical, and biological consequences with applications. Mozumder A., Hatano Y. (Eds). Marcel Dekker, New York. pp.431–470.

Bertrand, P., Lebeau, J., Lecomte-Pradines, C., Rigaud, O., Lopez, B., 2009. Réponses au niveau cellulaire et conséquences, Chapitre 14. In: Toxicologie nucléaire environnementale et humaine. Ménager M.T., Garnier-Laplace J., Goyffon M. (Eds.), Lavoisier, Paris. pp. 257–276.

Beyers R.J., Odum, H.T., 1993. Ecological microcosms. Springer-Verlag, New York. 557 pp.

- Bezrukov V., Møller A.P., Milinevsky G., Rushkovsky S., Sobol M., Mousseau T.A., 2015. Heterogeneous relationships between abundance of soil surface invertebrates and radiation from Chernobyl. *Ecol. Indicators* 52:128–133.
- Biermans G., Horemans N., Vanhoudt N., Vandenhove H., Saenen E., Van Hees M., Wannijn J., Vangronsveld J., Cuypers A., 2015. *Arabidopsis thaliana* seedlings show an age-dependent response on growth and DNA repair after exposure to chronic-radiation. *Environ. Exp. Bot.*, 109:122–130.
- Billoir E., Péry A.R.R., Charles S., 2007. Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*: A combination of the DEBtox and matrix population models. *Ecol. Model.*, 203:204–214.
- Billoir E., Laure Delignette-Muller M., Péry A. R. R., Geffard O. et Charles S., 2008a. Statistical cautions when estimating DEBtox parameters. *J. Theor. Biol.*, 254:55–64.
- Billoir E., Delignette-Muller M.L., Péry A.R.R., Charles S., 2008b. A bayesian approach to analyzing ecotoxicological data. *Environ. Sci. Technol.*, 42:8978–8984.
- Billoir E., Delhay H., Clément B., Delignette-Muller M.L., Charles S., 2011. Bayesian modelling of daphnid responses to time-varying cadmium exposure in laboratory aquatic microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74:693–702.
- Billoir. E., Trijau M., Parisot F., Alonzo A., Alonzo F. (en prep.) An energy-based model to analyze transgenerational effects of internal alpha radiation in *Daphnia magna* exposed to waterborne Am-241.
- Biron P.A., Massarin S., Alonzo F., Garcia-Sanchez L., Charles S., Billoir E., 2012. Population-level modelling to account for multigeneration effects of uranium in *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.*, 46:1136–1143.
- Blaylock B.G., Theodorakis C.W., Shugart L.R., 1996. Biological effects of ionising radiation. Protection of the natural environment. Proceedings of the first International Symposium on Ionising Radiation. Stockholm, May 20-24, 1996. Amiro B., Avadhanula R., Johnsson G., Larsson C.M., Luning M. (Eds.). 1:39–50.
- Bleise A., Danesi P. R., Burkart W., 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): A general overview. *J Environ Rad*, 64:93–112.
- Bollati V., Baccarelli A., 2010. Environmental epigenetics. *Heredity*, 105:105–112.
- Bonasio R., Li Q., Lian J., Mutti N.S., Jin L., Zhao H., Zhang P., Wen P., Xiang H., Ding Y., Jin Z., Shen S.S., Wang Z., Wang W., Wang J., Berger S.L., Liebig J., Zhang G., Reinberg D., 2012. Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Curr. Biol.*, 22:1755–1764.

Bonin B., Blanc P.L., 2001. L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine. In: L'uranium, de l'environnement à l'Homme, Chapitre 1, Metivier H., IPSN, Eds. EDP Science. pp. 7–42.

Bonisoli-Alquati A., Voris A., Mousseau T.A., Møller A.P., Saino N., Wyatt M.D., 2010. DNA damage in barn swallows (*Hirundo rustica*) from the Chernobyl region detected by use of the comet assay. *Comp. biochem. physiol. C*, 151:271–277.

Bontje D., Kooi B.W., Liebig M., Kooijman S.A.L.M., 2009. Modelling long-term ecotoxicological effects on an algal population under dynamic nutrient stress. *Water Res.*, 43 :3292-3300.

Bourrachot S. 2009. Etude des effets biologiques de l'exposition à l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) Impact sur le cycle de vie. Thèse de doctorat, Université Marseille-Provence.

Bradshaw C., Kapustka L., Barnthouse L., Brown J., Ciffroy P., Forbes V., Geras'kin S., Kautsky U., Brechignac F., 2014. Using an ecosystem approach to complement protection schemes based on organism-level endpoints. *J. Environ. Rad.*, 136:98–104.

Brausch J.M., Salice C.J., 2011. Effects of an environmentally realistic pesticide mixture on *Daphnia magna* exposed for two generations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 61:272-279.

Bréchignac F., Paquet F., 2013. Radiation-induced risks at low dose: moving beyond controversy towards a new vision. *Radiat. Environ. Biophys.* 52:299–301.

Bréchignac F., Oughton D., Mays C., Barnthouse L., Beasley J.C., Bonisoli-Alquati A., Bradshaw C., Brown J., Dray S., Geras'kin S., Glenn T., Higley K., Ishida K., Kapustka L., Kautsky U., Kuhne W., Lynch M., Mappes T., Mihok S., Møller A.P., Mothersill C., Mousseau T.A., Otaki J.M., Pryakhin E., Rhodes Jr. O.E., Salbu B., Strand P., Tsukada H., 2016. Addressing ecological effects of radiation on populations and ecosystems to improve protection of the environment against radiation: Agreed statements from a Consensus Symposium. *J. Environ. Radioact.*, 158-159:21–29.

Brenner D., Ward J., 1992. Constraints on energy deposition and target size of multiply damaged sites associated with DNA double-strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.*, 61:737–748.

Brooks S.P., Gelman A., 1998. General methods for monitoring convergence of iterative simulations. *J. Comput. Graph. Stat.*, 7:434–455.

Buijtendijk F.J.J., 1918. Combined action of narcotics and potassium cyanide on daphne. *Arch. Néerland. Physiol.*, 2:521–524.

Buisset-Goussen A., Goussen B., Della-Vedova C., Galas S., Adam-Guillermin C., Lecomte-Pradines C., 2014. Effects of chronic gamma irradiation: a multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*. *J. Environ. Radioact.*, 137:190–197.

- Burkett V.R., Wilcox D.A., Stottlemeyer R., Barrow W., Fagre D., Baron J., Price J., Nielsen J.L., Allen C.D., Peterson D.L., 2005. Nonlinear dynamics in ecosystem response to climatic change: case studies and policy implications. *Ecol. Complexity*, 2:357–394.
- Byerly L., Cassada R. C., Russell R. L. 1976. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. *Dev. Biol.*, 51:23–33.
- Bywater J. F., Banaczowski R., Bailey M., 1991. Sensitivity to uranium of six species of tropical freshwater fishes and four species of cladocerans from Northern Australia. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10:1449–1458.
- Bytwerk D.P., 2006. An allometric examination of the relationship between radiosensitivity and mass. Msc Thesis, Oregon State University, 70 pp.
- Cambier S., Gonzalez P., Durrieu G., Bourdineaud J.-P., 2010. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 73:312–319.
- Caswell H., 2001. Matrix population models: Construction, analysis and interpretation, 2nd Edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 722 pp.
- Cedergreen N., Nørhave N.J., Svendsen C., Spurgeon D.J., 2016. Variable temperature stress in the nematode *Caenorhabditis elegans* (Maupas) and its implications for sensitivity to an additional chemical stressor. *PloSOne*, 11:e0140277.
- Chambers D.B., Osborne R.V., Garva A.L., 2006. Choosing an alpha radiation weighting factor for doses to non-human biota. *J. Environ. Radioact.*, 87:1–14.
- Chen Y., Huang J., Xing L., Liu H., Giesy J.P., Yu H., Zhang X., 2014. Effects of multigenerational exposures of *D. magna* to environmentally relevant concentrations of pentachlorophenol. *Environ. Sci. Poll. Res.*, 21:234–243.
- Choppin G.R., 2006. Actinide speciation in aquatic systems. *Mar. Chem.*, 99:83–92.
- Clements W.H., Kiffney P.M. 1994. Assessing contaminant effects at higher levels of biological organization. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:357-359.
- Colbourne J.K., Pfrender M.E., Gilbert D., Thomas W.K., Tucker A., Oakley T.H., Tokishita S., Aerts A., Arnold G.J., Basu M.K., 2011. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science*, 331:555–561.
- Colle C., Garnier-Laplace J., Roussel-Debet S., Adam C., Baudin J.P., 2001. Comportement de l'uranium dans l'environnement. In: L'uranium, de l'environnement à l'Homme, Chapitre 6, Metivier H., IPSN, Eds. EDP Science. pp 187–211
- Cooley, J., Miller, J., FL, 1971. Effects of chronic irradiation on laboratory populations of the aquatic snail *Physa heterostropha*. *Radiat. Res.*, 47:716–724.

- Connelly S.J., Moeller R.E., Sanchez G., Mitchell D.L., 2009. Temperature effects on survival and DNA repair in four freshwater cladoceran *Daphnia* species exposed to UV radiation. *Photochem. Photobiol.*, 85:144–152.
- Copplestone, D., Bielby, S., Jones, S., Patton D., Daniel P., Gize I., 2001. Impact assessment of ionising radiation on wildlife. Environment Agency R&D Publication n°128. pp. 238
- Copplestone D., Hingston J., Real A., 2008. The development and purpose of the FREDERICA radiation effects database. *J. Environ. Radioact.*, 99:1456–1463.
- Craig A.L., Moser S.C., Bailly A.P., Gartner A. 2012. Methods for studying the DNA damage response in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Meth. Cell. Biol.*, 107:321–352.
- Daboussi F., Dumay A., Delacote F., Lopez B., 2002. "DNA double-strand break repair signalling: The case of RAD51 post-translational regulation." *Cell Signal.* 14:969–975.
- Daca-Roszak P., Pfeifer A., Żebracka-Gala J., Rusinek D., Szybińska A., Jarzab B., Witt M., Ziętkiewicz E., 2015. Impact of SNPs on methylation readouts by Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array: implications for comparative population studies. *BMC Genom.*, 16:1003.
- Dallas L.J., Keith-Roach M., Lyons B.P., Jha A.N., 2012. Assessing the impact of ionizing radiation on aquatic invertebrates: A critical review. *Rad. Res.*, 177:693–716.
- Darby, S.C., Doll, R., 1987. Fallout, radiation doses near Dounreay, and childhood leukaemia. *Brittish Med J*, 294:603–607.
- Dauer, L.T., Brooks, A.L., Hoel, D.G., Morgan, W.F., Stram, D., Tran, P., 2010. Review and evaluation of updated research on the health effects associated with low-dose ionising radiation. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 140:103–36.
- David R. M., 2009. Xenobiotic metabolism and markers of genotoxicity in regulatory nonvertebrate ecotoxicological test species. Ph. D thesis, University of Birmingham. pp. 319.
- David R.M., Dakic V., Williams T.D., Winter M.J., Chipman J.K., 2011. Transcriptional responses in neonate and adult *Daphnia magna* in relation to relative susceptibility to genotoxicants. *Aquatic Toxicology* 104, 192-204.
- Daxinger L., Whitelaw E., 2010. Transgenerational epigenetic inheritance: more questions than answers. *Genome Res.*, 20:1623–1628.
- De Meester L., 1996. Evolutionary potential and local genetic differentiation in a phenotypically plastic trait of a cyclical parthenogen, *Daphnia magna*. *Evol.*, 50:1293-1298.
- De Mott R.P., Balaraman A., Sorensen M.T., 2005. The future direction of ecological risk assessment in the United States: reflecting on the U.S. Environmental Protection Agency's "examination of risk assessment practices and principles". *Integr. Environ. Assess. Management* 1 :77–82.

