



HAL
open science

Evaluation des effets de polluants sur les poissons au laboratoire et sur le terrain : développement et utilisation de biomarqueurs – intérêt dans l'évaluation du risque environnemental

Béatrice Gagnaire

► To cite this version:

Béatrice Gagnaire. Evaluation des effets de polluants sur les poissons au laboratoire et sur le terrain : développement et utilisation de biomarqueurs – intérêt dans l'évaluation du risque environnemental. Environmental Sciences. Université de La Rochelle, 2019. tel-04566445

HAL Id: tel-04566445

<https://irsn.hal.science/tel-04566445>

Submitted on 2 May 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.

IRSN

INSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

Faire avancer la sûreté nucléaire

Evaluation des effets de polluants sur les poissons au laboratoire et sur le terrain : développement et utilisation de biomarqueurs - intérêt dans l'évaluation du risque environnemental

**Mémoire d'Habilitation à Diriger des
Recherches**

Béatrice Gagnaire

Rapport IRSN/2019-00700

Laboratoire d'Ecotoxicologie des Radionucléides

UNIVERSITE Aix-Marseille

Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement (ED 251)

**Dossier de demande d'autorisation pour soutenance de l'Habilitation à
Diriger des Recherches de l'Université d'Aix-Marseille**

Evaluation des effets de polluants sur les poissons au laboratoire et sur
le terrain : développement et utilisation de biomarqueurs – intérêt dans
l'évaluation du risque environnemental

Béatrice GAGNAIRE

Docteur de l'Université de La Rochelle

Chercheur à l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN)

Mémoire présenté le 19 septembre 2019

JURY

Mr Tristan RENAULT	Directeur de Recherches, IFREMER	Rapporteur initial
Mr Christophe MINIER	Professeur, Université du Havre	Rapporteur
Mme Marilyne STUART	Chercheuse Senior, CNL	Rapporteuse
Mr Frank LE FOLL	Professeur, Université du Havre	Rapporteur
Mme Magalie BAUDRIMONT	Professeure, Université de Bordeaux	Examinatrice
Mme Jeanne GARRIC	Directrice de Recherches, IRSTEA	Examinatrice
Mr Rémi CHAPPAZ	Professeur, Université d'Aix-Marseille	Examinateur
Mme Christelle ADAM-GUILLERMIN	Directrice de Recherches, IRSN	Tutrice
Mr Wilfried SANCHEZ	Adjoint au Directeur Scientifique, IFREMER	Membre invité

A Olivier
A Margot
A Charlène

A mes parents, sans qui rien de tout cela ne serait.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à adresser mes plus chaleureux remerciements aux membres de mon jury qui ont accepté de prendre sur leur temps pour lire et évaluer ce manuscrit. Merci pour les échanges scientifiques que je sais par avance très pertinents lors de la soutenance !

J'adresse un merci tout particulier à Tristan Renault, qui m'a donné goût à ce métier pendant ma thèse, cela me paraissait logique qu'il soit le rapporteur initial de mon HDR. Merci d'avoir accepté malgré les responsabilités qui t'incombent désormais, j'en suis très touchée.

Je remercie également ma tutrice, Christelle Adam-Guillermin, qui m'a accompagnée tout au long de ce travail d'écriture, et avec qui je travaille depuis mon arrivée à l'IRSN. Merci pour tous ces moments d'échanges (scientifiques ou non), j'espère qu'ils continueront à être nombreux.

Ce travail est une synthèse de 10 années de recherche à l'IRSN, pendant lesquelles j'ai eu la chance d'être la tutrice de trois étudiants en thèse. Merci donc à Starrlight Augustine, Antoine Le Guernic et Caroline Arcanjo pour votre travail, cela a été un vrai plaisir (j'espère réciproque !) de vous encadrer et de vous former à la recherche.

J'ai choisi de rédiger cette synthèse sur mon travail à l'IRSN et je n'ai de ce fait pas intégré le travail que j'ai effectué en post-doctorat à l'IRSTEA de Lyon juste après ma thèse. Cette expérience a été cependant très positive et je tiens à remercier tous les membres du laboratoire d'écotoxicologie, notamment Jeanne Garric qui m'avait recrutée, pour leur accueil et le très joli travail que nous avons réalisé ensemble.

Bien évidemment, ce travail n'aurait pas pu se faire sans l'aide de tous les membres du LECO. Merci donc à Isabelle, Virginie, Olivier Simon, Magali, Sandrine, Claire, Karine, Olivier Armant et Nicolas pour votre implication très efficace et souvent importante dans les différents projets de recherche que nous avons menés ensemble au fil des ans ; merci à Jean-Marc, Frédéric, Cathy, Rodolphe et François pour nos discussions toujours intéressantes et vos conseils avisés ; merci à Clara pour toute la logistique dont tu t'occupes si patiemment et efficacement ! Merci également à tous les membres du LR2T, du LRTA et du LRC pour nos discussions toujours très sympathiques, scientifiques ou non.

Ce travail est également le fruit de collaborations très riches avec des chercheurs d'autres instituts. Ainsi, je tiens à remercier très sincèrement, Bas Kooijman, pour avoir accepté de co-encadrer la thèse de Starrlight, ce qui lui a donné une dimension internationale ; pour l'INERIS, merci à Anne Bado-Nilles, que je connais depuis son stage de DEA (ça ne nous rajeunit pas !), Wilfried Sanchez, qui depuis s'est envolé pour d'autres horizons, merci pour tous nos échanges passés et j'espère à venir, et à toute l'équipe qui nous a souvent accompagnés dans les coins les plus reculés du Limousin... que de bons souvenirs ! pour l'Université de Reims, merci à Stéphane Betoulle et toute l'équipe pour leur implication également dans le travail d'Antoine ; pour l'INRA d'Avignon, merci à Luc Belzunces, Jean-Luc Brunet et Sylvie Tchamitchian pour votre bonne humeur et notre travail sur le projet abeilles ; pour les laboratoires CNL, un immense merci à Marilynne Stuart et toute son équipe pour les expériences que nous avons faites ensemble, mais que vous avez entièrement gérées au quotidien, merci de nous avoir si gentiment accueillies lors de nos visites, j'espère qu'on se retrouvera bientôt dans un nouveau projet commun. Merci également à tous les collègues d'horizons divers que je croise avec toujours beaucoup de plaisir lors de différents congrès, en France ou au Canada.

Enfin, comme il n'y a heureusement pas que le travail dans la vie, mes derniers remerciements, mais pas les moindres, vont à tous mes amis, ma famille, mes parents, mon frère, mon beau-frère et leurs compagnes, et surtout à mon mari et nos deux puces pour tous ces moments qui illuminent mon quotidien.

Sommaire

1	Présentation du candidat	13
1.1	Etat civil	13
1.2	Postes occupés.....	13
1.3	Activités de recherche	13
1.4	Implication dans des projets nationaux et internationaux	13
1.5	Autres activités.....	14
1.6	Formation initiale	14
1.7	Formation complémentaire	14
1.8	Encadrements/Enseignements.....	14
1.8.1	Encadrement/participation à l'encadrement d'étudiants	14
1.8.2	Participation à des jurys de thèse	15
1.8.3	Activités d'enseignement	16
1.9	Production scientifique	16
1.9.1	Articles scientifiques	16
1.9.2	Rapports.....	20
1.9.3	Articles de synthèse dans des ouvrages	21
1.9.4	Actes de colloque.....	21
1.9.5	Conférences, congrès	23
1.10	Expertises	33
1.10.1	Projets scientifiques	33
1.10.2	Dossiers.....	33
2	Synthèse des activités de recherche	35
2.1	Contexte général	35
2.2	Les biomarqueurs, outils pour l'évaluation du risque environnemental.....	40
2.2.1	Evaluation du risque environnemental	40
2.2.2	Les biomarqueurs.....	42
2.2.3	Biomarqueurs sélectionnés pour diagnostiquer l'état de santé des organismes	45
2.3	Caractérisation de la dose afin d'établir le lien entre la dose et l'effet.....	53
2.3.1	Notion d'accumulation	53
2.3.2	Lien entre la dose et les biomarqueurs	59
2.4	Exploration des liens entre les différentes échelles d'organisation biologique	61
2.4.1	Utilisation des biomarqueurs : évaluation des modes d'action	62
2.4.2	Approche métabolique : la théorie du Budget d'Energie Dynamique (DEB).....	72
2.5	Contexte de multipollution.....	75
2.5.1	Intérêt de l'étude des biomarqueurs sur le terrain	75
2.5.2	Lien entre multipollution et sensibilité aux maladies infectieuses	80

2.6	Synthèse	82
3	Projet de recherche	84
3.1	Effets du tritium et du rayonnement gamma sur les stades embryo-larvaires du poisson zèbre ..	85
3.2	Effets du tritium et du rayonnement gamma sur le stade adulte du poisson.....	86
3.2.1	Tritium	86
3.2.2	Irradiation gamma.....	88
3.3	Sensibilité aux maladies infectieuses	89
3.4	Evaluation des effets de la multipollution sur la santé des poissons	88
4	Références.....	92
5	Recueil d'articles	103

Liste des figures

Figure 1 : schéma des réponses des organismes aux effets délétères de l'exposition à des polluants (modifié d'après van der Oost <i>et al.</i> , 2003).....	43
Figure 2 : mécanisme général de la phagocytose ; d'après Bado-Nilles (2017).....	46
Figure 3 : histogramme représentant la fluorescence (FL1) suite à une incubation de leucocytes spléniques d'épinoche avec des microbilles fluorescentes (à gauche) et après une incubation avec du H ₂ DCF-DA (activité basale, tracé vert) et PMA (activité stimulée, tracé noir).....	48
Figure 4 : cytogramme représentant la taille (FSC) et la complexité (SSC) des leucocytes rénaux chez le poisson zèbre. La population R1 est celle utilisée pour l'analyse, excluant les débris. Les populations R7 et R8 correspondent respectivement aux granulocytes-macrophages et aux lymphocytes. A droite, l'histogramme montre le pourcentage de cellules mortes mesurées dans la population R1 marquée avec l'iodure de propidium.	48
Figure 5 : mécanisme général de la balance antioxydante ; d'après Pandey and Rizvi (2010).	50
Figure 6 : concentration en uranium appauvri en ng/mg p.s. mesuré dans les différents organes du poisson zèbre femelle après 28 jours d'exposition à 20 µg/L et 27 jours de dépuraction (la ligne verticale matérialise le début de la dépuraction). Trait noir : poisson exposés à l'U appauvri ; pointillés : contrôles.....	55
Figure 7 : méthodologie pour le calcul du débit de dose (Gy/h) dans les organismes exposés aux radionucléides (RNs). D'après Simon (2013).....	56
Figure 8 : contribution (en %) de l'OBT originaire de l'eau (bleu) et de la nourriture (rouge) dans l'OBT mesuré dans les tissus des poissons pendant les périodes d'exposition et de dépuraction.....	57
Figure 9 : analyse en composante principale (ACP) réalisée sur l'ensemble des biomarqueurs physiologiques. (A), D3; (B), D10. (C), D14. H, I et A représentent l'organe considéré (head, intestine, abdomen). Le débit de dose a été inclus comme variable quantitative supplémentaire.....	61
Figure 10 : gammes de débits de dose d'irradiation gamma externe recensées par la CIPR pour induire des effets chez le poisson (truite) comme organisme de référence (RAP) ; le DCRL proposé est en hachuré (d'après CIPR (2008) et Garnier-Laplace et al. (2010) pour la valeur de référence pour la protection des écosystèmes).....	63
Figure 11 : coupes longitudinales de tissu musculaire observées en microscopie électronique à transmission (MET) chez les larves de poisson zèbre de 96 hpf témoins et exposées à 1,22.10 ⁴ , 1,22.10 ⁵ et 1,22.10 ⁶ Bq/mL d'HTO (soit 1,7.10 ² , 4,6.10 ² et 3,3.10 ³ µGy/h) (S: sarcomère ; My: myofibrille ; E: endomysium ; Z: strie Z ; M: Ligne M).....	67
Figure 12 : coupes longitudinales de tissu musculaire observées en MET chez les larves de poisson zèbre de 7 jpf témoins et exposées à 1,22.10 ⁵ et 1,22.10 ⁶ Bq/mL d'HTO (2,8.10 ² et 4,7.10 ³ µGy/h) (S: sarcomère ; My: myofibrille ; E: endomysium ; Z: strie Z ; M: mitochondries).....	68
Figure 13 : distance parcourue et vitesse de nage chez les larves exposées à 1,22.10 ⁵ et 1,22.10 ⁶ Bq/mL d'HTO pendant 96 hpf. La ligne rouge en pointillés matérialise un stimulus tactile appliqué sur la plaque pendant l'acquisition des données.	70
Figure 14 : concept de la théorie de Budget d'Énergie Dynamique avec les principaux processus métaboliques. 1 : assimilation ; 2 : utilisation de la réserve ; 3 : maintenance somatique ; 4 : croissance ; 5 : maintenance de la maturité ; 6 : quantité cumulée de réserve investie dans la maturation puis dans la reproduction ; K _c : fraction allouée à la croissance et à la maintenance somatique ; K _R : coût de fabrication des œufs (Kooijman, 2010)..	72
Figure 15 : distributions des réponses centrées-réduites des épinoches selon l'étang et le temps d'échantillonnage. K : indice de condition ; HSI : indice hépato-somatique ; Mo : mortalité cellulaire ; Ly : pourcentage de lymphocytes ; Pg : phagocytose ; Oa : activité oxydative basale ; DNA : dommages à l'ADN. En bleu : étang sous influence minière, en rouge et vert : étangs hors influence minière.	77
Figure 16 : RDA (Redundancy Analysis) à T120 permettant de visualiser la relation entre les variables explicatives (température, pH, métaux (PC1), débit de dose interne en tritium (H3Tot.p), sexe, exposition HTO/OBT, en bleu) et les variables réponse (biomarqueurs, en rouge). FW : poids frais ; STD L: longueur standard ; KbioM : indice de condition de Fulton K ; AnnV et PI : cellules apoptotiques et mortes ; TailM : dommages à l'ADN ; H2AX.nb : nombre de foci de gamma-H2AX ; SM : ratio SFA/MUFA ; CT : C18:1 trans ; B : cerveau ; M : muscle ; L : foie.	79

Liste des tableaux

Tableau 1 : récapitulatif des résultats obtenus pour les expositions de larves de poisson zèbre à l'HTO, à la thymidine tritiée et à l'irradiation gamma. T :Témoin ; Ø : pas d'effet ; - : non testé ; ND : non déterminé. Un facteur de pondération de 3 a été appliqué pour le calcul des coefficients de dose pour les différentes formes de tritium (HTO et thymidine).....	64
Tableau 2 : interactions des effets entre les stress chimique (étang) et biologique (injection de LPS).Seuls les résultats significatifs d'un des deux stress ou de leur interaction sont rapportés (●: $0.05 > p \geq 0.10$; *: $0.01 > p \geq 0.05$; **: $0.001 > p \geq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$). ROS b. : niveau basal d'EOR ; ROS a. : niveau stimulé d'EOR ; SI : indice de production des EOR.	81
Tableau 3 : comparaison des intérêts des études de laboratoire et de terrain.	83

1 Présentation du candidat

1.1 Etat civil

GAGNAIRE Béatrice Françoise
Née le 4 décembre 1979 à Annecy
Mariée, 2 enfants

1.2 Postes occupés

Depuis 2008 **Ingénieur-Chercheur**, Laboratoire d'Écotoxicologie des Radionucléides, IRSN Cadarache
2008 **Post-doctorat**, Laboratoire de Radioécologie et Écotoxicologie, IRSN Cadarache
2006-2008 **Post-doctorat**, Laboratoire d'Écotoxicologie, IRSTEA Lyon (18 mois)
2005-2006 $\frac{1}{2}$ **ATER**, Université de La Rochelle-CRELA, CNRS UMR 6217
2002-2005 **Doctorat**, Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), IFREMER La Tremblade

1.3 Activités de recherche

Sujet : Etude des effets de différents polluants sur les invertébrés (mollusques bivalves et gastéropodes) et vertébrés (poissons) aquatiques (eau douce et milieu marin)

Disciplines traitées : écotoxicologie, immunotoxicité, reprotoxicité, pathologie

Missions : mise au point et application de tests toxicologiques et écotoxicologiques pour étudier les effets de polluants à différents niveaux d'organisation (*in vitro*, *in vivo* et *in situ*) sur des activités au niveau de la molécule, la cellule, de l'individu et de la population

Gestion de projets : responsable scientifique, définition du calendrier, respect des jalons, rendu des livrables, pilotage de réunions

Collaborations internationales pluridisciplinaires : IFREMER, IRSTEA, INRA, INERIS, EDF ; Université de Reims ; Université Libre d'Amsterdam ; Ministère du Canada ; Laboratoires CNL (Canadian Nuclear Labs)

1.4 Implication dans des projets nationaux et internationaux

Depuis 2018 **GDR Ecotoxicologie** (IRSTEA)

Depuis 2014 **GGP Environnement** (IRSN/EDF) – Pilotage de la fiche Tritium

2011-2012 Soumission d'un projet **ANR Jeunes Chercheurs** : Perturbations du système immunitaire du poisson zèbre par les radionucléides – conséquences sur la sensibilité aux maladies infectieuses (refusé 2 fois).

2010-2014 Deux projets de la fédération de recherche **ECCOREV** (Ecosystèmes Continentaux et Risques Environnementaux) - Pilotage

2009-2013 Post-Grenelle **DEVIL** (Development and validation of fish biomarkers for the implementation of environmental legislation –INERIS)

2009-2012 **GDRE AQUADEB** (analyse de la flexibilité physiologique des animaux aquatiques par le DEB)

2006-2008 **PNRPE** (Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens, MEDD)

2005-2006 **ANR ECODYN** Baie de Vilaine (Ecotoxicologie et Ecodynamique des Contaminants)

Depuis 2003 Membre du réseau **ECOBIM** (Réseau Atlantique en Ecotoxicologie franco-canadien)

- 2003-2006** GDR IMOPHYS (Intégration de réponses MOléculaires et PHYSiologiques aux contaminants)
- 2002-2005** Action Incitative INRA-IFREMER Baie de Vilaine
- 2001-2004** PEVS (Programme Environnement, Vie et Société), CNRS
- 2000-2006** MOREST (Mortalité Estivale des huîtres creuses), IFREMER

1.5 Autres activités

- Depuis 2013** Membre du **comité d'éthique** de l'IRSN et de la Structure du Bien-Etre Animal
- 2014-2017** **Coordinatrice** des avis du SERIS pour le pilote IRSN en réponse aux saisines de l'ASN
- 2011-2014** Responsable **communication** du SERIS

1.6 Formation initiale

- 2002-2005** **Thèse de Doctorat** en Océanologie Biologique et Environnement Marin, *Université de La Rochelle*, Soutenue le 9 décembre 2005 ; mention Très Honorable, Félicitations du jury
- 2002** **DES** en Biologie marine, *Paris VI* ; mention TB
- 2001** **DEA** Océanologie Biologique et Environnement Marin, *Paris VI* ; mention AB
- 2000** **Maîtrise** de Biologie des Populations et des Ecosystèmes, *Paris VI* ; mention AB
- 1999** **Licence** de Biologie des Organismes et des Populations, *Lyon I* ; mention AB
- 1996 à 1998** **Classes Préparatoires, BCPST**, *Lycée du Parc, Lyon* - Admission à l'ENSIA Massy

1.7 Formation complémentaire

- 2018** Décrire et analyser les données multifactorielles
- 2013** Droit de l'environnement
- 2011** Chirurgie expérimentale – modèle poissons
- 2011** Droit à l'image
- 2010** Formation à l'expérimentation animale – Niveau I
- 2009** Secouriste du Travail
- 2009** Formation au logiciel R
- 2009** Indicateurs écologiques d'eau douce

1.8 Encadrements/Enseignements

1.8.1 Encadrement/participation à l'encadrement d'étudiants

- Caroline Arcanjo (2018)**. Evaluation des modes d'action toxiques de l'HTO sur les stades précoces du poisson zèbre (*Danio rerio*) : de l'ADN à l'individu. Thèse soutenue le 30 octobre 2018. Directrice de thèse : Christelle Adam-Guillermin (IRSN). Université Aix-Marseille. Co-financement IRSN/EDF. Tutrice.
- Antoine Le Guernic (2015)**. Effets sublétaux d'une contamination métallique liée à des rejets miniers uranifères sur l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.). Implication dans la susceptibilité envers un stress biologique. Thèse soutenue le 24/12/2015 à Reims. Directeur de thèse : Stéphane Betoulle (Université de Reims). Université de Reims Champagne-Ardennes. Co-financement IRSN/INERIS. Co-tutrice avec Wilfried Sanchez (INERIS).

3. **Starrlight Augustine (2012)**. Metabolic programming of zebrafish, *Danio rerio* uncovered: Physiological performance as explained by Dynamic Energy Budget Theory and life-cycle consequences of uranium induced perturbations. Thèse soutenue le 23/4/2012 à Amsterdam. Directeurs de thèse : S.A.L.M. Kooijman (Université Libre d'Amsterdam) et Christelle Adam-Guillermin (IRSN). Université Libre d'Amsterdam. Co-financement IRSN/Région PACA. Tutrice.
4. **Anne Bado-Nilles (2010-2012)**. **Post doctorat** effectué dans le cadre du projet DEVIL (Development and validation of fish biomarkers for the implementation of environmental legislation).
5. **Anne Bado-Nilles (2008)**. Effets de pollutions par hydrocarbures sur les capacités de défense d'organismes marins. **Thèse**. Université de La Rochelle.
6. **Alexandre Padey (2007)**. Evaluation de la présence de l'activité ECOD chez une espèce de mollusque gastéropode d'eau douce, *Potamopyrgus antipodarum*. Stage de **M1**, Université Lyon 1.
7. **Emilie Aton (2006)**. Etude des mouvements calciques dans les hémocytes de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : premières approches expérimentales. Stage de DEA (**M2**) Interactions cellulaires et transferts membranaires, Université de Poitiers.
8. **Céline Bond (2006)**. Etude de la variabilité du parasite *Bonamia ostreae*, agent de la bonamiose chez l'huître plate, *Ostrea edulis*, en fonction des facteurs environnementaux (salinité, température, milieux) par cytométrie en flux. Stage d'**ingénieur**, ESITPA.
9. **Nicolas Bignon (2006)**. Etude de l'effets de modulateurs sur l'homéostasie calcique dans les hémocytes de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Stage de Licence (**L3**), Université de La Rochelle.
10. **Anne Bado-Nilles (2005)**. Environnement et immunomodulation : étude de l'effet de la fraction soluble d'un fuel lourd de type norvégien sur le système immunitaire de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et du bar commun (*Dicentrarchus labrax*). Stage de **M2**, Université de La Rochelle.
11. **Xavier Ambert (2005)**. Etude de l'homéostasie calcique des hémocytes chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, par cytométrie en flux : mise en évidence et analyse du calcium intracytoplasmique en présence d'un mélange de pesticides. Stage de DEA de Toxicologie (**M2**), Université Paris 5.
12. **Héloïse Frouin (2004)**. Analyse en cytométrie de flux de l'influence de la salinité sur les fonctions hémocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Stage de Licence (**L3**), Université de La Rochelle.
13. **Xavier Ambert (2004)**. Premières approches de l'étude des mouvements calciques par cytométrie en flux dans les hémocytes de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Stage de Maîtrise (**M1**), Université de La Rochelle.
14. **Kevin Moreau (2002)**. Etude en cytométrie de flux de l'influence de la température et de l'émersion sur les fonctions hémocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Sage d'IUT, La Rochelle.
15. **Dimitri Vincendeau (2002)**. Environnement et écotoxicité : étude de la bioaccumulation de micropolluants chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Stage de Licence (**L3**), Université de La Rochelle.
16. **Cécile Caillaud (2002)**. Etude de l'influence de différents polluants sur les huîtres *Crassostrea gigas*. Stage de **BTS** 1^{ère} année, La Rochelle.

1.8.2 Participation à des jurys de thèse

1. **Marine Breitwieser**. Développement d'outils normalisables pour l'évaluation d'une contamination chimique chronique : un enjeu pour la veille environnementale en milieu littoral. Thèse soutenue le 5/10/2018 à La Rochelle. Université de La Rochelle. Examinatrice.

2. **Paul Boisseaux**. Développement de marqueurs d'immunocompétence chez le gastéropode d'eau douce *Lymnaea stagnalis* et applications en écotoxicologie. Thèse soutenue le 14/2/2017 à Lyon. Université Claude Bernard Lyon 1. Examinatrice.
3. **Gonzalo Fuenzalida Del Rio**. Transcriptomic approach of the response to metals in the hydrothermal mussel *Bathymodiolus azoricus*. Thèse soutenue le 2/12/2016 à Roscoff. Université Pierre et Marie Curie Paris VI. Examinatrice.
4. **Lauris Evariste**. Caractérisations structurale et fonctionnelle des populations hémocytaires de la moule zébrée (*Dreissena* sp.) en vue de leur utilisation en évaluation du risque écotoxicologique. Thèse soutenue le 12/6/2016 à Reims. Université de Reims Champagne-Ardennes en co-tutelle avec l'INRS (Canada). Examinatrice.
5. **Pierrick Moreau**. Etude des interactions entre infection à ostreid herpesvirus 1, immunité, autophagie et pesticides chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Thèse soutenue le 30/10/2014 à La Rochelle. Université de La Rochelle. Examinatrice.

1.8.3 Activités d'enseignement

2001-2009 : Vacations et ½ ATER, Université et IUT La Rochelle : **340h éqTD**

- **Licence I** : fonctions venimeuses chez les organismes marins (27h éqTD)
- **Licence II** : biologie cellulaire ; techniques biologiques (19h éqTD)
- **Licence III** : techniques biologiques ; immunologie, virologie et parasitologie ; physiologie animale ; physiologie des organismes marins ; biologie cellulaire (200h éqTD)
- **IUT LIII professionnelle** : immunologie (36h éqTD)
- **Master I** : biochimie et pharmacologie marine ; microorganismes marins (42h éqTD)
- **Master II** : écotoxicologie ; environnement et écophysiologie ; préparation du projet de recherche (16h éqTD)

1.9 Production scientifique

1.9.1 Articles scientifiques

H-index : 20 ; ORCID ID : 0000-0003-4865-9544

1. Arcanjo C., Simon O., Armant O., Adam-Guillermin C., Cavalie I., Camillervi V., Floriani M., Orjollet D., **Gagnaire B. (in prep.)**. Tritiated water exposure disrupts behavior in zebrafish early life stages. *Aquatic Toxicology*.
2. **Gagnaire B.**, Gosselin I., Festarini A., Walsh S., Cavalié I., Adam-Guillermin C., Della-Vedova C., Farrow F., Kim S.B., Shkarupin A., Chen H.Q., Beaton D., Stuart M. (**online**). Effects of *in vivo* exposure to tritium: a multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Environmental Science & Pollution Research* <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3781-5>.
3. Arcanjo C., Maro D., Camilleri V., Cavalie I., Simon O., Beaugelin-Seiller K., Carasco L., Orjollet D., Adam-Guillermin C., **Gagnaire B. (2019)**. Assessing tritium internalisation in zebrafish early life stages: Importance of rapid isotopic exchange. *Journal of Environmental Radioactivity* 203: 30-38.
4. **Gagnaire B.**, Bonnet M., Tchamitchian S., Cavalié I., Della-Vedova C., Dubourg N., Adam-Guillermin C., Brunet J.-L., Belzunces L.P. (**2019**). Physiological effects of gamma irradiation in the honeybee, *Apis mellifera*. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 174: 153-163.
5. Beaton D., Gosselin I., Festarini A., **Gagnaire B.**, Farrow F., Cavalié I., Shultz C., Kim S.B., Walsh S., Chen H.Q., Adam-Guillermin C., Stuart M. (**2019**). Correlated responses for DNA damage,

- phagocytosis activity and lysosomal function revealed in a comparison between field and laboratory studies: Fathead minnow exposed to tritium. *Science of the Total Environment* 662: 990-1102.
6. Simon O., **Gagnaire B.**, Sommard V., Pierrisnard S., Camilleri V., Carasco L., Giblin R., Frelon S. (2019). Uranium transfer and accumulation in organs of *Danio rerio* after waterborne exposure alone or combined with diet-borne exposure. *Environmental Toxicology & Chemistry* 38(1):90-98.
 7. Simon O., Barjhoux I., Camilleri V., **Gagnaire B.**, Cavalie I., Orjollet D., Darriau F., Pereira S., Beaugelin-Seiller K., Adam-Guillermin C. (2018). Uptake, depuration, dose estimation and effects in zebrafish exposed to Am-241 via dietary route. *Journal of Environmental Radioactivity* 193-194: 68-74.
 8. Arcanjo C., Simon O., Armant O., Adam-Guillermin C., Cavalie I., Camillervi V., Floriani M., Orjollet D., **Gagnaire B.** (2018). Tritiated water exposure disrupts myofibrils structure and induces misregulation of eye opacity and DNA repair genes in zebrafish early life stages. *Aquatic Toxicology* 200: 114-126.
 9. Simon O., **Gagnaire B.**, Camilleri V., Cavalie I., Floriani M., Adam-Guillermin C. (2018). Toxicokinetic and toxicodynamic of depleted uranium in the zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology* 197: 9-18.
 10. **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin C., Festarini A., Cavalie I., Della-Vedova C., Shultz C., Kim S.B., Ikert H., Dubois C., Walsh S., Farrow F., Beaton D., Tan E., Wen K., Stuart M. (2017). Effects of *in situ* exposure to tritiated natural environments: a multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Science of the Total Environment* 599-600: 597-611.
 11. Le Guernic A., Sanchez W., Palluel O., Bado-Nilles A., Floriani, M., Turies C., Chadili E., Della Vedova, C., Cavalie I., Adam-Guillermin C., Porcher J.-M., Geffard, A., Betoulle S. & **Gagnaire B.** (2016). Acclimation capacity of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure. *Ecotoxicology* 25(8): 1478-1499.
 12. Le Guernic A., Sanchez W., Bado-Nilles A., Palluel O., Turies C., Chadili E., Cavalie I., Delahaut L., Adam-Guillermin C., Porcher J.-M., Geffard A., Betoulle S. & **Gagnaire B.** (2016). In situ effects of metal contamination from former uranium mining sites on the health of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.). *Ecotoxicology* 25(6): 1234-1259.
 13. Le Guernic A., Sanchez W., Palluel O., Bado-Nilles A., Turies C., Chadili E., Cavalie I., Adam-Guillermin C., Porcher J.-M., Geffard A., Betoulle S. & **Gagnaire B.** (2016). In situ experiments to assess effects of constraints linked to caging on ecotoxicity biomarkers of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 42(2): 643-657.
 14. **Gagnaire B.**, Cavalie I., Pereira S., Floriani M., Dubourg N., Camilleri V., Adam-Guillermin C. (2015). External gamma irradiation-induced effects in early-life stages of zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology* 169: 69-78.
 15. Bado-Nilles A., Jolly S., Lamand F., Geffard A., **Gagnaire B.**, Turies C., Porcher J.-M., Sanchez W. & Betoulle S. (2015). Involvement of fish immunomarkers in environmental biomonitoring approach: urban and agri-viticultural context. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 120: 35-40.
 16. **Gagnaire B.**, Bado-Nilles A., Betoulle S., Amara R., Camilleri V., Cavalie I., Chadili E., Delahaut L., Kerambrun E., Orjollet D., Palluel O. & Sanchez W. (2015). Former uranium mine-induced effects in caged roach: a multiparametric approach for the evaluation of *in situ* metal toxicity. *Ecotoxicology* 24 (1): 215-231.
 17. Augustine S., Pereira S., Floriani M., Camilleri V., Kooijman S.A.L.M., **Gagnaire B.** & Adam-Guillermin C. (2015). Effects of chronic exposure to environmentally relevant concentrations of

- waterborne depleted uranium on the digestive tract of zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of Environmental Radioactivity** 142: 45-53.
18. Bado-Nilles A., Techer R., Porcher J.-M., Geffard A., **Gagnaire B.**, Betoulle S., Sanchez W. (2014). Detection of immunotoxic effects of estrogenic and androgenic endocrine disrupting compounds using splenic immune cells of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L.). **Environmental Toxicology and Pharmacology** 38 (2): 672-683.
 19. **Gagnaire B.**, Bado-Nilles A. & Sanchez W. (2014). Depleted uranium disturbs immune parameters in zebrafish, *Danio rerio*: an *ex vivo/in vivo* experiment. **Archives of Environmental Contamination & Toxicology**.67 (3): 426-435.
 20. Bado-Nilles A., Jolly S., Porcher J-M., Palluel O., Geffard A., **Gagnaire B.**, Betoulle S. & Sanchez W. (2014). Applications in environmental risk assessment of leucocyte apoptosis, necrosis and respiratory burst analysis on European bullhead, *Cottus* sp. **Environmental Pollution**, 184: 9-17.
 21. G ret F., Burgeot T., Haure J., **Gagnaire B.**, Renault T., Communal P-Y. & Samain F. (2013). Effects of low-dose exposure to pesticide mixture on physiological responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Environmental Toxicology**, 28 (12): 689-699.
 22. Bado-Nilles A., Betoulle S., Geffard A., Porcher J-M., **Gagnaire B.** & Sanchez W. (2013). Flow cytometry detection of lysosomal presence and lysosomal membrane integrity in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) immune cells: applications in environmental aquatic immunotoxicology. **Environmental Science and Pollution Research**, 20 (5): 2692-2704.
 23. **Gagnaire B.**, Cavalié I., Camilleri V. & Adam-Guillermin C. (2013). Effects of depleted uranium on oxidative stress, detoxification, and defence parameters of zebrafish *Danio rerio*. **Archives of Environmental Contamination & Toxicology** 64 (1): 140-150.
 24. Augustine S., **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin A. & Kooijman S.A.L.M. (2012). Effects of uranium on the metabolism of zebrafish, *Danio rerio*. **Aquatic Toxicology**, 118-119: 9-26.
 25. Augustine S., **Gagnaire B.**, Floriani M., Adam-Guillermin A. & Kooijman S.A.L.M. (2011). Developmental energetics of zebrafish, *Danio rerio*. **Comparative Biochemistry & Physiology part A**, 159 (3): 275-283.
 26. **Gagnaire B.**, Boyer P., Bonzom J-M., Lecomte-Pradines C., Simon O., Gilbin R. (2011). Transfer modelling and toxicity evaluation of the effluent from an installation of cleansing and uranium recovery using a battery of bioassays. **Ecotoxicology**, 20 (1): 187-201.
 27. **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin C., Bouron A., Lestaevel P. (2011). The effects of radionuclides on animal behaviour: a review. **Reviews of Environmental Contamination & Toxicology**, 210: 35-58.
 28. **Gagnaire B.**, Geffard O., Noury P. & Garric J. (2010). *In vivo* indirect measurement of cytochrome P450-associated activities in freshwater gastropod molluscs. **Environmental Toxicology**, 25 (6): 545-553.
 29. Bado-Nilles A., Quentel C., Auffret M., Le Floch S, Arzel J., **Gagnaire B.**, Renault T. & Thomas-Guyon H. (2009). Immune effects of HFO on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 72 (5): 1446-1454.
 30. Arzul I., **Gagnaire B.**, Bond C., Chollet B., Morga B., Ferrand S., Robert M. & Renault T. (2009). Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, 85 (1): 67-75.
 31. **Gagnaire B.**, Gagné F., André C., Blaise C., Abbaci K., Budzinski H. Devier M.-H. & Garric J. (2009). Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. **Aquatic Toxicology**, 92 (3): 155-167.

32. Thomas-Guyon H., **Gagnaire B.**, Bado-Nilles A., Bouilly K., Lapègue S. & Renault T. (2009). Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Developmental & Comparative Immunology*, 33 (5): 653-659.
33. Bado-Nilles A., **Gagnaire B.**, Thomas-Guyon H., Le Floch S. and Renault T. (2008). Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicology in vitro*, 22 (6): 1610-1617.
34. **Gagnaire B.**, Duchemin M., Auffret M., Thomas-Guyon H. & Renault T (2008). Comparison of hemocyte parameters in the pericardial cavity and the adductor muscle sinus in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, using two types of flow cytometers. *Aquatic Living Resources*, 21(1): 39-43.
35. **Gagnaire B.**, Geffard O., Xuereb B., Margoum C. & Garric J (2008). Cholinesterase activities as potential biomarkers: characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774). *Chemosphere*, 71 (3): 553-560.
36. **Gagnaire B.**, Gay M., Huvet A., Daniel J-Y., Saulnier D. & Renault T. (2007). Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *in vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* 84 (1): 92-102 (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2007/publication-3022.pdf>).
37. **Gagnaire B.**, Soletchnik P., Faury N., Kerdudou N., Le Moine O. & Renault T. (2007). Analysis of hemocyte parameters in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in the field - Comparison of hatchery diploids and diploids from natural beds. *Aquaculture* 264 (1-4): 449-456 (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2007/publication-3119.pdf>).
38. Samain J. F., Dégremont L., Soletchnik P., Haure J., Bédier E., Ropert M., Moal J., Huvet A., Bacca H., Van Wormhoudt A., Delaporte M., Costil K., Pouvreau S., Lambert C., Boulo V., Soudant P., Nicolas J. L., Le Roux F., Renault T., **Gagnaire B.**, Gélet F., Boutet I., Burgeot T. & Boudry P. (2007). Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*, 268 (1-4 Special Issue): 227-243 (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2007/publication-2809.pdf>).
39. Hellio C., Bado-Nilles A., **Gagnaire B.**, Renault T. & Thomas-Guyon H. (2007). Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish & Shellfish Immunology* 22 (4): 433-440 (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2007/publication-2926.pdf>).
40. Bouilly K., Bonnard M., **Gagnaire B.**, Renault T. & Lapègue S. (2007). Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52 (1): 58-63. (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2007/publication-2178.pdf>)
41. **Gagnaire B.**, Thomas-Guyon H., Burgeot T. & Renault T. (2006). Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology* 22 (1): 1-14. (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2006/publication-1695.pdf>)
42. **Gagnaire B.**, Soletchnik P., Madec P., Geairon P., Le Moine O. & Renault T. (2006). Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture* 254 (1-4): 606-616 (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2007/publication-2923.pdf>).

43. **Gagnaire B.**, Frouin H., Moreau K., Thomas-Guyon H. & Renault T. (2006). Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish & Shellfish Immunology* 20 (4): 536-547. (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2006/publication-934.pdf>)
44. Bouilly K., **Gagnaire B.**, Bonnard M., Thomas-Guyon H., Renault T., Miramand P. & Lapègue S. (2006). Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology* 78 (2): 149-156. (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2006/publication-1687.pdf>)
45. Aton E., Renault T., **Gagnaire B.**, Thomas-Guyon H., Cognard C. & Imbert N. (2006). A flow cytometric approach to study intracellular-free Ca²⁺ in *Crassostrea gigas* haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 20 (4): 493-502. (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2006/publication-935.pdf>)
46. **Gagnaire B.**, Thomas-Guyon H., & Renault T. (2004). *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 16 (4): 501-512. (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2004/publication-691.pdf>)
47. Faucet J., Maurice M., **Gagnaire B.**, Renault T. & Burgeot T. (2004). Isolation and primary culture of gill and digestive gland cells from the common mussel, *Mytilus edulis*. *Methods in Cell Science* (merged to *Cytotechnology*) 25 (3-4): 177-184 (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2004/publication-936.pdf>)
48. **Gagnaire B.**, Renault T., Bouilly K., Lapègue S. & Thomas-Guyon H. (2003). Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Current Pharmaceutical Design*, 9 (2): 193-199.