De O.F. Rossetto A.L., Melegari S.P., Ouriques L.C., Matias W.G., 2014. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Sci. Tot. Environ.* 490:807–814.

De Schamphelaere K., Forrez I., Dierckens K., Sorgeloos P., Janssen C., 2007. Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.*, 81:409–418.

Dedeh A., Ciutat A., Tran D., Bourdineaud J.-P., 2014. DNA alterations triggered by environmentally relevant polymetallic concentrations in marine clams *Ruditapes philippinarum* and polychaete worms *Hediste diversicolor*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 67:651–658.

Delistraty, D. 2008. Radioprotection of non-human biota. *J. Environ. Radioactiv.* 99:1863–1869.

Delpoux M., Leonard A., Dulieu H., Dalebroux M., 1997. Experimental study of the genetic effects of high levels of natural radiation in South-France. In: Proceedings of the fourth international conference on high levels of natural radiation 1996. Radiation dose and health effects, Beijing, China. Elsevier, Tokyo (Eds). pp. 397–406.

Denslow N.D., Colbourne J.K., Dix D., Freedman J.H., Helbing C.C., Kennedy S., Williams P.L., 2007. Selection of surrogate animal species for comparative toxicogenomics. In : Genomic Approaches for Cross-Species Extrapolation in Toxicology. Benson W., Di Giulio R. (Eds), SETAC and CRC Press, Pensacola. pp. 33–75.

Deryabina T.G., Kuchmel S.V., Nagorskaya L.L., Hinton T.G., Beasley J.C., Lerebours A., Smith J.T., 2015. Long-term census data reveal abundant wildlife populations at Chernobyl. *Current Biol.*, 25:R824–R826.

Devos, A., 2013. Exposition chronique des stades précoces de développement de l'huître japonaise aux contaminants industriels en Manche. Marqueurs de stress à des niveaux intégrés et moléculaires. Thèse de doctorat, Université de Caen.

Dietrich S., Ploessl F., Bracher F., Laforsch C., 2010. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna*—A multigenerational study. *Chemosphere*, 79:60–66.

Ding G., Wang L., Zhang J., Wei Y., Wei L., Li Y., Mihua S., Xiong D., 2015. Toxicity and DNA methylation changes induced by perfluorooctane sulfonate (PFOS) in sea urching *Glyptocidaris crenularis*. *Chemosphere*, 128:225–230.

Dizdaroglu M., 1992. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat. Res.*, 275:331–342.

Dowling K., Seymour C., Mothersill C., 2005. Delayed cell death and bystander effects in the progeny of Chinook salmon embryo cells exposed to radiation and a range of aquatic pollutants. *International J. Radiat. Biol.*, 81:89–96.

- Dubrova Y.E., Jeffreys A.J., Malashenko A.M., 1993. Mouse minisatellite mutations induced by ionizing radiation. *Nat. Genet.*, 5:92–94.
- Dubrova, Y.E., Plumb, M., Gutierrez, B., Boulton, E., Jeffreys, A.J., 2000. Genome stability: transgenerational mutation by radiation. *Nature*, 405:37-37.
- Ducrot V., Billoir E., Péry A.R.R., Garric J., Charles S, 2010. From individual to population level effects of toxicants in the tubicifid *Branchiura sowerbyi* using threshold effect models in a Bayesian framework. *Environ. Sci. Technol.*, 44:3566–3571.
- Dutilleul M., Lemaire L., Réale D., Lecomte C., Galas S., Bonzom J.-M., 2013. Rapid phenotypic changes in *Caenorhabditis elegans* under uranium exposure. *Ecotoxicol.*, 22:869–878.
- Dutilleul M., Réale D., Goussen B., Lecomte C., Galas S., Bonzom J.-M., 2017. Adaptation costs to constant and alternating polluted environments. *Evol. Appl.* 10:839–851.
- EC (European Commission), 2003. Technical guidance document in support of Commission Directive 93/67/ EEC on risk assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part II. Office for Official Publication of the European Communities, Luxembourg.
- EC (European Commission), 2011. Technical guidance for deriving environmental quality standards. Common implementation strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance document N°27. Technical Report - 2011–055. pp.204.
- Eisler R. 1994. Radiation hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. Biological Report 26. Contaminant Hazard Reviews, Report No. 29. U.S. Department of the Interior, National Biological Service, Laurel. pp. 147.
- Elango N., Hunt B.G., Goodisman M.A.D., Yi S.V., 2009. DNA methylation is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106:11206–11211.
- Elendt B. P., Bias W. R., 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Res.*, 24:1157–1167.
- Ellegren H., Lindgren G., Primmer C.R., Møller A.P., 1997. Fitness loss and germline mutations in barn swallows breeding in Chernobyl. *Nature*, 389:593–596.
- Ellison A.M., 2004. Bayesian inference in ecology. *Ecol. Letters*, 7:509–520.
- Environment Canada, 2003. Releases of radionuclides from nuclear facilities (impact on nonhuman biota). Priority substances list assessment report, Canadian environmental protection act, 1999. Ottawa: Environment Canada.

Erickson B., 1978. Effect of continuous gamma-radiation on the stem and differentiating spermatogonia of the adult rat. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 52:117–128.

Erickson B., Martin P.G., 1976. Effects of continuous prenatal radiation on the pig and rat, Biological and environmental effects of low-level radiation. Proceedings of the symposium on biological effects of low-level radiation pertinent to protection of man and his environment. International Atomic Energy Agency, Vienna (Austria). Volume 7. pp. 111–117.

Erickson B., Martin P., 1984. Reproductive and genetic effects of continuous prenatal irradiation in the pig. *Teratol.*, 30, 99–106.

Falckenhayn C., Boerjan B., Raddatz G., Frohme M., Schoofs L., Lyko F., 2013. Characterization of genome methylation patterns in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *J. Exp. Biol.*, 216:1423–1429.

FASSET, 2003. Framework for assessment of environmental impact (FASSET). Deliverable 3. Dosimetric models and data for assessing radiation exposures to Biota. EC 5th Framework Programme. Contract FIGE-CT-2000-00102.

Favier, A., 2003. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 11-12:108–115.

Feng H., Conneely K.N., Wu H., 2014. A Bayesian hierarchical model to detect differentially methylated loci from single nucleotide resolution sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, 42:e69.

Fitzgerald W.F., Lamborg C.H., Hammerschmidt C.R. 2007. Marine biogeochemical cycling of mercury. *Chem. Rev.*, 107:641–662.

Fleeger J.W., Carman K.R., Nisbet R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Tot. Environ.*, 317:207–233.

Forbes V.E., Calow P., 1999. Is the per capita rate of increase a good measure of population level effects in ecotoxicology? *Environ. Toxicol. Chem.*, 18:1544–1556.

Forbes V.E., Calow P., Sibly R.M., 2001. Are current species extrapolation models a good basis for ecological risk assessment? *Environ. Toxicol. Chem.*, 20:442–447.

Forbes V.E., Calow P., 2002. Population growth rate as a basis for ecological risk assessment of toxic chemicals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B*, 357:1299–1306.

Forbes V.E., Palmqvist A., Bach L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25:272–280.

Franken N.A., Hovingh S., Ten Cate R., Krawczyk P., Stap J., Hoebe R., Aten J., Barendsen G.W., 2012. Relative biological effectiveness of high linear energy transfer α -particles for the

induction of DNA-double-strand breaks, chromosome aberrations and reproductive cell death in SW-1573 lung tumour cells. *Oncol. Rep.*, 27:769–774.

Friberg-Jensen U., Wendt-Rasch L., Woin P., Christoffersen K., 2003. Effects of the pyrethroid insecticide, cypermethrin, on a freshwater community studied under field conditions. I. Direct and indirect effects on abundance measures of organisms at different trophic levels. *Aquat. Toxicol.*, 63:357–371.

Fuller, N., Lerebours, A., Smith, J.T., Ford, A.T., 2015. The biological effects of ionising radiation on Crustaceans: A review. *Aquat. Toxicol.*, 167:55–67.

Fuller N., Ford A.T., Nagorskaya L.L., Gudkov D.I., Smith J.T., 2018 Reproduction in the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* along a gradient of radionuclide contamination at Chernobyl. *Sci. Total Environ.*, 628–629:11–17.

Fuma S., Takeda H., Miyamoto K., Yanagisawa K., Inoue Y., Sato N., Hirano M., Kawabata Z., 1998. Effects of gamma-rays on the populations of the steady-state ecological microcosm. *Int. J. Rad. Biol.*, 74:145–150.

Fuma S., Ishii N., Takeda H., Miyamoto K., Yanagisawa K., Doi K., Kawaguchi I., Tanaka N., Inamori Y., Polikarpov G. G., 2009. Effects of acute gamma-irradiation on the aquatic microbial microcosm in comparison with chemicals. *J. Environ. Rad.*, 100:1027–1033.

Fuma S., Ishii N., Takeda H., Doi K., Kawaguchi I., Shikano S., Tanaka N., Inamori Y., 2010. Effects of acute gamma-irradiation on community structure of the aquatic microbial microcosm. *J. Environ. Rad.*, 101:915–922.

Fuma S., Kawaguchi I., Kubota Y., Yoshida S., Kawabata Z.I., Polikarpov G.G., 2012. Effects of chronic gamma-irradiation on the aquatic microbial microcosm: equi-dosimetric comparison with effects of heavy metals. *J. Environ. Rad.*, 104:81–86.

Gajewski, E., Fuciarelli, A.F., Dizdaroglu, M., 1988. Structure of hydroxyl radical-induced DNA-protein crosslinks in calf thymus nucleohistone in vitro. *International J. Rad. Biol.*, 54:445–459.

Garcia-Reyero N., Murphy C.A., 2017. A systems biology approach to advancing Adverse Outcome Pathways for risk assessment. Springer International Publishing, Cham. 422 pp.

Garnier-Laplace J., Colle C., Morello M., 2001. Uranium naturel et environnement. Fiche radionucléide IRSN. DEI/SECRE.

Garnier-Laplace J., Della-Vedova C., Gilbin R., Copplestone D., Hingston J., Ciffroy P., 2006. First derivation of predicted-no-effect values for freshwater and terrestrial ecosystems exposed to radioactive substances. *Environ. Sci. Technol.* 40:6498–6505.

Garnier-Laplace J., Della-Vedova C., Andersson P., Copplestone D., Cailes C., Beresford N., Howard B., Howe P., Whitehouse P., 2010. A multi-criteria weight of evidence approach for deriving ecological benchmarks for radioactive substances. *J. Radiol. Protect.*, 30:215–233.

Garnier-Laplace, J., Beaugelin-Seiller, K., Hinton, T.G., 2011a. Fukushima wildlife dose reconstruction signals ecological consequences. *Environ. Sci. Technol.*, 45:5077–5078.

Garnier-Laplace J., Alonzo F., Bradshaw C., Della-Vedova C., Lecomte-Pradines C., Gilbin R., Hertel-Aas T., Hinton T.G., Horemans N., Oughton D.H., Rudolfsen G., Salbu B., Vandenhove H., 2011b. STAR Deliverable (D-N° 5.1) Plans for laboratory radiation effects studies. European Commission, 7th Framework, Contract N(Fission-2010-3.5.1-269672). pp. 127.

Garnier-Laplace J., Geras'kin S., Della-Vedova C., Beaugelin-Seiller K., Hinton T., Real A., Oudalova A., 2013. Are radiosensitivity data derived from natural field conditions consistent with data from controlled exposures? A case study of Chernobyl wildlife chronically exposed to low dose rates. *J. Environ. Radioact.*, 121:12–21.

Garnier-Laplace J., Beaugelin-Seiller K., Della-Vedova C., Métivier J.M., Ritz C., Mousseau T.A., Møller A.P., 2015. Radiological dose reconstruction for birds reconciles outcomes of Fukushima with knowledge of dose-effect relationships. *Scientific Reports* 5:e16594.

Gartner A., Milstein S., Ahmed S., Hodgkin J., Hengartner M.O. 2000. A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*. *Mol. Cell.*, 5:435–443.

Geffroy B., Ladhar C., Cambier S., Treguer-Delapierre M., Brèthes D., Bourdineaud J.-P., 2012. Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: the role of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicol.*, 6:144–160.

Gelman A., Rubin D.B., 1992, Inference from iterative simulation using multiple sequences, *Stat. Sci.*, 7:457–511.

Geras'kin S., Fesenko S., Alexakhin R., 2008. Effects of non-human species irradiation after the Chernobyl NPP accident. *Environ. Internat.*, 34:880–897.

Geras'kin S., Evseeva T., Oudalova A., 2013. Effects of long-term chronic exposure to radionuclides in plant populations. *J. Environ. Radioact.*, 121:22–32.

Geras'kin S.A., Dikareva N., Oudalova A., Vasil'ev D., Volkova P.Y., 2016. The consequences of chronic radiation exposure of scots pine in the remote period after the Chernobyl accident. *Russian J. Ecol.*, 47:26–38.

Gergs A., Kulkarni D., Preuss T.G., 2015. Body size-dependent toxicokinetics and toxicodynamics could explain intra- and interspecies variability in sensitivity. *Environ. Pollut.*, 206: 449–455.

Geweke J., 1992. Evaluating the accuracy of sampling-based approaches to calculating posterior moments. In : *Bayesian Statistics 4*. Bernardo J.M., Berger J.O., Dawid A.P., Smith A.F.M. (Eds). Clarendon Press, Oxford.

- Gilbin R., Alonzo F., Garnier-Laplace J., 2008. Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *J. Environ. Radioactiv.*, 99:134–145.
- Gilhen M., 2001. Current radionuclide activity concentrations in the Chernobyl Exclusion Zone and an assessment of the ecological impact. Thèse de doctorat, University of Liverpool
- Gombeau K., 2015. Pertinence de la prise en compte des réponses épigénétiques chez les organismes exposés à de faibles niveaux de substances radioactives. Thèse de doctorat, Université de Provence-Aix-Marseille I.
- Gómez-Oliván L.M., Galar-Martínez M., Islas-Flores H., García-Medina S., SanJuan-Reyes N., 2014. DNA damage and oxidative stress induced by acetylsalicylic acid in *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 164:21–26.
- Goodhead, D.T., 1994. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Internat J Radiat Biol* 65:7–17.
- Goodhead, D.T., 1999. Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations. *J Radiat Res* 40 suppl.:1–13.
- Goussen B., Parisot F., Beaudouin R., Dutilleul M., Buisset-Goussen A., Péry A. R. R., Bonzom J.-M., 2013. Consequences of a multi-generation exposure to uranium on *Caenorhabditis elegans* life parameters and sensitivity. *Ecotoxicol.*, 22:869– 878.
- Goussen B., Péry A.R.R., Bonzom J.-M., Beaudouin R., 2015a. Transgenerational adaptation to pollution changes energy allocation in populations of nematodes. *Environ. Sci. Technol.*, 49:12500–12508.
- Goussen B., Beaudouin R., Dutilleul M., Buisset-Goussen A., Bonzom J.-M., Péry A.R., 2015b. Energy-based modelling to assess effects of chemicals on *Caenorhabditis elegans*: A case study on uranium. *Chemosphere* 120:507–514.
- Goussen B., Price O.R., Rendal C., Ashauer R., 2016. Integrated presentation of ecological risk from multiple stressors. *Sci. Rep.*, 6:e36004.
- Green, E. L. 1964. Reproductive fitness of irradiated populations of mice. *Genetics.* 50:423–434.
- Grygoryev, D., Moskalenko, O., Hinton, T., Zimbrick, J., 2013. DNA Damage Caused by Chronic Transgenerational Exposure to Low Dose Gamma Radiation in Medaka Fish (*Oryzias latipes*). *Radiat. Res.*, 180:235–246.
- Gudkov D.I, Kipnis L.S., 1996. Long-term effect of tritiated water on the biological indicators of *Daphnia magna*. *Hydrobiol. J.* 32:1–21.
- Guo X., Sun J., Bian P., Chen L., Zhan F., Wang J., Xu A., Wang Y., Hei T.K., Wu, L. 2013. Radiation-induced bystander signaling from somatic cells to germ cells in *Caenorhabditis elegans*. *Radiat. Res.*, 180:268–275.

- Hägerbäumer A., Höss S., Heininger P., Traunspurger W., 2015. Experimental studies with nematodes in ecotoxicology: an overview. *J. Nematol.*, 47:11–27.
- Hagger J.A., Atienzar F.A., Jha A.N., 2005. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.*, 74:205–217.
- Halliwell, B., 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr. Rev.*, 70:257–265.
- Hamilton, S. J. 1995. Hazard assessment of inorganics of three endangered fish in the Green River, Utah. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 30:134–112.
- Han J., Won E.J., Kim I.C., Yim J.H., Lee S.J., Lee J.S., 2014a. Sublethal gamma irradiation affects reproductive impairment and elevates antioxidant enzyme and DNA repair activities in the monogonont rotifer *Brachionus koreanus*. *Aquat. Toxicol.*, 155:101–109.
- Han J., Won E.J., Lee B.Y., Hwang U.K., Kim I.C., Yim J.H., Lee J.S., 2014b. Gamma rays induce DNA damage and oxidative stress associated with impaired growth and reproduction in the copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquat. Toxicol.*, 152:264–272.
- Hansen S.R., Garton R.R., 1982. The effects of diflubenzuron on a complex laboratory stream community. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 11:1-10.
- Hanson N., Stark J. D., 2011. Utility of population models to reduce uncertainty and increase value relevance in ecological risk assessments of pesticides: An example based on acute mortality data for daphnids. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 8:262–270
- Hanson N., Stark J.D., 2012. Comparison of population level and individual level endpoints to evaluate ecological risk of chemicals. *Environ. Sci. Technol.*, 46:5590–5598.
- Harris E.H., 1989. The *Chlamydomonas* sourcebook. A comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, San Diego. pp. 780.
- Harris K.D., Bartlett N.J., Lloyd V.K., 2012. *Daphnia* as an emerging epigenetic model organism. *Genet. Res. Int.*, 2012:e147892.
- Harrison F.L., Anderson S.L., 1994. Effects of chronic irradiation on the reproductive success of the polychaete worm, *Neanthes arenaceodentata*. *Radiat. Res.*, 140:401–409.
- Harrison, F.L., Rice Jr, D.W., Moore, D.H., Varela, M., 1983. Effects of radiation on frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in the benthic worm *Neanthes arenaceodentata*. Lawrence Livermore National Lab., CA (USA); Environmental Protection Agency, Washington.
- Hayashi T.I., Kamo M., Tanaka Y., 2009. Population-level ecological effect assessment: Estimating the effect of toxic chemicals on density dependent populations. *Ecol. Res.*, 25:945–954.

Heard, E., Martienssen, R.A., 2014. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell*, 157:95–109.

Heilmann J., Taucher-Scholz G., Haberer T., Scholz M., Kraft G., 1996. "Measurement of intracellular dna double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water." *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 34:599–608.

Hertel-Aas T., Oughton D.H., Jaworska A., Bjerke H., Salbu B., Brunborg G., 2007. Effects of chronic gamma irradiation on reproduction in the earthworm *Eisenia fetida* (oligochaeta). *Radiat. Res.*, 168:515–526.

Higley K.A., Bytwerk D.P., 2007. Generic approaches to transfer. *J. Environ. Radioact.*, 98:4–23.

Hinton T., Février L., 2011. STAR Deliverable (D-N° 1.1) Performance Report. European Commission, 7th Framework, Contract N(Fission-2010-3.5.1-269672), 35 pp.

Hinton T.G., Garnier-Laplace J., Vandenhove H., Dowdall M., Adam-Guillermin C., Alonzo F., Barnett C., Beaugelin-Seiller K., Beresford N.A., Bradshaw C., Brown J., Eyrolle F., Février L., Gariel J.-C., Gilbin R., Hertel-Aas T., Horemans N., Howard B.J., Ikäheimonen T., Mora J.C., Oughton D., Real A., Salbu B., Simon-Cornu M., Steiner M., Sweeck L., Vives i Batlle J., 2013. An invitation to contribute to a strategic research agenda in radioecology. *J. Environ. Rad.*, 115:73–82.

Hinton T.G., Byrne M.E., Webster S., Beasley J.C., 2015. Quantifying the spatial and temporal variation in dose from external exposure to radiation: a new tool for use on free ranging wildlife. *J. Environ. Radioact.*, 145:58–65.

Hiyama A., Nohara C., Kinjo S., Taira W., Gima S., Tanahara A., Otaki J.M., 2012. The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly. *Sci Rep.*, 2:e570.

Hiyama A., Taira W., Nohara C., Iwasaki M., Kinjo S., Iwata M., Otaki J.M., 2015. Spatiotemporal abnormality dynamics of the pale grass blue butterfly: three years of monitoring (2011–2013) after the Fukushima nuclear accident. *BMC Evol. Biol.*, 15:e15.

Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton Jr, G.A., Cairns Jr, J., 2002. Handbook of ecotoxicology. CRC press.

Hofmann W., Fakir H., Aubineau-Laniece I., Pihet P., 2004. Interaction of alpha particles at the cellular level—implications for the radiation weighting factor. *Radiation Protection Dosimetry* 112:493–500.

Holden P.A., Nisbet R.M., Lenihan H.S., Miller R.J., Cherr G.N., Schimel J.P., Gardea-Torresdey J.L., 2013. Ecological nanotoxicology: Integrating nanomaterial hazard considerations across the subcellular, population, community, and ecosystems levels. *Accounts Chem. Res.* 46:813–822.

- Holling C.S., 1965. The functional response of predators to prey density and its role in mimicry and population regulation. *Mem. Entomol. Soc. Can.*, 97 suppl. 45: 5–60.
- Hooper H.L., Connon R., Callaghan A., Fryer G., Yarwood-Buchanan S., Biggs J., Maund S.J., Hutchinson T.H., Sibly R.M., 2008. The ecological niche of *Daphnia magna* characterized using population growth rate. *Ecology*, 89:1015–1022.
- Howard B.J., Beresford N.A., Andersson P., Brown J.E., Coppelstone D., Beaugelin-Seiller K., Garnier-Laplace J., Howe P.D., Oughton D., Whitehouse P., 2010. Protection of the environment from ionising radiation in a regulatory context an overview of the PROTECT coordinated action project. *J. Radiol. Prot.*, 30:195–214.
- Huh I., Wu X., Park T., Yi S.V., 2019. Detecting differential DNA methylation from sequencing of bisulfite converted DNA of diverse species. *Brief. Bioinform.*, 20:33–46.
- Hunt C.R., Ramnarain D., Horikoshi N., Iyengar P., Pandita R.K., Shay J.W., Pandita T.K., 2013. Histone modifications and DNA double-strand break repair after exposure to ionizing radiations. *Radiat Res.*, 179:383–92.
- Hyodo-Taguchi Y., Etoh H., 1986. Effects of tritiated water on germ cells in Medaka. II. Reproductive capacity following embryonic exposure. *Radiat. Res.*, 106:321–330.
- Ichikawa R., Suyama I., 1974. Effects of tritiated water on the embryonic development of two marine teleosts. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 40:819–824.
- IAEA, 2006. Environmental consequences of the Chernobyl accident and their remediation : twenty years of experience/report of the Chernobyl forum expert group 'environment'. Radiological assessment reports series. International atomic energy agency, Vienna. 166 p.
- Ibrahim L., Preuss T.G., Schaeffer A., Hommen U, 2014. A contribution to the identification of representative vulnerable fish species for pesticide risk assessment in Europe - A comparison of population resilience using matrix models. *Ecol. Model.*, 280:65–75.
- ICRP, 1977. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, International Commission of Radiological Protection, Publication 26. *Annals ICRP* 1:1–53.
- ICRP, 1991. Recommendations of the International Commission of Radiological Protection. International Commission of Radiological Protection, Publication 60. *Ann. ICRP* 21:1–201.
- ICRP, 2001. A report on progress towards new recommendations. A communication from the international commission on radiological protection. *J. Radiol. Prot.* 21:113–123.
- ICRP, 2003. Relative biological effectiveness (RBE), quality factor (Q), and radiation weighting factor (wR): International Commission of Radiological Protection, Publication 92. *Annals ICRP*, 33:1–117.
- ICRP, 2007. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. International Commission of Radiological Protection, Publication 103. *Annals ICRP*, 37:1–332.