1.9.2 Rapports

1. **Gagnaire B.**, Arcanjo C., Cavalié I., Simon O., Floriani M., Camilleri V., Orjollet D., Adam-Guillermin C. (2018). Sensibilité, spécificité et représentativité potentielle de marqueurs de génotoxicité pour l'analyse des effets des radionucléides. Application au tritium et à l'irradiation gamma (action GGP-Environnement, fiche V1-201, année 2017). RT/PSE-ENV/2018-00017.
2. **Gagnaire B.**, Arcanjo C., Cavalié I., Simon O., Floriani M., Camilleri V., Orjollet D., Adam-Guillermin C. (2016). Sensibilité, spécificité et représentativité potentielle de marqueurs de génotoxicité pour l'analyse des effets des radionucléides. Application au tritium et à l'irradiation gamma (action GGP-Environnement, fiche V1-201, année 2016). IRSN/PRP-ENV/SERIS/2016-00017.
3. **Gagnaire B.**, Arcanjo C., Cavalié I., Simon O., Floriani M., Camilleri V., Orjollet D., Adam-Guillermin C. (2015). Sensibilité, spécificité et représentativité potentielle de marqueurs de génotoxicité pour l'analyse des effets des radionucléides. Application au tritium et à l'irradiation gamma (action GGP-Environnement, fiche V1-201, année 2015). IRSN/PRP-ENV/SERIS/2015-00029.
4. **Gagnaire B.**, Cavalié I., Floriani M., Pereira S., Dubourg N., Camilleri V., Adam-Guillermin C. (2014). Sensibilité, spécificité et représentativité potentielle de marqueurs de génotoxicité pour l'analyse des effets des radionucléides. Application au tritium et à l'irradiation gamma (action GGP-Environnement, fiche V1-201, année 2013). IRSN/PRP-ENV/SERIS/2014-006.
5. **Gagnaire B.** (2012). Évaluation du risque écologique chimiotoxique associé aux substances autres que l'uranium présentes dans les effluents liquides des anciens sites miniers uranifères. IRSN/PRP-ENV/SERIS/2012-030.
6. Burgeot T., **Gagnaire B.**, Renault T., Haure J., Moraga D., David E., Boutet I. Sauriau P. G., Lapègue S., Bouilly K., Le Moullac G., Arzul G., Knoery J., Quiniou F., Bacher C., Haure J., Soletchnik P., 2006. Caractérisation des mortalités de *C. gigas* dans leurs écosystèmes. Stress environnemental. Synthèse MOREST 2000 – 2005.

7. Renault T., Arzul I., Faury N., **Gagnaire B.**, Garcia C., Gay M., Joly J.-P., Le Roux F., Miossec L., Pepin J.-F., Saulnier D., Goubet A., **2004**. Etudes des agents pathogènes et épidémiologie. Contrat de plan Etat-Région Poitou-Charentes 2000-2006. « Gestion durable des productions ostréicoles : les apports de la pathologie », 30p.
8. Étude des effets de polluants sur les paramètres hématologiques de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* – interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. **Thèse de Doctorat**, Océanologie Biologique et Environnement Marin, Université de La Rochelle ; 377 pages. Soutenue le 9 décembre **2005** (+ 2 rapports intermédiaires) (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2005/these-730.pdf>).
9. Environnement et immunomodulation : étude d'activités hématologiques chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. **Diplôme d'Etudes Supérieures**, Sciences Naturelles, Université Pierre et Marie Curie Paris VI, **2002** ; 55 pages.
10. Étude de l'impact de micropolluants sur les capacités immunitaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, *in vivo* et *in vitro*. **Diplôme d'Etudes Approfondies**, Océanologie Biologique et Environnement Marin, Université Pierre et Marie Curie Paris VI, **2001** ; 81 pages.
11. Étude des variations nyctémérales de la bioluminescence marine. Stage de Maîtrise, Université Pierre et Marie Curie Paris VI, **2000** ; 20 pages.

1.9.3 Articles de synthèse dans des ouvrages

1. Gueguen Y., Simon O., Souidi M., Lestaevél P., **Gagnaire B.**, **2009**. Chapitre 17 : Effets sur le système endocrinien. Toxicologie Nucléaire Environnementale et Humaine. Ménager M-T. and Garnier-Laplace J. (eds). Ed. Tec&Doc Lavoisier, pp 309-322.
2. Dublineau I., **Gagnaire B.**, Candéias S., Bertho J-M., Lifrani A., **2009**. Chapitre 19 : Effets sur le système immunitaire. Toxicologie Nucléaire Environnementale et Humaine. Ménager M-T. and Garnier-Laplace J. (eds). Ed. Tec&Doc Lavoisier, pp 337-349.
3. Lestaevél P., Adam-Guillermin C., **Gagnaire B.**, Bouron A., **2009**. Chapitre 20 : Effets sur le comportement. Toxicologie Nucléaire Environnementale et Humaine. Ménager M-T. and Garnier-Laplace J. (eds). Ed. Tec&Doc Lavoisier, pp 351-365.
4. **Gagnaire B.**, Ansoborlo E., Boiteux S., Forestier C., Gueguen Y., Simon O., **2009**. Chapitre 27 : Cadmium. Toxicologie Nucléaire Environnementale et Humaine. Ménager M-T. and Garnier-Laplace J. (eds). Ed. Tec&Doc Lavoisier, pp 507-528.
5. Burgeot T., **Gagnaire B.**, Renault T., Haure J., Moraga D., David E., Boutet I., Sauriau P.-G., Malet N., Bouchet V., Le Roux F., Lapègue S., Bouilly K., Le Moullac G., Arzul G., Knoery J., Quiniou F., Bacher C. & P. Soletchnik, **2007**. Les risques associés au stress environnemental. In Mortalités estivales de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Mortalités estivales de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - Défi Morest. Samain J.-F., Mc Combie H., Ed. Ifremer/Quæ, pp 95-139.
6. Nicolas J-L., Renault T., **Gagnaire B.**, Garcia C., Garnier M., Gay M., Labreuche Y., Le Roux F., Miossec L., Pépin J-F., Saulnier D., **2007**. Les risques associés aux pathogènes. In : Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Mortalités estivales de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - Défi Morest. Samain J.F. and McCombie H. (eds). Éd. Ifremer/Quæ, pp.229-269.

1.9.4 Actes de colloque

1. Le Guernic A., Betoulle S., Sanchez W., **Gagnaire B.** Multi-metallic contamination around former uranium mines induces adverse effects and acclimation disturbance in three-spined stickleback

- (*Gasterosteus aculeatus*) (2014). Special issue from ECOBIM meeting, May 2014, Brest, France. *Journal of Xenobiotics*, 4:4904.
2. **Gagnaire B.**, Bado-Nilles A., Betoulle S., Sanchez W. Effects of depleted uranium on immune parameters of zebrafish, *Danio rerio*, measured by flow cytometry (2013). Special issue from ECOBIM meeting, May 2013, Montréal, Quebec, Canada. *Journal of Xenobiotics*, 3(s1):e3.
 3. Bado-Nilles A., Betoulle S., Jolly S., Piccini B., Geffard A., **Gagnaire B.**, Porcher J-M., Sanchez W. (2012). Characterisation of the biological effects of chemical environmental pressure on fish health status by some immunotoxicological biomarkers. 28th Congress - European Society for Comparative Physiology and Biochemistry - Cellular and molecular mechanisms for physiological adaptation to multiple stress Bilbao, 2-5 September 2012. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 163: S41–S42.
 4. Bado-Nilles A., Betoulle S., Geffard A., **Gagnaire B.**, Porcher J-M., Sanchez W. (2012). Flow cytometry detection of lysosomal membrane integrity in the three spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) immune cells: applications in environmental aquatic immunotoxicology. 28th Congress - European Society for Comparative Physiology and Biochemistry - Cellular and molecular mechanisms for physiological adaptation to multiple stress Bilbao, 2-5 September 2012. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 163: S39.
 5. Bado-Nilles A., Renault T., **Gagnaire B.**, Auffret M., Le Floch S. & Thomas-Guyon H. (2007). *In vitro* and *in vivo* effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocyte parameters. Actes du congrès Annual Main Meeting of the Society for Experimental Biology (Abstracts). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146 (4 - S1): S71.
 6. **Gagnaire B.**, Burgeot T., G eret F., Thomas-Guyon H. & Renault T. (2006). Effect of heavy metals and herbicides on immune capacities in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Actes du PEVS (Abstract). *Cahiers de Biologie Marine* 47: 105-107.
 7. Imbert N., Aton E., Ambert X., **Gagnaire B.**, Cognard C., Thomas-Guyon H. & Renault T. (2006). Calcium homeostasis in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes: a tool in progress. Actes du PEVS (Abstract). *Cahiers de Biologie Marine* 47: 103-104.
 8. **Gagnaire B.**, Renault T., Thomas-Guyon H. & Burgeot T. (2006). Effect of *in vivo* pollutant exposure and pathogen injection on phagocytosis gene expression in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Actes du congrès PRIMO 13. Abstracts / **Marine Environmental Research** 62: S 371.
 9. Burgeot T., Quirion S., Quiniou F., Knoery J., Gagné F., **Gagnaire B.**, Renault T. Haure J., Moraga D., Osada M., Geret F. & Soletchnik P. (2006). Environmental stress of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during summer period. Actes du congrès PRIMO 13. Abstracts / **Marine Environmental Research** 62: S 380.
 10. **Gagnaire B.**, G eret F., Haure J., Martin J-L., Burgeot T., Thomas-Guyon H. & Renault T. (2005). Effets d'un mélange de pesticides sur les hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Actes du III eme congrès des SEM : Les mollusques dans la recherche actuelle : les mollusques comme bio-indicateurs : les mollusques et leurs ressources. *Haliotis*. (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2003/acte-924.pdf>)
 11. Gagnaire B., Renault T. & Thomas-Guyon H. (2004). *In vitro* and *in vivo* effects of mercury on haemocytes of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg): development of techniques evaluating estuarine pollution. Actes du Vème CLIO. *Journal de la Recherche Océanographique* 28 (1-2): 34-38. (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2002/acte-830.pdf>)

12. **Gagnaire B.**, Thomas-Guyon H., Lapègue S., Bouilly K. & Renault T. (2003). Recherche d'effets biologiques de l'atrazine sur des hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, *in vivo* et *in vitro*. **Actes du 31^{ème} congrès du GFP** : transferts des produits phytosanitaires, diagnostic de pollution et solutions correctives, pp 390-398. (<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2001/acte-834.pdf>)

1.9.5 Conférences, congrès

Participation au total à **79 congrès**, à **65 oraux** (35 présentés) et à **37 posters** (14 présentés).

1.9.5.1 Présentations orales internationales

1. **OBT Workshop:**

2018: 7th edition, Toronto, Canada, 24-26 Septembre

- **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin C., Festarini A., Cavalié I., Gosselin I., Della-Vedova C., Shultz C., Kim S.B., Ikert H., Dubois C., Walsh S., Farrow F., Beaton D., Chen H.Q., Tan E., Wen K., Shkarupin A., Stuart M. Effects of *in vivo* exposure to tritium (HTO and OBT) in fish (anglais).

2014: 3rd edition, Ottawa, Canada, 15-18 Septembre

- Stuart M., Festarini A., Kim S.B., Shultz C., Ikert H., Schleicher K., Walsh S., Dubois C., **Gagnaire B.** Biological effects of tritium in fish (anglais).

2. **ECOBIM** : Atelier franco-canadien sur l'évaluation environnementale par biomarqueurs écotoxicologiques

2018 : Université de Bordeaux, 22-25 mai

- **Gagnaire B.**, Festarini A., Kim S.B., Cavalié I., Farrow F., Beaton D., Adam-Guillermin C., Stuart M. Evaluation *in vivo* et *in situ* des effets du tritium sur le tête de boule, *Pimephales promelas*.

- Arcanjo C., **Gagnaire B.**, Armant O., Cavalié I., Camilleri V., Floriani M., Simon O., Adam-Guillermin C. Evaluation des modes d'action toxiques de l'eau tritiée sur les stades précoces du poisson zèbre (*Danio rerio*) : de l'ADN à l'individu.

2016 : Université du Havre, 30 mai – 1er juin

- **Gagnaire B.**, Arcanjo C., Armant O., Cavalié I., Camilleri V., Floriani M., Orjollet D., Simon O., Adam-Guillermin C., Bourgeault A., Festarini A., Kim S.B., Stuart M. Evaluation des effets du tritium sur les écosystèmes – étude sur un organisme modèle : le poisson.

2015 : Aquarium de Québec, Québec, Canada, 19-22 mai

- Rioul D., Brousseau P., **Gagnaire B.**, Auffret M., Bado-Nilles A., Serpentine A., Le Foll F., Betoulle S. L'harmonisation des résultats passe-t-elle par un équipement d'analyse identique ? Cas d'un test de viabilité cellulaire.

2009 : Anse Saint Jean, Québec, Canada, 2-4 juin

- **Gagnaire B.** Intérêt du modèle poisson-zèbre, *Danio rerio*, pour le développement de biomarqueurs immunologiques dans le cadre de l'évaluation de la toxicité de polluants.

2006 : Brest, 4-6 mai

- **Gagnaire B.**, Renault T., Thomas-Guyon H. & Burgeot T. Interactions between environment, defence mechanisms and infectious diseases in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.

2005 : HarmaBIM, Québec City, Québec, Canada, mai

- **Gagnaire B.** & Renault T. Assays for adjustment of *in vitro* pollutant exposure protocols on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemocytes (anglais).

- **Gagnaire B.**, Auffret M., Duchemin M. & Renault T. Analysis of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemocyte parameters, using flow cytometry: inter-laboratory method comparisons (anglais).
- 3. **ATINER** (Athens Institute for Education & Research) : A Panel on Impacts of Low Level Exposure to Radiation on Ecosystems - Athènes, Grèce, 22-25 Mai **2017**
 - **Gagnaire B.**, Festarini A., Cavalié C., Kim S.B., Farrow F., Adam-Guillermin C. & Stuart M. *In vivo* and *in situ* evaluation of tritium effects on fathead minnow, *Pimephales promelas* (anglais).
- 4. **SETAC Europe** (Society for Environmental Toxicology and Chemistry)
 - 2017**: 27^{ème} édition, Bruxelles, 7-11 Mai
 - Arcanjo C., **Gagnaire B.**, Cavalié I., Camilleri V., Simon O., Orjollet D., Floriani M., Armant O., Adam-Guillermin C. Bioaccumulation and biological effects of tritiated water using zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larvae model.
 - 2015**: 25^{ème} édition, Barcelone, 3-7 Mai
 - Le Guernic A., Sanchez W., Turies C., Chadili E., Bado-Nilles A., Palluel O., Cavalié I., Betoulle S., **Gagnaire B.** Evaluation of immune and acclimation capacities of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in polymetallic contamination context.
 - 2013**: 23^{ème} édition, Glasgow, Royaume-Uni, 12-16 Mai
 - **Gagnaire B.**, Bado-Nilles A., Betoulle S., Amara R., Kerambrun E., Denier X., Minier C., Cavalié I., Adam-Guillermin C., Le Guernic A., Sanchez W. Abandoned uranium mine-induced effects in caged roach: a multiparametric approach for the evaluation of *in situ* metal toxicity (anglais).
 - Bado-Nilles A., Jolly S., Porcher J-M., Palluel O., Geffard A., **Gagnaire B.**, Blanchard C., Le Rohic C., Betoulle S. & Sanchez W. Used of fish immune parameters in environmental risk assessment.
 - 2011** : 21^{ème} édition, Milan, Italie, 15-19 Mai
 - Bado-Nilles A., Jolly S., Geffard A., **Gagnaire B.**, Cadic N., Porcher J.-M., Sanchez W. & Betoulle S. Modulation of immune parameters by chemical environmental pressures in wild populations of European bullhead, *Cottus* sp., from Vesle basin (Champagne, France).
 - 2010** : 20^{ème} édition, Séville, Espagne, 23-27 Mai
 - **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin C., Bourrachot S., Barillet S., Lerebours A., Augustine S. & Gilbin R. From molecule to population: using zebrafish, *Danio rerio*, as a model to evaluate biological effects of uranium (anglais).
- 5. **MELODI** (Multidisciplinary European Low Dose Initiative): 7th Workshop, Next Generation Radiation Protection Research - Munich, Allemagne, 9-11 Novembre **2015**
 - **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin C., Alonzo F., Barjhoux I., Buisset-Goussen A., Cavalié I., Camilleri V., Floriani M., Lecomte-Pradines C., Parisot F., Simon O. Biomarkers of exposure and effects: are they useful tools to understand radiation effects in living organisms? (anglais).
- 6. **ENVIRA** (International Conference on Environmental Radioactivity): New Challenges with New Technologies, Thessaloniki, Grèce, 21-25 Septembre **2015**
 - Stuart M., Festarini A., Kim S.B., Shultz C., Ikert H., Schleicher K., Walsh S., Dubois C., **Gagnaire B.** Are drinking water guidelines for tritium adequate to protect aquatic biota? (anglais).
- 7. **Groupe de Recherche Universitaire sur les Techniques de Traitement et d'Épuration des Eaux (GRUTTEE)** : Limoges, 29-31 Octobre **2014**
 - Le Guernic A., **Gagnaire B.**, Sanchez W. & Betoulle S. Assessment of immune capacity and their acclimatization in a context of polymetallic contamination, around former uranium mines, in three-spined stickleback.

8. **ESCPB** (European Society for Comparative Physiology and Biochemistry)
2012 : 28^{ème} édition, Bilbao, Espagne, 2-5 Septembre
- Bado-Nilles A., Betoulle S., Geffard A., **Gagnaire B.**, Porcher J.M. & Sanchez W. Flow cytometry detection of lysosomal membrane integrity in the three spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) immune cells: applications in environmental aquatic immunotoxicology.
2004 : 23^{ème} édition, Cesenatico, Italie, 23-26 septembre
- **Gagnaire B.** & Renault T. Effect of *in vitro* pollutant exposure on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes (anglais).
9. **DEB symposium** : Lisbonne, Portugal, 13-15 avril **2011**
- Augustine S., **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin C., Kooijman S.A.L.M. Consequences of exposure to depleted uranium on developmental energetics of zebrafish, *Danio rerio*
10. **ASLO** (American Society of Limnology and Oceanography) Aquatic Sciences Meeting : San Juan, Porto Rico, 13-18 février **2011**
- Augustine S., **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin C., Kooijman S.A.L.M. Mechanistic modelling of zebrafish metabolism in relationship to food level and the presence of a toxicant: uranium
11. **ISTA** (International Symposium on Toxicity Assessment) : 14^{ème} édition, Metz, 31 Août-4 Septembre **2009**
- **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin C., Augustine S., Lerebours A., Bourrachot S., Simon O. & Gilbin R. From molecule to population: using zebrafish, *Danio rerio*, as a model to evaluate biological effects of uranium (anglais).
12. **SEB** (Society for Experimental Biology) : Glasgow, Ecosse, 31 Mars-4 avril **2007**
- Bado-Nilles A., Renault T., **Gagnaire B.**, Auffret M., Le Floch S. & Thomas-Guyon H. *In vitro* and *in vivo* effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocyte parameters.
13. **World Aquaculture Society** : San Antonio, Texas, USA, 26 février-2 mars **2007**
- Renault T., **Gagnaire B.**, Burgeot T. & Thomas-Guyon H. Environmental pollution and disease susceptibility: effects of a pesticide exposure prior to a bacterial challenge in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.
- Arzul I., Bond C., **Gagnaire B.**, Chollet B., Morga B., Ferrand S., Robert M. & Renault T. Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, parasite infecting flat oyster, *Ostrea edulis*, in seawater.
14. **Journées Franco-Tunisiennes de Zoologie** : 3^{ème} édition, Tabarka, Tunisie, 3-9 novembre **2006**
- Bado-Nilles A., **Gagnaire B.**, Quentel C., Thomas-Guyon H. & Renault T. Etude des effets de polluants de type hydrocarbure chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : criblage sur la base du suivi de paramètres hématocytaires et hémolympatiques.
15. **International Workshop on Summer Mortality of Marine Shellfish** : Tongyeong, Corée, 11-14 Octobre **2006**
- Boulo V., Huvet A., Azazeri J., Bacca E., Moal J., Moraga D., Boutet I., David L., Burgeot T., Van Wormhoudt A., **Gagnaire B.**, Renault T. & J.-F. Samain, 2006. Functional genomics in the oyster *Crassostrea gigas*: contribution of high throughput genomics to explain the summer mortality phenomenon.

16. **ISAAH** (International Symposium on Aquatic Animal Health) : 5^{ème} édition, San Francisco, California, USA, 2-6 Septembre **2006**
- **Gagnaire B.**, Burgeot T., Thomas-Guyon H. & Renault T. Pollution & infectious diseases: effect of pesticides on response to bacterial challenge in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (anglais).
 - Bado-Nilles A., Auffret M., Quentel C., Le Floch S., Arzel J., **Gagnaire B.**, Renault T. & Thomas-Guyon H. Effects of soluble fraction of an heavy fuel on hemolymph and hemocyte parameters of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.
17. **ICSR** (International Conference on Shellfish Restoration) : 8^{ème} édition, Brest, 2-5 Octobre **2005**
- **Gagnaire B.**, Renault T., Thomas-Guyon H. & Burgeot T. Effect of *in vivo* pesticide exposure and injection of bacteria on immune gene expression in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (anglais).
18. **EAFP** (European Association of Fish Pathology)
- 2005**: 12^{ème} édition, Copenhague, Danemark, 11-16 septembre
- **Gagnaire B.**, Renault T., Thomas-Guyon H. & Burgeot T. Effect of *in vivo* pesticide exposure and injection of bacteria on immune gene expression in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (anglais).
- 2003** : 11^{ème} édition, Malte, 21-26 septembre
- **Gagnaire B.**, Soletchnik P., Faury N., Guilpain P., Kerdudou N., Le Moine O. & Renault T. A cytometric morpho-functional analysis of the haemocytes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared in contrasted natural environments (anglais).
19. **PRIMO** (Pollutant Responses in Marine Organisms) : 13^{ème} édition, Alessandria, Italie, 19-22 juin **2005**
- **Gagnaire B.**, Renault T., Thomas-Guyon H. & Burgeot T. Effect of *in vivo* pollutant exposure and injection of bacteria on immune gene expression in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (anglais).
20. **ACFAS** (Association Francophone pour le Savoir) : 72^{ème} édition, Montréal, Québec, 12 mai **2004**
- Burgeot T., Gélet F., Ménard D., Quirion S., Haure J., Renault T., **Gagnaire B.**, Le Roux A., Huvet A., Moal J., Samain J-F., Moraga D., Boutet I., Violeau D., Royer A., Communal P.Y., Pffhol Leskowicz A., Quiniou F., Klein B., Caisey X., Masson P., Faury N. & Soletchnik P. Stress environnemental chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, en zone ostréicole impactée par les phytosanitaires.
21. **SEM** (Sociétés Européennes de Malacologie) : 3^{ème} édition, La Rochelle, 24-27 juin **2003** (**Lauréate du prix SEM de la meilleure présentation orale**)
- **Gagnaire B.**, Gélet F., Haure J., Martin J-L., Burgeot T., Thomas-Guyon H. & Renault T. Effect of pesticide exposure on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemocytes.
22. **NSA** (National Shellfisheries Association) : Nouvelle-Orléans, Louisiane, 13-17 avril **2003**
- Lambert C., Soudant P., Choquet G., Paillard C., Frouel S., Degrémont L., Delaporte M., Moal J., Boudry P., Soletchnik P., Le Moine O., Ropert M., Bédier E., Renault T., **Gagnaire B.**, Huvet A. & Samain J-F. Immunological status of selected *Crassostrea gigas* families and descendants, reared in different environmental conditions (anglais).
 - Renault T., **Gagnaire B.**, Le Moine O & Soletchnik P. A cytometric morpho-functional analysis of the haemocytes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared in contrasted natural environments - Effects of sampling time and genetic origin (anglais).
23. **CLIO** (Congrès International de Limnologie et Océanographie) : 5^{ème} édition, Institut Océanographique, Paris, 9-12 septembre **2002**

- **Gagnaire B.**, Thomas-Guyon H. & Renault T. Etude *in vivo* et *in vitro* des effets du mercure sur la réponse hémocytaire de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : développement de techniques évaluant les impacts de la pollution estuarienne.

1.9.5.2 Présentations orales nationales

1. **Journée RESAMA (Réseau d'Etudes Sanitaires des Animaux Modèles Aquatiques)** : Juoy-en-Josas, 13 Décembre **2018**

- **Gagnaire B.**, Simon O. Animalerie aquatique de l'IRSN/LECO : poisson zèbre, *Danio rerio* - Carpe, *Cyprinus carpio*.

2. **GDR Ecotoxicologie Aquatique** : Antony, 4-5 Décembre **2018**

- Arcanjo C., Adam-Guillermin C., **Gagnaire B.** Etude des effets de l'eau tritiée sur les stades de développement précoces chez le poisson zèbre, *Danio rerio* - Caractérisation des modes d'action.

3. **Colloque CEA/IRSN** : Fontenay-aux-Roses, 11 Septembre **2018**

- **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin C., Armant O., Bonzom J-M., Camilleri V., Cavalié I., Della-Vedova C., Dubourg N., Simon O., Lengagne T., Giraudeau M., Beaton D., Festarini A., Kim S.B., Stuart M. Etude des conséquences écologiques d'expositions chroniques aux rayonnements ionisants : du laboratoire au terrain.

4. **SEFA (Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée)** :

2018 : Montpellier, 27-28 Juin

- Guirandy N., Camilleri V., Cavalié I., Dubourg N., Armant O., **Gagnaire B.**, Simon O. Evaluation des effets reprotoxiques chez le poisson *Danio rerio* après irradiation gamma chronique. Effets transgénérationnels.

2015 : Bordeaux, 30 Juin-1^{er} Juillet

- **Gagnaire B.**, Cavalié I., Festarini A., Camilleri V., Simon O., Kim S.B., Adam-Guillermin C. & Stuart M. Evaluation *in vivo* et *in situ* des effets du tritium chez les poissons.

2014 : Besançon, 1-2 Juillet

- Le Guernic A., **Gagnaire B.**, Sanchez W. & Betoulle S. Evaluation des capacités de défenses immunitaires et de leur acclimatation dans un contexte de contamination polymétallique chez l'épinoche à trois épines.

2012 : Lyon, 4-5 Juillet

- **Gagnaire B.**, Bado-Nilles A., Betoulle S., Delahaut L., Amara R., Kerambrun E., Minier C., Denier X., Adam-Guillermin C., Cavalié I., Palluel O. & Sanchez W. Développement d'une batterie de biomarqueurs chez le gardon dans le cadre de l'évaluation *in situ* de la toxicité de mélanges de métaux à proximité d'anciennes mines d'uranium.

5. **Forum Ecotox Rovaltain** : Rovaltain, 11-13 Octobre **2016**

- **Gagnaire B.**, Cavalié I., Della-Vedova C., Dubourg N., Adam-Guillermin C., Belzunces L., Bonnet M., Brun S., Brunet J.-L. Etude des effets physiologiques des rayonnements gamma chez l'abeille domestique, *Apis mellifera*.

6. **Association pour la Recherche En Toxicologie (ARET)** : Paris, 7-8 Juin **2012**

- Adam-Guillermin C., Lerebours A., Faucher K., Floriani M., Bourrachot S., **Gagnaire B.**, Bourdineaud J-P, Garnier-Laplace J. Réponses intégrées du poisson zèbre lors d'expositions chroniques à l'uranium : liens entre expression génique, atteintes des tissus olfactifs et reprotoxicité.

7. **Ecole du Programme Transversal Toxicologie du CEA** : Giens, 21 Juin **2011**

- **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin C. & Gilbin R. De la molécule à la population: utilisation du poisson zèbre, *Danio rerio*, comme modèle pour évaluer les effets biologiques de l'uranium.
- 8. **ECCOREV** (Colloque biomarqueurs) : Aix en Provence, 29 Novembre **2010**
 - **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin C., Bourrachot S., Barillet S., Lerebours A., Augustine S. & Gilbin R. De la molécule à la population: utilisation du poisson zèbre, *Danio rerio*, comme modèle pour évaluer les effets biologiques de l'uranium.
- 9. **Ecologie 2010** : 1^{ère} édition, Montpellier, 2-4 septembre **2010**
 - Augustine S., **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin C. & Kooijman S.A.L.M. Etude de l'énergétique de la maturation chez le poisson zèbre, *Danio rerio*.
- 10. **Journée d'études scientifiques et techniques**, Grenoble, 22 Mars **2010**
 - Adam-Guillermin C., Plaire D., **Gagnaire B.** Utilisation du poisson zèbre *Danio rerio* dans les études comportementales : état de l'art et premières applications en écotoxicologie.
- 11. **SFRP** (Société Française de RadioProtection) : 7^{ème} édition, Angers, 15-18 Juin **2009**
 - Adam-Guillermin C., Alonzo F., Bonzom J-M., **Gagnaire B.**, Gilbin R. & Garnier-Laplace J. Conséquences écologiques de l'exposition chronique aux radionucléides : connaissances et méthodes nécessaires pour la mise en place d'un système de radioprotection de l'environnement.
- 12. **ASPS** (Association Santé Poissons Sauvages) : Nantes, 11-12 Mars **2008**
 - **Gagnaire B.**, Burgeot T., Thomas-Guyon H. & Renault T. Pollution environnementale: effets de l'exposition aux pesticides sur la réponse de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, aux maladies infectieuses.
- 13. **GPLF** (Groupement des Protistologues de Langue Française) : 45^{ème} édition, Roscoff, 29 mai **2007**
 - Morga B., Arzul I. Chollet B., **Gagnaire B.** & T. Renault, 2007. Etude des interactions entre le parasite *Bonamia ostreae* et son hôte, huître plate *Ostrea edulis in vitro*
- 14. **UOF** (Union des Océanographes de France) : 31^{ème} édition, Nantes, 2-3 Novembre **2006**
 - **Gagnaire B.**, Renault T., Thomas-Guyon H. & Burgeot T. Etude des effets de polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses.
- 15. **RIF** (Rencontre de l'Ichtyologie en France) : 3^{ème} édition, Paris, 28-30 mars **2006**
 - Bado-Nilles A., Quentel C., Le Floch S., Auffret M., **Gagnaire B.**, Renault T., Arzel J. & Thomas-Guyon H. Effets de la fraction soluble d'un fuel lourd sur les leucocytes, le complément et le lysozyme chez le bar commun, *Dicentrarchus labrax*.
- 16. **JEM** (Journées d'Ecologie Marine) : 1^{ère} édition, Nantes, 23-24 juin **2004**
 - **Gagnaire B.**, Burgeot T. & Renault T. Exposition *in vitro* des hématocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, à différents polluants.
- 17. **Colloque d'Immunologie des Invertébrés**
2003 : 3^{ème} édition, Banyuls, 17-19 novembre
 - **Gagnaire B.**, Gélet F., Haure J., Martin J-L., Burgeot T. & Renault T. Effet de l'exposition aux pesticides sur les hématocytes d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*.
 - **Gagnaire B.**, Soletchnik P., Faury N., Guilpain P., Kerdudou N., Le Moine O. & Renault T. Evolution temporelle de paramètres hématocytaires chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - Intérêt dans l'étude des mortalités estivales.
- 2001** : 1^{ère} édition, Villeneuve d'Ascq, 11-14 septembre

- **Gagnaire B.**, Thomas-Guyon H. & Renault T. Etude de l'impact de micropolluants sur les capacités immunitaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, *in vivo* et *in vitro*.

18. **GFP** (Groupe Français des Pesticides) : 33^{ème} édition, Aix en Provence, mai **2003**

- **Gagnaire B.**, Gélet F., Haure J., Martin J-L., Burgeot T. & Renault T. Effects of pesticide exposure on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemocytes.

19. **ADIC** (Association des Doctorants de l'Institut Curie) : 5^{ème} édition, Paris, avril **2002**

- **Gagnaire B.**, Thomas-Guyon H. & Renault T. Etude des effets de micropolluants sur le système immunitaire de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : environnement et immunotoxicité.

1.9.5.3 Posters internationaux (en anglais)

1. **Canadian Ecotoxicity Workshop**: 45th edition, Vancouver, Canada, 30 Septembre – 3 Octobre **2018**

- **Gagnaire B.**, Gosselin I., Festarini A., Walsh S., Cavalieri I., Adam-Guillermin C., Della-Vedova C., Farrow F., Kim S.B., Shkarupin A., Chen, H.Q., Beaton D., Stuart M. Effects of *in vivo* exposure to tritium: a multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas* (**poster corner**).

2. **ICRER** (International Conference on Radioecology & Environmental Radioactivity) : 7-12 Septembre **2014**, Barcelone, Espagne

- Le Guernic A., **Gagnaire B.**, Sanchez W. & Betoulle S. Assessment of immune capacities and their acclimatization in a context of multi-metallic contamination around former uranium mines in three-spined stickleback (**poster corner**).

3. **ECOBIM** : Atelier franco-canadien sur l'évaluation environnementale par biomarqueurs écotoxicologiques

2014 : Brest, 20-23 Mai

- **Gagnaire B.**, Festarini A., Cavalieri I., Shultz C., Dubois C., Walsh S., Kim S.B., Adam-Guillermin C., Stuart M. Evaluation *in situ* des effets du tritium chez des poissons têtes de boules, *Pimephales promelas*, dans un contexte de multipollution – une approche multiparamétrique (**poster corner**).

- Le Guernic A., Sanchez W., Betoulle S. & **Gagnaire B.** Evaluation des capacités de défense immunitaire et de leur acclimatation dans un contexte de contamination polymétallique chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) (**poster corner**).

2013 : Montréal, 37-30 Mai

- **Gagnaire B.**, Bado-Nilles A., Betoulle S., Sanchez W. Effets *ex vivo* et *in vivo* de l'uranium appauvri sur les paramètres immunitaires du poisson zèbre, *Danio rerio* (**poster corner**).

2012 : Reims, 5-8 Juin

- **Gagnaire B.**, Bado-Nilles A., Betoulle S., Amara R., Denier X., Minier C., Adam-Guillermin C. & Sanchez W. Développement d'une batterie de biomarqueurs chez le gardon dans le cadre de l'évaluation *in situ* de la toxicité de mélanges de métaux à proximité d'anciennes mines d'uranium (**poster corner**).

- Bado-Nilles A., Betoulle S., Geffard A., Porcher J-M., **Gagnaire B.** & Sanchez W. Détection en cytométrie de flux de l'intégrité membranaire des lysosomes au niveau des cellules immunitaires de l'épinoche à trois épines, *Gasterosteus* sp. Applications en immunotoxicité environnementale (**poster corner**).

2011 : Mont-Joli, Québec, Canada, 6-9 Juin

- **Gagnaire B.**, Bado-Nilles A., Sanchez W., Adam-Guillermin C., Betoulle S. Développement de biomarqueurs immunologiques chez le gardon dans le cadre de l'évaluation de la toxicité de l'uranium *in situ* à proximité l'anciennes mines (**poster corner**).

4. **SETAC Europe** (Society for Environmental Toxicology and Chemistry)
2013: 23^{ème} édition, Glasgow, Royaume-Uni, 12-16 Mai
- Bado-Nilles A., Betoulle S., **Gagnaire B.**, Techer R., Geffard A., Porcher J-M. & Sanchez W. Effects of spironolactone on fish immune capacities.
2012 : 22^{ème} édition, Berlin, Allemagne, 20-24 Mai
- Augustine S., **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin C. & Kooijman S.A.L.M. Energetics affects toxico-kinetics and vice-versa: a case study of uranium toxicity on the metabolism of zebrafish, *Danio rerio*.
2011 : 21^{ème} édition, Milan, Italie, 15-19 Mai
- Bado-Nilles A., Jolly S., Geffard A., **Gagnaire B.**, Porcher J.-M., Betoulle S. & Sanchez W. Flow cytometry methodology for measuring chemical induced cellular dead cell apoptosis and necrosis of splenic leucocytes in European bullhead, *Cottus* sp.
2010 : 20^{ème} édition, Séville, Espagne, 23-27 mai
- Adam-Guillermin C., Cavalié I., Camilleri V., **Gagnaire B.**, Gilbin R., Garnier-Laplace J. Genotoxicity in gills and gonads of the zebrafish *Danio rerio* in relation to uranium toxicokinetics.
2008 : 18^{ème} édition, Varsovie, Pologne, 25-29 mai
- Caquet T., Farcy E., Allenou J-P., Auffret M., Budzinski H., Burgeot T., Gabellec R., **Gagnaire B.**, Heydorff M., Lagadic L., Le Goic N., Mazzella N., Menard D., Mondeguer F., Renault T. Presence and effects of pesticides along estuarine continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). 3. Biomarker responses in bivalves.
2007 : 17^{ème} édition, Porto, Portugal, 20-24 mai
- **Gagnaire B.**, Xuereb B., Bezin L. & Garric J. Using freshwater gastropods, *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*, as new models for assessing endocrine disruption – development of biomarkers.
5. **ESCPB** (European Society for Comparative Physiology and Biochemistry) : 28^{ème} édition, Bilbao, Espagne, 2-5 Septembre **2012**
- Bado-Nilles A., Betoulle S., Jolly S., Piccini B., Geffard A., **Gagnaire B.**, Porcher J.M. & Sanchez W. Characterisation of the biological effects of chemical environmental pressure on fish health status by some immunotoxicological biomarkers.
6. **EAFP** (European Association of Fish Pathology)
2011 : 15^{ème} édition, Split, Croatie, 12-16 septembre
- Bado-Nilles A., Betoulle S., Jolly S., Piccini B., Geffard A., **Gagnaire B.**, Porcher J-M. & Sanchez W. characterisation of the biological effects of chemical environmental pressure on fish health status by some immunotoxicological biomarkers.
2007 : 13^{ème} édition, Prado, Italie, 17-21 septembre
- Arzul I., Bond C., **Gagnaire B.**, Chollet B., Morga B., Ferrand S., Robert M. & Renault T. Flow cytometry to measure impact of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, parasite infecting flat oyster, *Ostrea edulis*, in seawater.
- Morga B., Arzul I., Faury N., **Gagnaire B.**, Chollet B., & T. Renault. Study of interactions between flat oyster, *Ostrea edulis*, and the parasite *Bonamia ostreae* using flow cytometry and suppression subtractive hybridization (SSH).
7. **DEB Symposium** : Brest, 19-22 avril **2009**
- Augustine S., **Gagnaire B.**, Adam-Guillermin C., Kooijman S.A.L.M. Modelling the bioenergetics of zebrafish, *Danio rerio*, over its entire lifecycle using Dynamic Energy Budget theory.

8. **ASLO** (American Society of Limnology and Oceanography) Aquatic Sciences Meeting : Nice, 26-30 janvier **2009**
 - **Gagnaire B.**, Bonzom J-M., Boyer P., Dal-Pos N., Gilbin R., Lecomte-Pradines C., Signoret P. & Simon O. Toxicity evaluation of the effluent of a nuclear plant (Tricastin, France) after an uranium spillage using a battery of bioassays.
9. **SEB** (Society for Experimental Biology)
2007: Glasgow, Ecosse, 31 Mars-4 avril
 - **Imbert N.**, **Gagnaire B.**, Ambert X. & Renault T. Interactions between pesticides and calcium on hemocyte phagocytosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.
2004: Edinburg, Grande-Bretagne, avril
 - Aton E., Cognard C., Renault T., **Gagnaire B.**, Thomas-Guyon H. & **Imbert N.** Calcium signaling in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes : a first approach.
10. **ISAAH** (International Symposium on Aquatic Animal Health) : 5^{ème} édition, San Francisco, California, USA, 2-6 Septembre **2006**
 - **Bado-Nilles A.**, **Gagnaire B.**, Quentel C., Thomas-Guyon H. & Renault T. Polycyclic aromatic hydrocarbon effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) hemolymph and hemocyte parameters: screening of 18 pollutants.
11. **ICSR** (International Conference on Shellfish Restoration) : 8^{ème} édition, Brest, 2-5 Octobre **2005**
 - **Bado-Nilles A.**, Quentel C., Le Floch S., Auffret M., **Gagnaire B.**, Renault T., Arzel J. & Thomas-Guyon H. Environment and immunomodulation: effects of the soluble fraction of Norwegian heavy fuel on the immune system of Sea bass, *Dicentrarchus labrax*.
 - **Bado-Nilles A.**, Auffret M., Quentel C., Le Floch S., **Gagnaire B.**, Renault T., Arzel J. & Thomas-Guyon H. Environment and immunomodulation: effects of the soluble fraction of Norwegian heavy fuel on the immune system of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.
12. **PRIMO** (Pollutant Responses in Marine Organisms)
2005 : 13^{ème} édition, Alessandria, Italie, 19-22 juin
 - Burgeot T., Quirion S., Quiniou F., Knoery J., Soletchnik P., **Gagnaire B.**, Renault T., Haure J., Osada M., Gélet F., Communal P-Y., Jadas-Hecart A. & Gagné F. Environmental stress of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during the gametogenesis : role of herbicides ?
2003 : 12^{ème} édition, Tampa, Floride, 10-13 mai
 - Gélet F., **Gagnaire B.**, Ménard D., Renault T., Le Roux A., Haure J., Bocquené G. & Burgeot T. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to pesticide exposition.
13. **FEBS** (Federation of European Biochemical Societies), 30^{ème} édition et **IUBMB** (International Union of Biochemistry and Molecular Biology), 9^{ème} édition, Budapest, Hongrie, 2-7 juillet **2005**
 - **Thomas-Guyon H.**, Bado-Nilles A., **Gagnaire B.**, Caillaud C., Bouilly K., Lapègue S. & Renault T. *In vitro* phenoloxidase activation detected during the development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg).
14. **EFMS** (European Federation of Marine Science and Technology Societies) : Athènes, Grèce, 27-29 septembre **2002**
 - **Gagnaire B.**, Renault T. & Thomas-Guyon H. *In vitro* evaluation of the toxicity of micropollutants on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes.
15. **NSA** (National Shellfisheries Association) : Mystic, Connecticut, 12-17 avril **2002**

- **Gagnaire B.**, Thomas-Guyon H. & Renault T. *In vivo* and *in vitro* evaluation of the toxicity of micropollutants (heavy metals and atrazine) on haemocytes of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.