ICRP, 2008. Environmental Protection - the Concept and Use of Reference Animals and Plants. International Commission of Radiological Protection, Publication 108. Annals ICRP, 38:1–242.

IRSN, 2011. Relevé du Réseau national de Mesures de la Radioactivité de l'Environnement <http://www.mesure-radioactivite.fr/>.

IRSN, 2012. Summary of the Fukushima accident's impact on the environment in Japan, one year after the accident. http://www.irsn.fr/EN/publications/thematic/fukushima/Documents/IRSN_Fukushima-Environment-consequences_28022012.pdf.

IRSN, 2015. Actualisation des connaissances relatives à l'évolution de la pollution radioactive de l'eau de mer, des sédiments marins et des espèces marines issue du site nucléaire accidenté de Fukushima Daiichi. http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Installations_nucleaires/Les-accidents-nucleaires/accident-fukushima-2011/fukushima-2015/Documents/IRSN_Fukushima_10_milieu-marin_201503.pdf.

IRSN, 2016. Qu'avons-nous appris des études écologiques conduites à long terme sur la faune et la flore des territoires contaminés par les accidents de Tchernobyl et de Fukushima ? http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Installations_nucleaires/Les-accidents-nucleaires/accident-fukushima-2011/fukushima-2016/Documents/IRSN_Fukushima-Tchernobyl_faune-flore_201603.pdf

Ishii, N., 2007. Role of oxidative stress from mitochondria on aging and cancer. *Cornea suppl.* 26, 3-9.

Iwasaki, T., 1973. The differential radiosensitivity of oogonia and oocytes at different developmental stages of the Brine Shrimp, *Artemia salina*. *Biol. Bull.*, 144:151–161.

Jackson D., Copplestone D., Stone D.M., Smith G.M., 2005. Terrestrial invertebrate population studies in the Chernobyl exclusion zone, Ukraine. *Radioprot.*, 40 Suppl.:857–863.

Jablonka E., Raz G., 2009. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Q. Rev. Biol.*, 84:131–176.

Jacobasch C., Völker C., Giebner S., Völker J., Alsenz H., Potouridis T., Heidenreich H., Kayser G., Oehlmann J., Oetken M., 2014. Long-term effects of nanoscaled titanium dioxide on the cladoceran *Daphnia magna* over six generations. *Environ. Poll.*, 186: 180–186.

Jager T., 2011. Some good reasons to ban ECx and related concepts in ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.*, 45:8180–8181.

Jager T., 2013. All individuals are not created equal; accounting for inter-individual variation in fitting life-history responses to toxicants. *Environ. Sci. Technol.* 47:1664–1669.

Jager T., Ashauer R., 2018. Physiological modes of action across species and toxicants: the key to predictive ecotoxicology. *Environ. Sci. Process. Impacts*, 20:48–57.

Jager T., Hansen, B.H., 2013. Linking survival and biomarker responses over time. *Environ. Toxicol. Chem.*, 32:1842–1845.

Jager T., Zimmer E.I., 2012. Simplified dynamic energy budget model for analysing ecotoxicity data. *Ecol. Model.*, 225:74–81.

Jager T., Zimmer E., 2013. Making sense of chemical stress application of dynamic energy budget theory in ecotoxicology and stress ecology. E-book available: <http://www.debttox.info/book.php>: Version 1, 14.

Jager T., Crommentuijn T., Van Gestel C.A., Kooijman S.A., 2004. Simultaneous modeling of multiple end points in life-cycle toxicity tests. *Environ. Sci. Technol.*, 38:2894–2900.

Jager T., Alda Álvarez O., Kammenga J.E., Kooijman S.A.L.M., 2005. Modelling nematode life cycles using dynamic energy budgets. *Funct. Ecol.*, 19:136–144.

Jager T., Heugens E.H., Kooijman S.A., 2006. Making sense of ecotoxicological test results: towards application of process-based models. *Ecotoxicol.* 15, 305–314.

Jager T., Crommentuijn T., van Gestel C.A., Kooijman S.A., 2007. Chronic exposure to chlorpyrifos reveals two modes of action in the springtail *Folsomia candida*. *Environ. Poll.*, 145:452–458.

Jager T., Vandenbrouck T., Baas J., De Coen W.M., Kooijman S.A., 2010. A biology-based approach for mixture toxicity of multiple endpoints over the life cycle. *Ecotoxicol.*, 19:351–361.

Jager T., Albert C., Preuss T.G., Ashauer R., 2011. General unified threshold model of survival—a toxicokinetic–toxicodynamic framework for ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 45:2529–2540.

Jarvis R.B., Knowles J.F., 2003. DNA damage in zebra fish larvae induced by exposure to low-dose rate gamma-radiation: detection by the alkaline comet assay. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ.*, 541:63–69.

Johnson L.R., Pecquerie L., Nisbet R.M., 2013. Bayesian inference for bioenergetic models. *Ecology*, 94:882–894.

Kal'chenko V., Fedotov I., 2001. Genetic effects of acute and chronic ionizing irradiation on *Pinus sylvestris* L. inhabiting the Chernobyl meltdown area. *Russian J. Genetics* 37:341–350.

Kim H., Lee M., Yu S., Kim S., 2012. The individual and population effects of tetracycline on *Daphnia magna* in multigenerational exposure. *Ecotoxicol.*, 21:993–1002.

Kim H.Y., Yu S., Jeong T.-y., Kim S.D., 2014. Relationship between trans-generational effects of tetracycline on *Daphnia magna* at the physiological and whole organism level. *Environ. Poll.*, 191:111–118.

- Kim J., Park Y., Choi K., 2009. Phototoxicity and oxidative stress responses in *Daphnia magna* under exposure to sulfathiazole and environmental level ultraviolet B irradiation. *Aquat. Toxicol.*, 91:87–94.
- Kim J., Kim S., An K. W., Choi C. Y., Lee S., Choi K., 2010b. Molecular cloning of *Daphnia magna* catalase and its biomarker potential against oxidative stresses. *Compar. Biochem. Physiol. C*, 152:263–269.
- Kim K.T., Klaine S.J., Cho J., Kim S.-H., Kim S.D., 2010a. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. *Sci. Tot. Environ.*, 408:2268–2272.
- Klok C., De Roos A.M., Marinissen J.C.Y., Baveco H.M., Wei-Chun M.A., 1997. Assessing the effects of abiotic environmental stress on population growth in *Lumbricus rubellus* (Lubricidae, Oligochaeta). *Soil Biol. Biochem.*, 29:287–293.
- Knight C., Patel M., Azevedo R., Leroi A., 2002. A novel mode of ecdysozoan growth in *Caenorhabditis elegans*. *Evol. Dev.*, 4:16–27.
- Knowles J.F., Greenwood L.N., 1994. The effects of chronic irradiation on the reproductive performance of *Ophryotrocha diadema* (Polychaeta, dorvilleidae). *Mar. Environ. Res.*, 38:207–224.
- Knowles J., Greenwood L., 1997. A comparison of the effects of long-term ⁶⁰Co- and ¹³⁷Cs-irradiation on the reproductive performance of a marine invertebrate *Ophryotrocha diadema* (Polychaeta, Dorvilleidae). *J. Environ. Radioact.*, 34:1–7.
- Koivisto S., 1995. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environ. Poll.*, 90:263–267.
- Kooijman S.A.L.M., 2010. Dynamic Energy Budget theory for metabolic organisation. 3rd edition. pp. 508.
- Kooijman, S.A.L.M., 2013. Waste to hurry: dynamic energy budgets explain the need of wasting to fully exploit blooming resources. *Oikos* 122:348–357.
- Kooijman S., Metz J., 1984. On the dynamics of chemically stressed populations: the deduction of population consequences from effects on individuals. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 8:254–274.
- Kooijman S.A.L.M., Bedaux J.J.M., 1996. Analysis of toxicity tests on *Daphnia* survival and reproduction. *Water Res.*, 30:1711–1723.
- Kooijman S.A.L.M., Hanstveit A.O., Nyholm N., 1996. No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Res.*, 30:1625–1632.

- Koturbash I., Baker M., Loree J., Kutanzi K., Hudson D., Pogribny I., Sedelnikova O., Bonner W., Kovalchuk O., 2006. Epigenetic dysregulation underlies radiation-induced transgenerational genome instability in vivo. *Int. J. Radiat. Oncol.*, 66:327–330.
- Kovalchuk O., Burke P., Arkhipov A., Kuchma N., James S.J., Kovalchuk I., Pogribny I., 2003. Genome hypermethylation in *Pinus silvestris* of Chernobyl—a mechanism for radiation adaptation? *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, 529:13–20.
- Kovalchuk I., Abramov V., Pogribny I., Kovalchuk O., 2004a. Molecular aspects of plant adaptation to life in the Chernobyl zone. *Plant Physiol.*, 135:357–363.
- Kovalchuk O., Burke P., Besplug J., Slovack M., Filkowski J., Pogribny I., 2004b. Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, 548:75–84.
- Kramer V.J., Etterson M.A., Hecker M., Murphy C.A., Roesijadi G., Spade D.J., Spromberg J.A., Wang M., Ankley G.T., 2011. Adverse outcome pathways and ecological risk assessment: bridging to population-level effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, 30:64–76
- Krueger F., Andrews S. R., 2011. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinform.*, 27:1571–1572.
- Kubota Y., Shimada A., Shima A., 1995. DNA alterations detected in the progeny of paternally irradiated Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 92:330–334.
- Kuhne W.W., Caldwell C.A., Gould W.R., Fresquez P.R., Finger S., 2002. Effects of depleted uranium on the health and survival of *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:2198–2203
- Labrot F., Ribera D., Denis M.S., Narbonne J.F., 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, 1:21–28.
- Labrot F., Narbonne J. F., Ville P., Saint Denis M., Ribera D., 1999. Acute Toxicity, Toxicokinetics, and Tissue Target of Lead and Uranium in the Clam *Corbicula fluminea* and the Worm *Eisenia fetida*: Comparison with the Fish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36:167–178.
- Lance E., Alonzo F., Garcia-Sanchez L., Beaugelin-Seiller K., Garnier-Laplace J., 2012. Modelling population-level consequences of ionizing radiation effects in aquatic invertebrates under laboratory conditions. *Sci. Total. Environ.*, 429:206–214.
- Landis G., Shen J., Tower J., 2012. Gene expression changes in response to aging compared to heat stress, oxidative stress and ionizing radiation in *Drosophila melanogaster*. *Aging*, 4:768–789.