1.9.5.4 Posters nationaux

1. **SEFA** (Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée) : Besançon, 1-2 Juillet **2014**

- **Gagnaire B.**, Festarini A., Cavalié I., Shultz C., Dubois C., Walsh S., Kim S.B., Adam-Guillermin C., Stuart M. Evaluation *in situ* des effets du tritium chez des poissons têtes de boules, *Pimephales promelas*, dans un contexte de multipollution.

2. **RIF** (Rencontre de l'Ichtyologie en France) : 5^{ème} édition, Paris, 27-30 mars **2012**

- Bado-Nilles A., Betoulle S., **Gagnaire B.**, Porcher J-M. & Sanchez W. La cytométrie de flux, un outil innovant en écotoxicologie pour l'étude de l'impact des substances chimiques et la biosurveillance de l'environnement.

3. **Réseau ANTIOPEs** : 1^{ère} édition, Avignon, 19-20 Mars **2012**

- **Gagnaire B.**, Bado-Nilles A., Betoulle S., Amara R., Denier X., Minier C., Adam-Guillermin C. & Sanchez W. Développement de biomarqueurs immunologiques chez différentes espèces de poissons dans le cadre de l'évaluation de la toxicité de polluants *in situ*.

- Bado-Nilles A., Betoulle S., **Gagnaire B.**, Porcher J-M. & Sanchez W. La cytométrie de flux, un outil innovant en écotoxicologie pour l'étude de l'impact des substances chimiques et la biosurveillance de l'environnement.

4. **ASPS** (Association Santé Poissons Sauvages) : Nantes, 11-12 Mars **2008**

- **Gagnaire B.**, Gagné F., André C., Budzinski H., Devier M.-H. & Garric J. Impact des perturbateurs endocriniens sur deux mollusques gastéropodes d'eau douce, *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis* – développement de biomarqueurs.

5. **FJO** (Forum des Jeunes Océanographes) : 19^{ème} édition, Nantes, 4-5 avril **2002**

- **Gagnaire B.**, Renault T. & Thomas-Guyon H. Environnement et mécanismes de défense chez le naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

6. **GFP** (Groupe Français des Pesticides) : 31^{ème} édition, ENS Lyon, 15-17 mai **2001**

- **Gagnaire B.**, Renault T., Thomas-Guyon H., Lapègue S., Bouilly K., Gérard A. & Miramand P. Recherche d'effets biologiques de l'atrazine sur hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, *in vivo* et *in vitro*.

1.9.5.5 Vulgarisation scientifique

1. **Fête de la Science**, stand IRSN, Marseille & Manosque. **2009, 2010, 2011, 2013, 2016.**

2. **Prix OSTREA** : Lycée de la Mer, Bourcefranc-le-Chapus, 23 Novembre **2006 (Lauréate)**

- **Gagnaire B.** Pollution de l'environnement : comment les défenses des huîtres sont-elles affectées par les produits toxiques ?

3. **Prix de thèse** : Université de La Rochelle, 7 avril **2006**

- **Gagnaire B.** Pollution de l'environnement : comment les défenses de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sont-elles affectées par les produits toxiques ? (poster + communication).

4. **Journée des Doctorants** : Université de La Rochelle, 27 mai **2004**

- **Gagnaire B.** Etude des effets de polluants chimiques sur le système immunitaire de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : environnement et immunotoxicité (poster + communication).

1.10 Expertises

1.10.1 Projets scientifiques

1. **Czech Science Foundation (2018)**. DNA damage repair system in developing sturgeon embryo.
2. **Hong-Kong Research Grant Council (2018)**. Experimental studies on X-ray-induced rescue effect.
3. **CRSNG (2016)**. Combined effects of natural and anthropogenic stressors in fish.
4. **ANR (2016)**. Radiological and ecological impact of former uranium mines.
5. **NOAA-CSCOR (Center for Sponsored Coastal Ocean Research) (2006)**. Disease and Parasite Occurrence as Indicators and Consequences of Stressed Coastal Ecosystems.

Relectrice d'articles pour différentes revues internationales (AECL Nuclear Reviews, Animal Genetics, Aquaculture Research, Aquatic Toxicology, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, Chinese Journal of Oceanology and Limnology, Comparative Biochemistry and Physiology, Current Nutrition & Food Science, Ecotoxicology and Environmental Safety, Environmental Pollution, Environmental Research, Environmental Science and Pollution Research, Environmental Science and Technology, Fish and Shellfish Immunology, International Journal of Radiation Biology, Invertebrate Survival Journal, Journal of Biomarkers in Drug Development, Journal of Environmental Radioactivity, Journal of Hazardous Materials, Journal of Xenobiotics, Journal of Visualized Experiments, Marine Pollution Bulletin, Physiology & Behavior, Science of the Total Environment, Toxicological & Environmental Chemistry, Toxicology in Vitro, Water Air & Soil Pollution, Water Research).

1.10.2 Dossiers

1. **SERIS (2017)**. Contribution à l'analyse du dossier de demande de MAD/DEM de l'INB25 RAPSODIE (CEA Cadarache). IRSN/PRP-ENV, NI SERIS/2017-0044.
2. **SERIS (2016)**. Contribution à l'instruction du dossier de demande de mise en service de l'INB ECRIN. IRSN/PRP-ENV, NI SERIS/2016-00210.
3. **SERIS (2016)**. Analyse préalable du dossier de demande d'autorisation de MAD-DEM de l'INB n°25 RAPSODIE (CEA Cadarache). IRSN/PRP-ENV, NI SERIS/2016-00202.
4. **SERIS (2016)**. Contribution à l'analyse du dossier de demande de MAD/DEM de l'INB93 (EURODIF). IRSN/PRP-ENV, NI SERIS/2016-00195.
5. **SERIS (2016)**. Avis sur l'étude de dispersion de la nouvelle ligne de rejet du site de Marcoule. IRSN/PRP-ENV, NI SERIS/2016-00180.
6. **SERIS (2016)**. Contribution à l'analyse du dossier de demande de démantèlement complet des INB n°33 et 38 (La Hague). IRSN/PRP-ENV, NI SERIS/2016-00164.
7. **SERIS (2015)**. Analyse préalable du dossier de demande d'autorisation de MAD-DEM de l'INB105 (AREVA NC Tricastin). IRSN/PRP-ENV, NI SERIS/2015-000159.
8. **Gagnaire B., Beaugelin-Seiller K. (2014)**. Évaluation de l'impact environnemental des rejets de substances chimiques et radioactives aux valeurs limites demandées par l'exploitant pour le CNPE de Chinon- DARPE indice B. IRSN/PRP-ENV, rapport SERIS/2014-0018, 43p.
9. **Gagnaire B., Beaugelin-Seiller K. (2013)**. Évaluation de l'impact environnemental des rejets de substances chimiques et radioactives aux valeurs limites demandées par l'exploitant pour le CNPE de Saint-Laurent- DARPE indice B. IRSN/PRP-ENV, rapport SERIS/2013-024, 38 p.
10. **Gagnaire B., Beaugelin-Seiller K. (2012)**. Évaluation de l'impact environnemental des rejets de substances chimiques aux valeurs limites demandées par l'exploitant pour le CNPE de Cattenom. Déclaration de modification de novembre 2011. IRSN, rapport PRP-ENV/SERIS/2012-018, 64 p.

11. **Gagnaire B.**, Beaugelin-Seiller K., Métivier J.-M. (2012). Évaluation de l'impact environnemental des rejets de substances chimiques et radioactives aux valeurs limites demandées par l'exploitant pour le CNPE du Bugey. Déclaration de modifications de juin 2011. IRSN, rapport PRP-ENV/SERIS/2012-009, 75 p.
12. **Gagnaire B.** (2011). Évaluation de l'impact sur l'environnement des rejets d'effluents chimiques liquides et gazeux aux valeurs limites demandées par l'exploitant dans le cadre de la modification du périmètre de l'INB n°113 et de l'implantation de SPIRAL 2 au GANIL. Rapport DEI/SECRE/2011-08, 30p.
13. **Gagnaire B.** (2010). Évaluation de l'impact sur l'environnement des rejets liquides non radioactifs aux valeurs limites demandées par l'exploitant pour le CNPE de Penly : compléments sur l'ATMP, l'HEDP, l'acide acétique et l'acide acrylique. Dac indice A. IRSN/DEI, rapport SECRE/2010-047.
14. **Gagnaire B.**, Beaugelin-Seiller K. (2010). Évaluation de l'impact sur l'environnement des rejets aux valeurs limites demandées par l'exploitant pour le CNPE de Penly. DAC Penly 3 (EPR) indice A. IRSN/DEI, rapport SECRE/2010-036.
15. **Gagnaire B.** (2010). Évaluation de l'impact sur l'environnement des rejets aux valeurs limites demandées par l'exploitant pour les rejets liquides non radioactifs du CNPE de Dampierre en Burly. DARPE indice A. IRSN/DEI, rapport SECRE/10-013.

2 Synthèse des activités de recherche

2.1 Contexte général

La protection de l'environnement dans un contexte de changements globaux et dans la perspective de la gestion durable des ressources et des milieux naturels fait partie des objectifs prioritaires de la Communauté Européenne (cf. Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE). Les milieux aquatiques sont des écosystèmes complexes qui sont habités par une grande diversité d'espèces. Ces écosystèmes sont localisés à proximité d'activités industrielles et reçoivent de manière chronique des contaminants, dont des radionucléides. La pollution des milieux aquatiques est un problème majeur tant pour la population humaine, utilisatrice des ressources en eau, que pour les populations végétales et animales pour lesquelles l'eau représente le milieu de vie (Galloway and Depledge, 2001).

L'écotoxicologie est la discipline qui évalue les effets des perturbations physiques et chimiques sur les êtres vivants, les voies de transfert des contaminants et leur action sur l'environnement (Moore et al., 2004). Elle regroupe des études physico-chimiques, permettant de décrire le milieu étudié et de définir son niveau de contamination, ainsi que des études biologiques, afin de déterminer la qualité du milieu. Elle fait intervenir l'utilisation de biomarqueurs ayant pour but de mettre en évidence de façon précoce une pollution (van der Oost et al., 2003). Un biomarqueur se définit comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, de l'organisme, de la population ou de l'écosystème qui peut être reliée à une exposition ou à des effets toxiques de polluants chimiques environnementaux (Lagadic et al., 1997; Peakall, 1994; van der Oost et al., 2003). L'altération d'une ou plusieurs fonctions biologiques est susceptible de modifier l'homéostasie et la capacité d'adaptation de ces organismes avec pour conséquence la remise en cause de leur croissance, de leur reproduction, voire de leur survie. Cependant, les effets à des niveaux hiérarchiques élevés (population et écosystème) sont toujours précédés de changements précoces dans les processus biologiques, permettant le développement de biomarqueurs d'alerte précoce d'effets chez les individus. Le développement de ces outils diagnostiques est primordial dans le cadre de l'évaluation des risques en écotoxicologie (Sanchez and Porcher, 2009).

L'uranium est un métal non-essentiel présentant à la fois des propriétés chimiotoxiques et radiotoxiques qui se retrouve naturellement dans l'environnement sous la forme d'un mélange de trois radioisotopes émetteurs alpha (^{234}U 0,005%, ^{235}U 0,720%, et ^{238}U 99,274%) (Ragnarsdottir and Charlet, 2000). Il est distribué dans les roches, les sols, l'eau, l'air, les plantes, les animaux terrestres et aquatiques ainsi que chez l'homme (Bonin and Blanc, 2001). L'uranium est ubiquiste dans les eaux naturelles à des concentrations de quelques ng/L à 6 µg/L selon la composition des roches environnantes et jusqu'à 1 mg/L à l'exutoire des sites uranifères (Bonin and Blanc, 2001). De nombreuses activités anthropogéniques

peuvent augmenter l'abondance de l'uranium dans l'environnement, telles que l'utilisation de fertilisants phosphatés, de nombreuses activités minières et le traitement industriel de l'uranium pour la fabrication d'énergie nucléaire et d'armes atomiques, du fait de ses propriétés de fission. L'uranium appauvri (appauvri en ^{235}U), le produit résiduel de l'enrichissement de l'uranium, est communément utilisé pour des applications militaires, aéronautiques, médicales et en recherche. L'utilisation passée, présente et future de l'uranium appauvri le positionne comme un élément pouvant poser un problème majeur en termes de protection de l'environnement et de santé publique (WHO, 2001). En France, l'uranium a été extrait entre 1945 et 2001 à partir de quelques centaines de mines (IRSN, 2007). La contamination uranifère qui en a découlé pose un problème environnemental et sanitaire qui perdure encore aujourd'hui. En effet, les gestionnaires des mines ayant l'obligation réglementaire de limiter les impacts radiologiques et chimiques des activités passées, une décontamination des eaux est réalisée par l'utilisation de sels métalliques, ce qui a pour effet l'augmentation de la contamination métallique présente au niveau des sites d'uranium abandonnés. Les écosystèmes aquatiques constituent donc le récepteur final d'uranium sous différentes formes. Ils peuvent être chroniquement impactés à la fois à sa toxicité chimique largement majoritaire (van Dam et al., 2002) et radiologique (Thomas, 2000).

L'émission de rayonnements ionisants, assimilée à un stress physique, est un phénomène naturel et ubiquiste (radioactivité naturelle comprise entre 0,022 et 0,18 $\mu\text{Gy/h}$ suivant la zone géographique) auquel s'ajoute une radioactivité artificielle générée par les activités humaines (fonctionnement des installations du cycle du combustible, rejets issus des activités industrielles et de la médecine nucléaire, retombées des essais et de Tchernobyl) (UNSCEAR, 1996). Cette radioactivité peut aller jusqu'à plus de 100 mGy/h en contexte accidentel (Gaschak et al., 2011). Il a été récemment suggéré, sur la base de modèles d'extrapolation statistique, que des débits de dose inférieurs à 10 $\mu\text{Gy/h}$ pouvaient être considérés comme acceptables pour la protection des écosystèmes aquatiques (Garnier-Laplace et al., 2006). Néanmoins, il paraît intéressant d'acquérir des données sur les effets potentiels des rayonnements ionisants à des doses inférieures à cette valeur seuil.

Le tritium est un isotope radioactif de l'hydrogène qui émet, en se désintégrant selon une période radioactive de 12,3 ans, un rayonnement β^- de faible énergie (moyenne = 5,7 keV). Il est produit naturellement par la réaction entre les rayonnements cosmiques et l'azote, l'oxygène et l'argon présents dans l'air (Boyer et al., 2009). La quasi-totalité du tritium ainsi formé va se retrouver sous forme libre et intégrer le cycle de l'eau. En France, le tritium d'origine artificielle provient dans sa grande majorité des essais nucléaires atmosphériques réalisés entre 1945 et 1963 et de l'industrie nucléaire. Dans les centres nucléaires de production d'électricité (CNPE), le tritium est rejeté sous forme liquide et gazeuse, à hauteur de $6 \cdot 10^5$ à $4 \cdot 10^6$ Bq/L dans les effluents et jusqu'à 10^8 Bq/mL pour les centres de traitement des combustibles (ASN, 2010). Les projets de recherche actuellement en cours autour de la fusion thermonucléaire contrôlée (ex. projet ITER®) vont être susceptibles d'accroître les rejets de tritium dans

l'environnement. Le tritium gazeux (HT) n'est pas considéré comme toxique pour la faune et la flore. Cependant, dans l'environnement, le tritium est majoritairement sous forme d'eau tritiée (HTO), avec la même biodisponibilité que celle de l'eau. Etant un isotope de l'hydrogène, le tritium sous forme HTO peut également être incorporé aux molécules organiques (organically bound tritium (OBT)) (Bogen et al., 1979).

Parmi l'ensemble des fonctions physiologiques potentiellement perturbées par un polluant, le système immunitaire est considéré comme l'un des plus sensibles (Krzystyniak et al., 1995). Le système immunitaire s'est développé au cours de l'évolution des espèces du fait de nombreuses interactions hôtes-agents infectieux. Ce système contribue au maintien de l'intégrité de l'organisme hôte en éliminant les constituants étrangers (virus, bactéries et parasites), en détruisant les cellules néoplasiques et en rejetant les composants du « non-soi ». Le système immunitaire comprend un réseau de cellules capables de prolifération et de différenciation, régulées par un ensemble de facteurs solubles, et est intimement intégré à d'autres fonctions de l'organisme, notamment les systèmes nerveux et endocrinien, avec lesquels il communique par l'intermédiaire de médiateurs solubles (Krzystyniak et al., 1995). L'immunotoxicité peut être ainsi définie comme la discipline qui étudie l'ensemble des effets délétères provoqués par un xénobiotique sur le système immunitaire à la suite d'une exposition de l'organisme, et les conséquences pour la santé de ce dernier. Une substance chimique est considérée comme immunotoxique lorsque ses effets sont soit une action directe et/ou indirecte sur le système immunitaire, soit une réponse immunologique de l'hôte au polluant (Rehberger et al., 2017). Bien que des changements majeurs dans le système immunitaire soient rapidement exprimés en une morbidité allant parfois jusqu'à la mortalité, ils sont souvent précédés de changements subtils de certains des composants du système immunitaire, ces derniers pouvant alors être utilisés comme des biomarqueurs précoces d'immunotoxicité (Galloway and Depledge, 2001; Rehberger et al., 2017; van der Oost et al., 2003). Les réponses immunitaires innées telles que la phagocytose, qui représentent les premières lignes de défense de l'organisme (Lage et al., 2006), peuvent être altérées par les polluants et peuvent être considérées comme des biomarqueurs pertinents (Bols et al., 2001). L'altération des fonctions immunitaires par des polluants peut également conduire à une augmentation de la sensibilité aux maladies virales, bactériennes et parasitaires ainsi qu'aux tumeurs (Colosio et al., 2005; Rehberger et al., 2017). Selon Snieszko (1974), le déclenchement d'une maladie infectieuse chez un hôte résulte d'interactions conduisant à un déséquilibre entre l'hôte et un agent pathogène qui peut être dû à des facteurs externes (facteurs physico-chimiques, polluants) et/ou internes aux deux protagonistes (virulence de l'agent infectieux, sensibilité accrue de l'hôte). Il a même été proposé que la correcte détermination des capacités immunotoxiques d'un polluant soit fondée sur la mesure de son influence sur le taux de survie après une infection à une souche virulente de bactéries

(Köllner et al., 2002; Zelikoff, 1998). Ainsi, l'étude des biomarqueurs immunologiques semble particulièrement pertinente pour étudier les effets de polluants sur les organismes.

Chez les vertébrés comme chez les invertébrés, de nombreuses molécules telles que les métaux lourds, les HAPs, les PCBs, les pesticides ont été démontrées comme immunotoxiques (Wong et al., 1992). Les effets des substances radioactives sur le système immunitaire ne sont pas toujours clairement définis. Des études réalisées sur les populations humaines soumises aux radionucléides n'ont pas permis de démontrer un lien direct entre immunosuppression et exposition à l'uranium, du fait de nombreux facteurs confondants (irradiation externe et interne, contamination, multipollution). Cependant, de nombreux soldats de la Guerre du Golfe exposés à l'uranium appauvri se sont plaints de symptômes semblant refléter une atteinte du système immunitaire (syndrome de la Guerre du Golfe) (Craft et al., 2004). Une relation dose-réponse a également été observée pour des cancers hématopoïétiques et lymphopoïétiques chez des travailleurs du nucléaire exposés aux radionucléides (uranium et produits de fission) (Ritz et al., 2000). Chez les rats, l'uranium appauvri s'accumule dans les lysosomes des macrophages des cellules rénales, induisant ainsi une apoptose cellulaire (Kalinich et al., 2002; Thiébault et al., 2007), et modifie le nombre de cellules immunitaires de la *lamina propria* (Dublineau et al., 2007) et la réponse inflammatoire (Monleau et al., 2006). L'uranium appauvri induit également la production d'espèces oxygénées réactives et l'oxydation du glutathion dans les hépatocytes de rat (Pourahmad et al., 2006). Une partie de la toxicité de l'uranium appauvri chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, semble également mettre en jeu un stress oxydatif (Barillet et al., 2011; Barillet et al., 2007; Cooley et al., 2000; Labrot et al., 1996). Comme chez les rats, l'uranium appauvri s'accumule également dans les vésicules lysosomes-like dans des cultures de cellules embryonnaires de poisson zèbre ZF4 (Pereira et al., 2012). De plus, l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydatif, l'inflammation et l'apoptose est modifiée par l'uranium appauvri (Lerebours et al., 2009). Chez cette espèce, l'exposition à l'uranium appauvri entraîne également une diminution de l'activité de l'acétylcholinestérase (Barillet et al., 2011; Barillet et al., 2007; Labrot et al., 1996) et une augmentation des dommages à l'ADN chez les embryons (Bourrachot et al., 2008), les cellules germinales (Bourrachot et al., 2014) et les érythrocytes (Barillet et al., 2005).

Les rayonnements ionisants sont largement connus pour leurs effets génotoxiques chez les vertébrés et les invertébrés aquatiques (Adam-Guillermin et al., 2012). Cependant, certaines études ont montré que les rayonnements ionisants à fortes doses pouvaient également avoir des effets sur le système immunitaire des poissons. Une irradiation au ^{137}Cs chez la blennie, *Zoarces viviparus*, a induit une augmentation d'anticorps (Greenwood and Knowles, 1995). Une autre étude a montré la diminution du nombre de cellules immunitaires et de la taille du thymus chez les truites exposées à 50 Gy de ^{60}Co (Chilmonczyk and Oui, 1988). Les rayons γ provoquent également des dommages dans les organes hématopoïétiques et diminuent le nombre de leucocytes chez le poisson rouge, *Carassius auratus*, et la

gambusie, *Gambusia affinis* (Zeeman and Brindley, 1981). Ces résultats tendent à montrer que les rayonnements ionisants peuvent affecter le système immunitaire du poisson d'une manière similaire à celui des mammifères (Adam-Guillermin et al., 2012; Casarett, 1968; Smith and Beresford, 2005).

La toxicité aiguë du tritium sur les animaux aquatiques a été montrée pour de forts débits de dose (Real et al., 2004). Cependant, il existe des lacunes concernant les effets biologiques induits par les faibles niveaux d'exposition, surtout pour les poissons (Adam-Guillermin et al., 2012). La toxicité du tritium chez les poissons a surtout été rapportée au niveau macroscopique (survie, développement, fécondité, comportement) (Adam-Guillermin et al., 2012; Etoh and Hyodo-Taguchi, 1983; Sazykina and Kryshev, 2003). Cependant, il a été montré que de forts débits de dose en tritium peuvent induire de la génotoxicité chez les poissons et les invertébrés marins, notamment une augmentation de la fréquence des micronoyaux, un biomarqueur de dommages chromosomiques (Adam-Guillermin et al., 2012; Jaeschke et al., 2011; Suyama et al., 1981). D'autres effets ont également été démontrés. Par exemple, une diminution des anticorps chez la truite arc-en-ciel, *Onchornychus mykiss* (Strand et al., 1982; Zeeman and Brindley, 1981), ainsi que des effets hormonaux (Erickson, 1971) ont également été rapportés.

Il s'avère donc nécessaire d'approfondir les études pour déterminer les effets des radionucléides sur le système immunitaire du poisson, notamment afin d'améliorer les connaissances dans le contexte des faibles doses. De manière connexe au système immunitaire, le stress oxydant, la génotoxicité et le système nerveux semblent être des voies pertinentes pour évaluer les effets des radionucléides chez les poissons. Les poissons sont des organismes sentinelles pertinents largement utilisés en écotoxicologie. L'efficacité de ce modèle biologique a contribué à son utilisation pour les études de toxicologie, d'immunotoxicité et d'évaluation du risque depuis de nombreuses années (Carlson and Zelikoff, 2005). Parmi les poissons, le poisson zèbre est souvent utilisé comme modèle dans de nombreuses études écotoxicologiques du fait notamment de sa petite taille qui permet de réduire les coûts et les volumes de déchets liés à l'exposition aux polluants (Hill et al., 2005; Martins et al., 2007; OECD, 2004). D'autres espèces de poissons, plus représentatives des espèces vivant dans les rivières en France ou au Canada, peuvent également être utilisées, comme l'épinoche à trois épines, *Gasterosteus aculeatus* (Sanchez et al., 2008a), le gardon, *Rutilus rutilus* (Carru et al., 1996), le chabot, *Cottus* sp (Turnpenny and Williams, 1981) ou le tête de boule, *Pimephales promelas* (Pyle et al., 2001). Une meilleure connaissance des interactions entre les radionucléides et les organismes aquatiques à des concentrations pertinentes d'un point de vue environnemental, au laboratoire et sur le terrain, est donc nécessaire afin de prédire les potentielles conséquences liées à l'exposition à ces polluants.

2.2 Les biomarqueurs, outils pour l'évaluation du risque environnemental

2.2.1 *Evaluation du risque environnemental*

2.2.1.1 Concept

Le concept de l'évaluation du risque environnemental (ERE) est né aux Etats-Unis en 1981, grâce notamment à l'agence de protection environnementale (Environmental Protection Agency, USEPA) (Hayet et al., 2009).

Le risque environnemental est composé de deux variables : le danger et l'exposition. Le danger est la capacité d'une substance à induire des effets néfastes sur un écosystème et les organismes qui y vivent, tandis que l'exposition rassemble les mouvements, émissions, transformations et dégradations de cette substance pour connaître les doses auxquelles l'écosystème peut être exposé (Van Leeuwen and Vermeire, 2007). Le risque est donc la probabilité qu'un effet négatif d'une substance se produise pour une exposition précise (Van Leeuwen and Vermeire, 2007). L'évaluation du risque environnemental est un processus qui combine des données biologiques, les relations dose/réponse et le niveau d'exposition pour produire une estimation qualitative et quantitative des effets nocifs d'une activité ou d'un agent chimique sur un écosystème ou un de ses compartiments. Son but est de caractériser les substances, et de définir dans quelles conditions (concentrations, voies d'exposition, etc.) celles-ci sont capables d'induire des effets néfastes sur l'environnement (Forbes and Forbes, 1997; Scala, 1991).

Le processus d'évaluation du risque environnemental comprend une analyse du risque et un aspect plus politique de gestion du risque (Forbes and Forbes, 1997; Valcke et al., 2012). L'analyse du risque est un processus comprenant les éléments suivants : identification des dangers, évaluation des effets (relation entre dose d'exposition et incidence d'un effet), évaluation des expositions (doses auxquelles les populations humaines ou les écosystèmes peuvent être exposés) et caractérisation du risque (estimer l'incidence des effets délétères de pollutions présentes ou prédictives) ; il s'agit d'un processus scientifique d'estimation de l'importance et de la probabilité des effets. Le management du risque environnemental correspond à la prise en compte de mesures régulatrices fondées sur l'évaluation du risque comme des facteurs d'ordre économique, social, politique, éthique et scientifique pouvant influencer la décision finale. Le risque environnemental sera alors soit accepté soit traité pour essayer de le réduire (Van Leeuwen and Vermeire, 2007).

2.2.1.2 La surveillance environnementale

Des missions de surveillance peuvent ensuite être mises en place afin de s'assurer de l'absence de toute modification du risque ou de la bonne réduction du risque. La surveillance environnementale peut être définie comme l'ensemble des analyses i) chimiques pour vérifier et quantifier la présence d'une

contamination dans un écosystème par la mesure physico-chimique des substances présentes dans les différents compartiments de l'environnement (eau, air, sol) et des différentes formes biodisponibles, et ii) biologiques, ou biosurveillance, qui consiste à détecter et mesurer la concentration des polluants dans les compartiments biologiques des écosystèmes et leurs effets sur le vivant (Besse et al., 2011; Forbes and Forbes, 1997), afin de déterminer l'impact possible de cette contamination sur le vivant et de déterminer l'état de santé d'un écosystème donné. De nombreux outils sont à la disposition des scientifiques pour répondre aux objectifs de la surveillance environnementale (Hopkin, 1993; Peakall and Walker, 1994; van der Oost et al., 2003). Les outils à l'échelle de la population et de la communauté ne seront pas détaillés ici.

Les bioessais sont réalisés au laboratoire, sous conditions contrôlées avec des modèles biologiques connus (ex : daphnie, poisson zèbre, etc.), pour observer les effets d'un polluant sur les traits d'histoire de vie d'un organisme (croissance, reproduction, survie) (van der Oost et al., 2003). Ces outils permettent de connaître les doses nocives d'un polluant pour cet organisme modèle.

Ce type d'outils a été utilisé avec succès pour évaluer les effets d'une contamination par des radionucléides. En effet, suite au déversement accidentel d'uranium au niveau de l'usine nucléaire SOCATRI du Tricastin le 7 juillet 2008, une analyse du potentiel toxique de l'effluent déversé dans le milieu aquatique environnant (eau de la rivière Gaffière) a été réalisée [**ARTICLE 1** : Gagnaire et al. (2011)]. Plusieurs tests d'écotoxicité (batterie de bioessais) ont été réalisés avec l'effluent et avec du nitrate d'uranyle, utilisé comme polluant de référence, à l'aide de quatre espèces modèles représentatives du milieu aquatique : une algue verte unicellulaire, *Chlamydomonas reinhardtii*, un microcrustacé, *Daphnia magna*, une larve benthique d'insecte qui vit dans le sédiment, le chironome *Chironomus riparius*, et le poisson zèbre, *D. rerio* (aux stades œuf et larve). Les CL₅₀ et CE₅₀ aigues obtenues avec l'effluent ont été plus faibles que pour le nitrate d'uranyle pour les algues et les daphnies et du même ordre de grandeur pour les chironomes. Pour le poisson-zèbre, une LOEC de la vitesse d'éclosion d'œufs a été identique pour l'effluent et pour le nitrate d'uranyle ; ce dernier s'est par contre révélé plus toxique sur la survie des larves que l'effluent. Les résultats suggèrent que la biodisponibilité de l'uranium ainsi que des substances autres que l'uranium (fluor, chlore, chrome) présents dans l'effluent pourraient être impliquées dans sa toxicité (INERIS, 2005; Kaniewska-Prus, 1982). Cette approche a permis de conclure que le risque environnemental lié à l'uranium lors de cet accident, ayant eu lieu sur une courte durée, était probablement faible et, mais a pu exister pour certaines espèces.

Les biomarqueurs, second outil permettant de répondre à la surveillance environnementale, sont détaillés au paragraphe suivant.

2.2.2 *Les biomarqueurs*

2.2.2.1 Définition

Il est reconnu que l'évaluation des impacts des polluants sur les organismes requiert la compréhension des effets au travers de la hiérarchie de l'organisation biologique, depuis les niveaux moléculaire et cellulaire jusqu'à ceux de l'organisme et de la population, de la communauté et de l'écosystème (Moore et al., 2004). Cependant, bien que les changements induits par les polluants aux niveaux de la population/communauté/écosystème/santé humaine soient les plus importants à étudier, ces niveaux sont généralement trop complexes pour servir au développement d'outils pour la détection précoce et la prédiction des conséquences du risque environnemental (Moore et al., 2004). Il faut donc tenter de détecter des signaux de détresse aux niveaux moléculaire et cellulaire et de les lier aux conséquences possibles aux niveaux d'organisation plus élevés (Moore, 2002). Ces signaux peuvent être considérés comme des effets indirects des polluants, les effets directs correspondant à la mortalité, observée lors d'une contamination accidentelle par exemple (Peterson et al., 2003). Les biomarqueurs peuvent être définis comme des « changements structuraux ou fonctionnels observables et mesurables, qui prennent place à différents niveaux de l'organisation biologique, depuis la molécule jusqu'à l'organisme pris dans son intégralité, qui traduisent une exposition persistante ou passée d'un individu à une ou plusieurs substances polluantes » (Lagadic et al., 1997).

Les effets à des niveaux hiérarchiques élevés sont toujours précédés de changements précoces dans les processus biologiques, permettant le développement de biomarqueurs d'alerte précoce. Les toxiques présents dans l'environnement sont absorbés par les organismes vivants et se répartissent dans les tissus où ils interagissent avec différentes molécules biologiques. En présence d'un stress environnemental, les individus sont capables de s'adapter à leur environnement via des modulations réversibles de leurs réponses physiologiques, qui se traduisent par une (ou des) variation(s) de paramètres biochimiques pouvant être utilisés comme biomarqueurs de l'exposition de l'organisme aux toxiques. Au-delà d'un certain seuil (dans la dose du polluant ou la durée d'exposition), les signaux de réponses au polluant dévient de l'état basal, conduisant à la manifestation de nombreux effets à des niveaux hiérarchiques élevés de l'organisation biologique (**Figure 1**). Les changements biochimiques induits par la présence du toxique peuvent avoir des effets physiologiques sur les individus lorsque les capacités d'adaptation sont dépassées (Depledge and Fossi, 1994). Lorsque ces modifications physiologiques affectent plusieurs d'individus, les effets des toxiques sont décelables au sein des populations dont les performances écologiques (taux de croissance, expansion, efficacité d'utilisation des ressources, adaptabilité, etc) peuvent être perturbées. A terme, les déséquilibres provoqués par la disparition ou, au contraire, l'expansion excessive de populations de certaines espèces (espèces bioindicatrices) peuvent se répercuter au niveau des communautés, modifiant ainsi la structure et le fonctionnement de l'écosystème dans son ensemble.

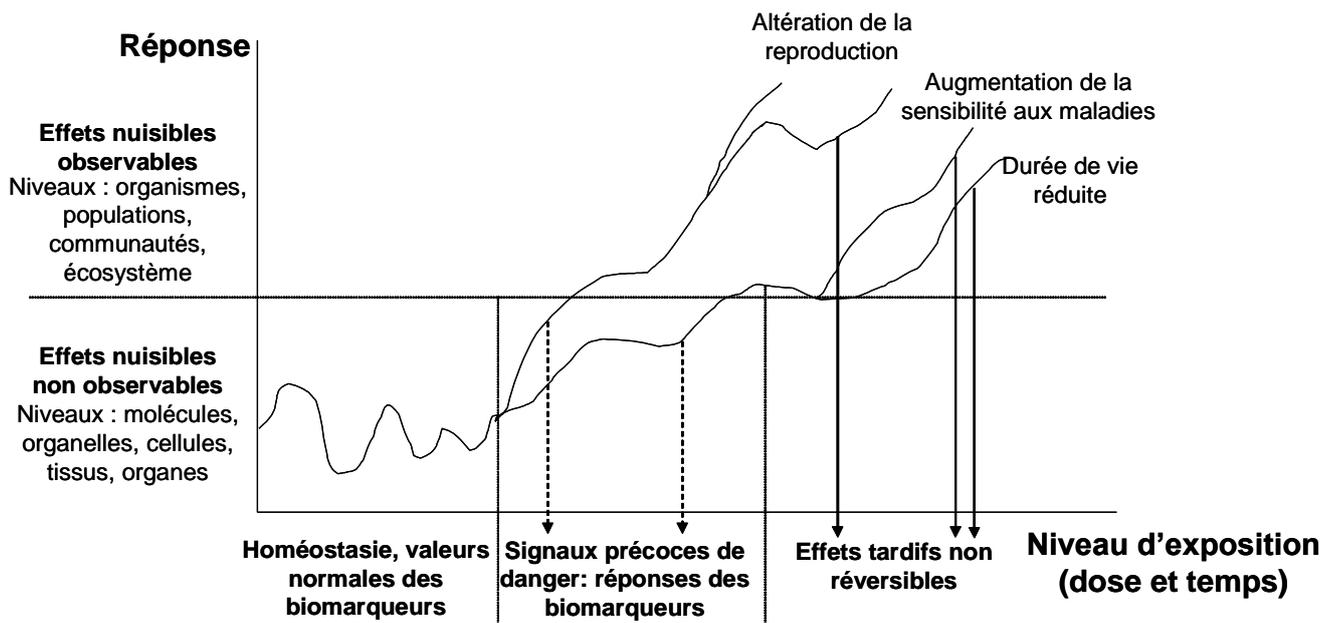


Figure 1 : schéma des réponses des organismes aux effets délétères de l'exposition à des polluants (modifié d'après van der Oost *et al.*, 2003).

Afin d'être utilisable en évaluation du risque, un biomarqueur doit respecter plusieurs critères (Burgeot and Bessinetton, 1999; Huggett et al., 1992; van der Oost et al., 2003) :

- Un biomarqueur se doit d'être évalué facilement et rapidement, être le moins invasif possible tout en étant fiable ;
- La réponse du biomarqueur doit être sensible à l'exposition au polluant et doit pouvoir servir de marqueur précoce d'alerte ;
- Les mécanismes sous-jacents des relations entre la réponse du biomarqueur et l'exposition au polluant (dose et temps) doivent être établis ;
- La signification toxicologique du biomarqueur, *i.e.* les relations entre sa réponse et l'impact à long terme sur l'organisme, doit être établie ;
- Les impacts de plusieurs facteurs sur le biomarqueur doivent être établis ;
- La variabilité basale des biomarqueurs (due aux paramètres biotiques et abiotiques) doit être connue et prise en compte dans les analyses ;
- Le temps de réponse des biomarqueurs à une contamination spécifique doit être connu.

Cependant ces critères sont rarement tous respectés (Flammarion et al., 2001). Les critiques les plus fréquentes sont liées au manque de recul sur la correspondance entre la variabilité des réponses biologiques et les effets d'une exposition à des polluants, ou plus simplement, à partir de quel niveau les variations mesurées des réponses biologiques correspondent à un effet ou une réponse à l'exposition à un

polluant. De surcroît, hormis au laboratoire, où les conditions environnementales de l'exposition peuvent être calibrées/contrôlées, des facteurs confondants peuvent augmenter la variabilité des réponses biologiques mesurées. De plus, comme de nombreuses substances peuvent affecter les mêmes biomarqueurs, la plupart des réponses des biomarqueurs ne sont pas spécifiques des composés. Leur comportement de dose-réponse n'est que rarement prédictible du fait du manque de connaissances sur les réponses de base des animaux (van der Oost et al., 2003). Enfin, peu d'études ont réussi à faire le lien entre les réponses biologiques évaluées au sein d'un individu et les conséquences sur la population ou la communauté. Le caractère prédictif des biomarqueurs est aussi remis en cause car les niveaux de dommages ou de réponses peuvent évoluer au cours du temps d'exposition, de la vie d'un organisme ou au fil des générations (Forbes et al. (2006)).

Malgré ces critiques justifiées, les biomarqueurs présentent des avantages certains et reconnus par la communauté scientifique, qui leur confèrent une place privilégiée dans des programmes de surveillance environnementale chez les poissons. C'est le cas notamment pour la vitellogénine, l'activité EROD, les dommages à l'ADN (essai des comètes, micronoyaux et adduits), la stabilité de la membrane lysosomale, l'acétylcholinestérase et les métallothionéines, utilisés dans de nombreux programmes internationaux (BEEP, ONED, MEDPOL, BEQUALM) (ICES, 2004). Ces biomarqueurs ont également été inclus comme paramètres à surveiller pour l'atteinte du bon état environnemental dans le descripteur 8 (contaminants) de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin par le biais de la convention OSPAR (Davies and Vethaak, 2012; Vethaak et al., 2017). La stabilité de la membrane lysosomale et les atteintes à l'ADN (micronoyaux et altérations par le test des comètes) ont également été incluses dans la Directive Cadre sur l'Eau¹ comme étant des indicateurs des effets de pollution sur les composants de l'écosystème à prendre en compte dans l'atteinte du bon état écologique des masses d'eau. Ceci démontre la pertinence de prendre en compte les biomarqueurs dans l'évaluation du risque environnemental.

2.2.2.2 Batterie de biomarqueurs

L'analyse d'un seul biomarqueur ne peut ni refléter l'état de contamination d'un milieu, ni l'étendue des réponses de l'organisme soumis à cette contamination (Sanchez, 2007). Il est donc préférable d'utiliser une approche multi-biomarqueurs (Bacchetta et al., 2014; Sanchez, 2007). Cette approche multi-biomarqueurs n'est utile que si les biomarqueurs utilisés sont complémentaires (Amiard and Amiard Triquet, 2008; Galloway et al., 2004). En effet, un ensemble de biomarqueurs centralisés sur une seule fonction biologique, comme par exemple la reproduction, ne permet pas d'observer les effets globaux de la contamination. L'intérêt d'une approche multi-marqueurs est de faire intervenir des biomarqueurs

¹ Arrêté du 17 décembre 2012 relatif à la définition du bon état écologique des eaux marines (<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000026864150&categorieLien=id>)

généralistes qui permettent de caractériser rapidement un dysfonctionnement de la fonction étudiée et d'autres biomarqueurs plus précis, qui donnent des indications sur les mécanismes d'action (Brousseau et al., 1997). Cette approche se développe depuis le développement d'outils permettant d'intégrer les réponses de plusieurs biomarqueurs (Beliaeff and Burgeot, 2002). Par ailleurs, en améliorant les connaissances sur la variabilité des réponses biologiques sans contamination, ces biomarqueurs pourraient garder leur rôle de signal précoce de perturbation chez un organisme et ainsi être intégrés dans une approche multi-paramétrique et multi-organisationnelle (différents niveaux du vivant) permettant d'améliorer l'évaluation du risque environnemental (Sanchez and Porcher, 2009). L'utilisation simultanée de plusieurs biomarqueurs apparaît comme l'approche la plus satisfaisante pour le diagnostic des effets des polluants sur les individus (Lagadic et al., 1997). Une approche multi-biomarqueurs, incluant des marqueurs tels que les radicaux libres oxygénés et les essais comètes, est également recommandée dans le cadre des études épidémiologiques liées aux rayonnements ionisants chez l'homme (Pernot et al., 2012).

Une approche multi-biomarqueurs a donc été mise en place lors des études réalisées dans ce travail en mettant au point la mesure de biomarqueurs d'immunotoxicité, du stress oxydant, de génotoxicité, de détoxification, de neurotoxicité et des indices physiologiques.

2.2.3 Biomarqueurs sélectionnés pour diagnostiquer l'état de santé des organismes

2.2.3.1 Biomarqueurs immunologiques

Le système immunitaire du poisson a été largement étudié et décrit (Carlson and Zelikoff, 2005). Ce système met en jeu des mécanismes de défense non spécifiques et spécifiques selon des processus à médiation cellulaire et humorale. D'une manière générale, le système immunitaire des téléostéens est très proche de celui des mammifères. L'immunité non spécifique est toutefois prépondérante chez le poisson (Ellis, 1999; Whyte, 2007). La réponse cellulaire non spécifique est constituée de cellules de défense élaborées par des organes lymphoïdes (rein antérieur, thymus, rate) (Zapata et al., 2006). Plusieurs types de leucocytes se rencontrent dans le sang (monocytes, lymphocytes, granulocytes) en nombre variable en fonction de l'état sanitaire du poisson (Ellis, 1989). Parmi ces cellules, celles liées à l'immunité non-spécifique sont principalement produites dans le rein antérieur du poisson avant de se retrouver dans le sang, c'est notamment le cas des cellules de la lignée Monocyte/Macrophage et des cellules granulocytaires neutrophiles circulantes (Whyte, 2007; Zapata et al., 2006). Ces deux catégories de cellules sont responsables du processus de phagocytose constituant une importante réponse de défense de l'organisme à la base de l'élimination non spécifique d'agents pathogènes. Au cours de la phagocytose, la destruction des particules antigéniques passe par une libération de composés chimiques (enzymes, radicaux libres oxygénés ou espèces oxygénées réactives (EOR)) provenant du lysosome fusionnant avec le phagosome, formant le phagolysosome, potentiel lytique de la cellule phagocytaire (Neumann et al.,

2001) (**Figure 2**). Dans ce contexte, la réponse microbicide productrice d'espèces réactives de l'oxygène (anions superoxyde, peroxyde d'hydrogène...) porte le nom de flambée respiratoire (Ellis, 1989). Du fait de leur très grande réactivité, ces dérivés de l'oxygène peuvent réagir avec la plupart des composés cellulaires et devenir toxiques pour l'individu. Le contrôle rigoureux de leur formation et de leur élimination par le biais de différents systèmes antioxydants (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase) préserve donc les cellules de leurs effets délétères (Ellis, 1989).

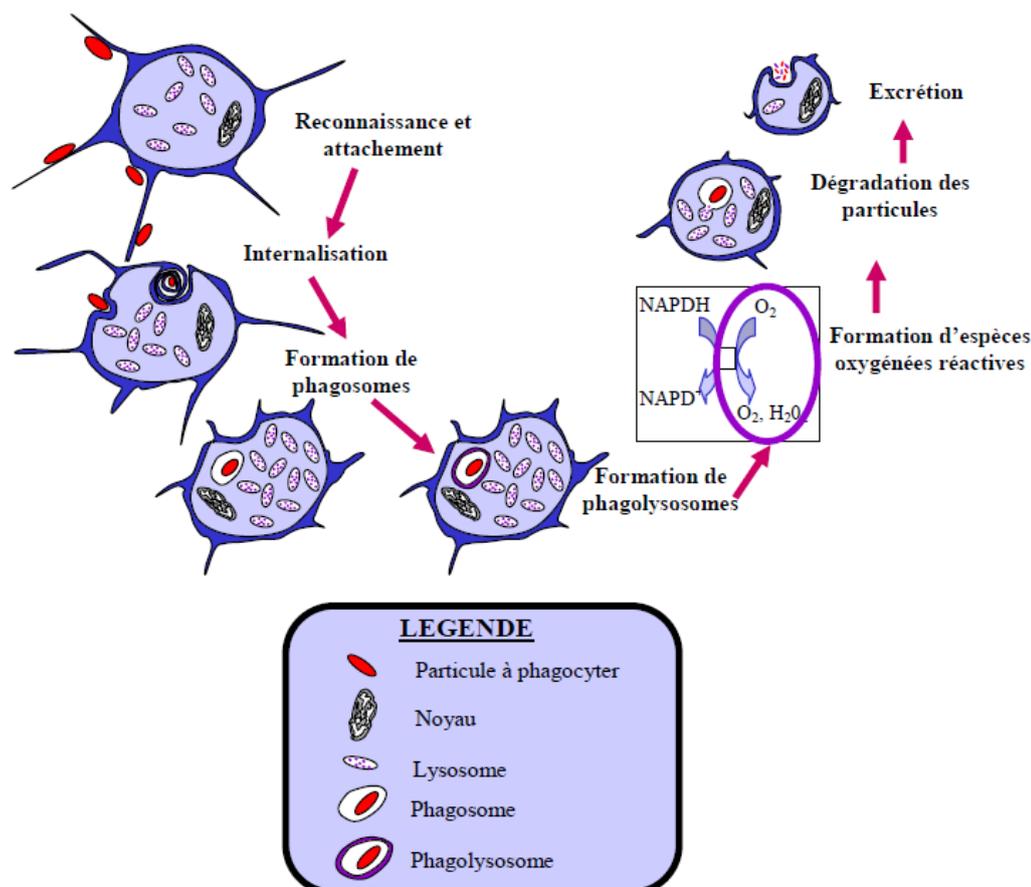


Figure 2 : mécanisme général de la phagocytose ; d'après Bado-Nilles (2017).

La phagocytose étant l'un des mécanismes prépondérants de la réponse immunitaire innée chez les poissons et ayant démontré sa capacité à une immunomodulation dans de nombreuses circonstances (Fournier et al., 2000), la mise au point de la mesure de cette activité par cytométrie de flux semble être pertinente pour l'évaluation des effets des radionucléides sur le système immunitaire des poissons. En effet, cet outil de routine dans le domaine de la recherche biomédicale humaine est de plus en plus utilisée dans d'autres domaines de recherches, notamment en écotoxicologie, sur les invertébrés tels que les mollusques bivalves (Gagnaire et al., 2006; Sauvé et al., 2002) et chez les vertébrés tels que les poissons (Bado-Nilles et al., 2009; Chilmonczyk and Monge, 1999).

Dans ce travail, la capacité de phagocytose a été évaluée en suivant l'ingestion de billes fluorescentes, tel que précédemment décrit chez différentes espèces (Fournier et al., 2000). La mesure des espèces oxygénées réactives libérées lors de la phagocytose a également été réalisée par cytométrie en flux en utilisant le marqueur 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) (Chilmonczyk and Monge, 1999). Cette molécule stable non fluorescente est d'abord convertie en DCFH par une estérase, puis en DCF (fluorescente) par une peroxydase en présence d'H₂O₂. La mesure de la fluorescence de la DCF est un indicateur de la production de H₂O₂. Cette mesure a été réalisée en présence et en absence de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), l'inducteur le plus spécifique de la flambée oxydative, qui stimule l'ensemble des processus qui a lieu lors de la flambée oxydative, au cours de laquelle la NADPH oxydase et la superoxyde dismutase catalysent les réactions aboutissant à la formation d'H₂O₂. L'indice de production des EOR est réalisé par un ratio de la mesure de l'H₂O₂ total produit en présence et en absence de PMA. Enfin, la mesure de ces activités n'a de sens que si elle est réalisée sur des cellules vivantes. Il est donc primordial d'évaluer l'état de santé des cellules parallèlement aux mesures d'activités. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus physiologique irréversible qui contrebalance la division cellulaire (Wendelaar Bonga, 1997), et dont le but principal est de détruire les cellules endommagées. Ce biomarqueur est réellement utile s'il est analysé en parallèle avec une autre mort cellulaire, la nécrose, car ces deux types de morts cellulaires sont liées. La mesure de ces deux paramètres a été réalisée par un double marquage iodure de propidium (qui pénètre les cellules dont la membrane est lésée et marque l'ADN) et du YO-PRO®-1, qui pénètre les cellules apoptotiques suite à l'activation du récepteur purinergique P2X7 (Baraldi et al., 2004).

Dans le cadre de collaborations avec l'INERIS et l'Université de Reims et dans le cadre de la thèse d'Antoine Le Guernic, les protocoles de mesure de la phagocytose, des EOR, de la nécrose et de l'apoptose ont été mis au point sur les leucocytes de l'épinoche à trois épines, *G. aculeatus* (**Figure 3**) [**ARTICLE 2** : Bado-Nilles et al. (2014b)] ; (Le Guernic et al., communication personnelle), du poisson zèbre adulte, *D. rerio* (**Figure 4**) [**ARTICLE 3** : Gagnaire et al. (2014) ; données non publiées pour l'apoptose] et du tête de boule, *P. promelas* [**ARTICLE 4** : Gagnaire et al. (2017)], en cytométrie de flux. La mesure des EOR a également été réalisée par une mesure *in toto* de fluorescence sur la larve vivante et sur le rein du poisson zèbre adulte [**ARTICLE 5** : Gagnaire et al. (2013)], en se basant sur un protocole existant (Hermann et al., 2004). La mise au point de ces immunomarqueurs chez les poissons permettra d'évaluer leur potentiel en tant que marqueurs d'une contamination aux radionucléides (cf. §2.2.3.1).

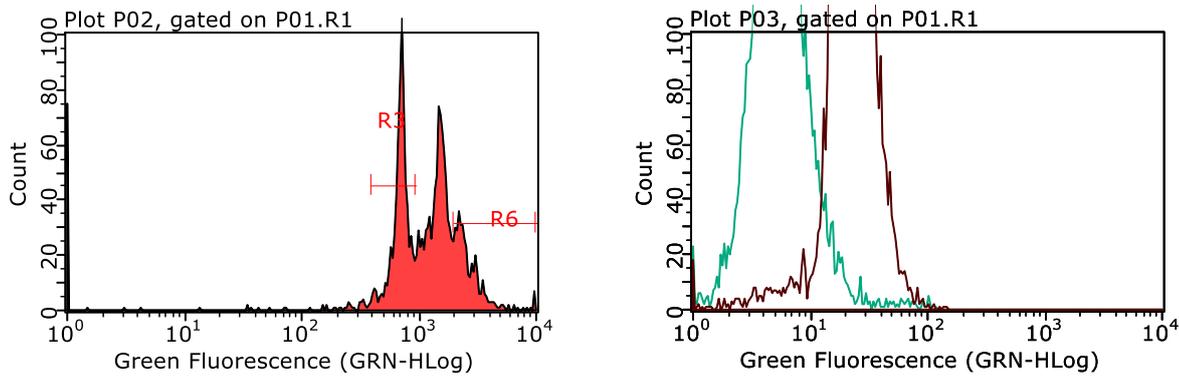


Figure 3 : histogramme représentant la fluorescence (FL1) suite à une incubation de leucocytes spléniques d'épinoche avec des microbilles fluorescentes (à gauche) et après une incubation avec du H₂DCF-DA (activité basale, tracé vert) et PMA (activité stimulée, tracé noir).

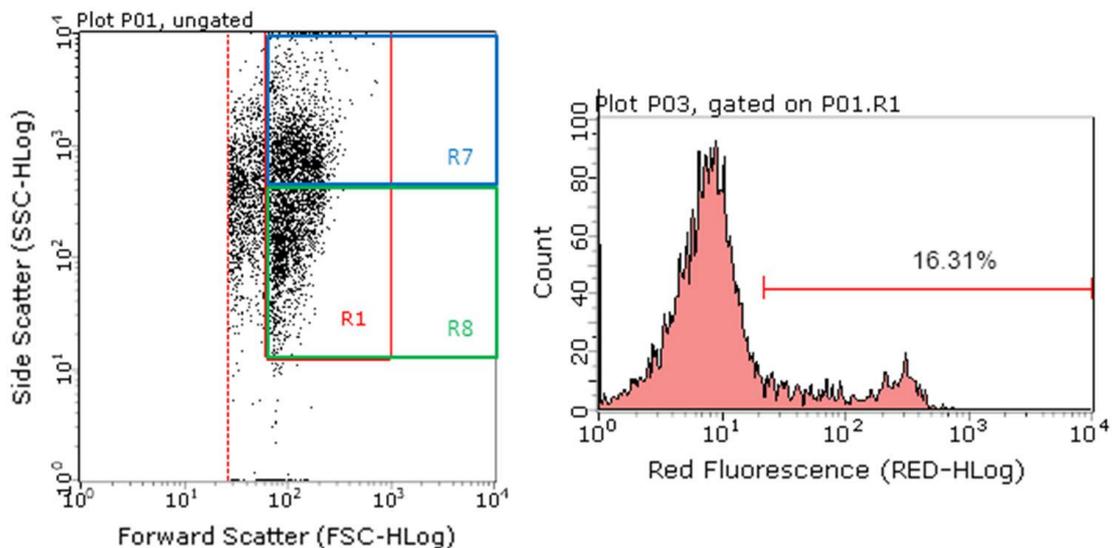


Figure 4 : cytogramme représentant la taille (FSC) et la complexité (SSC) des leucocytes rénaux chez le poisson zèbre. La population R1 est celle utilisée pour l'analyse, excluant les débris. Les populations R7 et R8 correspondent respectivement aux granulocytes-macrophages et aux lymphocytes. A droite, l'histogramme montre le pourcentage de cellules mortes mesurées dans la population R1 marquée avec l'iodure de propidium.

Les lysosomes, organites cellulaires présents dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes, contiennent de nombreuses enzymes hydrolytiques ayant pour fonction d'effectuer la digestion intracellulaire et extracellulaire (Whyte, 2007). Leur membrane peut être déstructurée par de nombreux polluants. La stabilité de la membrane lysosomale est donc un biomarqueur largement étudié chez les invertébrés par des techniques principalement microscopiques (Moore et al., 2004). Chez les Téléostéens, peu d'études se sont penchées sur la mise au point d'une mesure de la stabilité de la membrane lysosomale. Afin de

disposer d'un outil plus reproductible et pratique à mettre en œuvre, nous avons substitué l'analyse en microscopie des altérations lysosomales par des tests en cytométrie de flux. En effet, une caractérisation individuelle, quantitative et qualitative des lysosomes cellulaires par cytométrie de flux présente l'avantage de réduire la subjectivité des observations histologiques des échantillons tout en étant représentatif de l'organe dans son ensemble. Cette technique permet également une réduction de la variabilité inter-laboratoire tout en accroissant la sensibilité du test proposé et en augmentant le débit de lecture des échantillons. Le test développé est basé sur un fluorophore métachromatique spécifique des lysosomes : l'acridine orange. Lorsque ce fluorophore est retenu dans le compartiment lysosomal, il fluoresce en rouge ; lors de la déstructuration des membranes lysosomales, il se déverse dans le cytosol cellulaire et fluoresce alors en vert (Kurz et al., 2008). Le marquage spécifique de l'acridine orange a été confirmé par une incubation avec différentes concentrations en L-leucine methyl ester hydrochloride, un agent lysosomotropique. Ce marqueur a d'abord été développé sur l'épinoche [ARTICLE 6 : Bado-Nilles et al. (2013)] avant d'être adapté au poisson zèbre [ARTICLE 3 : Gagnaire et al. (2014)] et au tête de boule [ARTICLE 4 : Gagnaire et al. (2017)]. Ce travail a permis de mettre au point un marqueur robuste, l'intégrité de la membrane lysosomale (LMI), pour appréhender les effets des polluants sur le système immunitaire des poissons.

La phénoloxydase (PO) est une enzyme cuivre-dépendante (Coles and Pipe, 1994), détectée dans l'hémolymphe (fraction acellulaire et hémocytes) chez plusieurs espèces d'invertébrés. Cette enzyme est capable d'oxyder les monos et di-phénols : elle catalyse la réaction de conversion de la L-dihydrophénylalanine (L-dopa) et de la dopamine en dopaquinone. Cette molécule peut à son tour être polymérisée en mélanine en produisant différents intermédiaires à propriétés bactéricides (Coles and Pipe, 1994; Söderhäll and Cerenius, 1998). La PO existe pour beaucoup d'espèces dans les cellules sous une forme inactive, la pro-phénoloxydase (pro-PO). Ce système a été également détecté chez certaines espèces de poissons, comme le tilapia, *Oreochromis niloticus* (Witten et al., 1998), le tambour, *Müichthys miiuy* (Song et al., 2006) et la brème, *Megalobrama terminalis* (Zhang et al., 2013). Cette activité a donc été mise au point avec succès chez le poisson zèbre dans le plasma et sur les larves *in toto* [ARTICLE 5 : Gagnaire et al. (2013)].

2.2.3.2 Autres biomarqueurs

La génération d'EOR, détaillée au paragraphe précédent, implique la création d'un stress oxydant dans les cellules. Plusieurs enzymes ont évolué dans les cellules aérobies pour contrebalancer les effets dévastateurs des EOR. Elles sont utilisées pour maintenir l'équilibre oxydatif pendant le stress oxydatif et sont appelées les enzymes antioxydantes. Les superoxyde dismutases (SOD), le glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GR) et la catalase (CAT) sont les principaux enzymes de défense des

cellules (Pandey and Rizvi, 2010). Elles confèrent une protection en neutralisant directement les radicaux superoxydes et le peroxyde d'hydrogène, en les convertissant en des espèces moins réactives. La SOD catalyse la dismutation du radical superoxyde (O_2^{\bullet}) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Bien que l' H_2O_2 ne soit pas un radical, il est rapidement converti par la réaction de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$) en radical OH^{\bullet} qui lui est très réactif. La GPx neutralise l' H_2O_2 en prenant les hydrogènes des deux molécules de glutathion réduit (GSH) résultant des deux H_2O et du glutathion oxydé (GSSG). La GR régénère le GSH à partir du GSSG. Enfin, la CAT, qui représente une partie importante de la défense enzymatique, neutralise l' H_2O_2 en H_2O (**Figure 5**).

La mesure de l'activité ces différentes enzymes impliquées dans la régulation du stress oxydant est largement utilisée pour évaluer la réponse à un stress de type contaminant chez les poissons (Ahmad et al., 2006; Eyckmans et al., 2011; Fernández-Dávila et al., 2012; Kelly and Janz, 2009; Maria et al., 2009; Sanchez et al., 2008b). Ainsi, la mesure de la CAT, de la SOD et du GPx a été développée chez le têtard de poisson à partir de protocoles existants afin de disposer d'un panel d'outils pour évaluer l'effet des radionucléides sur le stress oxydant chez les poissons [ARTICLE 4 : Gagnaire et al. (2017)].

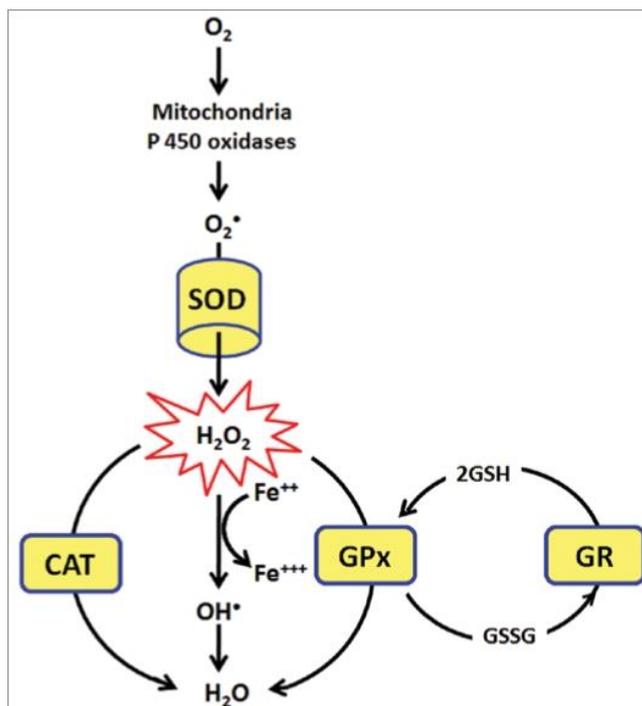


Figure 5 : mécanisme général de la balance antioxydante ; d'après Pandey and Rizvi (2010).

Afin de se protéger face aux agressions cellulaires des composés organiques toxiques, des réactions enzymatiques se mettent en place pour modifier le xénobiotique (enzymes de phase I, II et III) (Parant, 1998). Les enzymes de phase I fonctionnalisent le xénobiotique par une réaction de monooxygénation (introduction d'un atome d'oxygène) de manière à le rendre plus réactif, ce qui facilite la suite du métabolisme. Cette phase fait intervenir les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP) et à flavine

(FMO) ainsi que d'autres composants (cytochrome b5, cytochrome b5 réductase, cytochrome c réductase, NADPH, NADH). Ainsi, l'activité EROD (7-ethoxyresufin-O-deethylase), souvent proposée comme biomarqueurs de pollution dans l'environnement aquatique (van der Oost et al., 2003), a été recherchée chez l'adulte (foie) et les larves *in toto* de poisson zèbre, afin de disposer d'un paramètre indicateur des capacités de détoxification [**ARTICLE 5** : Gagnaire et al. (2013)].

Une autre fonction physiologique largement impactée par les polluants de diverses natures est la neurotoxicité. Son impact se mesure classiquement en écotoxicologie par le dosage de l'acétylcholinestérase (AChE). L'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur qui véhicule l'information nerveuse entre neurones ou entre un neurone et un muscle squelettique au niveau des synapses, par sa liaison sur les récepteurs cholinergiques qui permet la propagation de l'influx nerveux et notamment la contraction musculaire. Le rôle de l'AChE est d'hydrolyser l'ACh en choline et acide acétique, inactivant les récepteurs cholinergiques et permettant au système cholinergique de se mettre au repos. Si l'AChE est inhibée par une contamination, l'ACh se trouvera en quantité trop importante dans la fente synaptique, maintenant l'activité permanente du système cholinergique. Ceci peut entraîner un dysfonctionnement irréversible de la synapse, qui ne pourra plus transmettre l'information nerveuse (Bocquené et al., 1997; Sturm et al., 2000). De nombreux polluants sont connus pour être neurotoxiques, notamment les pesticides (van der Oost et al., 2003), mais certains radionucléides comme l'uranium ont démontré des effets sur l'AChE (Barillet et al., 2007). La mesure de l'AChE a donc également été sélectionnée comme biomarqueur d'effet potentiel des radionucléides et a été suivie chez les larves de poisson zèbre [**ARTICLE 7** : Gagnaire et al.(2015c)] ainsi que le tête de boule [**ARTICLE 4** : Gagnaire et al. (2017)].

Enfin, certains biomarqueurs n'ont pas été développés au sens strict dans le cadre de ce travail, mais ont été ajoutés aux études du fait de la présence de compétences au sein des équipes pour les mesurer et de leur pertinence pour améliorer la compréhension des modes d'actions toxiques des radionucléides. Il s'agit des marqueurs de génotoxicité et des indices morphométriques.

L'ADN, centre de l'information génétique, peut être la cible de polluants, soit directement, comme c'est le cas pour les radiations ionisantes ou certains produits chimiques, soit indirectement via la production d'ERO (Lee and Steinert, 2003). Les conséquences des agents génotoxiques sont variées, en agissant sur l'ADN via l'oxydation de bases azotées, la création de pontages ADN-protéines, des adduits, des cassures simples ou doubles brins, ou bien en agissant sur les systèmes de réparation de l'ADN. Ces lésions arrivent très fréquemment, mais sont réparées par la cellule. Cependant, lorsque les dommages sont trop nombreux

ou importants, ou encore lors d'un dysfonctionnement des mécanismes de réparation, les dommages sont conservés et les conséquences peuvent aller jusqu'à l'apoptose ou la nécrose (Favier, 2003).

Le suivi des dommages à l'ADN et des mécanismes de réparation est donc très pertinent en écotoxicologie est notable puisque leurs conséquences peuvent se répercuter sur plusieurs niveaux d'organisation du vivant, de l'individu à la population (Akcha et al., 2004). Le test des comètes est une technique sensible pour la détection des cassures doubles brins de l'ADN dans les cellules eucaryotes (Collins, 2004; Devaux et al., 1998). La phosphorylation de l'histone H2AX en gamma-H2AX est aussi une cible sensible pour la quantification des cassures doubles brins qui peuvent être réparées (Ward et al., 2003). La fréquence des micronoyaux (MN), un marqueur de dommages chromosomiques, peut également être augmentée par les radiations ionisantes (Jaeschke et al., 2011). Les avantages de l'évaluation des dommages à l'ADN ont conféré à ce biomarqueur une utilité lors de programme de surveillance (Sanchez and Porcher, 2009). Le suivi de ces différents marqueurs a donc été intégré aux autres biomarqueurs développés dans ce travail, sur le poisson zèbre, l'épinoche et le tête de boule.

Les biomarqueurs biochimiques à eux seuls ne peuvent pas donner d'indication sur l'état global de la physiologie du poisson. A cette fin, les indices morphométriques, qui sont des données biométriques permettant d'obtenir des données sur le bien-être, la croissance et le cycle de développement des organismes, sont couramment utilisés. Ces indices ne sont pas précoces mais peuvent traduire physiologiquement les altérations biochimiques au niveau individuel, et doivent donc être associés à ces mesures biochimiques aux niveaux d'organisation biologique moins élevés (tissu, cellule ou molécule) (Amara et al., 2009). De ce fait, l'indice de condition de Fulton et les indices hépato-, spléno et gonadosomatiques (HSI, SSI et GSI) ont été intégrés dans les études qui s'y prêtaient afin de faire le lien entre marqueurs biochimiques et physiologiques.

Ce chapitre sur les biomarqueurs présente et justifie les **choix des biomarqueurs** qui ont été sélectionnés dans ce travail pour **caractériser les modes d'actions et les effets** dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental lié aux rayonnements ionisants et aux radionucléides. Parmi toutes les fonctions physiologiques susceptibles d'être impactées par ces contaminants, un effort a été mis sur les **biomarqueurs du système immunitaire**, pour toutes les raisons évoquées dans le chapitre. Cependant, des biomarqueurs des **systèmes connexes** tels que les **défenses anti-oxydantes**, la **neurotoxicité**, la **génétoxicité**, ainsi que les **indices morphométriques** ont été inclus dans l'étude. Cette liste ne saurait être exhaustive et de nombreux autres systèmes seraient intéressants à étudier, tels que la **reproduction** et le **système endocrinien**, qui sont évoqués dans les perspectives de ce travail (question Q2).

2.3 Caractérisation de la dose afin d'établir le lien entre la dose et l'effet

2.3.1 Notion d'accumulation

2.3.1.1 Définitions

L'accumulation des polluants dans les tissus permet de fournir les concentrations des produits chimiques emmagasinés dans les êtres vivants ou dans une partie de leur organisme (Besse et al., 2011; van der Oost et al., 2003). Cette mesure est donc complémentaire à l'évaluation des concentrations des polluants dans le milieu. Elle inclut la bioconcentration, la bioaccumulation et la bioamplification (Arnot and Gobas, 2006; Luoma and Rainbow, 2005; Rainbow, 2007).

L'accumulation des polluants se fait d'abord par les membranes cytoplasmiques des organismes. Indépendamment des sources de contamination et des mécanismes qui y conduisent, il y a accumulation lorsque les apports de contaminants à l'organisme dépassent les quantités éliminées. Ces apports peuvent se faire à partir de l'eau lors de la respiration, par l'alimentation ou par contact direct (Arnot and Gobas, 2006).

- La bioconcentration est l'accumulation par un organisme d'un contaminant à partir de l'eau uniquement. Le facteur de bioconcentration (BCF), mesuré à l'équilibre, relie la concentration dans le biote à celle mesurée dans l'eau. Il est fortement influencé par la biodisponibilité des espèces chimiques présentes dans l'environnement. La connaissance de la spéciation chimique des polluants est donc primordiale pour caractériser précisément son entrée dans l'organisme.

- La bioaccumulation est l'accumulation d'une substance à partir de l'eau et de la nourriture. L'apport de contaminant par voie alimentaire implique donc qu'il y ait eu bioconcentration aux niveaux trophiques inférieurs. A la différence de la bioconcentration, la bioaccumulation est un phénomène dynamique qui résulte de nombreux processus biologiques propres à chaque espèce : la respiration et l'alimentation agissent sur l'apport de contaminant à l'organisme (« uptake ») tandis que l'excrétion, la métabolisation (biotransformation), la reproduction et la dilution par la croissance participent à l'élimination du contaminant (« clearance »). Le facteur qui la décrit est le facteur de bioaccumulation (BAF).

- La bioamplification traduit l'augmentation de la contamination d'un niveau trophique à l'autre. La concentration accumulée est alors plus importante chez le prédateur par rapport à sa proie.

2.3.1.2 Toxicité chimique : cas de l'uranium

La toxicocinétique et la toxicodynamique de l'uranium appauvri ont été étudiées lors d'une expérience où des poissons zèbres mâles et femelles ont été exposés à une concentration nominale dans l'eau de 20 µg/L pendant 28 jours, suivi d'une période de dépuración de 27 jours [**ARTICLE 8** : Simon et al. (2019)]. Le profil d'accumulation et de dépuración de l'uranium appauvri dans différents organes du poisson (peau, branchies, rein, foie, tractus digestif, cerveau, gonades, muscle et reste du corps) a ainsi été dressé. La distribution en uranium appauvri dans les organes du poisson s'est révélée en accord avec de précédentes études (Barillet et al., 2011; Barillet et al., 2007; Bourrachot et al., 2014). Il en ressort que l'uranium appauvri s'accumule plus rapidement dans le tractus digestif, les gonades et le foie que dans les reins. L'uranium appauvri s'accumule également dans une moindre mesure dans les branchies et la peau, qui sont pourtant les barrières biologiques, organes en contact avec le polluant. A la fin de la dépuración, les concentrations en uranium appauvri étaient toujours supérieures aux contrôles dans tous les organes à l'exception du tractus digestif. Les concentrations accumulées dans les reins, le cerveau et les gonades étaient encore élevées (**Figure 6**). Cette étude a permis de mieux appréhender le profil toxicodynamique de l'uranium, étape indispensable pour relier les concentrations accumulées avec les effets biologiques.

Une autre étude toujours sur l'uranium a été conduite chez le poisson zèbre afin d'évaluer le transfert de l'uranium appauvri par la voie directe (exposition à l'eau seule, 20 µg/L) par une double exposition combinant voie directe (eau, 20 µg/L) et voie trophique (nourriture, 10,7 µg/g d' U^{233}) pendant 20 jours [**ARTICLE 9** : Simon et al. (2019)]. L'accumulation de l'uranium a été évaluée dans les branchies, le foie, le rein, l'intestin et les gonades. Les concentrations dans les organes étaient équivalentes entre les deux types de contamination ; l'intestin présentait les concentrations les plus fortes et le rein les plus faibles. Le transfert trophique de l'uranium était faible (< 10 ng/g p.f.) mais a été démontré ; il semble être une voie potentielle de transfert d'uranium dans les écosystèmes naturellement contaminés et doit être pris en compte dans l'évaluation du risque environnemental.

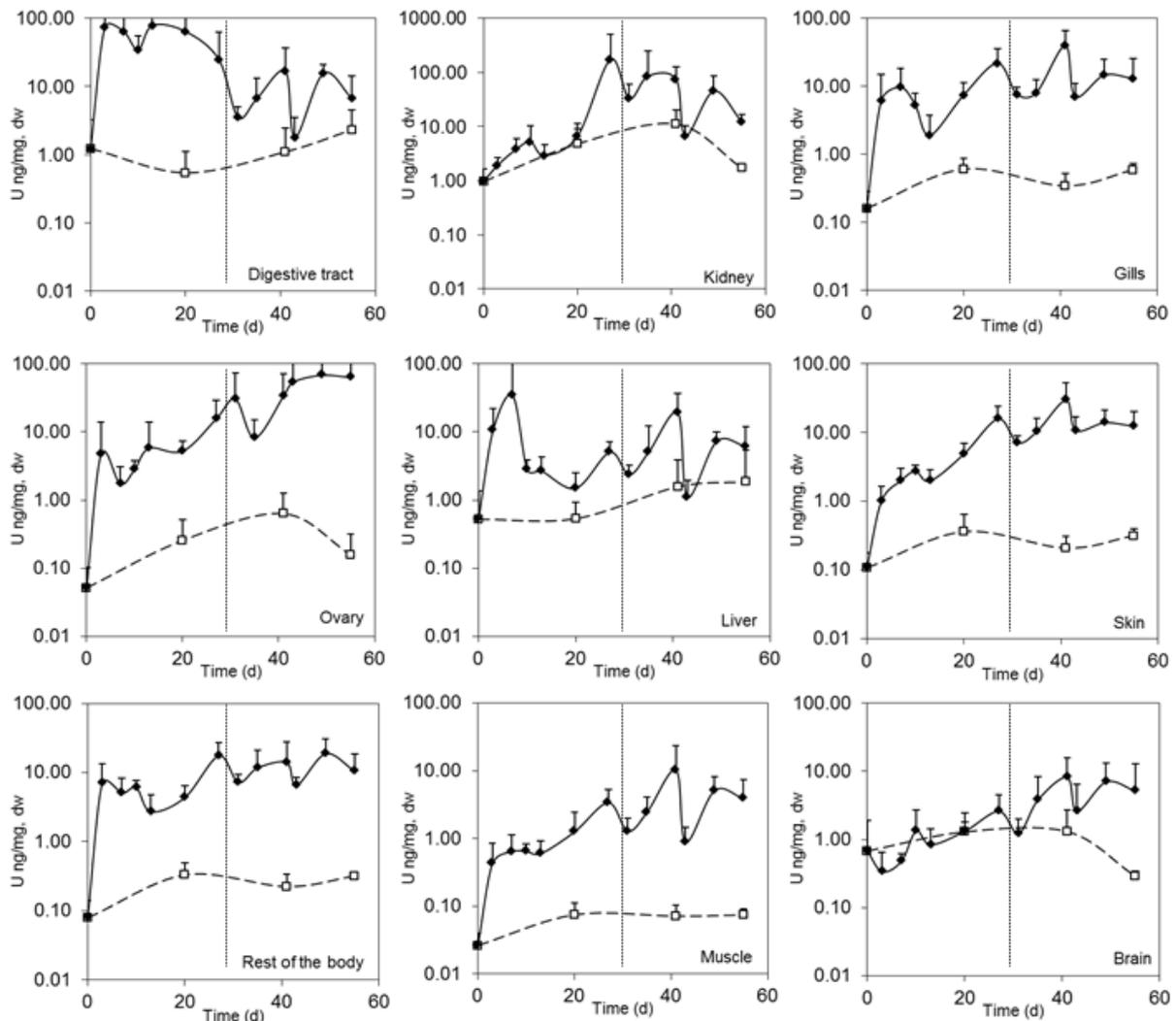


Figure 6 : concentration en uranium appauvri en ng/mg p.s. mesuré dans les différents organes du poisson zèbre femelle après 28 jours d'exposition à 20 $\mu\text{g/L}$ et 27 jours de dépuraton (la ligne verticale matérialise le début de la dépuraton). Trait noir : poisson exposés à l'U appauvri ; pointillés : contrôles.

2.3.1.3 Toxicité radiologique : cas du tritium

Dans le cas des radionucléides, le BCF est également utilisé afin de caractériser les débits de doses totales dans l'organisme (Gy/h), grandeur définissant l'exposition aux radionucléides. Il prend en compte l'énergie déposée dans les organismes *via* l'internalisation des radionucléides et celle liée à la présence des radionucléides dans le milieu² (**Figure 7**). La concentration de radionucléides accumulés dans les organismes est mesurée et les activités massiques accumulées (Bq/g) sont converties en débit de dose (Gy/h) *via* l'utilisation de DC (Gy/h par Bq/g, Dose Coefficient), modélisés avec le logiciel EDEN sur la base de données morphométriques propres à chaque espèce, pour aboutir à une dose totale dans

² Le tritium étant un isotope radioactif de l'hydrogène, le terme de bioaccumulation ne peut s'appliquer, l'hydrogène étant un élément constitutif des tissus et de l'eau. Le terme d'internalisation sera utilisé dans ce document pour le tritium sous forme HTO.

l'organisme (Beaugelin-Seiller et al., 2004). Ce DC fait intervenir des facteurs de pondération dépendant du rayonnement étudié (cf. §2.3.1.4).