- Larsson C.-M., 2008. An overview of the ERICA integrated approach to the assessment and management of environmental risks from ionising contaminants. *J. Environ. Radioact.*, 99:1364–1370.
- Lecomte-Pradines C., Bonzom J.-M., Della-Vedova C., Beaugelin-Seiller K., Villenave C., Gaschak S., Coppin F., Dubourg N., Maksimenko A., Adam-Guillermin C., Garnier-Laplace J., 2014. Soil nematode assemblages as bioindicators of radiation impact in the Chernobyl Exclusion Zone. *Sci. Total Environ.*, 490:161-170.
- Lecomte-Pradines C., Hertel-Aas T., Coutris C., Gilbin R., Alonzo F., 2017. A dynamic energy-based model to analyze sub-lethal effects of chronic gamma irradiation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 80:830–844.
- Lee S.-J., Choi S.-A., Lee K.-H., Chung H.-Y., Kim T.-H., Cho C.-K., Lee Y.-S., 2001. Role of inducible heat shock protein 70 in radiation-induced cell death. *Cell Stress Chaperones*, 6:273–281.
- Lee S.-W., Kim S.-M., Choi J., 2009. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 28:86-91.
- Lerebours A., 2009. Caractérisation des effets de l'uranium chez le poisson zèbre *Danio rerio*. Mécanismes de stress, neurotoxicité et métabolisme mitochondrial. Thèse de doctorat, Université de Provence Aix-Marseille I.
- Lerebours A., Bourdineaud J.-P., Ven K., Vandebrouck T., Gonzalez P., Camilleri V., Floriani M., Garnier-Laplace J., Adam-Guillermin C., 2010. Sublethal effects of waterborne uranium exposures on the zebrafish brain: transcriptional responses and alterations of the olfactory bulb ultrastructure. *Environ Sci. Technol.*, 44:1438–1443.
- Lerebours A., Cambier S., Hislop L., Adam-Guillermin C., Bourdineaud J.-P., 2013. Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 755:55–60.
- Leslie P.H., 1945. On the use of matrices in certain population mathematics. *Biometrika*, 33:183–212.
- Li E., Beard C., Jaenisch R., 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366:362–365.
- Li H., 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinform.*, 27:2987–2993.
- Li L., Story M., Legerski R.J., 2001. Cellular responses to ionizing radiation damage. *Internat J Radiat Oncol Biol Phys.*, 49:1157-1162.

- Lika K., Nisbet R. M., 2000. A dynamic energy budget model based on partitioning of net production. *J. Math. Biol.*, 41:361–386.
- Link W.A., Barker R.J., 2009. *Bayesian Inference: With Ecological Applications*. Academic Press, Boston. pp. 400.
- Löbrich M., Rief N., Kühne M., Heckmann M., Fleckenstein J., Rube C., Uder M., 2005. In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 8984–8989.
- Lourenço J., Castro B., Machado R., Nunes B., Mendo S., Gonçalves F., Pereira R., 2010. Genetic, biochemical, and individual responses of the teleost fish *Carassius auratus* to uranium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 58:1023–1031.
- Lourenço J., Pereira R., Silva A., Carvalho F., Oliveira J., Malta M., Paiva A., Gonçalves F., Mendo S., 2012. Evaluation of the sensitivity of genotoxicity and cytotoxicity endpoints in earthworms exposed in situ to uranium mining wastes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 75:46–54.
- Lourenço J., Pereira R., Pinto F., Caetano T., Silva A., Carvalheiro T., Guimarães A., Gonçalves F., Paiva A., Mendo S., 2013. Biomonitoring a human population inhabiting nearby a deactivated uranium mine. *Toxicol.*, 305:89–98.
- Ludwig D., 1996. Uncertainty and the assessment of extinction probabilities. *Ecol. Appl.*, 6:1067–1076.
- Luke G.A., Riches A.C., Bryant P.E., 1997. Genomic instability in haematopoietic cells of F1 generation mice of irradiated male parents. *Mutagen.*, 12:147–152.
- Lyko F., Foret S., Kucharski R., Wolf S., Falckenhayn C., Malezka R., 2010. The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biol.*, 8:e1000506.
- MacLeod, D., Clark V.H., Bird A., 1999. Absence of genome-wide changes in DNA methylation during development of the zebrafish. *Nature Genet.*, 23:139–140.
- Madic C., Genet M., 2001, Propriétés physiques et chimiques de l'uranium. In : *L'uranium de l'environnement à l'Homme*. EDP Science, ed. Collection IPSN, Les Ulis, p. 43–82.
- Maier P., Hartmann L., Wenz F., Herskind C., 2016. Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization. *Int. J. Mol. Sci.*, 17:e102.
- Maleszka R., 2008. Epigenetic integration of environmental and genomics signals in honey bees: the critical interplay of nutritional, brain and reproductive networks. *Epigenetics*, 3:188–192.
- Malhotra N., Rani N., Rana K., Malhotra R.K., 1990. Radiation induced blood pathology in chick erythrocytes and related parameters. *Exp. Path.* 38:241–248.

- Manikkam M., Tracey R., Guerrero-Bosagna C., Skinner M.K., 2012a. Dioxin (TCDD) induces epigenetic transgenerational inheritance of adult onset disease and sperm epimutations. *PlosOne*, 7:e46249.
- Manikkam M., Tracey R., Guerrero-Bosagna C., Skinner M.K., 2012b. Pesticide and insect repellent mixture (permethrin and DEET) induces epigenetic transgenerational inheritance of disease and sperm epimutations. *Reprod. Toxicol.*, 34:708-719.
- Manikkam M., Tracey R., Guerrero-Bosagna C., Skinner M.K., 2013. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PlosOne*, 8 :e55387.
- Marshall J.S., 1962. The effects of continuous gamma radiation on the intrinsic rate of natural increase of *Daphnia pulex*. *Ecology*, 43:598-607.
- Marshall, J.S. 1963. The effect of continuous, sub-lethal gamma radiation on the intrinsic rate of natural increase and other population attributes of *Daphnia pulex*. In : *Radioecology*. Schultz V., Klement Jr A. W. (Eds.), Reinhold, New York. pp. 363–366.
- Marshall J.S., 1966. Population dynamics of *Daphnia pulex* as modified by chronic radiation stress. *Ecology*, 561-571.
- Markich S. J., 2002. Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *TheScientificWorldJournal*, 2:707–729.
- Martin B.T., Jager T., Nisbet R.M., Preuss T.G., Hammers-Wirtz M., Grimm V., 2013. Extrapolating ecotoxicological effects from individuals to populations: a generic approach based on Dynamic Energy Budget theory and individual-based modeling. *Ecotoxicol.*, 22:574–583.
- Massarin S., 2010. Etude de l'effet de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population de *Daphnia magna*. Thèse IRSN. N°ISRN/IRSN-2011/145. Université d'Aix-Marseille II, Université de la Méditerranée. pp. 229.
- Massarin S., Alonzo F., Garcia-Sanchez L. , Gilbin R., Garnier-Laplace J., Poggiale J.-C., 2010. Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. *Aquat. Toxicol.*, 99:309–319.
- Massarin S., Beaudoin R., Zeman F., Floriani M., Gilbin R., Alonzo F., Péry A., 2011. Biology-based modeling to analyze uranium toxicity data on *Daphnia magna* in a multigeneration study. *Environ. Sci. Technol.*, 45:4151–4158.
- Mat A.M., Haberkorn H., Bourdineaud J.-P., Massabuau J.-C., Tran D., 2013. Genetic and genotoxic impacts in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the harmful alga *Alexandrium minutum*. *Aquat. Toxicol.*, 140:458–465.
- Matsunaga, T., Ueno, T., Amano, H., Tkatchenko, Y., Kovalyov, A., Watanabe, M., Onuma, Y., 1998. Characteristics of Chernobyl-derived radionuclides in particulate form in surface

waters in the exclusion zone around the Chernobyl Nuclear Power Plant. *J. Contam. Hydrol.*, 35:101–113.

Maury O., Poggiale J.-C., Aumont O., 2019. Damage-related protein turnover explains inter-specific patterns of maintenance rate and suggests modifications of the DEB theory. *J. Sea Res.*, 143 :35–47.

Métivier H., Ansoborlo E., Chazel V., Gérosimo P., 2001 Biocinétique et dosimétrie des expositions à l'uranium. In: *L'uranium, de l'environnement à l'Homme*, Chapitre 7, Metivier H., IPSN, Eds. EDP Science. pp. 213–238

Miller A.C., Stewart M., Brooks K., Shi L., Page N., 2002. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *J Inorg Biochem*, 91:246–252.

Miller R.J., Lenihan H.S., Muller E.B., Tseng N., Hanna S.K., Keller A.A., 2010. Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton. *Environ. Sci. Technol.*, 44:7329–7334.

Miller R.J., Muller E.B., Cole B., Martin T., Nisbet R., Bielmyer-Fraser G.K., Jarvis T.A., Keller A.A., Cherr G., Lenihan H.S., 2017. Photosynthetic efficiency predicts toxic effects of metal nanomaterials in phytoplankton. *Aquat. Toxicol.*, 183:85–93.

Minouflet M., Ayrault S., Badot P.-M., Cotelle S., Ferard J.-F., 2005. Assessment of the genotoxicity of ¹³⁷Cs radiation using *Vicia*-micronucleus, *Tradescantia*-micronucleus and *Tradescantia*-stamen-hair mutation bioassays. *J. Environ. Radioact.*, 81:143-153.

Mirbahai L., Williams T.D., Zhan H., Gong Z., Chipman J.K., 2011. Comprehensive profiling of zebrafish hepatic proximal promoter CpG island methylation and its modification during chemical carcinogenesis. *BMC Genom.*, 12:e3.

Møller A.P., Mousseau T.A., 2006. Biological consequences of Chernobyl: 20 years on. *Trends Ecol. Evol.*, 2006. 21:200–207.

Møller A.P., Mousseau T.A., 2007a. Species richness and abundance of forest birds in relation to radiation at Chernobyl. *Biol. Letters Roy. Soc.*, 3:483–486.

Møller A.P., Mousseau T.A., 2007b. Determinants of Interspecific Variation in Population Declines of Birds after Exposure to Radiation at Chernobyl. *J. Appl. Ecol.*, 44: 909–919.

Møller A.P., Mousseau T.A., 2009. Reduced abundance of insects and spiders linked to radiation at Chernobyl 20 years after the accident. *Biol. Letters Roy. Soc.* 5:356–359.

Møller A.P., Mousseau T.A., 2013. Assessing effects of radiation on abundance of mammals and predator-prey interactions in Chernobyl using tracks in the snow. *Ecol. Indicators*, 26:112–116.

Møller A.P., Mousseau T.A., de Lope F., Saino N., 2007. Elevated frequency of abnormalities in barn swallows from Chernobyl. *Biology Letters Roy. Soc.*, 3:414–417.

- Møller A.P., Bonisoli-Alquati A., Rudolfsen G., Mousseau T.A., 2011. Chernobyl Birds Have Smaller Brains. *PlosOne*, 6:e16862
- Møller A.P., Barnier F., Mousseau T.A., 2012a. Ecosystems effects 25 years after Chernobyl: pollinators, fruit set and recruitment. *Oecologia*, 170:1155–1165.
- Møller A.P., Bonisoli-Alquati A., Rudolfsen G., Mousseau T.A., 2012b. Elevated mortality among birds in Chernobyl as judged from biased sex and age ratios. *PlosOne*, 7:e35223.
- Møller , A.P., Nishiumi I., Suzuki H., Ueda K., Mousseau T.A., 2013. Differences in effects of radiation on abundance of animals in Fukushima and Chernobyl. *Ecol. Indicators*, 24:75–81.
- Møller A. P., Nishiumi I., Mousseau, T. A., 2015. Cumulative effects on interspecific differences in response of birds to radioactivity from Fukushima. *J. Ornithol.*, 156:297–305
- Morgan W.F., 2003a. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiat. Res.*, 159:567–580.
- Morgan W.F., 2003b. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiat. Res.*, 159:581–596.
- Morgan W.F., Bair W.J., 2013. Issues in low dose radiation biology: the controversy continues. A perspective. *Radiat. Res.*, 179:501–510.
- Mothersill C., Seymour C., 2013. Uncomfortable issues in radiation protection posed by low dose radiobiology. *Radiat. Environ. Biophys.*, 52:293–298.
- Mothersill C., Smith R., Lariviere D., Seymour C., 2013. Chronic exposure by ingestion of environmentally relevant doses of ^{226}Ra leads to transient growth perturbations in fathead minnow (*Pimephales promelas*, Rafinesque, 1820). *Int. J. Radiat. Biol.*, 89:950–964.
- Mousseau T.A., Møller A.P., 2013. Elevated Frequency of Cataracts in Birds from Chernobyl. *PlosOne*, 8:e66939.
- Muravitsky A.V., Razbudey V.F., Vorona P.N., Tokarevsky V.V., 2005. Time-dependent ^{241}Am activity in the environment from decay of ^{241}Pu released in the Chernobyl accident. *Appl. Radiat. Isotopes*, 63:487–492.
- Murphy C.A., Nisbet R.M., Antczak P., Garcia-Reyero N., Gergs A., Lika K., Mathews T., Muller E.B., Nacci D., Peace A., Remien C.H., Schultz I.R., Watanabe K.H., 2018. Linking Adverse Outcome Pathways to Dynamic Energy Budgets: A conceptual model. In: A systems biology approach to advancing Adverse Outcome Pathways for risk assessment. Garcia-Reyero N., Murphy C.A. (Eds). Springer International Publishing, Cham. pp. 281–302.
- Muschiol D., Schroeder F., Traunspurger W., 2009. Life cycle and population growth rate of *Caenorhabditis elegans* studied by a new method. *BMC Ecol.*, 9:14.