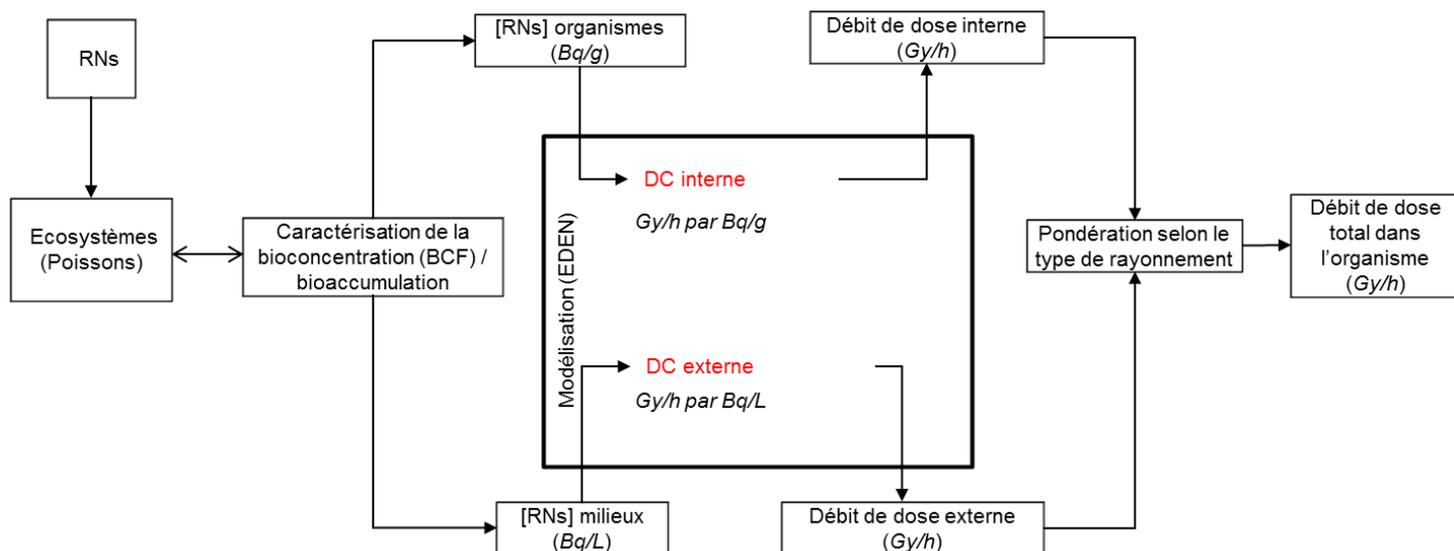


Figure 7 : méthodologie pour le calcul du débit de dose (Gy/h) dans les organismes exposés aux radionucléides (RN). D'après Simon (2013).

Ces concepts ont été appliqués à l'étude du tritium, dans le cadre d'une collaboration avec CNL (Canadian Nuclear Laboratories, Ontario, Canada). Afin de déterminer les débits de doses liés au tritium dans les tissus des poissons et également la contribution de l'eau et de la nourriture dans l'accumulation, des têtes de boule ont été exposés pendant 120 jours (60 jours de contamination et 60 jours de dépuración) à différentes concentrations en HTO (0, 12000, 25000, 180000 Bq/L), à de la nourriture enrichie en OBT (OBT, 27000 Bq/L) et à une condition réunissant une exposition directe (HTO, 25000 Bq/L) et trophique (nourriture enrichie en OBT) [ARTICLE 10 : Gagnaire et al. (online)]. Il a été ainsi montré qu'après 60 jours de contamination, le gradient d'augmentation en activité en tritium dans les tissus des poissons suivait celui de l'eau pour l'HTO ; pour l'OBT accumulé, les concentrations étaient plus fortes pour les poissons recevant la nourriture contaminée. Pendant la dépuración, la concentration tissulaire en HTO a diminué très rapidement ; les concentrations en OBT étaient par contre toujours mesurables à la fin de la dépuración. Ces résultats corroborent ceux de la littérature, qui rapportent que l'accumulation d'OBT dans les tissus des poissons est un processus complexe et long, et la dépuración est également longue (Kim et al., 2015). Il a même été proposé que du fait de leur différence de temps de résidence, les formes OBT et HTO soient considérées séparément dans l'évaluation du risque lié aux radionucléides (Diabate and Strack, 1993; Galeriu et al., 2008). Plusieurs études ont montré que l'HTO internalisé dans les organismes au stade adulte s'équilibre avec la concentration en HTO présente dans le milieu (Galeriu et al., 2005) et que la fraction OBT échangeable s'équilibre avec la concentration en HTO internalisé (Galeriu and

Melintescu, 2011; Kim and Korolevych, 2013; Melintescu et al., 2015). Notre étude n'a probablement pas duré assez longtemps pour arriver à l'équilibre pour l'OBT internalisé.

Les débits de dose interne en tritium, estimés d'après les concentrations en HTO et OBT dans les tissus et grâce au calcul du DC pour le tête de boule via le logiciel EDEN, ont atteint un maximum de 0,65 $\mu\text{Gy/h}$ pour les poissons exposés à 180000 Bq/L après 60 jours de contamination. Cette valeur est relativement faible compte tenu du niveau de contamination et est inférieure à toutes celles de la littérature rapportant des effets sur les poissons (Adam-Guillermin et al., 2012).

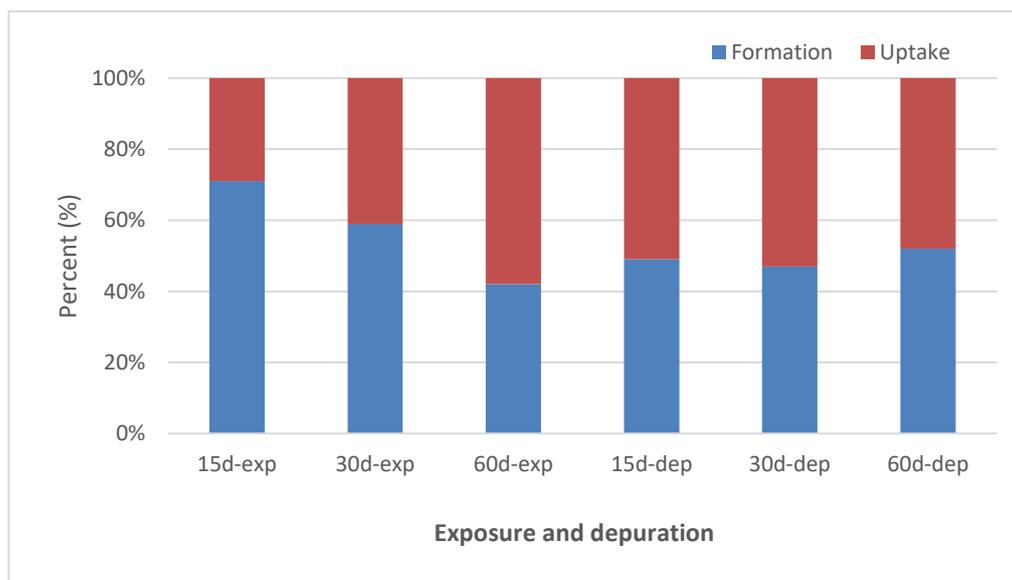


Figure 8 : contribution (en %) de l'OBT originaire de l'eau (bleu) et de la nourriture (rouge) dans l'OBT mesuré dans les tissus des poissons pendant les périodes d'exposition et de dépurat

Concernant l'origine de l'OBT accumulé dans les tissus des poissons, au début de la période de contamination, le contributeur majoritaire était l'OBT provenant de l'eau, alors que l'OBT provenant de la nourriture s'est avéré être le contributeur majoritaire à la fin de la contamination (**Figure 8**). Lors de la dépurat

Nos travaux nous ont également conduit à évaluer le transfert de tritium à partir d'une eau contaminée en HTO chez les stades larvaires du poisson zèbre, notamment dans le cadre d'un projet co-financé par EDF (GGP Environnement) et de la thèse de Caroline Arcanjo. Ce modèle biologique ne permettant pas

l'application des protocoles classiques pour la mesure d'HTO et d'OBT du fait de sa petite taille, un protocole robuste et reproductible a été mis au point afin d'évaluer le plus précisément possible les activités en tritium dans les tissus et ainsi de pouvoir calculer les débits de doses absorbés dans les tissus [ARTICLE 11 : Arcanjo et al. (2019)]. Il a ainsi été possible de mesurer l'HTO et l'OBT dans les œufs de 24 hpf (heures post fécondation) et les larves de 96 hpf, 7 jpf (jours post fécondation) et 10 jpf exposés à $1,22 \cdot 10^5$ et $1,22 \cdot 10^6$ Bq/L (données reportées dans le **Tableau 1**, §2.4.1). Une cinétique a également été réalisée pour évaluer la vitesse du processus d'internalisation. Les résultats ont montré que l'internalisation d'HTO est un processus rapide et que l'équilibre est atteint 24h après le début de la contamination. Comme pour l'étude réalisée pour le tête de boule, cette étude a montré que la formation d'OBT était un processus plus long, avec seulement 8% de tritium dans les tissus sous la forme OBT, quel que soit le stade considéré. Comme pour le tête de boule, grâce à la mesure des activités internes, les débits de doses absorbés ont ainsi pu être déterminés avec précision. Ces données permettront ensuite de pouvoir relier les effets observés aux doses absorbées et d'évaluer correctement le risque environnemental lié à la présence de tritium pour les poissons.

2.3.1.4 Efficacité Biologique Relative (EBR)

Dans l'environnement, les populations naturelles sont exposées à différents radionucléides, émettant différents types de rayonnements (α , β ou γ). Les effets d'un rayonnement ionisant dépendent du type de rayonnement, de la dose absorbée, du temps d'exposition mais également de la sensibilité de l'organisme ou de l'organe exposé. Le calcul de dose absorbée décrit précédemment (cf. §2.3.1.3) ne suffit cependant pas pour la prise en compte des effets dans la mesure où les rayonnements n'ont pas tous la même efficacité. Il est donc nécessaire de prendre en compte ces variations d'efficacité biologique lors de l'évaluation du risque environnemental lié à l'exposition à ces différents types de rayonnements. Pour cela, le concept d'Efficacité Biologique Relative (EBR) est couramment utilisé. L'EBR correspond au rapport entre la dose du rayonnement de référence (γ ou X) nécessaire pour produire un niveau d'effet et la dose du rayonnement étudié (α ou β) nécessaire pour produire le même niveau d'effet (Dobson and Kwan, 1978; Hall et al., 1967). L'EBR est fonction de nombreux facteurs, notamment le type de cellule irradiée, l'effet considéré et la distribution tissulaire (homogène ou non) des radionucléides.

Dans le domaine de la radioprotection des espèces non-humaines, il n'y a actuellement pas de consensus quant au choix de ces valeurs d'EBR, en raison notamment du peu de données pour les organismes non-humains, et de surcroît, pour les faibles doses. Ainsi, sur la base des données disponibles dans la littérature, une EBR de 5 a été recommandée dans le cas des émetteurs alpha à la fois pour les effets déterministes (e.g. mortalité des cellules somatiques et germinales, effets sur l'hématopoïèse) et stochastiques (e.g. aberrations chromosomiques, cassures double-brin, mutations), avec une gamme allant de 1 à 10 pour les premiers et de 1 à 20 pour les seconds (Chambers et al., 2006). Ces études ont mis en évidence de

considérables incertitudes d'estimations, avec des valeurs d'EBR alpha allant de 1 à 377, illustrant toute la complexité de déterminer précisément l'efficacité biologique d'un rayonnement. Dans le cas du tritium, une EBR de 3 est recommandée (ASN, 2010).

En ayant connaissance de ces faits, il convient de noter que les calculs de dose présentés dans ce travail concernant le tritium étaient basés sur certaines hypothèses. Les coefficients de dose utilisés afin de convertir les quantités de tritium internalisé en débit de dose ont été calculés via le logiciel EDEN en supposant une répartition homogène du tritium dans l'organisme entier ; cette hypothèse est probablement simpliste, au moins pour l'OBT (Adam-Guillermin et al., 2012). Cependant, ayant à notre disposition une mesure de tritium totale sur l'organisme, ce choix nous a paru justifié. D'autre part, les coefficients de dose ont pris en compte le facteur de pondération de 3 pour tenir compte de l'EBR du tritium. Or, cette valeur ne fait pas l'objet d'un consensus dans la communauté scientifique, du fait des incertitudes liées aux modèles (Harrison et al., 2002; Melintescu et al., 2007). De façon générale, l'application de facteurs de pondération dans le contexte de la caractérisation de la dose est controversée, étant donné que ces facteurs ont été créés pour décrire des effets stochastiques chez l'Homme plutôt que des effets déterministes, qui seraient plus applicables aux espèces non-humaines (Highley et al., 2012). Cependant, ce facteur de pondération de 3 est préconisé par l'ASN ; d'autre part, une revue de la littérature sur les effets du tritium sur les organismes non-humains a recensé les EBR calculés par les auteurs et a présenté les valeurs calculées lorsque celles-ci étaient manquantes, et la moyenne de l'ensemble de ces valeurs d'EBR (vertébrés et invertébrés) est de l'ordre de 3 (Adam-Guillermin et al., 2012). Il nous a alors paru important de prendre en compte ce facteur de 3 comme EBR du tritium.

2.3.2 Lien entre la dose et les biomarqueurs

Afin de relier le débit de dose interne et les effets via l'utilisation de biomarqueurs, une expérience a été réalisée sur des poissons tête de boule exposés à différentes concentrations de tritium sous forme HTO (de 0 à 180000 Bq/L) pendant 60 jours (D60), puis remis en eau sans contamination pendant 60 jours (dépuración, D120) [**ARTICLE 10** : Gagnaire et al. (online)]. La mesure de l'HTO et de l'OBT dans les tissus a permis de calculer le débit de dose maximum auquel les poissons ont été exposés, soit 0,65 $\mu\text{Gy/h}$. Une batterie de biomarqueurs a été mesurée à D60 et D120 afin d'explorer les effets du tritium sous forme HTO chez les poissons. Aucun effet n'a été reporté sur la mortalité ou les indices de conditions mesurés (K, GSI, HSI, SSI, ratios ARN/ protéines et ADN/protéines). Ce résultat n'est pas étonnant au regard du DCRL pour lequel des effets délétères sont attendus chez le poisson qui est de 4 mGy/h (ICRP, 2008). Certains biomarqueurs n'ont pas été modifiés par le tritium (CAT, SOD, GPx). Cependant, des analyses multivariées ont montré que les niveaux de plusieurs biomarqueurs (dommages à l'ADN, fréquence des micronoyaux, AChE, LMI, activité de phagocytose et production de ROS) étaient positivement corrélés au débit de dose interne en tritium, à D60 et à D120, montrant ainsi que le tritium a induit une génotoxicité

et des réponses immunitaires et neurales chez les poissons exposés, et que les effets perduraient lorsque le tritium n'était plus présent dans le milieu. Ce travail a donc permis d'identifier les biomarqueurs les plus pertinents dans le cadre de l'évaluation des risques liés au tritium et de mieux comprendre les modes d'action du tritium chez le têtard de boule en reliant dose interne et effets.

La même stratégie a été utilisée afin d'étudier le lien entre le débit de dose absorbé lors d'une irradiation externe d'organismes et une batterie de biomarqueurs. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un projet avec l'INRA d'Avignon [**ARTICLE 12** : Gagnaire et al. (2019)]. De ce fait, l'abeille domestique, *Apis mellifera*, a été choisie comme modèle biologique. Cette espèce est communément utilisée en écotoxicologie comme modèle pour évaluer l'effet des polluants. De plus, l'abeille est un des modèles de référence pour l'étude des effets des rayonnements ionisants (ICRP, 2008). Dans ce contexte, des abeilles naissantes ont été exposées à des débits de doses allant de $4,38 \cdot 10^{-3}$ à 588 mGy/j pendant 14 jours. Des tissus biologiques (tête, intestin et abdomen) ont été prélevés à D3, D10 et D14. L'INRA disposant d'une batterie de biomarqueurs pour cette espèce, il a été possible de suivre plusieurs processus physiologiques : système nerveux (AChE), antioxydant (CAT, SOD, GPx, GST), immunitaire (PO) et aussi le métabolisme général (carboxylestérases (CaE), phosphatase alcaline). Des analyses univariées ont été réalisées afin de savoir si chaque biomarqueur était positivement ou négativement corrélé à l'augmentation du débit de dose interne. Le type de relation (linéaire ou polynomial de différents ordres) a alors été défini. Ensuite, des analyses multivariées ont été conduites afin d'étudier les relations entre les réponses de l'ensemble des biomarqueurs. De manière similaire à l'étude sur les effets du tritium sur le têtard de boule, aucune mortalité n'a été rapportée durant l'expérience. Cependant, plusieurs biomarqueurs ont ainsi montré des variations significativement reliées au débit de dose externe. Globalement, les activités enzymatiques impliquées dans le système immunitaire et le stress oxydant étaient diminuées avec l'augmentation du débit de dose (**Figure 9**). Des effets réversibles ont été montrés sur l'AChE. Les carboxylestérases ont présenté des variations sans qu'un pattern précis se soit dégagé. L'ensemble de ces résultats a permis de montrer que la physiologie des abeilles pouvait être affectée par les rayonnements ionisants en l'absence de mortalité. Ces effets subtils, se produisant parfois pour de faibles débits de dose, ont ainsi démontré la sensibilité de l'abeille aux rayonnements ionisants. Cette espèce semble donc intéressante dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental lié aux rayonnements ionisants dans les écosystèmes terrestres.

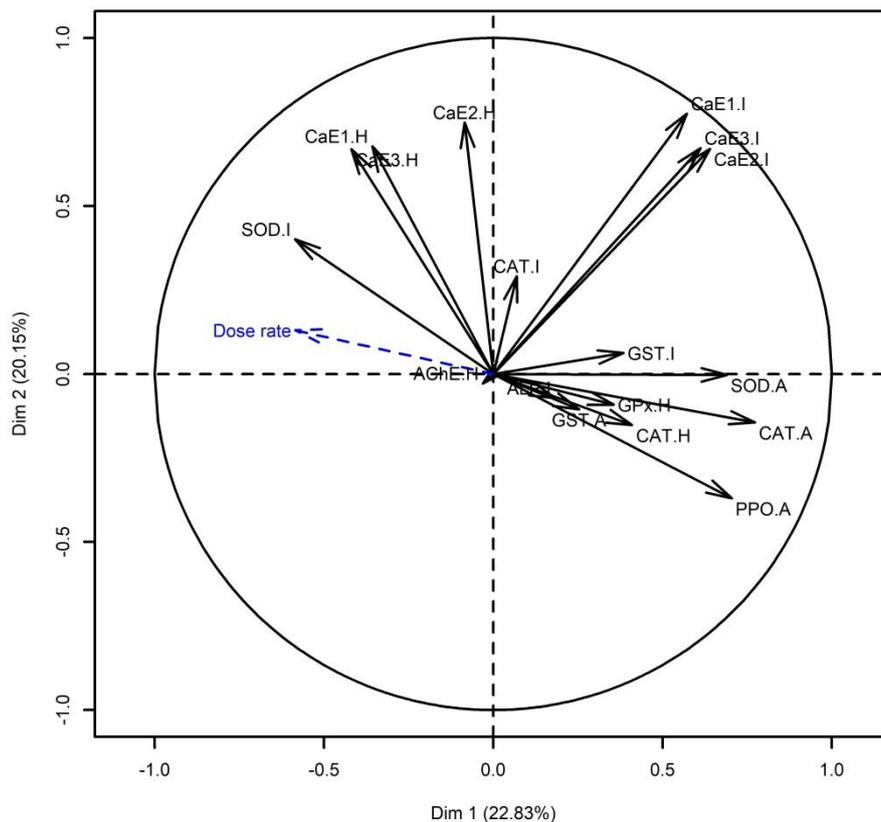


Figure 9 : analyse en composante principale (ACP) réalisée sur l'ensemble des biomarqueurs physiologiques. (A), D3; (B), D10. (C), D14. H, I et A représentent l'organe considéré (head, intestine, abdomen). Le débit de dose a été inclus comme variable quantitative supplémentaire.

Ce chapitre décrit la **caractérisation de la dose**, étape indispensable pour pouvoir faire des **liens** entre **dose** et **effet**. Que ce soit pour l'uranium ou pour le tritium, des **protocoles robustes** et **reproductibles** ont été mis au point afin de mesurer avec **précision** l'internalisation des radionucléides. Dans le cas du tritium, l'HTO apparaît **difficile** à mesurer du fait de la **rapidité** des échanges avec les molécules d'eau du milieu. En perspective de ce travail, une **caractérisation précise** du tritium en utilisant des **vecteurs ciblés** tels que la thymidine tritiée permettra de **mieux caractériser la dose** afin de **relier les effets induits** (questions Q1 et Q2). Le lien **entre** dose est effet est illustré ici par des expériences d'irradiation aux rayonnements gamma et d'exposition au tritium, qui ont permis, grâce à des analyses statistiques poussées, **d'identifier les biomarqueurs corrélés à la dose plus pertinents** à étudier afin **d'évaluer les effets** de ces polluants.

2.4 Exploration des liens entre les différentes échelles d'organisation biologique

2.4.1 Utilisation des biomarqueurs : évaluation des modes d'action

L'évaluation des biomarqueurs en tant qu'indicateurs de l'état de santé d'un organisme prend tout son sens si les réponses de ces marqueurs biochimiques peuvent être reliées à des réponses mesurées à des échelles hiérarchiques supérieures. Ainsi, mesurer des réponses au niveau de l'individu permet de confirmer ou non si les changements de réponses des biomarqueurs observés à l'échelle moléculaire ou cellulaire se sont propagés à l'organisme entier, ou si l'impact est resté limité à la cellule/molécule. Ce contexte rejoint le concept d'AOP ou Adverse Outcome Pathways, qui est une construction conceptuelle rassemblant les connaissances sur le lien entre un événement moléculaire initiateur (tel qu'une interaction entre une substance chimique et un récepteur moléculaire) et un effet néfaste à un niveau pertinent pour l'évaluation des risques (Ankley et al., 2010). C'est dans ce contexte qu'une grande partie du travail de recherche présenté ici s'est inscrit, en particulier pour le tritium et l'irradiation gamma, en utilisant comme modèle les stades embryo-larvaires du poisson zèbre. Dans certaines expériences, les larves ont été exposées jusqu'à 10 jours, afin de pouvoir suivre les effets au niveau macroscopique sur le développement larvaire jusqu'à la résorption complète de la réserve vitelline, et ainsi étudier l'éventuel impact des radionucléides sur le métabolisme.

Dans le cadre du GGP Environnement, l'objectif était de tester la sensibilité, la spécificité et la représentativité d'outils pour l'analyse détaillée des effets et de l'exposition des écosystèmes aquatiques aux radionucléides, en vue d'en valider l'utilisation pour la caractérisation du risque. Plus particulièrement, il s'agissait de tester la sensibilité et la spécificité de marqueurs pertinents pour l'analyse des effets des radionucléides et d'évaluer leur lien avec des conséquences à l'échelle de l'individu. Un certain nombre de biomarqueurs ont alors été suivis après une exposition au tritium et au rayonnement gamma, à différents niveaux d'organisation biologique : moléculaire (dommages à l'ADN par le test des comètes, mesure de l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes étudiés), cellulaire (mesure des EOR, de l'ACHé, de la PO et de l'activité EROD), tissulaire (ultrastructure du muscle de la queue) et individuel (mortalité, développement embryonnaire, vitesse et succès d'éclosion). Différents stressseurs ont été étudiés : l'irradiation gamma et le tritium sous forme HTO et thymidine tritiée.

Les débits de doses sélectionnés pour réaliser ces études ont été choisis en considérant les DCRLs ('derived consideration reference level') fixés par la CIPR³ qui sont les gammes de débits de dose au sein desquelles des effets délétères des radionucléides sont susceptibles d'apparaître sur des organismes du

³ CIPR : Commission Internationale de Protection Radiologique

même type que l'organisme de référence (Reference Animals and Plants (RAP), ici les poissons) (**Figure 10**) (ICRP, 2008).

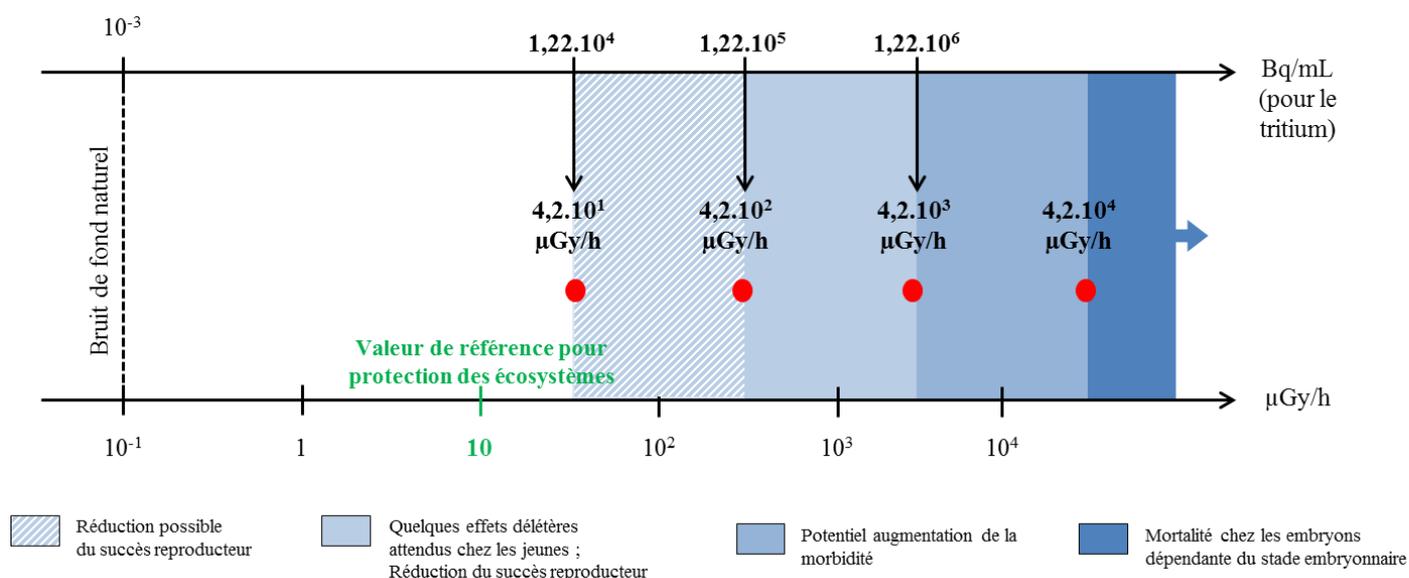


Figure 10 : gammes de débits de dose d'irradiation gamma externe recensées par la CIPR pour induire des effets chez le poisson (truite) comme organisme de référence (RAP) ; le DCRL proposé est en hachuré (d'après CIPR (2008) et Garnier-Laplace et al. (2010) pour la valeur de référence pour la protection des écosystèmes).

Des larves de poisson zèbre ont été exposées pendant 96h à deux débits de dose : 33 $\mu\text{Gy/h}$, proche de la valeur seuil recommandée pour la protection des écosystèmes vis-à-vis des rayonnements ionisants de 10 $\mu\text{Gy/h}$ (Garnier-Laplace et al., 2010) et 23 mGy/h [ARTICLE 7 : Gagnaire et al. (2015c)]. Les résultats ont montré que l'exposition aux rayonnements gamma induisait une accélération de l'éclosion pour les deux débits de dose testés, comme cela avait déjà été montré précédemment (Pereira et al., 2011; Simon et al., 2011), ainsi qu'une diminution de la longueur des larves à 72 hpf et du diamètre de la réserve vitelline à 96 hpf ; ces résultats semblent indiquer que les rayonnements gamma induisent une augmentation de la consommation des réserves énergétiques et donc du métabolisme global de la larve. D'autre part, l'expression de gènes liés à la neurotransmission a été modifiée par l'irradiation, l'AChE a été diminuée pour le faible débit de dose et des dégradations des myofibrilles avec altération des filaments d'actine et de myosine ont été mises en évidence aux deux débits de dose. Ces résultats suggèrent que l'irradiation gamma peut induire des dommages sur la neurotransmission chez les larves, ce qui pourrait avoir des répercussions sur la locomotion. Les dommages à l'ADN, la production basale d'EOR et l'expression de la myeloperoxydase ont été induits par l'irradiation, alors que l'activité EROD a été diminuée (Tableau 1). L'ensemble de ces résultats montre que l'irradiation gamma induit un stress oxydatif chez la larve de poisson zèbre, conduisant à des dommages à l'ADN.

Tableau 1 : récapitulatif des résultats obtenus pour les expositions de larves de poisson zèbre à l'HTO, à la thymidine tritiée et à l'irradiation gamma.
T :Témoin ; Ø : pas d'effet ; - : non testé ; ND : non déterminé. Un facteur de pondération de 3 a été appliqué pour le calcul des coefficients de dose pour les différentes formes de tritium (HTO et thymidine).

	HTO 1,22.10 ⁴ Bq/mL		HTO 1,22.10 ⁵ Bq/mL				HTO 1,22.10 ⁶ Bq/mL				Thymidine tritiée		Irradiation gamma	
	Œufs	Larves 96 hpf	Œufs	Larves 96 hpf	Larves 7 jpf	Larves 10 jpf	Œufs	Larves 96 hpf	Larves 7 jpf	Larves 10 jpf	Œufs	Larves 96 hpf	Œufs	Larves 96 hpf
Débit de dose	9,1.10 ¹ μGy/h	1,7.10 ² μGy/h	5,2.10 ² μGy/h	4,6.10 ² μGy/h	2,8.10 ² μGy/h	3,7.10 ² μGy/h	3,8.10 ³ μGy/h	3,3.10 ³ μGy/h	4,7.10 ³ μGy/h	3,4.10 ³ μGy/h	-	2,6.10 ² - 5,3.10 ² - 1,3.10 ³ - 7,2.10 ³ μGy/h	3,3.10 ¹ et 2,4.10 ⁴ μGy/h	
Dose totale	2,2.10 ³ μGy	1,6.10 ⁴ μGy	1,2.10 ⁴ μGy	4,5.10 ⁴ μGy	4,7.10 ⁴ μGy	8,8.10 ⁴ μGy	9,1.10 ⁴ μGy	3,2.10 ⁵ μGy	7,8.10 ⁵ μGy	8,2.10 ⁵ μGy	-	2,5.10 ⁴ - 5,1.10 ⁴ - 1,25.10 ⁵ - -6,9.10 ⁵ μGy	8.10 ² et 5,7.10 ⁵ μGy	3,2.10 ³ et 2,3.10 ⁶ μGy
Éclosion	Ø	-	Ø	-	-	-	Ø	-	-	-	retard	-	accélération	-
Développement	Diamètre > T	Longueur < T Diamètre RV > T	Ø	Longueur < T Diamètre RV < T	Diamètre RV < T	Diamètre RV > T	Diamètre œuf et RV > T	Ø	Diamètre RV > T	ND	-	-	Ø	Longueur < T à 2,4.10 ⁴ μGy/h Diamètre RV < T à 2,4.10 ⁴ μGy/h
Domages à l'ADN	Ø	< T	> T	> T	Ø	ND	Ø	Ø (2016) / >T (2017)	Ø	Ø	-	> T à 7,2.10 ³ μGy/h	> T à 2,4.10 ⁴ μGy/h	> T à 3,3.10 ¹ μGy/h < T à 2,4.10 ⁴ μGy/h

Expression de gènes	-	Mt2 > T	-	Mpx < T	∅	∅	-	Cyp1a > T GSTp1 < T	Mpx > T Lyz > T MT2 > T	Ache > T	-	-	-	> T : ache, cyp1a, mpx aux 2 débits de doses ; chat à 2,4.10 ⁴ µGy/h ; gstp1 à 3,3.10 ¹ µGy/h
Production d'EOR	-	∅	-	Activités b et s < T (2016) / Activités s < T (2017) Indice > T (2016) / ∅ (2017)	Activités b et s > T	Activités s > T	-	Activités s < T	∅	∅	-	-	-	ROS < T à 3,3.10 ¹ µGy/h
Biomarqueurs immunitaires et neurotoxiques	-	∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	EROD < T aux 2 débits de dose AChE < T à 3,3.10 ¹ µGy/h
Histologie du muscle	-	Rares altérations des myofibrilles	-	Rares altérations des myofibrilles	Altérations importantes des mitochondries	Altérations importantes des mitochondries	-	Altérations + nombreuses des myofibrilles	Altérations importantes des mitochondries	ND	-	-	-	Nombreuses altérations des myofibrilles aux 2 débits de doses

Des larves de poisson zèbre ont également été exposées à de la thymidine tritiée (de $1,22.10^3$ à $1,22.10^6$ Bq/mL) pendant 96h. Les débits de doses correspondant sont rapportés dans le **Tableau 1**. Cette étude avait rapporté un nombre plus important d'anomalies du développement embryonnaire et un retard d'éclosion chez les larves exposées aux plus forts débits de doses testés (Adam-Guillermin et al., 2013). Les dommages à l'ADN étaient également augmentés pour le plus fort débit de dose testé.

Le tritium a été également étudié plus largement sous sa forme HTO. Des larves ont été ainsi exposées à $1,22.10^4$, $1,22.10^5$ et $1,22.10^6$ Bq/mL jusqu'à 10 jpf. Les débits de doses correspondant sont rapportés dans le **Tableau 1**. L'HTO n'a jamais induit de mortalité ni eu d'effet sur l'éclosion. Des effets sur le développement embryonnaire ont été rapportés, mais de manière transitoire, sans lien apparent avec le débit de dose (**Tableau 1**). Des dommages à l'ADN ont été mesurés principalement sur les larves de 96 hpf, mais les larves de 7 et 10 jpf n'ont pas montré de dommages à l'ADN pour les deux débits de dose testés, suggérant la mise en place de mécanismes de réparation (**Tableau 1**). Les niveaux et l'indice de production des EOR ont été principalement modulés lors de l'exposition à $1,22.10^5$ Bq/mL pour les larves à 96 hpf, 7 et 10 jpf, avec une tendance à l'augmentation pour tous les paramètres ; cependant, ces effets n'ont pas été retrouvés au débit de dose supérieur (**Tableau 1**). L'expression de gènes a été modifiée principalement à la concentration de $1,22.10^6$ Bq/mL, avec une surexpression pour des gènes impliqués dans la neurotoxicité, la détoxification et les défenses immunitaires (**Tableau 1**).

Concernant les atteintes tissulaires, des dommages ont été observés au niveau des myofibrilles, sporadiquement pour les larves de 96 hpf exposées à $1,22.10^4$ Bq/mL ($1,7.10^2$ μ Gy/h) (Gagnaire et al., 2015a) et à $1,22.10^5$ Bq/mL ($4,6.10^2$ μ Gy/h), et de manière plus fréquente et plus prononcée chez les larves exposées à $1,22.10^6$ Bq/mL ($3,3.10^3$ μ Gy/h) (**Figure 11**) (Gagnaire et al., 2016). L'ensemble de ces résultats montraient des atteintes tissulaires qui pouvaient affecter la contractilité du muscle et avoir à terme des conséquences sur la motilité de la larve.

Lors de l'exposition de larves de 7 et 10 jpf aux deux plus forts débits de dose d'HTO, les dommages aux myofibrilles observés chez les larves de 96h n'ont pas été retrouvés, suggérant qu'ils ont été réparés, possiblement du fait du renouvellement important des cellules et des tissus dans cet organisme en plein développement embryo-larvaire. Cependant, des dommages importants ont été démontrés pour les deux débits de dose et les deux temps au niveau des mitochondries (**Figure 12**) (Gagnaire et al., 2018). L'intensité des dommages laisse penser que l'altération des fonctions mitochondriales peut être importante, avec des altérations potentielles au niveau de la respiration cellulaire et allant jusqu'à l'arrêt du processus énergétique du tissu musculaire. Ce phénomène pourrait faire penser à une dystrophie musculaire progressive. Les dommages n'ont pas paru plus importants au débit de dose plus élevé, laissant penser que

les dommages induits par l'HTO au niveau des mitochondries avaient atteint un maximum ou étaient compensés par l'organisme.

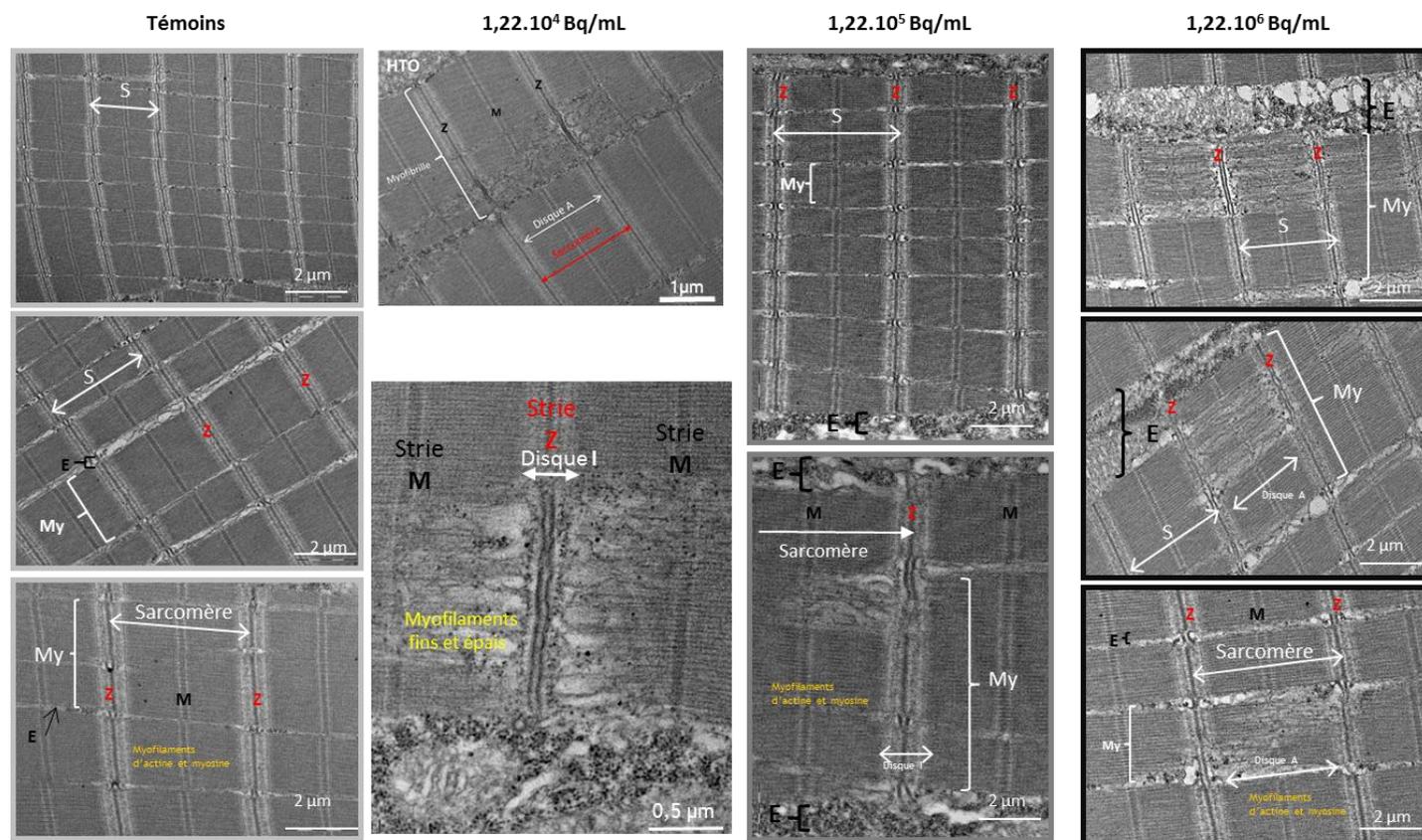


Figure 11 : coupes longitudinales de tissu musculaire observées en microscopie électronique à transmission (MET) chez les larves de poisson zèbre de 96 hpf témoins et exposées à $1,22.10^4$, $1,22.10^5$ et $1,22.10^6$ Bq/mL d'HTO (soit $1,7.10^2$, $4,6.10^2$ et $3,3.10^3$ μ Gy/h) (S: sarcomère ; My: myofibrille ; E: endomysium ; Z: strie Z ; M: Ligne M).

L'ensemble de ces résultats permet de comparer les effets de différents types de radionucléides chez les larves de poisson zèbre. Concernant les critères morphologiques, les différents types d'exposition (tritium vs irradiation gamma) ont eu des conséquences différentes sur la vitesse d'éclosion des œufs (accélération pour le gamma, retard pour la thymidine tritiée). De plus, les effets du tritium sur l'éclosion des œufs de poisson zèbre dépendent de la forme utilisée (pas d'effet de l'HTO). Les paramètres du développement ne semblent pas être de réels indicateurs de l'effet de l'HTO sur les larves de poisson zèbre, à l'inverse de l'irradiation gamma.

Au niveau tissulaire, l'HTO a induit des effets différents sur les larves de 7 et 10 jpf, où les mitochondries étaient sévèrement affectées (Gagnaire et al., 2018), par rapport aux larves de 96 hpf, pour qui des altérations des myofibrilles avaient été observées, ce qui avait également été observé après irradiation

gamma. Les mécanismes d'action de ces différents types d'irradiation responsables des atteintes au muscle du poisson zèbre semblent donc être similaires aux temps précoces.

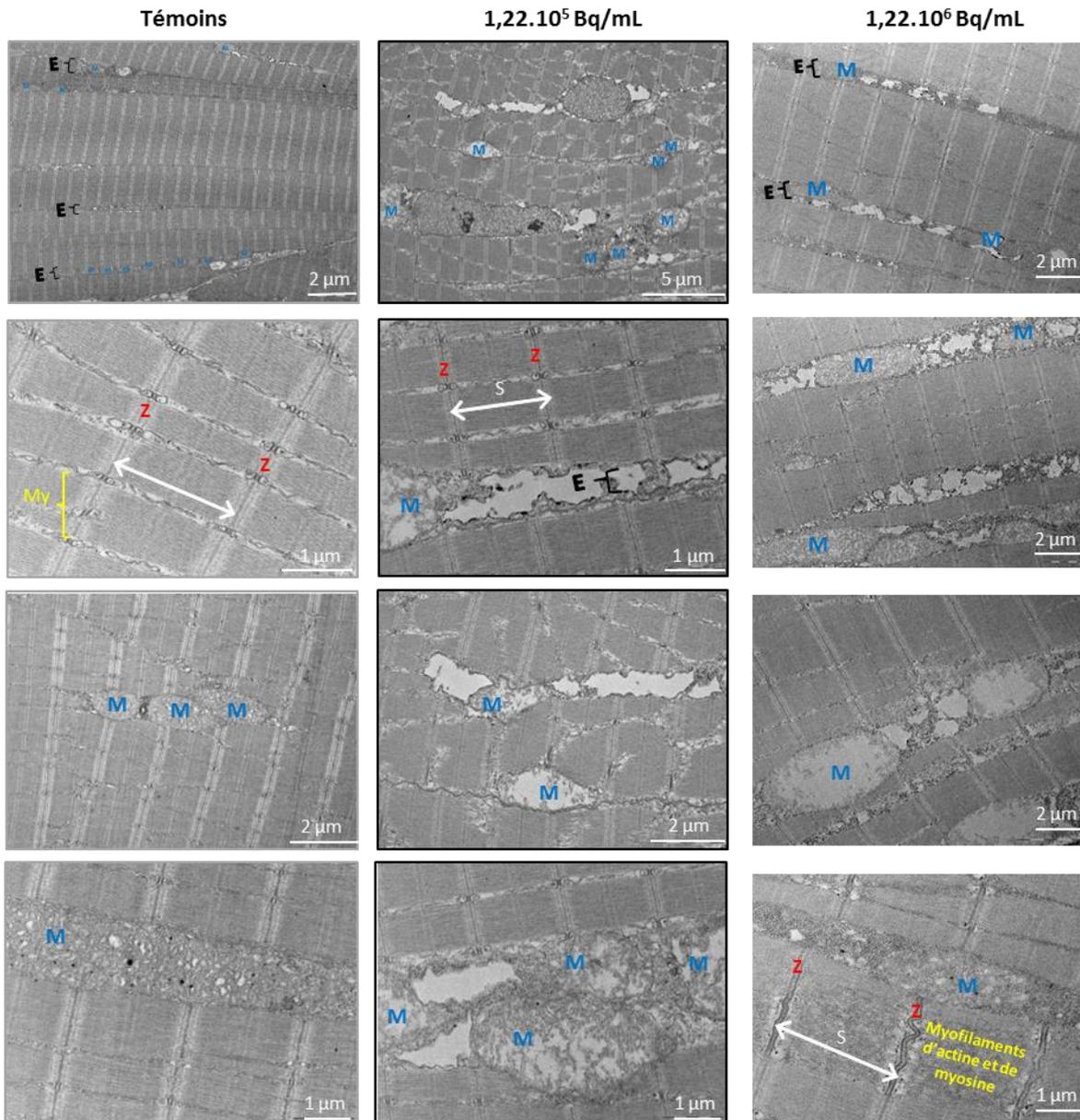


Figure 12 : coupes longitudinales de tissu musculaire observées en MET chez les larves de poisson zèbre de 7 jpf témoins et exposées à $1,22.10^5$ et $1,22.10^6$ Bq/mL d'HTO ($2,8.10^2$ et $4,7.10^3$ μ Gy/h) (S: sarcomère ; My: myofibrille ; E: endomysium ; Z: strie Z ; M: mitochondries).

Concernant les autres paramètres mesurés, la production de ROS ainsi que les dommages à l'ADN et les mécanismes de détoxification, répondant à la fois à l'exposition au tritium et à l'irradiation gamma, semblent des biomarqueurs d'intérêt dans l'évaluation des risques liés aux rayonnements ionisants. A

l'inverse, le système nerveux ne semble pas être une cible précoce du tritium, à l'inverse de l'irradiation gamma. Ces résultats traduisent sur la base de ces paramètres des différences entre les mécanismes de réponse mis en jeu dans la réponse aux différents types de stress radioactifs.

Cependant, les réponses ne sont pas dose-dépendantes et sont parfois plus importantes au faible débit de dose et l'intensité des réponses ne varient pas linéairement avec l'âge de la larve.

L'ensemble de ces résultats démontrent l'intérêt de l'utilisation des biomarqueurs dans l'évaluation des effets des rayonnements ionisants chez la larve de poisson zèbre et permettent d'améliorer la compréhension des mécanismes mis en jeu lors de l'exposition de larves de poissons zèbres à différents types de radionucléides.

La comparaison des réponses obtenues chez les stades précoces de poisson zèbre entre le tritium et les rayonnements gamma s'inscrit également dans l'objectif général de calculer l'EBR pour le tritium (cf. §2.3.1.4). Cependant, les expériences menées jusqu'à maintenant ne permettent pas de recouper les résultats tritium et rayonnements gamma car les débits de doses étudiés étaient trop différents. D'autres expériences viendront compléter le jeu de données afin de calculer l'EBR du tritium (cf. §2.3.1.4)

Dans le cadre de la thèse de Caroline Arcanjo, l'approche globale était identique à celle présentée précédemment, mais l'échelle moléculaire a été particulièrement étudiée dans le but d'identifier des effets précoces après l'exposition à l'HTO via une analyse du transcriptome. Cette analyse globale et sans a priori a permis de mettre en évidence des effets au niveau de l'expression des gènes à la suite de l'exposition à l'HTO. Le cas échéant, ces effets précoces ont pu être reliés à des effets observés à un niveau d'organisation supérieur dans le but de faire le lien entre les échelles biologiques [**ARTICLE 13** : Arcanjo et al. (2018) et **ARTICLE 14** : Arcanjo et al. (in prep.)]. Pour ce faire, une analyse transcriptomique haut débit (RNAseq) a été utilisée chez des œufs de 24 hpf et des larves de 96 hpf exposées à $1,22 \cdot 10^5$ et $1,22 \cdot 10^6$ Bq/mL. L'expression des gènes a été comparée entre les débits de doses et entre les stades. Les résultats majeurs montrent que certains gènes liés au stress oxydant (*gpx*, *sod2*, *mpx*, gènes impliqués dans la réponse à H_2O_2) et aux réparations des cassures double brins (*h2afx* et *ddb2*) ont été sur-exprimés chez les organismes exposés par rapport aux témoins (Arcanjo et al., 2018). Il est intéressant de souligner que le gène *ddb2* figure, avec des gènes impliqués dans l'apoptose et le stress oxydatif, parmi les gènes identifiés comme prédictifs d'une exposition aux rayonnements ionisants chez l'homme du fait de leur réponse dose-dépendante (Macaeva et al., 2016) et potentiellement utilisables pour reconstituer la dose reçue et la durée d'exposition (Macaeva et al., 2018). La mesure de la production d'EOR présentée précédemment a mis en évidence des effets de l'HTO sur les niveaux de production essentiellement à la concentration de $1,22 \cdot 10^5$ Bq/mL (**Tableau 1**), renforçant l'hypothèse de l'induction d'un stress oxydant par l'HTO. L'analyse de l'activité gamma H2AX sur organisme entier n'a cependant pas révélé de différences entre les organismes contrôles et exposés, suggérant que les effets sur les mécanismes de réparation de l'ADN sont transitoires

[ARTICLE 14 : Arcanjo et al. (in prep.)]. L'analyse transcriptomique a révélé certains gènes impliqués dans l'organisation des fibres musculaires et des sarcomères, telles que les troponines, *capn3a*, *capn3b*, *tcap* et *obsca*. Ces résultats suggèrent que l'exposition à l'HTO pourrait impacter l'organisation des sarcomères et l'organisation des fibres musculaire plus généralement pour le stade 24 hpf via la modulation de l'expression de gènes clés impliqués dans ces processus biologiques. Afin de faire le lien entre les échelles biologiques, ces résultats ont été mis en regard des analyses histologiques sur les muscles des larves présentées précédemment, où des altérations ponctuelles au niveau des filaments d'actine et de myosine qui composent les sarcomères avaient été observées (Figure 11). Il est donc probable que la modulation des gènes impliqués dans l'organisation des sarcomères par l'HTO puisse expliquer en partie ces observations (Arcanjo et al., 2018). D'autre part, la réalisation de tests macroscopiques a été faite sur les larves exposées à l'HTO. Si le rythme cardiaque et les mouvements de l'embryon à 24 hpf n'ont pas montré d'effet de l'HTO, le comportement de nage des larves exposées à $1,22 \cdot 10^5$ Bq/mL d'HTO a été modifié, les larves contaminées parcourant une distance moins grande et à une vitesse plus faible en comparaison aux témoins (Figure 13) (Arcanjo, 2018). L'ensemble de ces résultats démontre les effets de l'HTO sur l'organisation musculaire à différentes échelles biologiques (molécule, tissu et individu).

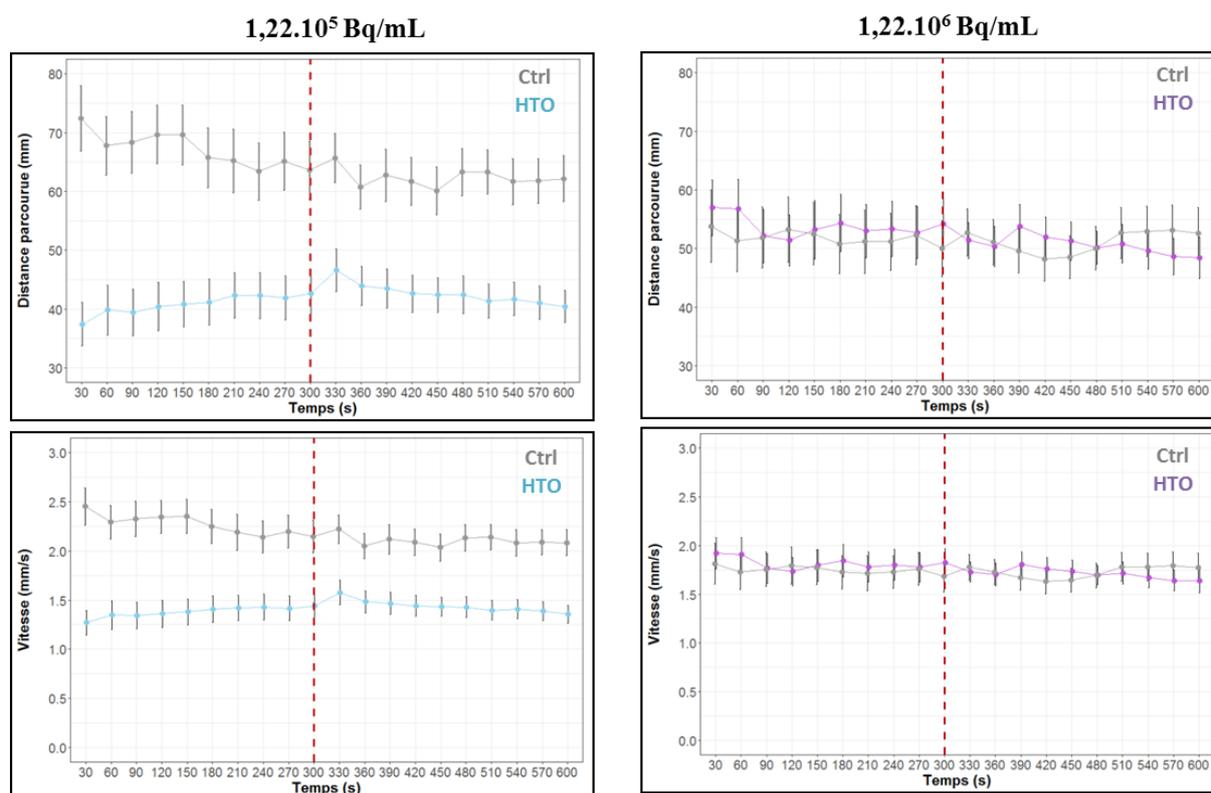


Figure 13 : distance parcourue et vitesse de nage chez les larves exposées à $1,22 \cdot 10^5$ et $1,22 \cdot 10^6$ Bq/mL d'HTO pendant 96 hpf. La ligne rouge en pointillés matérialise un stimulus tactile appliqué sur la plaque pendant l'acquisition des données.

Enfin, l'analyse transcriptomique a également révélé des effets de l'HTO sur l'expression des gènes codant notamment pour les protéines du cristallin et donc impliqués dans la transparence de l'œil (Froger et al., 2010). Ce résultat est intéressant car chez l'Homme, le développement de la cataracte est l'une des complications observées après des thérapies utilisant des rayons beta (Barron et al., 1970) et à Tchernobyl, une augmentation de l'incidence des cataractes a été observé chez des oiseaux (Mousseau and Møller, 2013). Afin de confirmer si la modulation de l'expression des gènes impliqués dans la transparence de l'œil pourrait avoir un impact à une échelle d'organisation biologique plus importante, des observations histologiques des yeux à différents stades de développement ont été réalisées [**ARTICLE 14** : Arcanjo et al. (in prep.)]. Cependant, aucun effet notable n'a été observé sur la structure de la lentille de l'œil ni des cellules de soutien chez des larves de 48, 72 et 96 hpf exposées à l'HTO. L'impact du tritium sur le développement de l'œil et l'induction de la cataracte aux stades précoces n'a donc pas été confirmé ; il serait intéressant de réaliser des tests optocinétiques sur des larves plus âgées afin de conclure sur l'effet potentiel du tritium sur l'œil du poisson zèbre.

Il est important de souligner que les réponses obtenues, dans leur grande majorité, suivent une relation dose-réponse non-monotone plutôt que linéaire. L'hypothèse de la pluralité des cibles moléculaires peut être avancée : les réponses à de faibles et de fortes doses seraient différentes car les cibles moléculaires pourraient être touchées/activées de façon différentielle en fonction de la dose, et ainsi produire des effets différents (Lagarde et al., 2015). Des effets métaboliques pourraient également expliquer les réponses opposées observées. Dans le cas des perturbateurs endocriniens, les effets produits par les molécules mères et les métabolites peuvent être opposés et la saturation du système métabolique à forte dose pourrait favoriser les effets des parents plutôt que ceux des métabolites (Lagarde et al., 2015). Dans le cas du tritium, le TOL se forme via l'HTO par des processus métaboliques dans les organismes, qui pourraient être impactés différemment en fonction du débit de dose testé et ainsi mener à l'observation d'effets opposés en fonction de la dose. Enfin, la présence de tritium à partir d'un certain débit de dose pourrait également induire un feedback négatif sur la régulation des mécanismes liés par exemple aux contrôles endocriniens (qui n'ont pas été évalués dans ce travail), ou encore désactiver certains récepteurs, ce qui pourrait avoir des conséquences sur les effets observés. Dans le cadre de l'évaluation du risque, il semble important de prendre en compte ces relations non-monotones notamment lors de la définition de seuils tels que la NOEC (concentration la plus forte pour laquelle aucun effet n'est observé) ou la LOEC (concentration la plus faible pour laquelle des effets sont observés), qui sont plutôt définis pour les relations linéaires.

L'ensemble du travail présenté dans ce paragraphe montre que la réalisation d'expériences multi-échelles (de la molécule à l'individu) de contamination à l'eau tritiée ou d'irradiation externe permettant la mesure des biomarqueurs représentatifs de différentes fonctions physiologiques du poisson, associée au suivi de

l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes sous-jacents et couplée à l'analyse histologique des tissus et au comportement des individus, constitue un outil puissant pour identifier les cibles biologiques d'intérêt d'une exposition aux rayonnements ionisants et de leurs effets et permet d'en comprendre les modes d'action toxiques. Cette approche pourrait être étendue à d'autres radionucléides.

2.4.2 Approche métabolique : la théorie du Budget d'Énergie Dynamique (DEB)

Comme exposé précédemment, les polluants, incluant les radionucléides, ont la capacité d'agir à tous les niveaux d'organisation biologique, de la molécule à la cellule, de l'individu à la population et des communautés aux écosystèmes (Adam-Guillermin et al., 2012; van der Oost et al., 2003). En complément des biomarqueurs, une approche mécanistique des liens unissant les différentes perturbations observées peut être utilisée pour prédire les conséquences sur la survie, la croissance et la reproduction des organismes. La théorie du Budget d'Énergie Dynamique (DEB) a été développée par S.A.L.M. Kooijman au cours des trois dernières décennies (Kooijman, 1986; 2000, 2010). Cette théorie a pour objectif de relier les processus métaboliques d'un organisme au sein d'un même cadre conceptuel. Le modèle DEB décrit les flux d'énergie au sein de l'organisme (**Figure 14**) et permet de déterminer comment l'énergie acquise par la nourriture est utilisée pour les processus biologiques majeurs de maintenance, croissance, maturation et reproduction de l'organisme (Kooijman, 2010).

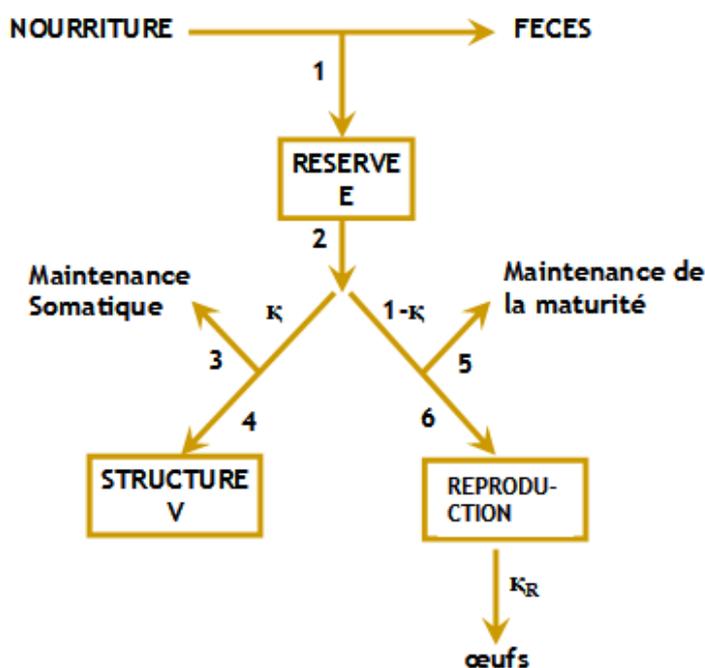


Figure 14 : concept de la théorie de Budget d'Énergie Dynamique avec les principaux processus métaboliques. 1 : assimilation ; 2 : utilisation de la réserve ; 3 : maintenance somatique ; 4 : croissance ; 5 : maintenance de la maturité ; 6 : quantité cumulée de réserve investie dans la maturation puis dans la reproduction ; κ : fraction allouée à la croissance et à la maintenance somatique ; κ_R : coût de fabrication des œufs (Kooijman, 2010).

L'objectif du travail de thèse de Starrlight Augustine était d'utiliser la théorie DEB pour caractériser les effets de l'uranium appauvri sur le métabolisme du poisson zèbre, et en particulier de tenter d'établir des liens entre les réponses précoces mesurées aux niveaux cellulaires et moléculaires et les réponses observées aux échelles hiérarchiques supérieures telles que l'individu et la population. Il a d'abord été nécessaire de calibrer le modèle DEB sur le poisson zèbre, ce qui n'avait jamais été fait. La première partie du travail a donc permis de quantifier le développement, la croissance et la reproduction du poisson zèbre [**ARTICLE 15** : Augustine et al. (2011)]. L'hypothèse que l'uranium peut affecter des mécanismes de défense cellulaire a été prise en compte dans la paramétrisation du modèle, en posant l'hypothèse que les coûts du système immunitaire et de défense cellulaire contribuent à la maintenance de la maturité. Ce travail a permis de montrer que le poisson zèbre accélère son développement après la naissance (où l'individu commence à se nourrir) jusqu'à la métamorphose, où l'accélération cesse. La théorie DEB spécifie que l'individu atteint un stade de développement à un niveau de maturité donné, qui peut être atteint à des tailles ou des âges différents selon la température et/ou la nourriture disponible. Le travail a ainsi permis d'expliquer par la théorie DEB la variabilité en termes de taille et d'âge.

La première partie de ce travail a donc permis de disposer d'un outil permettant de comprendre, et de prédire, la manière dont la performance physiologique du poisson zèbre dépend de son niveau de nutrition. Le modèle a été utilisé pour détecter les modifications induites par l'uranium sur la performance physiologique d'un individu exposé par rapport à celle du témoin. A cette fin, un modèle dynamique qui spécifie la manière dont l'uranium s'accumule et s'élimine chez un individu qui se nourrit, grandit et se reproduit, a été développé [**ARTICLE 16** : Augustine et al. (2012)]. Ces travaux suggèrent que l'uranium augmenterait les coûts de synthèse de la structure et diminuerait l'assimilation et/ou augmenterait le coût de la maintenance somatique et ce pour des concentrations dans l'eau très faibles (proches de 0 µg/L). Un résultat important de ces travaux est que la condition des poissons (structure, maturité, réserve, buffer de reproduction, stade de préparation des "batch") au début de l'expérience dépend de chaque individu et conditionne la réponse de celui-ci au stress pendant toute l'expérience. En prenant en compte les différences entre les conditions initiales de chaque individu, il a alors été possible d'expliquer les résultats contradictoires publiés dans la littérature ainsi que ceux de la présente étude sur la bioaccumulation de l'uranium dans le poisson zèbre. La conclusion est que des données acquises sur des individus ne devraient pas être moyennées sur des groupes d'individus. Cette information peut s'avérer d'importance dans l'évaluation du risque environnemental lié aux radionucléides.

Malgré ce travail, nous sommes encore loin de pouvoir quantifier quels processus subcellulaires interagissent avec un processus donné du modèle DEB. De nombreux travaux sont encore à réaliser afin de

lier les réponses de l'individu aux réponses subcellulaires décrivant la toxicité d'un polluant. Un essai dans ce sens a été réalisé en étudiant l'histologie de l'intestin. Bien que le travail ait montré que l'uranium altère l'histologie de la paroi intestinale (acteur majeure dans l'assimilation des nutriments) et pourrait potentiellement modifier l'homéostasie des interactions hôte-bactéries (acteur majeur dans l'assimilation et l'immunité innée) [ARTICLE 17 : Augustine et al. (2015)], il n'a pas été possible de faire le lien mécanistique quantitatif entre ces résultats et le modèle.

L'uranium appauvri a augmenté les coûts de maintenance chez les individus exposés. La maintenance somatique comprend une multitude de processus coordonnés intervenant au niveau subcellulaire (exocytose, endocytose, modification post traduction des protéines, flux membranaires, etc). La maintenance de la maturité comprend quant à elle des processus liés aux systèmes immunitaires et hormonaux qui eux-mêmes comprennent des mécanismes cellulaires complexes (Kooijman, 2010). Il serait intéressant d'acquérir des données permettant de quantifier ces deux processus, par exemple en comparant les performances physiologiques d'individus sains et malades lors d'une exposition à un même polluant augmentant les coût de maintenance (Augustine, 2012).

Ce chapitre décrit comment les **biomarqueurs** ont été utilisés pour **décrire les effets et les liens entre les différentes échelles d'organisation biologiques**, de la molécule à l'individu, dans le cadre d'expériences d'exposition à différents types de radionucléides. Ainsi, il a été montré que pour l'irradiation gamma ainsi que pour le tritium sous forme HTO, des effets sont observés à **différentes échelles** (molécule, cellule, organe, et individu) et ces effets, affectant des grandes fonctions de l'organisme, peuvent être **reliés entre eux** (exemple de l'atteinte aux réponses neurologiques et comportementales). Au travers de l'utilisation du DEB, il a été possible **d'identifier les voies d'atteintes de l'uranium** chez le poisson zèbre. Ce type d'étude illustre le **concept des AOP** fortement utilisé à l'heure actuelle en écotoxicologie.

Cependant, certains points restent à élucider, comme par exemple **l'absence apparente de relation dose-réponse**, pour l'HTO comme pour l'irradiation gamma. Un des objectifs de cette approche est également de **caractériser l'EBR** des différents types de radionucléides étudiés.

Cependant, **des éléments manquent encore** pour arriver à calculer correctement l'EBR, notamment pour le tritium.

En perspective de ce travail, il est prévu de **combler** ces différents manques en augmentant la plage des débits de dose testés pour l'irradiation gamma et en mettant l'effort sur la caractérisation plus poussée des effets du tritium sous forme organique (Questions Q1 et Q2).

2.5 Contexte de multipollution

2.5.1 Intérêt de l'étude des biomarqueurs sur le terrain

La compréhension des mécanismes d'action d'un polluant fait intervenir principalement des expériences en conditions contrôlées, qui permettent de ne faire varier que l'élément étudié, afin de relier les réponses des biomarqueurs à cet élément précis. De plus, ces expérimentations sont pour la plupart standardisées, permettant la comparaison inter-expérimentale. Cependant, ces expériences ne sont pas représentatives de l'écosystème puisqu'un nombre important de paramètres ne sont pas prises en compte, telles que les variations des variables environnementales, les interactions entre les espèces biologiques, entre les polluants, les variations des concentrations de ces polluants, etc. Une autre approche plus intégratrice consiste donc à étudier la réponse de ces biomarqueurs chez des espèces de poissons dites sentinelles en conditions naturelles, afin d'intégrer l'environnement en son entier (paramètres biotiques et abiotiques) (Bervoets et al., 2001).

Plusieurs stratégies sont envisageables. Une des possibilités est d'exposer les poissons au laboratoire avec l'eau du site pollué d'intérêt. Cependant, les effets biologiques sont sous-estimés dans la mesure où d'autres paramètres (parasites, prédateurs) et les fluctuations de l'environnement sont difficiles à reproduire au laboratoire (Pyle et al., 2001). Une autre possibilité est d'étudier les poissons natifs capturés sur les sites d'intérêts. Afin de comparer les sites, il convient d'étudier la même espèce de poisson, dans la même classe d'âge, et de pouvoir trouver un nombre suffisant d'animaux à chaque endroit. Cette méthode requiert une évaluation écologique préliminaire des sites d'étude. Une telle stratégie a été appliquée afin de démontrer l'intérêt d'utiliser des biomarqueurs immunologiques pour évaluer l'état de santé de poissons soumis à différents types de pollutions [ARTICLE 18 : Bado-Nilles et al. (2015)]. Des chabots, *Cottus* sp., ont été échantillonnés à différentes saisons sur des sites soumis à une pollution urbaine, agricole intensive ou viticole. Les résultats ont montré une augmentation de la mortalité cellulaire et une diminution de la phagocytose chez les poissons provenant des stations impactées par les pollutions agricoles et viticoles. De plus, les immunomodulations suivaient les variations temporelles des différents traitements appliqués aux cultures (agriculture au printemps et viticulture en automne). Ce travail a donc permis de montrer que les biomarqueurs immunitaires peuvent donner une vue d'ensemble de la santé d'organismes exposés aux polluants. Une autre étude, toujours sur le chabot, s'est intéressée à d'autres paramètres immunitaires tels que la nécrose, l'apoptose et la production d'EOR, couplés à des biomarqueurs de stress oxydant et de neurotoxicité (EROD, GST, GPx, TBARS, AChE), dans l'objectif d'obtenir une batterie de biomarqueurs afin de discriminer onze sites d'études en Artois-Picardie en fonction de leur degré de pollution (qualité de l'eau qualifiée de bonne ou mauvaise selon un classement ONEMA) [ARTICLE 19 : Bado-Nilles et al. (2014a)]. Des analyses multivariées ont été utilisées afin d'investiguer les relations entre les biomarqueurs et les caractéristiques physico-chimiques des sites. Il en résulte que l'utilisation couplée des biomarqueurs

immunitaires, de stress oxydant et de neurotoxicité a conduit à une meilleure séparation des sites entre eux (67%) en comparaison à l'utilisation des biomarqueurs biochimiques seuls (44%). Ces études montrent l'intérêt d'utiliser les biomarqueurs immunologiques seuls ou en batterie dans l'évaluation du risque environnemental sur le terrain.

Une autre possibilité attractive des études sur le terrain est de conduire des études de biosurveillance active en utilisant des poissons encagés (Oikari, 2006). En effet, l'encagement combine à la fois une sélection contrôlée de poissons de laboratoire (âge, sexe, taille, diversité génétique) avec des conditions d'exposition site-spécifique complexes et impossibles à reproduire au laboratoire (Geffard et al., 2010) et évite les impacts négatifs de l'échantillonnage légal sur des populations de poissons résidents (Reynders et al., 2008). L'encagement rend la standardisation des résultats plus facile et permet de choisir la saison, la durée et les sites d'étude (Viarengo et al., 2007). De surcroît, l'encagement prend en compte les interactions entre polluants et autres stress, difficiles à retranscrire au laboratoire (Pereira et al., 2006). Cependant, il convient de correctement définir les conditions d'encagement optimales pour l'espèce de poisson étudiée, au regard de la densité d'animaux et de l'ajout ou non de nourriture par exemple [**ARTICLE 20** : Le Guernic et al. (2016c)]. Une telle démarche a été utilisée dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental lié aux radionucléides (uranium dans le contexte des anciens sites miniers uranifères et tritium). Dans le contexte des effluents miniers uranifères, des gardons ont été encagés pendant 28 jours dans deux étangs du Limousin, un sous l'influence des rejets (Pontabrier) et un en dehors de la zone d'influence (les Sauvages) [**ARTICLE 21** : Gagnaire et al. (2015b)]. Une batterie de biomarqueurs a été évaluée chez les poissons et les niveaux d'accumulation d'uranium et des autres métaux présents dans l'effluent (fer, aluminium, baryum, manganèse) ont été mesurés dans l'eau, les sédiments et les tissus des poissons. Les résultats ont permis de montrer que plusieurs paramètres immunitaires et du stress oxydant étaient augmentés chez les poissons encagés dans l'étang contaminé, alors que l'ACHé a diminué. Une ACP intégrant les réponses des biomarqueurs avec les niveaux de métaux dans l'eau et les sédiments a permis de discriminer les deux sites et également certains biomarqueurs immunologiques (indice de production des EOR, LMI). Cette étude a permis de déterminer l'état de santé des gardons dans un contexte de pollution pluri-métallique à tendance uranifère et à mieux caractériser le risque environnemental lié à la présence de substances radioactives dans l'environnement.

Ce travail a été poursuivi sur l'épinoche et a été étendu sur six étangs, trois dans la Haute-Vienne et trois dans le Cantal (avec à chaque fois un étang sur les trois sous l'influence des rejets), toujours dans l'objectif d'évaluer l'état de santé des poissons soumis aux rejets uranifères, et également de comparer les deux bassins miniers [**ARTICLE 22** : Le Guernic et al. (2016a)]. Les épinoches encagées dans les étangs contaminés ont présenté un stress oxydant, visible par une augmentation de la production d'ERO, par une modification d'une partie du système antioxydant du foie (SOD, CAT, GSH, GPx) et par une déstabilisation

des membranes lipidiques (peroxydation). Ces corrélations entre la bioaccumulation et les biomarqueurs étaient néanmoins très dépendantes du département et du temps de prélèvement (D14 ou D28). Certains autres biomarqueurs ont montré une augmentation dans les étangs contaminés uniquement à D14, comme les dommages à l'ADN et l'AChE, mettant en évidence l'action de facteurs confondants (pH, température, concentrations en métaux).

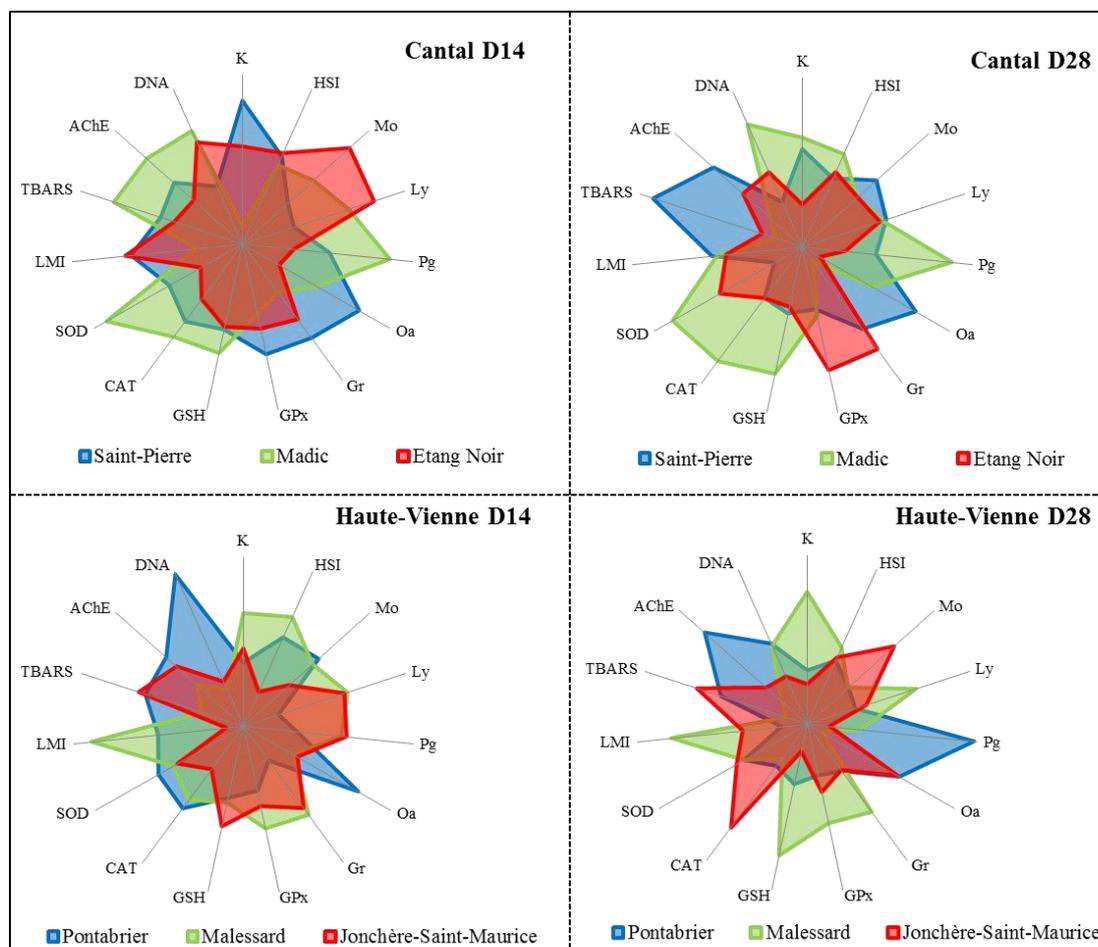


Figure 15 : distributions des réponses centrées-réduites des épinoches selon l'étang et le temps d'échantillonnage. K : indice de condition ; HSI : indice hépato-somatique ; Mo : mortalité cellulaire ; Ly : pourcentage de lymphocytes ; Pg : phagocytose ; Oa : activité oxydative basale ; DNA : dommages à l'ADN. En bleu : étang sous influence minière, en rouge et vert : étangs hors influence minière.

Les indices de distribution ont montré des effets généraux de la contamination polymétallique sur les réponses des épinoches : les poissons engagés dans les étangs sous influences des effluents miniers uranifères ont présenté une plus grande activité oxydative, avec une altération de leur système antioxydant, une plus grande peroxydation lipidique, des dommages à l'ADN et une activité AChE plus élevée, ainsi qu'un plus faible pourcentage de lymphocytes (**Figure 15**). Cette étude a permis de mettre en valeur

l'utilisation d'une approche multi-biomarqueurs lors d'expériences *in situ*. Différents effets ont été observés, pouvant laisser les épinoches plus susceptibles à l'occurrence d'un stress supplémentaire.

L'encagement a également été utilisé dans le cadre de l'évaluation du risque lié au tritium sur le terrain, en utilisant comme modèle le tête de boule [ARTICLE 4 : Gagnaire et al. (2017)]. Des poissons ont été placés sur cinq sites présentant une contamination croissante en tritium (de 4 à 23 000 Bq/L) et autres polluants. La contamination a duré 60 jours et a été suivie d'une période de dépuración de 60 jours. Pour chaque condition, une batterie de biomarqueurs représentatifs de différentes fonctions physiologiques des poissons (système immunitaire, stress oxydant, neurotoxicité et génotoxicité) ont été mesurés. Aucun effet n'a été observé sur la survie, les indices de conditions (indice de Fulton, gonado-, hépato- et spléno-somatique) ni sur les marqueurs moléculaires liés au métabolisme (ratios ARN/ADN, protéines/ADN, carbonylation des protéines dans le rein et le foie). D'autres biomarqueurs ont présenté des variations significatives en relation avec la contamination croissante de tritium dans les sites. Ainsi, les dommages à l'ADN (test des comètes) ont augmenté à T60 et T120 et la fréquence des micronoyaux ont également augmenté à T60. Une augmentation de l'intégrité de la membrane lysosomale a également été notée aux deux temps de prélèvement. Les activités AChE du muscle et SOD du cerveau ont diminué à T120 et les acides gras polyinsaturés (rapport SFA/MUFA, acides gras saturés/acides gras mono-insaturés) ont augmenté à T60 avec l'activité croissante en tritium. Les analyses multivariées ont permis de discriminer l'effet dû au débit de dose du tritium total par rapport aux autres polluants sur les biomarqueurs. Ainsi, il a été mis en évidence que plusieurs biomarqueurs de génotoxicité (dommages à l'ADN, fréquence des micronoyaux), neurotoxicité (AChE) et du système immunitaire (LMI) étaient positivement corrélés au débit de dose en tritium à T60. A T120, le débit de dose du tritium total était toujours positivement corrélé à ces biomarqueurs, et également à d'autres biomarqueurs de génotoxicité (gamma-H2AX), du système immunitaire (estérases) et antioxydant (SOD et CAT) ainsi que des marqueurs physiologiques (rapport SFA/MUFA) (**Figure 16**).

Ces résultats peuvent être comparés à l'étude réalisée en complément sur le même poisson exposé uniquement au tritium en laboratoire [ARTICLE 10 : Gagnaire et al. (online)]. De manière très intéressante, les résultats obtenus sont similaires pour plusieurs biomarqueurs immunitaires (phagocytose, production d'EOR, LMI) et génotoxiques (dommages à l'ADN, fréquence des micronoyaux), qui ont été positivement corrélés au débit de dose interne en tritium, quel que soit le mode d'exposition (laboratoire ou terrain). Ce résultat majeur montre que l'approche multi-biomarqueurs a permis d'identifier certaines cibles d'action du tritium chez le tête de boule en s'affranchissant des facteurs confondants et de mieux comprendre les modes d'action du tritium chez ce poisson. Cette approche semble très prometteuse pour

évaluer le risque environnemental lié à la présence de tritium sur les écosystèmes aquatiques et pourrait être déployée pour l'étude d'autres radionucléides.