- Muyssen B.T., Janssen C.R., 2001. Multigeneration zinc acclimation and tolerance in *Daphnia magna*: Implications for water quality guidelines and ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20:2053–2060.
- Muyssen B.T., Janssen C.R., 2004. Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna* Straus. *Environ. Poll.*, 130:309–316.
- Muyssen B.T., De Schamphelaere K.A., Janssen C.R., 2006. Mechanisms of chronic waterborne Zn toxicity in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.*, 77:393–401.
- Nascimento F.J., Svendsen C., Bradshaw C., 2015. Combined effects from gamma irradiation and fluoranthene exposure on carbon transfer from phytoplankton to zooplankton. *Environ. Sci. Technol.*, 49:10624–10631.
- Naumann E., 1934. Über die Anwendung von *Daphnia magna* Straus als Versuchstier zur experimentellen Klarlegung der Lebensverhältnisse im Wasser. *Int Rev gesamten Hydrobiol Hydrogr.*, 31:421–431.
- Neubert M.G., Caswell H., 2000. Density-dependent vital rates and their population dynamic consequences. *J. Math. Biol.* 41:103-121.
- Nilsen F. M., Parrott B. B., Bowden J. A., Kassim B. L., Somerville S. E., Bryan T. A., Bryan C. E., Lange T. R., Delaney J. P., Brunell A. M., Long S. E., Guillete L. J. Jr, 2016. Global DNA methylation loss associated with mercury contamination and aging in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Sci. Total Environ.*, 545–546:389–397.
- Nisbet R., Muller E., Lika K., Kooijman S., 2000. From molecules to ecosystems through dynamic energy budget models. *J. Anim. Ecol.*, 69:913–926.
- Nisbet R.M., Jusup M., Klanjscek T., Pecquerie L., 2012. Integrating dynamic energy budget (DEB) theory with traditional bioenergetic models. *J. Exp. Biol.*, 215:892–902.
- Nohara C., Taira W., Hiyama A., Tanahara A., Takatsuji T., Otaki J.M., 2014. Ingestion of radioactively contaminated diets for two generations in the pale grass blue butterfly. *BMC Evol. Biol.*, 14:e193.
- Noonburg E., Nisbet R., McCauley E., Gurney W., Murdoch W., De Roos A., 1998. Experimental testing of dynamic energy budget models. *Funct. Ecol.*, 12:211–222.
- Odum E.P., 1985. Trends expected in stressed ecosystems. *Biosci.*, 35:419–422.
- OECD, 2004. OECD 202 *Daphnia*, acute immobilisation test.
- OECD, 2008. OECD 211: *Daphnia magna* reproduction test.
- Oppold A., Kreß A., Vanden Bussche J., Diogo J. B., Kuch U., Oehlmann J., Vandegehuchte M. B., Müller R., 2015. Epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 122:45–53.

- Orieux N., Cambier S., Gonzalez P., Morin B., Adam C., Garnier-Laplace J., Bourdineaud J.-P., 2011. Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 74:974–983.
- Orsini L., Gilbert D., Podicheti R., Jansen M., Brown J.B., Solari O.S., Spanier K.I., Colbourne J.K., Rusch D.B., Decaestecker E., Asselman J., De Schamphelaere K.A.C., Ebert D., Haag C.R., Kvist J., Laforsch C., Petrussek A., Beckerman A.P., Little T.J., Chaturvedi A., Pfrender M.E., De Meester L., Frilander M.J., 2017. *Daphnia magna* transcriptome by RNA-seq across 12 environmental stressors. *Sci. Data*, 3:e160030.
- Oujifard A., Amiri R., Shahhosseini G., Davoodi R., 2015. Effect of gamma radiation on the growth, survival, hematology and histological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Aquat. Toxicol.*, 165 :259–265.
- Parisot F., 2015. Etude mécaniste des effets transgénérationnels des radiations ionisantes alpha et gamma chez *Daphnia magna*. Thèse IRSN N° ISRN/IRSN-2016/188. Thèse de doctorat, Université d’Aix-Marseille. pp. 248.
- Parisot F., Bourdineaud J.-P., Plaire D., Adam-Guillermin C., Alonzo F., 2015. DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations. *Aquat. Toxicol.*, 163:27–36.
- Park S.-y., Choi J.-H., 2010. Geno-and ecotoxicity evaluation of silver nanoparticles in freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Engineer. Res.*, 15:23–27.
- Pentreath R., 1998. Radiological protection criteria for the natural environment. *Radiat. Protect. Dosim.*, 75:175–179.
- Pentreath R., Larsson C., Copplestone D., 2015. ICRP’s approach to protection of the living environment under different exposure situations. *Annals ICRP*, 44 :288–294.
- Pereira S., Bourrachot S., Cavalie I., Plaire D., Dutilleul M., Gilbin R., Adam-Guillermin C., 2011. Comparative analysis of genotoxicity induced by acute and chronic gamma-irradiation on zebra fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 30:2831–2837
- Pereira S., Camilleri V., Floriani M., Cavalié I., Garnier-Laplace J. , Adam-Guillermin C. , 2012. Genotoxicity of uranium contamination in embryonic zebrafish cells. *Aquat Toxicol*, 109:11–16.
- Péry A.R., Ducrot V., Mons R., Garric J., 2003. Modelling toxicity and mode of action of chemicals to analyse growth and emergence tests with the midge *Chironomus riparius*. *Aquat Toxicol.*, 65:281–292.
- Péry A.R., Gust M., Vollat B., Mons R., Ramil M., Fink G., Ternes T., Garric J., 2008. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere*, 73:300–304.

- Pickett J.B., Specht W.L., Keyes J.L., 1993. Acute and chronic toxicity of uranium compounds to *Ceriodaphnia-Daphnia dubia*. Report N° WSRC-RP-92-995. Westinghouse Savannah River Co., Aiken. pp. 403.
- Pieters B.J., Jager T., Kraak M.H., Admiraal W., 2006. Modeling responses of *Daphnia magna* to pesticide pulse exposure under varying food conditions: intrinsic versus apparent sensitivity. *Ecotoxicol.*, 15:601–608.
- Plaire D., 2013. Etude transgénérationnelle des altérations de l'ADN et de leurs conséquences sur les traits d'histoire de vie et le budget énergétique de *Daphnia magna* exposé à l'uranium appauvri. Thèse IRSN N°ISRN/IRSN-2014/169. Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille. pp. 210.
- Plaire D., Bourdineaud J.-P., Alonzo A., Camilleri V., Garcia-Sanchez L., Adam-Guillermin C., Alonzo F., 2013. Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of *Daphnia magna* exposed to uranium. *J. Compar. Biochem. Physiol. C*, 158:231–243.
- Plummer M., 2003. JAGS: a program for analysis of Bayesian graphical models using Gibbs sampling. Proceedings of the 3rd International Workshop on Distributed Statistical Computing (DSC 2003). pp. 20–22.
- Poff N.L., Zimmerman J.K., 2010. Ecological responses to altered flow regimes: a literature review to inform the science and management of environmental flows. *Freshw. Biol.*, 55:194–205.
- Pogribny I., Raiche J., Slovack M., Kovalchuk O., 2004. Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320:1253–1261.
- Poston T.M., Hanf R.W., Simmons M.A., 1984. Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 22:289–298.
- Pourcelot, L., Louvat, D., Gauthier-Lafaye, F., Stille, P., 2003. Formation of radioactivity enriched soils in mountain areas. *J. Environ. Radioactiv.*, 68:215–233.
- Poynton H.C., Lazorchak J.M., Impellitteri C.A., Smith M.E., Rogers K., Patra M., Hammer K.A., Allen H.J., Vulpe C.D., 2010. Differential gene expression in *Daphnia magna* suggests distinct modes of action and bioavailability for ZnO nanoparticles and Zn ions. *Environ. Sci. Technol.*, 45:762-768.
- Preston B.L., 2002. Indirect effects in aquatic ecotoxicology: implications for ecological risk assessment. *Environ. Manag.*, 29:311-323.
- Preuss T.G., Hammers-Wirtz M., Hommen U., Rubach M.N., Ratte H.T., 2009. Development and validation of an individual based *Daphnia magna* population model: the influence of crowding on population dynamics. *Ecol. Model.*, 220:310–329.

- Priest N., Hoel D., 2010. Determining the relative toxicity and RBE of internal emitters in animals. *Health Phys.*, 99:367–370.
- Putiri E.L., Robertson K.D., 2011. Epigenetic mechanisms and genome stability. *Clin. Epigenetics*, 2:299–314.
- R Core Team, 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.Rproject.org/>
- Raftery A.E., Lewis S., 1992. How many iterations in the Gibbs sampler? In : *Bayesian Statistics 4*. Bernardo J.M., Berger J.O., Dawid A.P., Smith A.F.M. (Eds). Clarendon Press, Oxford. pp. 763–773.
- Ragnarsdottir K.V., Charlet L., 2000. Uranium behaviour in natural environments. In: *Environmental Mineralogy: Microbial Interactions, Anthropogenic Influences, Contaminated Lands and Waste Management*, pp. 333–377.
- Raimondo S., McKenney C.L., Barron M.G., 2006. Application of perturbation simulations in population risk assessment for different life history strategies and elasticity patterns. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 12:983–999.
- Rautio M., Tartarotti B., 2010. UV radiation and freshwater zooplankton: damage, protection and recovery. *Freshw. rev.* 3:105–131.
- Real A., Sundell-Bergman S., Knowles J., Woodhead D., Zinger I., 2004. Effects of ionising radiation exposure on plants, fish and mammals: relevant data for environmental radiation protection. *J. Radiol. Protect.*, 24:A123–A137.
- Regev A., Lamb M.J., Jablonka E., 1998. The role of DNA methylation in invertebrates: developmental regulation or genome defense? *Mol. Biol. Evol.*, 15:880–891.
- Relyea R., Hoverman J., 2006. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecol. Letters*, 9:1157-1171.
- Ren W., McHale C. M., Skibola C. F., Smith A. H., Smith M. T., Zhang L., 2011. An emerging role for epigenetic dysregulation in arsenic toxicity and carcinogenesis. *Environ. Health. Persp.*, 119:11–19.
- Reisz J.A., Bansal N., Qian J., Zhao W., Furdui C. M., 2014. Effects of ionizing radiation on biological molecules – mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid. Redox Signal.*, 21:260–292.
- Ribera D., Labrot F., Tisnerat G. et Narbonne J. F., 1996. Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 146:53–89.
- Ringelberg J., 1964. The positively phototactic reaction of *Daphnia magna* Straus: a contribution to the understanding of diurnal vertical migration. *Netherl. J. Sea Res.*, 2:319–406.

- Rivière G., 2014. Epigenetic features in the oyster *Crassostrea gigas* suggestive of functionally relevant promoter DNA methylation in invertebrates. *Front. Physiol.*, 5:129.
- Robichaud N.F., Sassine J., Beaton M.J., Lloyd V.K., 2012. The epigenetic repertoire of *Daphnia magna* includes modified histones. *Genet. Res. Int.*, 2012:e174860.
- Rodgers, B. E., R. K. Chesser, J. K. Wickliffe, C. J. Phillips, Baker R. J., 2001. Subchronic exposure of BALB/c and C57BL/6 strains of *Mus musculus* to the radioactive environment of the Chernobyl, Ukraine exclusion zone. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20:2830–2835.
- Rohr J.R., Kerby J.L., Sih A., 2006. Community ecology as a framework for predicting contaminant effects. *Trends Ecol. Evol.*, 21:606-613.
- Rose K., 1991. Lower limits of radiosensitivity in organisms, excluding man. *J. Environ. Radioact.*, 15:113–133.
- Russo V.E., Martienssen R.A., Riggs A.D., 1996. Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 692.
- Ryabokon, N.I., Goncharova R.I., 2006. Transgenerational accumulation of radiation damage in small mammals chronically exposed to Chernobyl fallout. *Radiat. Environ. Biophys.* 45:167–177.
- Sakamoto-Hojo E.T., Mello S.S., Pereira E., Fachin A.L., Cardoso R.S., Junta C.M., Sandrin-Garcia P., Donadi E.A., Passos G.A.S., 2003. Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress. *Mutat. Res. Mutat. Res.*, 544:403–413.
- Salminen R., 2005. Geochemical atlas of Europe. Part I: Background Information, Methodology and Maps. Espoo: Geological Survey of Finland (Eds). pp. 524.
- Salomaa S., Prise K.M., Atkinson M.J., Wojcik A., Auvinen A., Grosche B., Sabatier L., Salminen E., Baatout S., Kulka U., 2013. State of the art in research into the risk of low dose radiation exposure? findings of the fourth MELODI workshop. *J. Radiol. Protect.* 33:589–603.
- Sample B.E., Irvine C., 2011. Radionuclides in biota. In: Environmental contaminants in biota: interpreting tissue concentrations, second edition. Beyer, W.N., Meador, J.P. (Eds). CRC Press, pp. 703–732.
- Sazykina, T. G, Jaworska A., Brown J., 2003. Report of dose-effects relationships for reference (or related) Arctic biota. EPIC database “Radiation effects on biota”. A deliverable report for EPIC (Environmental Protection from Ionizing Contaminants) Project CIA2-CT-2000–10032.
- Sarapultseva E.I., Gorski A.I., 2013. Low-dose γ -irradiation affects the survival of exposed *Daphnia* and their offspring. *Dose-Response* 11:460-468.

- Schaack S., Allen, D.E., Latta IV L.C., Morgan K.K., Lynch M., 2013. The effect of spontaneous mutations on competitive ability. *J. Evol. Biol.*, 26:451–456.
- Semaan M., Holdway D.A., Van Dam R.A., 2001. Comparative sensitivity of three populations of the cladoceran *Moinodaphnia macleayi* to acute and chronic uranium exposure. *Environ. Toxicol.*, 16:365–376.
- Shaw J.R., Pfrender M.E., Eads B.D., Klaper R., Callaghan A., Sibly R.M., Colson I., Jansen B., Gilbert D., Colbourne J.K., 2008. *Daphnia* as an emerging model for toxicological genomics. *Adv. Exp. Biol.*, 2:165–328.
- Sheppard S. C., Sheppard M. I., Gallerand M. O., Sanipelli B., 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *J. Environ. Radioact.*, 79:55–83.
- Shimada A., Shima A., 2001. High incidence of mosaic mutations induced by irradiating paternal germ cells of the medaka fish, *Oryzias latipes*. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ.* 495:33–42
- Shimada, A., Shima, A., 2004. Transgenerational genomic instability as revealed by a somatic mutation assay using the medaka fish. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 552:119–124.
- Simon O., Floriani M., Cavalie I., Camilleri V., Adam C., Gilbin R. et Garnier-Laplace J., 2011. Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages in the chronically exposed bivalve *Corbicula fluminea*. *J Environ Rad*, 102:766–773.
- Skinner M.K., 2008. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reprod. Toxicol.*, 25:2–6.
- Skinner M.K., 2011. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. *Epigenetics*, 6:838–842.
- Smith Z.D., Meissner A. 2013. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.*, 14:204–220.
- SNIFFER, 2002. Scotland and Northern Ireland Forum for Environmental Research (SNIFFER). An investigation into the effects of chronic radiation on fish. Research and Development Technical Report P3-053/TR.
- Sobral O., Chastinet C., Nogueira A., Soares A.M. V.M., Gonçalves, F., Ribeiro, R., 2001. In vitro development of parthenogenetic eggs: a fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*? *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 50:174–179.
- Sochová I., Hofman J., Holoubek I., 2006. Using nematodes in soil ecotoxicology. *Environ. Int.*, 32:374–383.
- Soetaert A., Vandenbrouck T., van der Ven K., Maras M., van Remortel P., Blust R., De Coen W.M., 2007. Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*:

- integration of differential gene expression with higher-level effects. *Aquat. Toxicol.* 83:212–222.
- Spiegelhalter D.J., Best N., Carlin B., van der Linde A., 2002. Bayesian measures of model complexity and fit. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol.*, 64:583–616.
- Spiegelhalter D.J., Thomas A., Best N., Lunn D., 2003. WinBUGS User Manual – Version 1.4, January 2003. Technical Report, MRC Biostatistics Unit, Cambridge, UK.
- Spitz, D.R., Azzam, E.I., Li, J.J., Gius, D., 2004. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev.*, 23:311–322.
- Stadnicka-Michalak J., Schirmer K., Ashauer R., 2015. Toxicology across scales: Cell population growth in vitro predicts reduced fish growth. *Sci. Adv.*, 1:1–8.
- Stancheva I., Meehan R.R., 2000. Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos. *Genes Develop.*, 14:313–327.
- Stark J.D., Banks J.E., Vargas R., 2004. How risky is risk assessment: The role that life history strategies play in susceptibility of species to stress. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 101:732–736.
- Stearns, S.C., 1992. The evolution of life histories. Oxford University Press, Oxford. pp. 249.
- Stearns D. M., Yazzie M., Bradley A. S., Coryell V. H., Shelley J. T., Ashby A., Asplund C. S., Lantz R. C., 2005. Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagen.*, 20:417–423.
- Suyama I., Etoh H., Maruyama Y., Kato Y., Ichikawa R., 1981. Effects of ionizing radiation on the early development of *Oryzias* eggs. *J Radiat Res* 22:125–133
- Swain S., Wren J.F., Stürzenbaum S.R., Kille P., Morgan A.J., Jager T., Jonker M.J., Hankard P.K., Svendsen C., Owen J., 2010. Linking toxicant physiological mode of action with induced gene expression changes in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Syst. Biol.*:4:1–19.
- Talmage S. S., Meyers-Schone L., 1995. Nuclear and thermal. In: Handbook of ecotoxicology, Hoffman J., Rattner B. A., Burton G. A., Cairns, J. (eds.), Lewis Publishers, Boca Raton. pp. 469–491.
- Tatusov R.L., Fedorova N.D., Jackson J.D., Jacobs A.R., Kiryutin B., Koonin E.V., Krylov D.M., Mazumder R., Mekhedov S.L., Nikolskaya A.N., Rao B.S., Smirnov S., Sverdlov A.V., Vasudevan S., Wolf Y.I., Yin J.J., Natale D.A., 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics*, 4:41–41.
- Tawa R., Kimura Y., Komura J.-I., Miyamura Y., Kurishita A., Sasaki M. S., Sakurai H., Ono T., 1998. Effects of X-ray Irradiation on Genomic DNA Methylation Levels in Mouse Tissues. *J. Radiat. Res.*, 39:271–278.

- Thiébault C., Carrière 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.
- Thompson L.H., Schild D., 2002. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 509:49–78.
- Tong Q., Zhang M., Cao X., Xu S., Wang D., Zhao Y., 2017. Expression and activation of *Daphnia pulex* Caspase-3 are involved in regulation of aging. *Gene*, 634 :37–46.
- Trijau M., 2018. Approche moléculaire et mécaniste de la réponse transgénérationnelle lors d'une irradiation gamma chronique chez le cladocère *Daphnia magna*. Thèse IRSN N°ISRN/IRSN-2019/214. Thèse de doctorat, Université de Marseille. pp. 234.
- Trijau M., Asselman J., Armant O., Adam-Guillermin C., De Schamphelaere K.A.C., Alonzo F., 2018. Transgenerational DNA methylation changes in *Daphnia magna* exposed to chronic gamma irradiation. *Environ. Sci. Technol.*, 52:4331–4339.
- Trijau M., Parisot F., E. Billoir., Alonzo F. (en prep.) A mechanistic model to analyze sub-lethal effects of chronic gamma irradiation in *Daphnia magna* in a multigeneration context.
- Tsyusko, O., Yi, Y., Coughlin, D., Main, D., Podolsky, R., Hinton, T., Glenn, T., 2007. Radiation-induced untargeted germline mutations in Japanese medaka. *Compar Biochem Physiol C*, 145:103–110.
- Tubiana M., Aurengo A., 2005. La relation dose-effet et l'estimation des effets cancérogènes des faibles doses de rayonnements ionisants. Rapport de l'Académie Nationale de Médecine et de l'Académie des Sciences 1–59.
- Tubiana M., Aurengo A., Averbeck D., Masse R., 2006. The debate on the use of linear threshold for assessing the effects of low doses. *J. Radiol. Prot.* 26:317–324.
- UNSCEAR, 1996. Sources and Effects of Ionizing Radiation. UNSCEAR 1996 Report to the General Assembly, with Scientific Annex. Annex A: Effects of radiation on the environment. United Nations, New York.
- UNSCEAR, 2000a. Sources and Effects of Ionizing Radiation. UNSCEAR 2000 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Vol. I: Sources. Annex B: Exposures from natural radiation sources. United Nations, New York.
- UNSCEAR, 2000b. Sources and Effects of Ionizing Radiation. UNSCEAR 2000 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Vol. II: Effects. Annex J: Exposures and effects of the Chernobyl accident. United Nations, New York.
- UNSCEAR, 2008. Sources and effects of ionizing radiation. Report to the General Assembly with Scientific Annexes, Vol. II. Scientific Annex E: Effects of Ionising Radiation on Non-human Biota. United Nations, New York.

- Van Leeuwen C.J., Luttmer W.J., Griffioen P.S., 1985. The use of cohorts and populations in chronic toxicity studies with *Daphnia magna*: a cadmium example. *Ecotoxicol Environ. Saf.*, 9:26–39.
- Vandeghechuchte M.B., Janssen C.R., 2014. Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 764–765:36–45.
- Vandeghechuchte M.B., Lemièrre F., Janssen C.R., 2009. Quantitative DNA-methylation in *Daphnia magna* and effects of multigeneration Zn exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 150:343–348.
- Vandeghechuchte M.B., Lemièrre F., Vanhaecke L., Vanden Berghe W., Janssen C. R., 2010a. Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 151:278–285.
- Vandeghechuchte M.B., De Coninck D., Vandenbrouck T., De Coen W.M., Janssen C.R., 2010b. Gene transcription profiles, global DNA methylation and potential transgenerational epigenetic effects related to Zn exposure history in *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.*, 180:3323–3329.
- Vandenhove H., Vanhoudt N., Wannijn, J., Van Hees, M., Cuypers, A., 2009. Effect of low-dose chronic gamma exposure on growth and oxidative stress related responses in *Arabidopsis thaliana*. *Radioprot.*, 44:487–491.
- Vandenhove H., Vanhoudt N., Cuypers A., Van Hees M., Wannijn J., Horemans N., 2010. Life-cycle chronic gamma exposure of *Arabidopsis thaliana* induces growth effects but no discernable effects on oxidative stress pathways. *Plant Physiol, Biochem.*, 48:778–786.
- Villarroel M.J., Ferrando M.D., Sancho E., Andreu E., 2000. Effects of tetradifon on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to the pesticide. *Aquat. Toxicol.*, 49:39–47.
- Vives i Batlle J., 2012. Dual-age-class population model to assess radiation dose effects on non-human biota populations. *Radiat. Environ. Biophys.*, 51:225–243.
- Vives i Batlle, J., Beaugelin-Seiller, K., Beresford, N., Copplestone, D., Horyna, J., Hosseini, A., Johansen, M., Kamboj, S., Keum, D.-K., Kurosawa, N., 2011. The estimation of absorbed dose rates for non-human biota: an extended intercomparison. *Radiat. Environ. Biophys.*, 50, 231–251.
- Vrije University Theoretical Biology, 2019. Add-My-Pet collection. Available from: http://www.bio.vu.nl/thb/deb/deblab/add_my_pet/index.html
- Wallace D.F., Hand L.H., Oliver, R.G., 2010. The role of indirect photolysis in limiting the persistence of crop protection products in surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29:575–581.

- Wang X., Li Q., Lian J., Li L., Jin L., Cai H., Xu F., Qi H., Zhang L., Wu F., Meng J., Que H., Fang X., Guo X., Zhang G., 2014. Genome-wide and single-base resolution DNA methylomes of the pacific oyster *Crassostrea gigas* provide insight into the evolution of invertebrate CpG methylation. *BMC Genomics*, 15:1119.
- Ward J., 1988. DNA Damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, 35:95–125.
- Ward T.J., Robinson, W.E., 2005. Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24:2341-2349.
- Warren, E., 1900. On the reaction of *Daphnia magna* (Straus) to certain changes in its environment. *Quarterly J. Microscop. Sci.*, 43:199–224.
- Watanabe Y., Ichikawa S., Kubota M., Hoshino J., Kubota Y., Maruyama K., Fuma S., Kawaguchi I., Yoschenko V.I., Yoshida S., 2015. Morphological defects in native Japanese fir trees around the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. *Sci. Rep.*, 5:13232.
- Wendt-Rasch L., Friberg-Jensen U., Woin P., Christoffersen K., 2003. Effects of the pyrethroid insecticide cypermethrin on a freshwater community studied under field conditions. II. Direct and indirect effects on the species composition. *Aquat. Toxicol.*, 63:373–389.
- Whicker F., Bedford J., 1995. Protection of the natural environment from the ionising radiation. Are specific criteria needed? Proceedings of an International Symposium on Environmental Impact of Radioactive Releases, International Atomic Energy Agency, IAEASM- 339/193, pp. 561–567.
- Whicker F.W., 1997. Impacts on plant and animal populations, Health impacts of large releases of radionuclides. CIBA Foundation Symposium, pp. 74–93.
- Williams, C., 2004. Framework for assessment of environmental impact (FASSET) of ionising radiation in European ecosystems. *J. Radiol. Protect.*, 24:A1–177.
- Wilson A. E., Sarnelle O., Tillmanns A. R., 2006. Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: meta-analyses of laboratory experiments. *Limnol. Oceanogr.*, 51:1915–1924.
- WHO, 2001. Depleted uranium: sources, exposure and health effects. WHO/SDE/PHE/01.1. World Health Organization, Genève. pp. 209. <http://www.who.int/iris/handle/10665/66930>
- Won, E.-J., Dahms, H.-U., Kumar, K.S., Shin, K.-H., Lee, J.-S., 2014a. An integrated view of gamma radiation effects on marine fauna: from molecules to ecosystems. *Environ Sci Poll Res*, 22:17443–17452.
- Won, E.-J., Lee, J.-S., 2014b. Gamma radiation induces growth retardation, impaired egg production, and oxidative stress in the marine copepod *Paracyclops nana*. *Aquat Toxicol* 150, 17–26.

- Woodhead D., 1998. The impact of radioactive discharges on native British wild-life and the implications for environmental protection. Environment Agency R&D Technical report n°135. Environment Agency, Bristol. pp. 82.
- Woodhead D., 2003. A possible approach for the assessment of radiation effects on populations of wild organisms in radionuclide-contaminated environments? *J. Environ. Radioact.* 66:181–213.
- Wren J.F., Kille P., Spurgeon D.J., Swain S., Sturzenbaum S.R., Jager T., 2011. Application of physiologically based modelling and transcriptomics to probe the systems toxicology of aldicarb for *Caenorhabditis elegans* (Maupas 1900). *Ecotoxicol.* 20:397–408.
- Wu H., Xu T., Feng H., Chen L., Li B., Yao B., Qin Z., Jin P., Conneely K.N., 2015. Detection of differentially methylated regions from whole-genome bisulfite sequencing data without replicates. *Nucleic Acids Res.*, 43:e141.
- Xiang H., Zhu J., Chen Q., Dai F., Li X., Muwang L., Zhang H., Zhang G., Li D., Dong Y., Zhao L., Lin Y., Cheng D., Yu J., Sun J., Zhou X., Ma K., He Y., Zhao Y., Guo S., Ye M., Guo G., Li Y., Li R., Zhang X., Ma L., Kristiansen K., Guo Q. J., Beck S., Xia Q., Wang W., Wang J., 2010. Single base-resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map. *Nat. Biotechnol.*, 28:516–520.
- Xie F., Koziar S.A., Lampi M.A., Dixon D.G., Norwood W.P., Borgmann U., Huang X.D., Greenberg B. M., 2006. Assessment of the toxicity of mixtures of copper, 9,10-phenanthrenequinone, and phenanthrene to *Daphnia magna*: Evidence for a reactive oxygen mechanism. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25:613-622.
- Xu, S., Schaack, S., Seyfert, A., Choi, E., Lynch, M., Cristescu, M. E., 2012. High Mutation Rates in the Mitochondrial Genomes of *Daphnia pulex*. *Mol. Biol. Evol.* 29, 763–769.
- Yazzie M., Gamble S.L., Civitello E.R., Stearns D.M., 2003. Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chem. Res. Toxicol.*, 16:524–530.
- Yoschenko V.I., Kashparov V.A., Melnychuk M.D., Levchuk S.E., Bondar Y.O., Lazarev M., Yoschenko M.I., Farfan E.B., Jannik G.T., 2011. Chronic irradiation of scots pine trees (*Pinus sylvestris*) in the Chernobyl exclusion zone: dosimetry and radiobiological effects. *Health Phys.*, 101:393–408.
- Youngson N.A. Whitelaw E., 2008. Transgenerational epigenetic effects. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.*, 9:233–257.
- Zelena L., Sorochinsky B., von Arnold S., van Zyl L., Clapham D.H., 2005. Indications of limited gene expression in *Pinus sylvestris* trees from the Chernobyl region. *J. Environ. Radioact.*, 84:363–373.
- Zemach A., McDaniel I. E., Silva P., Zilberman D., 2010. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science*, 328:916–919.

Zeman F.A., Gilbin R., Alonzo F., Lecomte-Pradines C., Garnier-Laplace J., Aliaume C., 2008. Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.*, 86:370–378.

Zhang B., Wang Y., Pang X., Su Y., Ai G., Wang T., 2010. ER stress induced by ionising radiation in IEC-6 cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 86:429–435.

Zhou P.-K., Rigaud O., 2001. Down-regulation of the Human CDC16 gene after exposure to ionizing radiation: A possible role in the radioadaptive response. *Radiat. Res.*, 155:43–49.

RESUME

La question de savoir à partir de quels débits de dose, les rayonnements ionisants représentent un danger à long terme pour l'environnement reste controversée et s'inscrit comme l'un des objectifs principaux de l'IRSN depuis de nombreuses années. Même si un nombre croissant d'études mettent en évidence les effets des radionucléides aux échelons moléculaires, cellulaires, histologiques, macroscopiques, rares sont celles qui abordent plus d'un niveau d'organisation biologique à la fois. Pourtant, comprendre comment les contaminants toxiques en général, et les substances radioactives en particulier, peuvent affecter les espèces naturelles à différents niveaux d'organisation biologique est un enjeu majeur en écotoxicologie comme en radioécologie. Dans ce contexte, une compréhension mécaniste des liens unissant les différentes perturbations observées est nécessaire pour prédire les conséquences sur la survie, la croissance et la reproduction des organismes, processus critiques pour la dynamique de population et la réponse aux échelles écologiques pertinentes.

Les différentes études réalisées, en collaboration ou supervisées, ont contribué à promouvoir une évaluation plus robuste du risque lié à la présence de radionucléides dans l'environnement en l'appréhendant à des doses et des temps d'exposition et à des échelles d'organisation biologique pertinentes sur le plan environnemental.

Les expérimentations menées en conditions contrôlées ont pour objectif d'étudier et de comparer les effets des radionucléides lors d'expositions chroniques sur plusieurs générations successives à l'Am-241, à l'U appauvri et au Cs-137, représentant respectivement une contamination alpha interne, une contamination par un métal radioactif principalement chimiotoxique et une irradiation gamma externe. Les résultats permettent d'examiner si l'intensité des effets mesurée au cours d'une génération unique est représentative de la toxicité sur le long terme ou si cette intensité augmente au fil des générations. Au terme des études réalisées, la daphnie a rejoint les rares espèces biologiques chez lesquelles les effets des trois types de rayonnements (alpha, beta et gamma) sont décrits.

Dès le départ, une approche intégrative est choisie, basée sur les théories de l'Histoire de Vie et du Budget Énergétique Dynamique (Stearns, 1992 ; Kooijman, 2010) qui examinent l'ensemble du cycle de vie et un large éventail de traits biologiques et physiologiques. Les êtres vivants étant limités par leurs caractéristiques intrinsèques et par les contraintes de l'environnement, l'idée est de quantifier toute perturbation métabolique induite par la toxicité et de comprendre comment la dépense énergétique supplémentaire qu'elle entraîne au sein de l'organisme se répercute sur la réalisation des fonctions clés du cycle de vie, comme la survie, la croissance et la reproduction qui représentent les processus critiques de la dynamique de population et de la sélection naturelle.

Le volet expérimental des études est accompagné d'une approche de modélisation. Le modèle mathématique utilisé au niveau de l'organisme est le Budget Énergétique Dynamique appliqué à la Toxicologie (DEBtox). Les analyses DEBtox permettent de décrire et expliquer les données expérimentales acquises au laboratoire et de produire des prédictions robustes dans toute condition d'exposition non testée. Développé pour l'étude des polluants chimiques,

le modèle DEBtox est appliqué pour la première fois au cas d'un radionucléide, l'U appauvri. Cette application reste classique car la réponse à la toxicité – majoritairement chimique – est expliquée par l'augmentation de la concentration au sein des organismes exposés. Dans le cas des expositions aux rayonnements gamma et alpha, le modèle est spécialement modifié pour prendre en compte une toxicité de nature strictement radiologique.

Rapidement, le modèle DEBtox s'avère extrêmement puissant pour identifier les processus métaboliques sous-jacents en cause dans l'apparition des effets biologiques. Pourtant, une limite se fait jour : l'analyse du budget énergétique ne permet pas de comprendre pourquoi la toxicité augmente en intensité au fil des générations. L'approche expérimentale est donc complétée par des analyses moléculaires visant à explorer les processus génétiques et épigénétiques en cause lors des réponses transgénérationnelles. Sur le plan de la modélisation, une application novatrice du modèle DEBtox est mise en œuvre. Elle repose sur le développement d'un dommage transmissible d'une génération à la suivante, permettant de décrire une cinétique transgénérationnelle et d'expliquer l'accroissement de l'intensité des effets. Les prédictions du modèle DEBtox peuvent être couplées à un modèle de population dits « Matrices de Leslie » (Caswell, 2001) afin d'en calculer les conséquences pour la dynamique de population et le risque encouru à un niveau écologiquement plus pertinent.