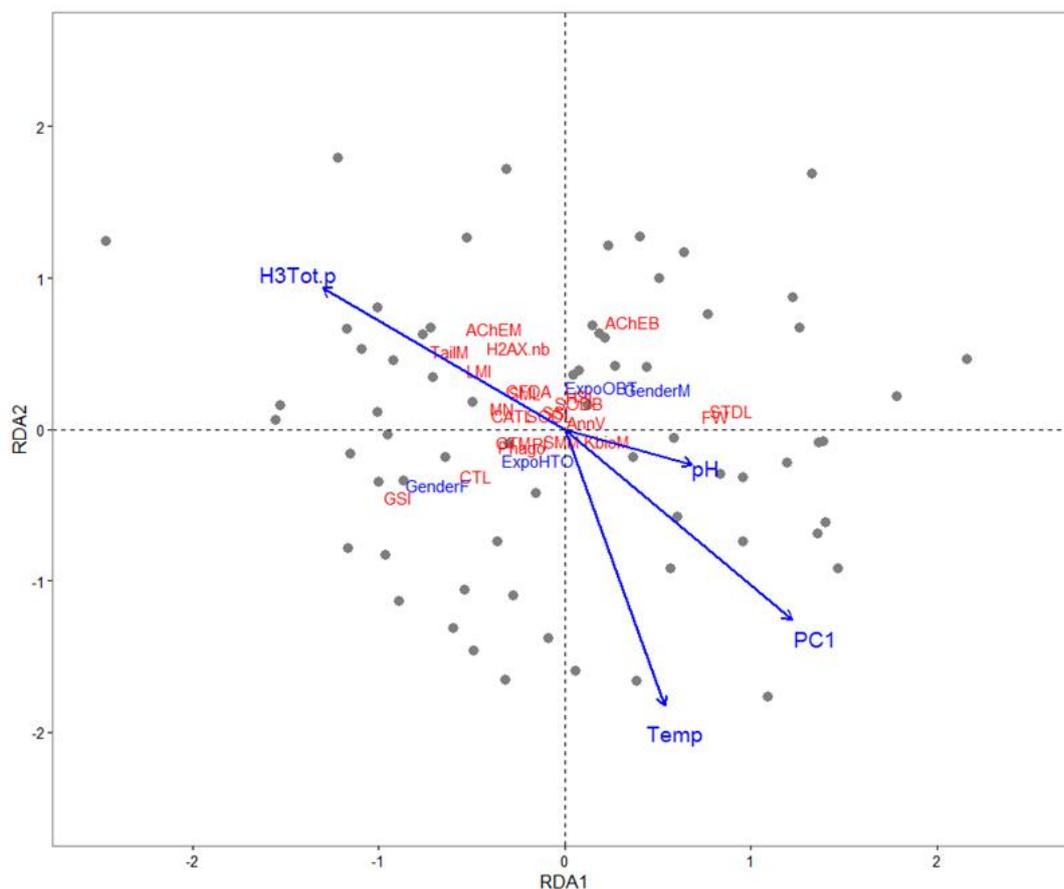


Figure 16 : RDA (Redundancy Analysis) à T120 permettant de visualiser la relation entre les variables explicatives (température, pH, métaux (PC1), débit de dose interne en tritium (H3Tot.p), sexe, exposition HTO/OBT, en bleu) et les variables réponse (biomarqueurs, en rouge). FW : poids frais ; STD L: longueur standard ; KbioM : indice de condition de Fulton K ; AnnV et PI : cellules apoptotiques et mortes ; TailM : dommages à l'ADN ; H2AX.nb : nombre de foci de gamma-H2AX ; SM : ratio SFA/MUFA ; CT : C18:1 trans ; B : cerveau ; M : muscle ; L : foie.

D'autre part, la comparaison des études de laboratoire et de terrain a montré que les biomarqueurs de génotoxicité de l'étude de terrain avaient des valeurs plus faibles que lors de l'étude de laboratoire, pour des débits de dose interne en tritium assez similaires (Beaton et al., accepté). Ce résultat ne soutient pas l'hypothèse d'une augmentation des marqueurs de morbidité chez les poissons exposés sur le terrain, comme cela est suggéré par la méta-analyse comparant des données obtenues sur le terrain dans la zone d'exclusion de Tchernobyl et des données de laboratoire (Garnier-Laplace et al., 2013).

2.5.2 Lien entre multipollution et sensibilité aux maladies infectieuses

Sur le terrain, les organismes sont soumis à des stress de différentes natures, dont des stress chimiques par la présence de polluants, et aussi des stress biologiques par la présence de nombreux agents potentiellement infectieux. La réponse d'un organisme envers un stress donné peut être modifiée par l'exposition à un autre facteur de stress (Wendelaar Bonga, 1997). Les capacités immunitaires sont des éléments essentiels de défense contre le stress biologique, tel que les bactéries, virus ou parasites, qui permettent de prévenir le développement de maladies (Bols et al., 2001). Un polluant affectant ce système de défense peut être dangereux lorsque les organismes sont exposés en parallèle à un stress biologique, car il peut augmenter leur susceptibilité envers ce stress, allant jusqu'à la mort de l'organisme (Bols et al., 2001; Brousseau et al., 1997). Dans ce contexte, une étude a été réalisée afin de déterminer si une exposition préalable à une pollution métallique, sous la forme d'effluents d'anciens sites miniers uranifères, pouvait modifier les capacités d'acclimatation, et donc la susceptibilité des poissons à la présence d'un stress biologique soudain [ARTICLE 23 : Le Guernic et al. (2016b)]. Des épinoches ont été acclimatées pendant 14 jours dans les trois étangs de la Haute-Vienne déjà étudiés, puis ont reçu une injection de LPS (9 mg/kg), des composants des parois bactériennes qui induisent une réaction inflammatoire (Ellis, 1999) ou de PBS (solvant) en intramusculaire après anesthésie. Les poissons ont été replacés dans les cages puis euthanasiés quatre jours après l'injection pour l'analyse des biomarqueurs. Les épinoches de l'étang contaminé ayant reçu le PBS ont montré un stress oxydant (activité oxydative basale, TBARS élevés et GST, CAT et SOD faibles) lié à la contamination polymétallique, comme démontré précédemment [ARTICLE 22 : Le Guernic et al. (2016a)]. Quatre biomarqueurs ont été impactés par l'interaction étang – condition d'injection : la phagocytose, la peroxydation lipidique, la CAT ainsi que le GSH (Tableau 2). L'ensemble des résultats indique que l'exposition préalable aux plus fortes concentrations métalliques a augmenté la susceptibilité des épinoches aux LPS, en ne permettant pas leur réponse phagocytaire après injection des LPS, ainsi qu'en empêchant le maintien des niveaux de GSH et la régulation des TBARS par la CAT. Une exposition à une combinaison métallique a donc entraîné une augmentation de la susceptibilité des épinoches au stress biologique soudain, en perturbant les réponses immunitaires (phagocytose) et antioxydantes (GSH, CAT, TBARS). Ce travail a permis de montrer l'intérêt de l'analyse d'une batterie de biomarqueurs immunitaires et du stress oxydant dans le contexte d'un multistress chimique et biologique.

Tableau 2 : interactions des effets entre les stress chimique (étang) et biologique (injection de LPS). Seuls les résultats significatifs d'un des deux stress ou de leur interaction sont rapportés (●: $0.05 > p \geq 0.10$; *: $0.01 > p \geq 0.05$; **: $0.001 > p \geq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$). ROS b. : niveau basal d'EOR ; ROS a. : niveau stimulé d'EOR ; SI : indice de production des EOR.

Biomarkers	Two-way ANOVA (<i>p</i> -value)			
	Pond	Injection	Pond × Injection	
Biometric data	K	*		
	HSI			
Immune capacities	Necrosis	***	●	
	Apoptosis		**	
	Lympho			
	LMI	***		
	Pg	***	**	*
	ROS b.	***		
	ROS a.			
	SI	***		
Oxidative stress	Gr	*	●	
	GPx			
	GSH	*		●
	GST	*	*	
	CAT	**		●
	SOD	**		
	TBARS	**	●	***
DNA damage	DNA	*		

Ce chapitre décrit l'utilisation des biomarqueurs dans le contexte de la **multipollution** sur le **terrain**. L'intérêt des études de terrain est la prise en compte de l'ensemble des facteurs susceptibles d'agir sur la physiologie des organismes, le corolaire étant que la **complexité** lié à la présence de facteurs confondants rend parfois difficile l'interprétation des résultats. Les études présentées ici ont permis de montrer que grâce à des analyses statistiques multivariées, il est possible de **mettre en évidence l'effet d'un contaminant d'intérêt** (ici uranium ou tritium) **parmi l'ensemble des facteurs de stress** présents sur le site. Ainsi, dans chaque cas, les **biomarqueurs les plus pertinents** pour l'étude des effets des radionucléides chez les poissons ont pu être identifiés. Dans le cas du tritium, ces biomarqueurs impliqués dans **l'immunotoxicité** et la **génotoxicité** avaient également été identifiés comme marqueurs d'intérêt lors des expériences de laboratoire, indiquant leur **pertinence** quel que soit le type d'étude. En perspective, d'autres expériences de terrain, à Tchernobyl ou à Fukushima, pourrait permettre de les valider dans d'autres contextes pertinents pour la radioprotection des écosystèmes (question Q3). Certaines expériences ont été initiées dans le cadre de l'étude du **lien entre polluants et maladies infectieuses**, cependant les résultats restent difficiles à interpréter. En perspective, il apparaît intéressant de continuer à travailler dans ce contexte afin de quantifier l'impact suspecté des radionucléides sur le développement de pathologies (question Q4).

2.6 Synthèse

Les travaux de recherche présentés tout au long de ce document montrent que les biomarqueurs immunologiques ne peuvent être considérés comme des biomarqueurs d'exposition en raison de leur manque de spécificité. Cependant, les conséquences physiologiques de leur déstabilisation rendent ces marqueurs potentiellement prédictifs d'effet à différents niveaux d'organisation. En effet, comme la réponse immunitaire joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de l'organisme vis-à-vis notamment des pathogènes, une perturbation de différents effecteurs du système immunitaire peut à terme induire des conséquences sur la survie des organismes. Ces propriétés rendent les biomarqueurs immunologiques réellement représentatifs d'un point de vue écologique, particulièrement sensibles et pertinents à utiliser. Cependant, leur seule utilisation ne peut pas rendre compte de l'ensemble des effets délétères induits par les polluants. L'utilisation d'une batterie de biomarqueurs, en intégrant l'étude des biomarqueurs immunologiques à celles de biomarqueurs plus classiques (stress oxydant, neurotoxicité, génotoxicité), semble représenter une voie d'étude pertinente dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental lié aux polluants, notamment aux radionucléides. Il apparaît nécessaire de bien caractériser la plage de variation naturelle de tous les types biomarqueurs afin d'être plus pertinent lors de l'évaluation de l'état de santé des organismes.

Ce travail a également permis de s'intéresser à la complexité des études de terrain, mettant en évidence la difficulté d'interprétation des résultats en présence de différents facteurs confondants. Cependant, des analyses statistiques poussées ont permis de discriminer l'effet du polluant d'intérêt parmi l'ensemble des facteurs de stress. Les études de terrain sont incontournables pour étudier les effets des polluants dans un contexte environnemental de multipollution et de variations des facteurs physico-chimiques. Ces études sont par définition réalisées sur des espèces autochtones pouvant supporter les variations des conditions d'exposition. Les concentrations d'exposition sont le plus souvent faibles ou intermédiaires, majoritairement non contrôlables. La pertinence de ces études se place au niveau écologique. Afin de pouvoir correctement interpréter les résultats des études de terrain, il apparaît nécessaire de réaliser en parallèle des expériences de laboratoire afin de découpler les facteurs de stress. En effet, la réalisation d'expériences en milieu contrôlé sur des espèces modèles permet de ne faire varier que le niveau du polluant d'intérêt au sein d'une gamme contrôlée de concentrations d'exposition et de progresser dans la compréhension des mécanismes d'action (**Tableau 3**). La pertinence de ces études est davantage mécanistique. La correcte évaluation du risque environnemental lié à un polluant ne peut se faire qu'en couplant les deux types d'approche.

Tableau 3 : comparaison des intérêts des études de laboratoire et de terrain.

	Etudes de laboratoire	Etudes de terrain
Objectif de l'étude	Mécanisme d'action d'un polluant	Contexte environnemental (multistress)
Paramètres physico-chimiques	Régulation (environnement simplifié)	Variables (saison)
Type d'espèce	Espèce modèle	Espèce autochtone
Concentrations étudiées	Gamme de concentrations	Concentrations plutôt faibles non contrôlées
Conclusions	Effets observés dus au polluant d'intérêt	Potentielle difficulté de ressortir l'effet du polluant d'intérêt
Pertinence	Mécanistique	Ecologique

Au-delà de ces considérations, les études résumées ici démontrent la robustesse de certains biomarqueurs, notamment ceux liés à l'immunotoxicité et à la génotoxicité, pour identifier les modes d'action des radionucléides. Dans le contexte de la radioprotection de l'environnement, il apparaîtrait judicieux de recommander leur utilisation pour l'évaluation du risque environnemental lié aux radionucléides, dans le cadre de programmes de surveillance, de manière similaire à ce qui est fait pour les polluants chimiques (cf §2.2.2.1). D'un point de vue réglementaire, la valeur seuil recommandée pour la protection des écosystèmes vis-à-vis des rayonnements ionisants de 10 $\mu\text{Gy/h}$ (Garnier-Laplace et al., 2010). Or, un certain nombre d'effets non réversibles ont été observés dans ce travail pour des débits de dose inférieurs à 1 $\mu\text{Gy/h}$. Les conclusions de ce travail vont donc également dans le sens d'incorporer ces biomarqueurs dans l'estimation des seuils de protection, en intégrant par exemple ces critères d'effets dans l'établissement des LOEDR (Lowest Observed Effect Dose Rate) et PNEDR (Predicted No Effect Dose Rate).

3 Projet de recherche

3.1 Introduction

Comme cela a été démontré au fil des paragraphes précédents, de nombreux paramètres doivent être pris en compte pour une évaluation pertinente des effets des radionucléides. Un travail important reste à faire pour identifier des marqueurs fiables des effets des radionucléides, une condition incontournable étant leur sensibilité vis-à-vis d'un contexte d'exposition chronique à des débits de doses réalistes. A ce titre, à l'issue du travail présenté précédemment, les biomarqueurs immunologiques et ceux indiquant les atteintes à l'ADN semblent constituer des biomarqueurs de premier ordre pour la compréhension des effets des radionucléides sur les organismes non humains. Il est suspecté que ces biomarqueurs puissent également être reliés à des effets à l'échelle de l'individu, comme par exemple via l'expression de maladies infectieuses.

Le projet de recherche développé ci-après vise à combler les lacunes identifiées dans la synthèse des activités de recherche afin de progresser sur la compréhension de l'exposition et des effets des radionucléides sur les poissons. Ainsi, le projet de recherche visera à répondre aux questions suivantes :

Q1- quels sont les effets des radionucléides sur les stades larvaires du poisson zèbre ?

Cet axe de recherche a pour but de combler les données manquantes sur les effets de l'irradiation gamma, du tritium et de la thymidine tritiée sur la larve de poisson zèbre afin de définir l'EBR du tritium.

Q2- quels sont les effets des radionucléides sur le stade adulte du poisson zèbre ?

Au vu des résultats obtenus sur la larve de poisson zèbre et les têtes de boule adultes, il apparaît intéressant de poursuivre les investigations des effets du tritium et de l'irradiation gamma sur les poissons zèbres adultes et de comparer les résultats obtenus sur la descendance de ces poissons à ceux obtenus pour des larves issus de parents naïfs de contamination.

Q3- comment peut-on évaluer les effets de la multipollution sur la santé des organismes ?

Les résultats acquis sur ce thème montrent qu'il semble intéressant de continuer à travailler sur l'utilisation des biomarqueurs identifiés comme pertinents pour l'évaluation du risque environnemental lié aux radionucléides dans le cadre d'études de terrain.

Q4- quels sont les effets des radionucléides sur la sensibilité des poissons aux maladies infectieuses ?

Comme évoqué dans la synthèse des travaux, cet aspect n'a été que peu abordé jusqu'à maintenant, en utilisant l'épinoche comme modèle. L'une des orientations possibles des travaux après ceux prévus dans

les deux premières questions est de travailler sur le lien potentiel entre exposition aux radionucléides, effets sur l'immunité et augmentation de la sensibilité aux maladies infectieuses.

3.2 Axe 1 : effets du tritium et du rayonnement gamma sur les stades embryolairvaires du poisson zèbre (GGP Environnement)

Dans le cadre du projet GGP Environnement, un certain nombre de biomarqueurs ont été acquis sur le poisson zèbre pour le tritium et l'irradiation gamma, à différents stades (24, 96 hpf, 7 et 10 jpf). La comparaison des réponses obtenues chez les stades précoces de poisson zèbre entre le tritium et les rayonnements gamma s'inscrit dans l'objectif général de calculer l'EBR pour le tritium (cf. §2.3.1.4). Cependant, les expériences menées jusqu'à maintenant ne permettent pas de recouper les résultats tritium et rayonnements gamma car les débits de doses sont trop différents (Tableau 1). Il est donc prévu de réaliser des expériences sur les larves en irradiation gamma à des débits de dose qui se rapprochent de ceux obtenus pour le tritium, en prenant en compte le facteur de pondération de 3 : 33, 130 et 1300 $\mu\text{Gy/h}$. Les biomarqueurs d'immunité (dosage des espèces réactives de l'oxygène), de génotoxicité (test des comètes, gamma H2AX), le suivi du développement (taille, diamètre de la réserve vitelline) et l'analyse des tissus (microscopie électronique à transmission) seront réalisés. Le suivi de l'expression de gènes impliqués dans ces mécanismes sera également réalisé. Les expériences seront réalisées jusqu'à 10 jpf pour être comparable à celles réalisées sur le tritium. Le calcul de l'EBR exige également de travailler sur une assez large gamme de débit de dose, or, pour le tritium, seules deux débits de doses ont été étudiés. Il conviendrait alors de refaire également des expériences HTO à 7 et 10 jpf sur la plus faible concentration testée ($1,22 \cdot 10^4$ Bq/mL) et de mesurer les mêmes biomarqueurs, afin d'être homogène avec les deux autres débits de doses pour être plus robuste dans le calcul de l'EBR. Le même travail sera réalisé pour la thymidine tritiée. Ainsi, nous disposerons de l'ensemble des biomarqueurs pour les mêmes temps d'exposition et de recouper les débits de doses entre HTO et irradiation gamma. Suite à l'acquisition de ces dernières données, un bilan complet de tous les résultats acquis sur la larve de poisson zèbre en thymidine tritiée, en irradiation gamma et en HTO sera réalisé, et les différents modes d'action seront comparés. L'ensemble des données permettra de calculer un EBR pour le tritium sur le stade larvaire du poisson zèbre. Ces expérimentations sont prévues dans le courant de l'année 2019.

Avec la thèse de Caroline Arcanjo, l'étude des effets du tritium sur les stades embryolairvaires du poisson zèbre a été menée à l'échelle transcriptomique, tout en couplant les réponses moléculaires avec des réponses obtenues à des échelles d'organisation biologique plus élevées, sur les stades 24 et 96 hpf. Des données de transcriptomique ont également été acquises pour les stades 7 et 10 jpf exposés à $1,22 \cdot 10^5$ Bq/mL, mais l'analyse n'est pas encore réalisée. De plus, sur les mêmes stades à la même concentration, des analyses du

protéome ont été réalisées (collaboration avec S. Frelon, IRSN/LECO). L'analyse couplée de ces données permettra de déterminer quelles réponses mises en avant au niveau moléculaire sont traduites au niveau protéique, sur un stade plus âgé, et permettra d'avancer dans la compréhension des modes d'action du tritium sur les poissons.

3.3 Axe 2 : effets du tritium et du rayonnement gamma sur le stade adulte du poisson zèbre

3.3.1 Tritium (Thèse 2019-2022, projet CNL)

Au vu des résultats obtenus sur les stades précoces du poisson zèbre exposés directement au tritium, il semble intéressant d'étudier les effets de ces radionucléides sur le poisson adulte, en allant jusqu'aux effets sur la descendance des poissons contaminés ou irradiés, afin de comparer les effets d'une exposition directe à celle d'une exposition parentale.

Concernant le tritium, un sujet de thèse (2019-2022) va être déposé sur la comparaison d'effets physiologiques radioinduits par le tritium reçu à l'ADN ainsi qu'à d'autres sous-compartiments cellulaires et à l'organisme entier chez le poisson zèbre. En effet, l'ensemble des travaux réalisés jusqu'à présent sur le tritium a permis de valider l'utilisation de différents biomarqueurs d'immunotoxicité et de génotoxicité pour la caractérisation du risque et de mettre en lumière les différences de mécanismes d'action des émetteurs beta en fonction de la forme considérée (thymidine tritiée ou HTO). Dans la continuité de ces résultats, le projet de thèse propose de caractériser la répartition subcellulaire de la dose générée par les émetteurs beta en utilisant différentes formes de tritium (dose liée à l'ADN vs dose à l'échelle de l'organisme entier) afin de caractériser la dose reçue aux différents compartiments cellulaires de manière robuste. Le travail proposé vise à relier la distribution de la dose générée par les émetteurs beta aux effets sur les poissons. Pour répondre à cet objectif, il est proposé d'utiliser des vecteurs de dépôt d'émetteurs beta afin de déposer la dose à des endroits ciblés de la cellule ou de l'organisme afin de caractériser la répartition subcellulaire de la dose. Différents types de vecteurs pourront être utilisés : une forme organique de tritium (comme la thymidine tritiée) permettant de générer un dépôt d'énergie localisé au niveau de l'ADN, la glycine tritiée permettant de localiser le dépôt aux acides aminés, un marqueur de tropisme membranaire, et l'HTO permettant de générer une dose plus homogène à l'organisme entier. Il sera alors possible de mettre en relation la distribution de l'énergie déposée avec les effets mesurés à la même échelle et de mieux appréhender les relations doses-réponses pour les émetteurs beta d'une manière plus générale. Les contaminations des poissons à l'HTO serviront également à faire le lien avec les données précédemment obtenues sur les larves et de comparer les résultats obtenus avec les vecteurs ciblés. Différentes expériences permettant de générer différents débits de dose seront réalisées. Le tritium sera mesuré dans les compartiments biologiques à l'échelle a minima de l'individu et de l'ADN pour les larves, et à l'échelle

subcellulaire et de l'ADN pour les adultes. Différentes formes de tritium seront mesurées (tritium libre et lié à la matière organique (TOL)). Des marqueurs d'effets ciblés seront étudiés chez les poissons adultes contaminés. Ce pourront être des marqueurs impliqués dans l'immunité (apoptose, phagocytose, ROS, lysosomes) et la génotoxicité (dommages à l'ADN mesurés par le test des comètes, marqueur gamma H2AX). Les mécanismes liés aux modifications épigénétiques, qui sont des modifications transmissibles pouvant jouer un rôle important dans les effets transgénérationnels, seront évalués. Le système endocrinien pourra également être suivi par la mesure de certaines hormones. L'expression de gènes impliqués dans les mécanismes précités sera également recherchée. Par la suite, les réponses biologiques seront recherchées à l'échelle macroscopique sur les capacités de reproduction des poissons. La capacité de reproduction sera suivie en termes de succès reproducteur, de taux de survie, d'éclosion et de développement et de comportement des larves produites. Certains marqueurs ciblés du processus de reproduction ainsi que l'expression de gènes impliqués dans ce mécanisme seront suivis. Les larves provenant de parents contaminés pourront continuer à être exposées au tritium ou retourner en condition contrôle. Les mêmes biomarqueurs (immunotoxicité, génotoxicité) que ceux développés sur le stade embryo-larvaire seront mesurés. Les réponses seront alors comparées entre les larves contrôle contaminées tritium et les larves issues de poissons adultes contaminés. En effet, les expériences menées avec CNL sur le poisson tête de boule ont mis en évidence des dommages à l'ADN dans les gonades des poissons exposés au tritium [ARTICLE 4 : Gagnaire et al. (2017) et ARTICLE 10 : Gagnaire et al. (in press)], ce qui justifie l'intérêt d'étudier les effets potentiels sur la descendance. L'ensemble de ces réponses permettra de progresser sur la compréhension des effets transgénérationnels du tritium sur le poisson zèbre.

Toujours sur le tritium, un nouveau projet de collaboration avec les laboratoires CNL est en discussion sur le tête de boule. Le contexte est celui de la contamination des grands lacs canadiens aux éléments traces métalliques et autres types de contaminants industriels dont des polluants radioactifs (iode, tritium, strontium) pouvant atteindre des concentrations importantes à proximité des grandes villes. Le projet est d'exposer les poissons dans l'eau reconstituée ou l'eau du site ramenée au laboratoire et ajouter la contamination en tritium par la nourriture et/ou l'eau. L'étude du multistress sera réalisée dans le cadre d'expositions chroniques (28j, concentrations qui pourraient être atteintes lors d'un accident) et aiguës (<14j, fortes concentrations). La même palette de biomarqueurs que celle étudiée lors des expériences précédentes sera mesurée sur les adultes. Egalement, la reproduction des adultes contaminés en tritium sera suivie à la fin de la période de contamination, et le succès reproducteur des adultes, la mortalité et le développement des larves produites seront évalués. Ce projet permettra de faire le pendant avec la thèse proposée sur le poisson zèbre et de disposer d'un panel d'informations pouvant servir à la comparaison inter-espèce des effets du tritium, et ainsi de progresser sur la compréhension de son mode d'action chez les poissons. Ce projet débutera mi-2019.

3.3.2 Irradiation gamma (Thèse 2018-2021)

De manière similaire au tritium, les résultats obtenus sur les stades précoces du poisson zèbre exposés directement aux rayonnements gamma laissent penser que l'étude de l'irradiation des adultes serait intéressante. L'approche consistera également à étudier les effets sur la descendance des poissons irradiés, afin de comparer les effets d'une exposition directe à celle d'une exposition parentale. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont démontré que des poissons zèbre adultes exposés à 0,5 et 5 mGy/h de rayonnements gamma pendant 24 jours ne présentaient pas de différences par rapport aux témoins en termes de capacités de reproduction ; cependant, la mesure de l'indice de production d'EOR sur les larves issues de ces parents irradiés a diminué pour la condition 5 mGy/h à 4 et 10 jpf, alors que la quantité de dommages à l'ADN et d'apoptose étaient augmentées (stage de M2 de Thomas Munch, 2017). La production d'EOR stimulée au PMA et le LMI mesurés dans la rate des poissons adultes à la fin de la période d'irradiation ont également diminué avec l'augmentation du débit de dose. Ces données très préliminaires demandent à être vérifiées. Ce sera le cas dans le cadre d'une thèse qui va démarrer fin 2018, qui a pour objectif d'évaluer l'héritabilité des effets de l'irradiation gamma chronique à faibles doses (0,5 et 20 mGy/h) au travers de l'étude des effets reprotoxiques à l'échelle individuelle et moléculaire chez le poisson zèbre (Noémie Guirandy, directeur de thèse O. Simon, IRSN/LECO). L'objectif est (i) d'identifier les effets moléculaires (génotoxicité, stress oxydant, immunité et altération des processus de reproduction) chez les adultes, (ii) leurs conséquences sur les performances de reproduction au cours de deux générations, et (iii) d'évaluer la transmission des effets phénotypiques et moléculaires (stress oxydant, immunité, génotoxicité, reprotoxicité) à la descendance (F1). Les résultats pourront être comparés avec ceux obtenus sur les larves issues de parents témoins irradiées aux rayonnements gamma, afin de comprendre la transmission des effets d'une irradiation gamma à la descendance.

3.4 Axe 3 : évaluation des effets de la multipollution sur la santé des organismes

Les expériences réalisées sur les gardons et les épinoches engagés en aval des sites miniers et sur les têtes de boules engagés sur les sites contaminés en HTO ont donné des résultats très intéressants sur les effets des radionucléides sur les poissons, notamment sur les biomarqueurs immunitaires. Il serait également intéressant de continuer des expériences similaires sur des sites soumis à des pollutions radioactives multiples, comme la zone d'exclusion de Tchernobyl, ou bien à Fukushima. Le LECO a déjà mené de nombreuses expériences sur ces territoires contaminés, sur différentes espèces animales (oiseau, grenouille), en capturant les organismes sur les sites d'intérêt. La dernière campagne de prélèvements de rainette verte, *Hyla arborea*, à Tchernobyl sur 12 sites présentant des niveaux de contamination variés par les radionucléides, va d'ailleurs faire l'objet de mesures de paramètres du stress oxydant (SOD, CAT) dans

le foie et d'AChE dans le muscle dans le cadre d'un projet en cours (collaboration J.-M. Bonzom, IRSN/LECO). Une telle approche de prélèvements ne semble pas forcément réalisable sur les poissons, du fait de la méconnaissance des espèces de poissons fréquentant les sites contaminés. L'encagement semble être une possibilité plus facile à mettre en œuvre. Plusieurs sites avec des degrés de contamination variés seraient à inclure dans l'étude. Il serait envisageable de réaliser des contaminations d'au moins un mois, suivies d'une période de dépuración, et d'évaluer une batterie de biomarqueurs sur les poissons contaminés, tout en quantifiant également les radionucléides dans les tissus afin de mesurer la dose absorbée. Pour cela, une collaboration avec des chercheurs locaux serait nécessaire pour suivre les animaux tout au long de l'expérience. Pour l'instant, aucun collaborateur potentiel n'a été identifié, et de ce fait l'espèce de poisson qu'il conviendrait le mieux à cette expérience reste encore à trouver.

Il serait également intéressant d'étudier les effets des rayonnements ionisants sur le terrain en utilisant les abeilles. En effet, les abeilles font partie des organismes modèles utilisés par la CIPR ("Reference Animals and Plants", RAP) (ICRP, 2008) et ont déjà été utilisées pour détecter les radionucléides internalisés suite à l'accident de Tchernobyl notamment (Porrini, 2008). D'autre part, l'étude présentée précédemment (cf §2.3.2) réalisée sur les effets des rayonnements gamma sur la physiologie de l'abeille a permis de mettre en évidence certains biomarqueurs pertinents. Ces éléments font des abeilles un intéressant modèle pour l'étude des effets des rayonnements ionisants. Une perspective de ce travail pourrait être d'utiliser des abeilles et des ruches comme outils de biomonitoring de sites contaminés (Tchernobyl, Fukushima) ou bien autour des centrales nucléaires afin d'évaluer leur impact sur les écosystèmes, en faisant le parallèle avec les effets induits par une irradiation seule au laboratoire. Un tel projet pourrait faire l'objet d'un dépôt de projet à l'ANR avec l'INRA d'Avignon.

3.5 Axe 4 : sensibilité aux maladies infectieuses

Les résultats obtenus dans la thèse d'Antoine Le Guernic sur les effets des effluents miniers sur l'acclimatation des épinoches à un stress soudain (agent pathogène mimé par l'injection de LPS) sont très intéressants. A plus long terme, il serait pertinent de continuer dans la voie d'étude des effets des radionucléides sur la sensibilité aux maladies infectieuses. Le modèle le plus simple pour cette étude serait le poisson zèbre. Ainsi, il serait envisageable d'exposer des poissons au tritium ou aux rayonnements gamma. Les doses et temps seront à choisir en fonction des résultats obtenus dans les thèses pré-citées pour déterminer les conditions les plus appropriées pour induire une immunosuppression. Le profil immunitaire des poissons sera suivi en cytométrie de flux pendant la contamination. Puis, une épreuve virulente avec un pathogène réalisée à la suite de l'exposition à l'agent polluant sera réalisée, afin d'obtenir un outil diagnostique pour évaluer le potentiel global de défense du poisson à résister aux maladies. En effet, en faisant intervenir la plupart des mécanismes immunitaires, spécifiques et non-spécifiques, cette épreuve apporte des informations importantes sur l'état général du système immunitaire des individus (Kennedy

and Farrell, 2008; Wester et al., 1994). Les études portant sur les épreuves infectieuses virales ou bactériennes et les réponses immunitaires (innées ou adaptatives) chez le poisson zèbre sont nombreuses (Meeker and Trede, 2008). En effet, le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (vNPI) et le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (vNHI) se répliquent très bien chez cette espèce au stade adulte, mais seul un effet transitoire sur les précurseurs érythroïdes est mesuré (LaPatra et al., 2000). Par ailleurs, le poisson zèbre est sensible à l'infection par les rhabdovirus de la virémie printanière de la carpe (vVPC) (Sanders et al., 2003) et de la septicémie hémorragique virale (vSHV) (Novoa et al., 2006), qui induisent tous les deux une mortalité importante. Pour ce faire, une collaboration avec le laboratoire ANSES de Plouzané pourra être envisagée. En effet, ce laboratoire maîtrise depuis 30 ans les conditions expérimentales pour réaliser de telles infections virales de poissons (Byrne et al., 2008; Danion et al., 2012a). D'autre part, les lipopolysaccharides (LPS), constituants des parois bactériennes, sont fréquemment utilisés comme agent pathogène sur les poissons (Miest et al., 2012). Dans un premier temps, une étude préliminaire sera effectuée en utilisant différentes doses de pathogène (LPS ou virus) afin de déterminer la sensibilité des organismes. Ensuite, la dose induisant un pourcentage de mortalité fixé (10, 20, 50%) sera utilisée sur les animaux témoins et contaminés. Il sera ainsi possible de déterminer si les animaux préalablement contaminés sont plus sensibles à la maladie (taux de mortalité diminué par rapport aux témoins). Les biomarqueurs immunitaires seront également suivis au cours de la période post-infection afin de voir si les mécanismes de défense contre l'agent infectieux sont affectés différemment chez les animaux témoins et ceux préalablement contaminés ou irradiés. De plus, certains paramètres humoraux spécifiques d'une infection pourront également être mesurés (recherche d'anticorps, mesure de l'activité du complément voie classique) (Danion et al., 2012b). Le suivi de l'expression de gènes spécifiquement liés à l'immunité virale (interféron, TNF) pourra également être inclus. Cet aspect mécanistique sera complété par la mesure des paramètres antioxydants. Ce projet permettrait d'obtenir des données très rares sur l'augmentation de sensibilité de poissons exposés aux radionucléides à des maladies infectieuses, et de progresser sur la compréhension des modes d'action de ces polluants sur le système immunitaire des poissons.

Un autre axe d'étude intéressant en lien avec l'immunité pourrait être l'étude du microbiote intestinal. En effet, chez l'homme, la régulation du nombre de bactéries intestinales par le système immunitaire de l'hôte est un processus complexe (Gaboriau-Routhiau and Cerf-Bensussan, 2016) qui peut être perturbé par différents facteurs pouvant aboutir à des maladies (Purchiaroni et al., 2013). Chez les poissons, les interactions entre le microbiote intestinal et le système immunitaires et l'équilibre fragile et nécessaire entre ces deux éléments sont étudiés depuis une vingtaine d'années (Gómez and Balcázar, 2008). Une étude souligne l'importance de prendre en compte les effets potentiels des variations dans la composition du microbiote sur la reproductibilité et la comparaison des expériences menées sur les poissons et les efforts à faire en terme de standardisation des profils du microbiote (Vatsos, 2017). Cependant, l'impact des contaminants sur le microbiote des poissons n'est pour l'heure pas documenté. Une étude a montré les

effets d'une cyanobactérie sur le microbiote et le système immunitaire du poisson zèbre (Qian et al., 2019). En effet, le poisson zèbre est considéré comme un bon modèle pour étudier les inflammations intestinales (Brugman, 2016). La stérilisation par rayonnements gamma est bien décrite dans le domaine sanitaire (Verde et al., 2004). Au-delà de ces pratiques, les effets des rayonnements ionisants sont connus pour altérer les populations du microbiote intestinal chez l'homme et pour déréguler la réponse immunitaire chez l'homme, dans le cadre des expositions (Sajjadieh, 2016) ou des radiothérapies (Kainthola et al., 2016). Une étude réalisée sur des campagnols dans la zone d'exclusion de Tchernobyl montre que la diversité des microbiomes intestinaux semble diminuer dans les zones présentant une contamination en radionucléides (Lavrinienko et al., 2018). Il serait donc intéressant d'étudier les effets des rayonnements ionisants sur la composition du microbiote du poisson zèbre et les effets subséquents sur le système immunitaire.

4 Références

- Adam-Guillermin, C., Pereira, S., Cavalié, I., Orjollet, D., 2013. Sensibilité, spécificité et représentativité potentielle de marqueurs de génotoxicité pour l'analyse des effets des radionucléides. Application au tritium et à l'irradiation gamma (action GGP-Environnement, fiche V1-201, année 2012). Rapport IRSN/PRP-ENV/SERIS/2013-005. IRSN, p. 14.
- 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 Reviews of environmental contamination and toxicology 220, 67-103.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2006. Anguilla anguilla L. oxidative stress biomarkers: An in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). Chemosphere 65, 952-962.
- Akcha, F., Leday, G., Pfohl-Leszkowicz, A., 2004. Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 552, 197-207.
- Amara, R., Selleslagh, J., Billon, G., Minier, C., 2009. Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. Hydrobiologia 627, 87-98.
- Amiard, J.-C., Amiard Triquet, C., 2008. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier.
- 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. Environmental Toxicology and Chemistry 29, 730-741.
- Arcanjo, C., 2018. Etude des effets de l'eau tritiée sur les stades de développement précoces chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) : caractérisation des modes d'action, Sciences de l'Environnement. Université Aix-Marseille, Aix-Marseille, p. 150.
- Arcanjo, C., Armant, O., Floriani, M., Cavalié, I., Camilleri, V., Simon, O., Orjollet, D., Adam-Guillermin, C., Gagnaire, B., 2018. Tritiated water exposure disrupts myofibril structure and induces misregulation of eye opacity and DNA repair genes in zebrafish early life stages. Aquatic Toxicology 200, 114-126.
- Arcanjo, C., Maro, D., Camilleri, V., Cavalié, I., Simon, O., Beaugelin-Seiller, K., Carasco, L., Orjollet, D., Adam-Guillermin, C., Gagnaire, B., 2019. Assessing tritium internalisation in zebrafish early life stages: Importance of rapid isotopic exchange. Journal of Environmental Radioactivity 203, 30-38.
- Arcanjo, C., Murat El Houdigui, S., Loro, G., Della-Vedova, C., Floriani, M., Cavalié, I., Camilleri, V., Adam-Guillermin, C., Gagnaire, B., in prep. From molecule to individual: behavioral and microscopic analysis of zebrafish embryo-larvae after tritiated water exposure
- Arnot, J.A., Gobas, F.A.P.C., 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. Environ Rev 14, 257-297.
- ASN, 2010. Livre blanc du tritium - The tritium white paper. <http://www.asn.fr/sites/tritium>.
- Augustine, S., 2012. Metabolic programming of zebrafish, *Danio rerio*, uncovered - physiological performance as explained by Dynamic Energy Budget Theory and life-cycle consequences of uranium induced perturbations. Vrije Universiteit / Université Aix Marseille I, Amsterdam, p. 228.
- Augustine, S., Gagnaire, B., Adam-Guillermin, C., Kooijman, S.A.L.M., 2012. Effects of uranium on the metabolism of zebrafish, *Danio rerio*. Aquatic Toxicology 118-119, 9-26.
- Augustine, S., Gagnaire, B., Floriani, M., Adam-Guillermin, C., Kooijman, S.A.L.M., 2011. Developmental energetics of zebrafish, *Danio rerio*. Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology 159, 275-283.
- Augustine, S., Pereira, S., Floriani, M., Camilleri, V., Kooijman, S.A.L.M., Gagnaire, B., Adam-Guillermin, C., 2015. Effects of chronic exposure to environmentally relevant concentrations of waterborne depleted uranium on the digestive tract of zebrafish, *Danio rerio*. Journal of Environmental Radioactivity 142, 45-53.

- Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M.J., Cazenave, J., 2014. Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. *Ecological Indicators* 36, 532-538.
- Bado-Nilles, A., 2017. Immunotoxicologie environnementale et biosurveillance des milieux. Mémoire HDR, Université de Reims Champagne-Ardennes. Reims Champagne-Ardennes, p. 146.
- Bado-Nilles, A., Betoulle, S., Geffard, A., Porcher, J.M., Gagnaire, B., Sanchez, W., 2013. Flow cytometry detection of lysosomal presence and lysosomal membrane integrity in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) immune cells: Applications in environmental aquatic immunotoxicology. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 2692-2704.
- Bado-Nilles, A., Jolly, S., Lamand, F., Geffard, A., Gagnaire, B., Turies, C., Porcher, J.M., Sanchez, W., Betoulle, S., 2015. Involvement of fish immunomarkers in environmental biomonitoring approach: Urban and agri-viticultural context. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 120, 35-40.
- Bado-Nilles, A., Jolly, S., Porcher, J.M., Palluel, O., Geffard, A., Gagnaire, B., Betoulle, S., Sanchez, W., 2014a. Applications in environmental risk assessment of leucocyte apoptosis, necrosis and respiratory burst analysis on the European bullhead, *Cottus* sp. *Environmental Pollution* 184, 9-17.
- Bado-Nilles, A., Quentel, C., Auffret, M., Le Floch, S., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2009. Immune effects of HFO on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1446-1454.
- Bado-Nilles, A., Techer, R., Porcher, J.M., Geffard, A., Gagnaire, B., Betoulle, S., Sanchez, W., 2014b. Detection of immunotoxic effects of estrogenic and androgenic endocrine disrupting compounds using splenic immune cells of the female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L.). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 38, 672-683.
- Baraldi, P.G., Di Virgilio, F., Romagnoli, R., 2004. Agonists and antagonists acting at P2X7 receptor. *Current topics in medicinal chemistry* 4, 1707-1717.
- Barillet, S., Adam-Guillermin, C., Palluel, O., Porcher, J.M., Devaux, A., 2011. Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environmental Pollution* 159, 495-502.
- 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.
- Barillet, S., Buet, A., Adam, C., Devaux, A., 2005. Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio* ? *Radioprotection* 40 175-181.
- Barron, A., McDonald, J., Hughes, W., 1970. Long-term complications of beta-radiation therapy in ophthalmology. *Transactions of the American Ophthalmological Society* 68, 112.
- Beaton, D., Gosselin, I., Festarini, A., Gagnaire, B., Farrow, F., Cavalie, I., Schultz, C., Kim, S.B., Walsh, S., Ikert, H., Chen, H.Q., Adam-Guillermin, C., Stuart, M., accepté. Correlated Biomarker Responses for DNA Damage and Innate Immunity Revealed in a Comparison between Field and Laboratory Studies: Fathead Minnow Exposed to Tritium *Science of the Total Environment*.
- Beaugelin-Seiller, K., Jasserand, F., Garnier-Laplace, J., Gariel, J.C., 2004. EDEN: Software to calculate the dose rate of energy for the non-human biota, due to the presence of radionuclides in the environment, in: Latini, G., Passerini, G., Brebbia, C.A. (Eds.), *Tenth International Conference on Development and Application of Computer Techniques to Environmental Studies, ENVIROSOFT X*, Ancona, pp. 87-96.
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1316-1322.
- Bervoets, L., Blust, R., Verheyen, R., 2001. Accumulation of metals in the tissues of three spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) from natural fresh waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48, 117-127.
- Besse, J.-P., Geffard, O., Coquery, M., 2011. Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales. Partenariat 2011 – Domaine substances polluantes ; Action 20 – Surveillance des substances prioritaires dans le biote.
- Bocquené, G., Galgani, F., Walker, C., 1997. Les cholinestérases, biomarqueurs de neurotoxicité. *Collection Écologie*, Masson, Paris, pp. 209-240.

- Bogen, D., Welford, G., White, C., 1979. Tritium distribution in man and his environment. IAEA-SM-232 75, 567-574.
- Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C., Lee, L.E., 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 853-873.
- Bonin, B., Blanc, P.L., 2001. L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine, in: Métivier, H. (Ed.), *L'uranium de l'environnement à l'homme*. EDP Sciences, Les Ulis, pp. 7-41.
- Bourrachot, S., Brion, F., Pereira, S., Floriani, M., Camilleri, V., Cavalié, I., Palluel, O., Adam-Guillermin, C., 2014. Effects of depleted uranium on the reproductive success and F1 generation survival of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 154, 1-11.
- Bourrachot, S., Simon, O., Gilbin, R., 2008. The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 90, 29-36.
- Boyer, C., Vichot, L., Fromm, M., Losset, Y., Tatin-Froux, F., Guétat, P., Badot, P.M., 2009. Tritium in plants: A review of current knowledge. *Environ. Exp. Bot.* 67, 34-51.
- Brousseau, P., Dunier, M., Deschaux, P., De Guise, S., Krzystyniak, K., Fournier, M., 1997. Marqueurs immunologiques, in: Masson (Ed.), *Biomarqueurs en écotoxicologie - aspects fondamentaux*, Paris, pp. 287-314.
- Brugman, S., 2016. The zebrafish as a model to study intestinal inflammation. *Developmental and Comparative Immunology* 64, 82-92.
- Burgeot, T., Bessineton, C., 1999. *Des organismes sous stress*. Editions Quae.
- Byrne, N., Castric, J., Lamour, F., Cabon, J., Quentel, C., 2008. Study of the viral interference between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* 24, 489-497.
- Carlson, E.A., Zelikoff, J.T., 2005. The immune system of fish : a target organ of toxicity, in: Di Giulio, R., Hinton, D. (Eds.), *Toxicology of fishes*. CRC Press, Boca Raton, pp. 489-530.
- Carru, A.M., Teil, M.J., Blanchard, M., Chevreuil, M., Chesterikoff, A., 1996. Evaluation of the roach (*Rutilus rutilus*) and the perch (*Perca fluviatilis*) for the biomonitoring of metal pollution. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 31, 1149-1158.
- Casarett, A.P., 1968. *Radiation Biology*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- Chambers, D.B., Osborne, R.V., Garva, A.L., 2006. Choosing an alpha radiation weighting factor for doses to non-human biota. *Journal of Environmental Radioactivity* 87, 1-14.
- Chilmonczyk, S., Monge, D., 1999. Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 319-333.
- Chilmonczyk, S., Oui, E., 1988. The effects of gamma irradiation on the lymphoid organs of rainbow trout and subsequent susceptibility to fish pathogens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 18, 173-180.
- Coles, J.A., Pipe, R.K., 1994. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish & Shellfish Immunology* 4, 337-352.
- Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Appl. Biochem. Biotechnol. Part B Mol. Biotechnol.* 26, 249-261.
- Colosio, C., Birindelli, S., Corsini, E., Galli, C.L., Maroni, M., 2005. Low level exposure to chemicals and immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology* 207, 320-328.
- Cooley, H.M., Evans, R.E., Klaverkamp, J.F., 2000. Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* 48, 495-515.
- Craft, E., Abu-Qare, A., Flaherty, M., Garofolo, M., Rincavage, H., Abou-Donia, M., 2004. Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews* 7, 297-317.
- Danion, M., Le Floch, S., Castric, J., Lamour, F., Cabon, J., Quentel, C., 2012a. Effect of chronic exposure to pendimethalin on the susceptibility of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* L., to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79, 28-34.

- Danion, M., Le Floch, S., Kanan, R., Lamour, F., Quentel, C., 2012b. Effects of in vivo chronic exposure to pendimethalin/Prowl 400Â® on sanitary status and the immune system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Science of the Total Environment* 424, 143-152.
- Davies, I.M., Vethaak, A.D., 2012. Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES, Copenhagen.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3, 161-172.
- Devaux, A., Flammarion, P., Bernardon, V., Garric, J., Monod, G., 1998. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in Chub (*Leuciscus cephalus*). *Marine Environmental Research* 46, 257-262.
- Diabate, S., Strack, S., 1993. Organically bound tritium. *Health physics* 65, 698-712.
- Dobson, R.L., Kwan, T.C., 1978. The tritium RBE at low-level exposure--variation with dose, dose rate, and exposure duration. *Curr Top Radiat Res Q* 12, 44-62.
- Dublineau, I., Grandcolas, L., Grison, S., Baudelin, C., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., 2007. Modifications of inflammatory pathways in rat intestine following chronic ingestion of depleted uranium. *Toxicological Sciences* 98, 458-468.
- Ellis, A.E., 1989. The immunology of teleosts, in: Roberts, R.J. (Ed.), *Fish Pathology*. Bailliere Tindall, London, pp. 92-104.
- Ellis, A.E., 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 291-308.
- Erickson, R.C., 1971. Effects of chronic irradiation by tritiated water on *Poecilia reticulata*, the guppy. National Technical Information Service, US Department of Commerce, Springfield.
- Etoh, H., Hyodo-Taguchi, Y., 1983. Effects of tritiated water on germ cells in medaka embryos. *Radiation Research* 93, 332-339.
- Eyckmans, M., Celis, N., Horemans, N., Blust, R., De Boeck, G., 2011. Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. *Aquatic Toxicology* 103, 112-120.
- Favier, A., 2003. Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108-115.
- Fernández-Dávila, M.L., Razo-Estrada, A.C., García-Medina, S., Gómez-Oliván, L.M., Piñón-López, M.J., Ibarra, R.G., Galar-Martínez, M., 2012. Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (*Cyprinidae-Ctenopharingodon idella*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 76, 87-92.
- Flammarion, P., Devaux, A., Garric, J., 2001. Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Exemples d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 209-226.
- Forbes, V.E., Forbes, T.L., 1997. *Ecotoxicologie: théorie et applications*. Editions Quae.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental toxicology and chemistry* 25, 272-280.
- Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Brousseau, P., 2000. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *American Zoologist* 40, 412-420.
- Froger, A., Clemens, D., Kalman, K., Németh-Cahalan, K.L., Schilling, T.F., Hall, J.E., 2010. Two distinct aquaporin 0s required for development and transparency of the zebrafish lens. *Investigative ophthalmology & visual science* 51, 6582-6592.
- Gaboriau-Routhiau, V., Cerf-Bensussan, N., 2016. Gut microbiota and development of the immune system. *Med. Sci.* 32, 961-967.
- Gagnaire, B., Adam-Guillermin, C., Festarini, A., Cavalié, I., Della-Vedova, C., Shultz, C., Kim, S.B., Ikert, H., Dubois, C., Walsh, S., Farrow, F., Beaton, D., Tan, E., Wen, K., Stuart, M., 2017. Effects of in situ exposure to tritiated natural environments: A multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Science of the Total Environment* 599-600, 597-611.
- Gagnaire, B., Arcanjo, C., Camilleri, V., Cavalié, I., Floriani, M., Frelon, S., Orjollet, D., Simon, O., Adam-Guillermin, C., 2018. Sensibilité, spécificité et représentativité potentielle de marqueurs de génotoxicité pour l'analyse des effets des radionucléides. Application au tritium et à l'irradiation gamma

(action GGP-Environnement, fiche V1-201, année 2017). Rapport IRSN/RT/PSE-ENV/SRTE/2018-00017. IRSN, p. 37.

Gagnaire, B., Arcanjo, C., Cavalié, I., Simon, O., Floriani, M., Camilleri, V., Orjollet, D., Adam-Guillermin, C., 2015a. Sensibilité, spécificité et représentativité potentielle de marqueurs de génotoxicité pour l'analyse des effets des radionucléides. Application au tritium et à l'irradiation gamma (action GGP-Environnement, fiche V1-201, année 2015). Rapport IRSN/PRP-ENV/SERIS/2015-00029. IRSN, p. 28.

Gagnaire, B., Arcanjo, C., Cavalié, I., Simon, O., Floriani, M., Camilleri, V., Orjollet, D., Adam-Guillermin, C., 2016. Sensibilité, spécificité et représentativité potentielle de marqueurs de génotoxicité pour l'analyse des effets des radionucléides. Application au tritium et à l'irradiation gamma (action GGP-Environnement, fiche V1-201, année 2016). Rapport IRSN/PRP-ENV/SERIS/2016-00017. IRSN, p. 30.

Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Betoulle, S., Amara, R., Camilleri, V., Cavalié, I., Chadili, E., Delahaut, L., Kerambrun, E., Orjollet, D., Palluel, O., Sanchez, W., 2015b. Former uranium mine-induced effects in caged roach: a multiparametric approach for the evaluation of in situ metal toxicity. *Ecotoxicology* 24, 215-231.

Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Sanchez, W., 2014. Depleted Uranium Disturbs Immune Parameters in Zebrafish, *Danio rerio*: An Ex Vivo/In Vivo Experiment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 67, 426-435.

Gagnaire, B., Bonnet, M., Tchamitchian, S., Cavalié, I., Della-Vedova, C., Dubourg, N., Adam-Guillermin, C., Brunet, J.L., Belzunces, L.P., 2019. Physiological effects of gamma irradiation in the honeybee, *Apis mellifera*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 174, 153-163.

Gagnaire, B., Boyer, P., Bonzom, J.M., Lecomte-Pradines, C., Simon, O., Gilbin, R., 2011. Transfer modelling and toxicity evaluation of the effluent from an installation of cleansing and uranium recovery using a battery of bioassays. *Ecotoxicology* 20, 187-201.

Gagnaire, B., Cavalié, I., Camilleri, V., Adam-Guillermin, C., 2013. Effects of depleted uranium on oxidative stress, detoxification, and defence parameters of zebrafish *danio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64, 140-150.

Gagnaire, B., Cavalié, I., Pereira, S., Floriani, M., Dubourg, N., Camilleri, V., Adam-Guillermin, C., 2015c. External gamma irradiation-induced effects in early-life stages of zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology* 169, 69-78.

Gagnaire, B., Gosselin, I., Festarini, A., Walsh, S., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., Della-Vedova, C., Farrow, F., Kim, S.B., Shkarupin, A., Chen, H.Q., Beaton, D., Stuart, M., in press. Effects of in vivo exposure to tritium: a multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Environmental Science and Pollution Research*.

Gagnaire, B., Gosselin, I., Festarini, A., Walsh, S., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., Della-Vedova, C., Farrow, F., Kim, S.B., Shkarupin, A., Chen, H.Q., Beaton, D., Stuart, M., online. Effects of in vivo exposure to tritium: a multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Environmental Science and Pollution Research*.

Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T., Renault, T., 2006. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology* 22, 1-14.

Galeriu, D., Davis, P., Raskob, W., Melintescu, A., 2008. Recent progresses in tritium radioecology and dosimetry. *Fusion science and technology* 54, 237-242.

Galeriu, D., Heling, R., Melintescu, A., 2005. The dynamics of tritium-including OBT-in the aquatic food chain. *Fusion science and technology* 48, 779-782.

Galeriu, D., Melintescu, A., 2011. A model approach for tritium dynamics in wild mammals. *Radioprotection* 46, S445-S451.

Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project – a multi-biomarker approach to ecosystem management. *Marine environmental research* 58, 233-237.

Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 10, 5-23.

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

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. *Environmental Science and Technology* 40, 6498-6505.

Garnier-Laplace, J., Geras'kin, S., Della-Vedova, C., Beaugelin-Seiller, K., Hinton, T.G., 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. *Journal of Environmental Radioactivity* 121, 12-21.

Gaschak, S.P., Maklyuk, Y.A., Maksimenko, A.M., Bondarkov, M.D., Jannik, G.T., Farfán, E.B., 2011. Radiation ecology issues associated with murine rodents and shrews in the Chernobyl Exclusion Zone. *Health Physics* 101, 416-430.

Geffard, O., Ferrari, B., Chaumot, A., Montuelle, B., 2010. Les expérimentations *in situ*: principes et perspectives. *Sciences Eaux & Territoires*, 20-25.

Gómez, G.D., Balcázar, J.L., 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 145-154.

Greenwood, L.N., Knowles, J.F., 1995. Effect of chronic irradiation on the humoral immune response of a marine fish, the eelpout (*Zoarces Viviparus* L.). *International Journal of Radiation Biology* 67, 71 - 77.

Hall, E.J., Oliver, R., Bedford, J.S., 1967. The relative biological effectiveness of tritium beta particles compared to gamma radiation--its dependence on dose-rate. *Br J Radiol* 40, 704-710.

Harrison, J.D., Khursheed, A., Lambert, B.E., 2002. Uncertainties in dose coefficients for intakes of tritiated water and organically bound forms of tritium by members of the public. *Radiation Protection Dosimetry* 98, 299-311.

Hayet, A., Deram, A., Couffignal, B., 2009. Évaluation des risques écologiques (ERE): vers une harmonisation des méthodes et des outils à l'échelle européenne. *Environnement, Risques & Santé* 8, 137-147.

Hermann, A.C., Millard, P.J., Blake, S.L., Kim, C.H., 2004. Development of a respiratory burst assay using zebrafish kidneys and embryos. *Journal of Immunological Methods* 292, 119-129.

Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences* 86, 6-19.

Hopkin, S., 1993. *In situ* biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystems. *Handbook of ecotoxicology*, 397-427.

Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrlé Jr, P.M., Bergman, H.L., 1992. Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers Boca Raton, FL.

ICES, 2004. Report of the ICES Advisory Committee on the Marine Environment. ICES, Copenhagen.

ICRP, 2008. ICRP Publication 108. Environmental Protection: The Concept and Use of Reference Animals and Plants. *Ann ICRP* 37, 1-242.

INERIS, 2005. Chrome et ses dérivés INERIS.

IRSN, 2007. Inventaire national des sites miniers d'uranium v2. Mémoire et Impact des Mines d'urAniUm : Synthèse et Archives (programme MIMAUSA).

Jaeschke, B.C., Millward, G.E., Moody, A.J., Jha, A.N., 2011. Tissue-specific incorporation and genotoxicity of different forms of tritium in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution* 159, 274-280.

Kainthola, A., Gupta, N., Agrawala, P.K., 2016. Gastrointestinal microflora in radiation injury and countermeasure. *Annu. Res. Rev. Biol.* 10.

Kalinich, J.F., Ramakrishnan, N., Villa, V., McClain, D.E., 2002. Depleted uranium-uranyl chloride induces apoptosis in mouse J774 macrophages. *Toxicology* 179, 105-114.

Kaniewska-Prus, M., 1982. The effect of ammonia, chlorine, and chloramine toxicity on the mortality of *Daphnia magna* Straus. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 29, 607-624.

Kelly, J.M., Janz, D.M., 2009. Assessment of oxidative stress and histopathology in juvenile northern pike (*Esox lucius*) inhabiting lakes downstream of a uranium mill. *Aquatic Toxicology* 92, 240-249.

Kennedy, C.J., Farrell, A.P., 2008. Immunological alterations in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasii*, exposed to aqueous hydrocarbons derived from crude oil. *Environmental Pollution* 153, 638-648.

Kim, S.B., Korolevych, V., 2013. Quantification of exchangeable and non-exchangeable organically bound tritium (OBT) in vegetation. *Journal of Environmental Radioactivity* 118, 9-14.

Kim, S.B., Shultz, C., Stuart, M., Festarini, A., 2015. Tritium uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): HTO and OBT-spiked feed exposures simultaneously. *Applied Radiation and Isotopes* 98, 96-102.

Kim, S.B., Shultz, C., Stuart, M., McNamara, E., Festarini, A., Bureau, D.P., 2013. Organically bound tritium (OBT) formation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): HTO and OBT-spiked food exposure experiments. *Applied Radiation and Isotopes* 72, 114-122.

Köllner, B., Wasserrab, B., Kotterba, G., Fischer, U., 2002. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)--how can environmental influences be detected? *Toxicology Letters* 131, 83-95.

Kooijman, S., 1986. Energy budgets can explain body size relations. *J. Theor. Biol.* 121, 269-282.

Kooijman, S.A.L.M., 2000. Dynamic energy and mass budgets in biological systems. Cambridge university press.

Kooijman, S.A.L.M., 2010. Dynamic energy budget theory for metabolic organisation. Cambridge university press.

Krzystyniak, K., Tryphonas, H., Fournier, M., 1995. Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity. *Environmental Health Perspectives* 103 Suppl 9, 17-22.

Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B., Brunk, U.T., 2008. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780, 1291-1303.

Labrot, F., Ribera, D., Saint Denis, M., 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.

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie - aspects fondamentaux. Masson, Paris.

Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S.M., Belzunces, L.P., Emond, C., Guerbet, M., Rousselle, C., 2015. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: A qualitative method of assessment -No section. *Environ. Health Global Access Sci. Sour.* 14.

Lage, C.R., Nayak, A., Kim, C.H., 2006. Arsenic ecotoxicology and innate immunity. *Integr. Comp. Biol.* 46, 1040-1054.

LaPatra, S.E., Barone, L., Jones, G.R., Zon, L.I., 2000. Effects of infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus infection on hematopoietic. Precursors of the zebrafish. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 26, 445-452.

Lavrinenko, A., Tukalenko, E., Mappes, T., Watts, P.C., 2018. Skin and gut microbiomes of a wild mammal respond to different environmental cues. *Microbiome* 6.

Le Guernic, A., Sanchez, W., Bado-Nilles, A., Palluel, O., Turies, C., Chadili, E., Cavalié, I., Delahaut, L., Adam-Guillermin, C., Porcher, J.M., Geffard, A., Betoulle, S., Gagnaire, B., 2016a. In situ effects of metal contamination from former uranium mining sites on the health of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.). *Ecotoxicology* 25, 1234-1259.

Le Guernic, A., Sanchez, W., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Floriani, M., Turies, C., Chadili, E., Vedova, C.D., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., Porcher, J.M., Geffard, A., Betoulle, S., Gagnaire, B., 2016b. Acclimation capacity of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to a sudden biological stress following a polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Ecotoxicology* 25, 1478-1499.

Le Guernic, A., Sanchez, W., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Turies, C., Chadili, E., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., Porcher, J.M., Geffard, A., Betoulle, S., Gagnaire, B., 2016c. In situ experiments to assess effects of constraints linked to caging on ecotoxicity biomarkers of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 42, 643-657.

Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544, 43-64.

- Lerebours, A., Gonzalez, P., Adam, C., Camilleri, V., Bourdineaud, J.P., Garnier-Laplace, J., 2009. Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles, and gills of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant waterborne uranium concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 1271-1278.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science and Technology* 39, 1921-1931.
- Macaeva, E., Mysara, M., De Vos, W.H., Baatout, S., Quintens, R., 2018. Gene expression-based biodosimetry for radiological incidents: assessment of dose and time after radiation exposure. *International Journal of Radiation Biology* 95, 64-75.
- Macaeva, E., Saeys, Y., Tabury, K., Janssen, A., Michaux, A., Benotmane, M.A., De Vos, W.H., Baatout, S., Quintens, R., 2016. Radiation-induced alternative transcription and splicing events and their applicability to practical biodosimetry. *Sci. Rep.* 6.
- Maria, V.L., Ahmad, I., Oliveira, M., Serafim, A., Bebianno, M.J., Pacheco, M., Santos, M.A., 2009. Wild juvenile *Dicentrarchus labrax* L. liver antioxidant and damage responses at Aveiro Lagoon, Portugal. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1861-1870.
- Martins, J., Oliva Teles, L., Vasconcelos, V., 2007. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International* 33, 414-425.
- Meeker, N.D., Trede, N.S., 2008. Immunology and zebrafish: Spawning new models of human disease. *Developmental & Comparative Immunology* 32, 745-757.
- Melintescu, A., Galeriu, D., Diabaté, S., Strack, S., 2015. Preparatory steps for a robust dynamic model for organically bound tritium dynamics in agricultural crops. *Fusion. Sci. Technol.* 67, 479-482.
- Melintescu, A., Galeriu, D., Takeda, H., 2007. Reassessment of tritium dose coefficients for the general public. *Radiation Protection Dosimetry* 127, 153-157.
- Miest, J.J., Falco, A., Pionnier, N.P.M., Frost, P., Irnazarow, I., Williams, G.T., Hoole, D., 2012. The influence of dietary beta-glucan, PAMP exposure and *Aeromonas salmonicida* on apoptosis modulation in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology* 33, 846-856.
- Monleau, M., De Méo, M., Paquet, F., Chazel, V., Duménil, G., Donnadiou-Claraz, M., 2006. Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicological Sciences* 89, 287-295.
- Moore, M.N., 2002. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 59, 1-15.
- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Paul Leonard, D.R., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552, 247-268.
- Mousseau, T.A., Møller, A.P., 2013. Elevated frequency of cataracts in birds from Chernobyl. *PloS one* 8, e66939.
- Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J., Belosevic, M., 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 807-825.
- Novoa, B., Romero, A., Mulero, V., Rodríguez, I., Fernández, I., Figueras, A., 2006. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of vaccination against viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Vaccine* 24, 5806-5816.
- OECD, 2004. OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. Test 203 : Fish, acute toxicity test.
- Oikari, A., 2006. Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic Toxicology* 78, 370-381.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2010. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative Med. Cell. Longevity* 3, 2-12.
- Parant, M., 1998. Xenobiotic metabolism in bivalves. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série III - Sciences de la Vie -Life* 321, 485-494.
- Peakall, D.B., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* 3, 157-160.

- Peakall, D.B., Walker, C.H., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (3). *Vertebrates. Ecotoxicology* 3, 173-179.
- Pereira, R., Pereira, M.L., Ribeiro, R., Goncalves, F., 2006. Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus* L.) and Algerian mice (*Mus spretus* Lataste) from an abandoned mine area (Southeast Portugal). *Environ Pollut* 139, 561-575.
- Pereira, S., Bourrachot, S., Cavalie, I., Plaire, D., Dutilleul, M., Gilbin, R., Adam-Guillermin, C., 2011. Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. *Environmental Toxicology and Chemistry* 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. *Aquatic Toxicology* 109, 11-16.
- Pernot, E., Hall, J., Baatout, S., Benotmane, M.A., Blanchardon, E., Bouffler, S., El Saghire, H., Gomolka, M., Guertler, A., Harms-Ringdahl, M., Jeggo, P., Kreuzer, M., Laurier, D., Lindholm, C., Mkacher, R., Quintens, R., Rothkamm, K., Sabatier, L., Tapio, S., de Vathaire, F., Cardis, E., 2012. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 751, 258-286.
- Peterson, C.H., Rice, S.D., Short, J.W., Esler, D., Bodkin, J.L., Ballachey, B.E., Irons, D.B., 2003. Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. *Science* 302, 2082-2086.
- Porrini, C., 2008. Les abeilles utilisées pour détecter la présence de radio-isotopes dans l'environnement. *Bulletin Technique Apicole* 35, 165-167.
- Pourahmad, J., Ghashang, M., Etehad, H.A., Ghalandari, R., 2006. A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity. *Environmental Toxicology* 21, 349-354.
- Purchiaroni, F., Tortora, A., Gabrielli, M., Bertucci, F., Gigante, G., Ianiro, G., Ojetti, V., Scarpellini, E., Gasbarrini, A., 2013. The role of intestinal microbiota and the immune system. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 17, 323-333.
- Pyle, G.G., Swanson, S.M., Lehmkuhl, D.M., 2001. Toxicity of uranium mine-receiving waters to caged fathead minnows, Pimephales promelas. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48, 202-214.
- Qian, H., Zhang, M., Liu, G., Lu, T., Sun, L., Pan, X., 2019. Effects of different concentrations of *Microcystis aeruginosa* on the intestinal microbiota and immunity of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 214, 579-586.
- Ragnarsdottir, K.V., Charlet, L., 2000. Uranium behavior in natural environments, in: Cotter-Howells, J., Batchelder, M., Campbell, L., Valsami-Jones, E. (Eds.), *Environmental Mineralogy: Microbial Interactions, Anthropogenic Influences, Contaminated Land and Waste Management*. Mineralogical Society of Great Britain and Ireland, pp. 333-377.
- Rainbow, P.S., 2007. Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. *Environment International* 33, 576-582.
- Real, A., Sundell-Bergman, S., Knowles, J.F., Woodhead, D.S., Zinger, I., 2004. Effects of ionising radiation exposure on plants, fish and mammals: Relevant data for environmental radiation protection. *J. Radiol. Prot.* 24, A123-A137.
- Rehberger, K., Werner, I., Hitzfeld, B., Segner, H., Baumann, L., 2017. 20 Years of fish immunotoxicology—what we know and where we are. *Critical Reviews in Toxicology* 47, 509-535.
- Reynders, H., Bervoets, L., Gelders, M., De Coen, W.M., Blust, R., 2008. Accumulation and effects of metals in caged carp and resident roach along a metal pollution gradient. *Science of the Total Environment* 391, 82-95.
- Ritz, B., Morgenstern, H., Crawford-Brown, D., Young, B., 2000. The effects of internal radiation exposure on cancer mortality in nuclear workers at rocketdyne/atomics international. *Environmental Health Perspectives* 108, 743-751.
- Sajjadih, M.R.S., 2016. External human exposure and management immune system in pathogenesis of irritable bowel syndrome. *Intl. J. Radiat. Res.* 14, 165-171.
- Sanchez, W., 2007. Approche multi-biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.): un modèle pour la surveillance des écosystèmes aquatiques continentaux. *Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS*.

- Sanchez, W., Katsiadaki, I., Piccini, B., Ditche, J.M., Porcher, J.M., 2008a. Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: A multiparametric approach. *Environment International* 34, 490-498.
- Sanchez, W., Piccini, B., Ditche, J.M., Porcher, J.M., 2008b. Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. *Environment International* 34, 791-798.
- Sanchez, W., Porcher, J.M., 2009. Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 28, 150-158.
- Sanders, G.E., Batts, W.N., Winton, J.R., 2003. Susceptibility of Zebrafish (*Danio rerio*) to a Model Pathogen, Spring Viremia of Carp Virus. *Comparative Medicine* 53, 514-521.
- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Senecal, L., Goudreau, P., Fournier, M., 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology* 58, 189-200.
- Sazykina, T.G., Kryshev, A.I., 2003. EPIC database on the effects of chronic radiation in fish: Russian/FSU data. *Journal of Environmental Radioactivity* 68, 65-87.
- Scala, R., 1991. Risk assessment, Casarett and Doull's Toxicology. Pergamon Press Elmsford, NY, p. 985.
- Simon, O., 2013. Intégration de l'étude de la biodistribution des polluants dans l'évaluation du risque écologique. Vers l'émergence d'une valeur seuil de bioaccumulation toxique. Mémoire HDR, Université de Bordeaux. Bordeaux, p. 88.
- Simon, O., Gagnaire, B., Somnard, V., Pierrisnard, S., Camilleri, V., Carasco, L., Gilbin, R., Frelon, S., 2019. Uranium transfer and accumulation in organs of *Danio rerio* after waterborne exposure alone or combined with diet-borne exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 38, 90-98.
- Simon, O., Massarin, S., Coppin, F., Hinton, T.G., Gilbin, R., 2011. Investigating the embryo/larval toxic and genotoxic effects of \hat{P}^3 irradiation on zebrafish eggs. *Journal of Environmental Radioactivity* 102, 1039-1044.
- Smith, J.G., Beresford, N., 2005. Chernobyl : Catastrophe and Consequences, Chichester.
- Snieszko, S.F., 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology* 6, 197-208.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10, 23-28.
- Song, Z.F., Wu, T.X., Cai, L.S., Zhang, L.J., Zheng, X.D., 2006. Effects of dietary supplementation with clostridium butyricum on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy*. *Journal of Zhejiang University Science B* 7, 596-602.
- Strand, J.A., Fujihara, M.P., Poston, T.M., Abernethy, C.S., 1982. Permanence of suppression of the primary immune response in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, sublethally exposed to tritiated water during embryogenesis. *Radiation Research* 91, 533-541.
- Sturm, A., Wogram, J., Segner, H., Liess, M., 2000. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Application in biomonitoring. *Environmental toxicology and chemistry* 19, 1607-1615.
- Suyama, I., Etoh, H., Maruyama, T., Kato, Y., Ichikawa, R., 1981. Effects of ionizing radiation on the early development of *Oryzias* eggs. *J. RADIAT. RES.* 22, 125-133.
- Thiébaud, 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. *Toxicological Sciences* 98, 479-487.
- Thomas, P.A., 2000. Radionuclides in the terrestrial ecosystem near a Canadian uranium mill - Part I: Distribution and doses. *Health Physics* 78, 614-624.
- Turnpenny, A.W.H., Williams, R., 1981. Factors affecting the recovery of fish populations in an industrial river. *Environmental Pollution Series A: Ecological and Biological* 26, 39-58.
- UNSCEAR, 1996. Sources and effects of ionising radiation, report for the general assembly, New York.

- Valcke, M., Buteau, S., Belleville, D., Phaneuf, D., Bourgault, M.H., Nantel, A., 2012. Lignes directrices pour la réalisation des évaluations du risque toxicologique d'origine environnementale au Québec. Institut national de santé publique du Québec.
- van Dam, R.A., Humphrey, C.L., Martin, P., 2002. Mining in the Alligator Rivers Region, northern Australia: Assessing potential and actual effects on ecosystem and human health. *Toxicology* 181-182, 505-515.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- Van Leeuwen, C.J., Vermeire, T.G., 2007. Risk assessment of chemicals: an introduction. Springer Science & Business Media.
- Vatsos, I.N., 2017. Standardizing the microbiota of fish used in research. *Lab. Anim.* 51, 353-364.
- Verde, S.C., Tenreiro, R., Botelho, M.L., 2004. Sanitation of chicken eggs by ionizing radiation: HACCP and inactivation studies. *Radiat. Phys. Chem.* 71, 29-33.
- Vethaak, A.D., Davies, I.M., Thain, J.E., Gubbins, M.J., Martínez-Gómez, C., Robinson, C.D., Moffat, C.F., Burgeot, T., Maes, T., Wosniok, W., Giltrap, M., Lang, T., Hylland, K., 2017. Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment. *Marine Environmental Research* 124, 11-20.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 146, 281-300.
- Ward, I.M., Minn, K., Jorda, K.G., Chen, J., 2003. Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *Journal of Biological Chemistry* 278, 19579-19582.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77, 591-625.
- Wester, P.W., Vethaak, A.D., Van Muiswinkel, W.B., 1994. Fish as biomarkers in immunotoxicology. *Toxicology* 86, 213-232.
- WHO, 2001. Depleted uranium, sources, exposure and health effects. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Whyte, S.K., 2007. The innate immune response of finfish - A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 1127-1151.
- Witten, P.E., Villwock, W., Renwantz, L., 1998. Haematogram of the tilapia *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Teleostei) and application of a putative phenoloxidase for differentiating between neutrophilic granulocytes and monocytes. *Canadian Journal of Zoology* 76, 310-319.
- Wong, S., Fournier, M., Coderre, D., Banska, W., Krzystyniak, K., 1992. Environmental immunotoxicology, in: Peakall, D. (Ed.), *Animals Biomarkers as Pollution Indicators*. Chapman and Hall, London, pp. 167-189.
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutierrez-de Frias, C., Cortes, A., 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology* 20, 126-136.
- Zeeman, M.G., Brindley, W.A., 1981. Effects of toxic agents upon fish immune systems: A review, in: Sharma, R.P. (Ed.), *Immunologic considerations in toxicology*. CRC Press, London, pp. 1-60.
- Zelikoff, J.T., 1998. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? *Toxicology* 129, 63-71.
- Zhang, C.N., Li, X.F., Xu, W.N., Jiang, G.Z., Lu, K.L., Wang, L.N., Liu, W.B., 2013. Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). *Fish and Shellfish Immunology* 35, 1380-1386.

5 Recueil d'articles

ARTICLE 1 : Gagnaire, B., Boyer, P., Bonzom, J.M., Lecomte-Pradines, C., Simon, O., Gilbin, R., **2011**. Transfer modelling and toxicity evaluation of the effluent from an installation of cleansing and uranium recovery using a battery of bioassays. *Ecotoxicology* 20, 187-201.

ARTICLE 2 : Bado-Nilles, A., Techer, R., Porcher, J.M., Geffard, A., **Gagnaire, B.**, Betoulle, S., Sanchez, W., **2014b**. Detection of immunotoxic effects of estrogenic and androgenic endocrine disrupting compounds using splenic immune cells of the female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L.). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 38, 672-683.

ARTICLE 3 : Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Sanchez, W., **2014**. Depleted Uranium Disturbs Immune Parameters in Zebrafish, *Danio rerio*: An *Ex Vivo/In Vivo* Experiment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 67, 426-435.

ARTICLE 4 : Gagnaire, B., Adam-Guillermin, C., Festarini, A., Cavalié, I., Della-Vedova, C., Shultz, C., Kim, S.B., Ikert, H., Dubois, C., Walsh, S., Farrow, F., Beaton, D., Tan, E., Wen, K., Stuart, M., **2017**. Effects of *in situ* exposure to tritiated natural environments: A multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Science of the Total Environment* 599-600, 597-611.

ARTICLE 5 : Gagnaire, B., Cavalie, I., Camilleri, V., Adam-Guillermin, C., **2013**. Effects of depleted uranium on oxidative stress, detoxification, and defence parameters of zebrafish, *Danio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64, 140-150.

ARTICLE 6 : Bado-Nilles, A., Betoulle, S., Geffard, A., Porcher, J.M., **Gagnaire, B.**, Sanchez, W., **2013**. Flow cytometry detection of lysosomal presence and lysosomal membrane integrity in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) immune cells: Applications in environmental aquatic immunotoxicology. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 2692-2704.

ARTICLE 7 : Gagnaire, B., Cavalié, I., Pereira, S., Floriani, M., Dubourg, N., Camilleri, V., Adam-Guillermin, C., **2015c**. External gamma irradiation-induced effects in early-life stages of zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology* 169, 69-78.

ARTICLE 8 : Simon, O., **Gagnaire, B.**, Camilleri, V., Cavalié, I., Floriani, M., Adam-Guillermin, C., **2018**. Toxicokinetic and toxicodynamic of depleted uranium in the zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology* 197, 9-18.

ARTICLE 9 : Simon, O., **Gagnaire, B.**, Sommard, V., Pierrisnard, S., Camilleri, V., Carasco, L., Gilbin, R., Frelon, S., **2019**. Uranium transfer and accumulation in organs of *Danio rerio*, after waterborne exposure alone or combined with dietborne exposure. *Environmental Toxicology & Chemistry* 38(1): 90-98.

ARTICLE 10 : **Gagnaire, B.**, Gosselin, I., Festarini, A., Walsh, S., Cavalie, I., Adam-Guillermin, C., Della-Vedova, C., Farrow, F., Kim, S.B., Shkarupin, A., Chen, H.Q., Beaton, D., Stuart, M., **online**. Effects of *in vivo* exposure to tritium: a multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Environmental Science and Pollution Research*.

ARTICLE 11 : Arcanjo, C., Maro D., Camilleri V., Cavalie I., Simon O., Beaugelin-Seiller K., Carasco L., Orjollet D., Adam-Guillermin C., **Gagnaire B. (2019)**. Assessing tritium internalisation in zebrafish early life stages: Importance of rapid isotopic exchange. *Journal of Environmental Radioactivity* 203: 30-38.

ARTICLE 12 : **Gagnaire, B.**, Bonnet M., Tchamitchian S., Cavalie I., Della-Vedova C., Dubourg N., Adam-Guillermin C., Brunet J.-L., Belzunces L.P. (**2019**). Physiological effects of gamma irradiation in the honeybee, *Apis mellifera*. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 174: 153-163.

ARTICLE 13 : Arcanjo, C., Armant, O., Floriani, M., Cavalie, I., Camilleri, V., Simon, O., Orjollet, D., Adam-Guillermin, C., **Gagnaire, B., 2018**. Tritiated water exposure disrupts myofibril structure and induces mis-regulation of eye opacity and DNA repair genes in zebrafish early life stages. *Aquatic Toxicology* 200, 114-126.

ARTICLE 14 : Arcanjo, C., Murat El Houdigui, S., Loro, G., Della-Vedova, C., Floriani, M., Cavalie, I., Camilleri, V., Adam-Guillermin, C., **Gagnaire, B., in prep**. From molecule to individual: behavioral and microscopic analysis of zebrafish embryo-larvae after tritiated water exposure. *Aquatic Toxicology*.

ARTICLE 15 : Augustine, S., **Gagnaire, B.**, Floriani, M., Adam-Guillermin, C., Kooijman, S.A.L.M., **2011**. Developmental energetics of zebrafish, *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 159, 275-283.

ARTICLE 16 : Augustine, S., **Gagnaire, B.**, Adam-Guillermin, C., Kooijman, S.A.L.M., **2012**. Effects of uranium on the metabolism of zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology* 118-119, 9-26.

ARTICLE 17 : Augustine, S., Pereira, S., Floriani, M., Camilleri, V., Kooijman, S.A.L.M., **Gagnaire, B.**, Adam-Guillermin, C., **2015**. Effects of chronic exposure to environmentally relevant concentrations of waterborne depleted uranium on the digestive tract of zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Environmental Radioactivity* 142, 45-53.

ARTICLE 18 : Bado-Nilles, A., Jolly, S., Lamand, F., Geffard, A., **Gagnaire, B.**, Turies, C., Porcher, J.M., Sanchez, W., Betoulle, S., **2015**. Involvement of fish immunomarkers in environmental biomonitoring approach: Urban and agri-viticultural context. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 120, 35-40.

ARTICLE 19 : Bado-Nilles, A., Jolly, S., Porcher, J.M., Palluel, O., Geffard, A., **Gagnaire, B.**, Betoulle, S., Sanchez, W., **2014a**. Applications in environmental risk assessment of leucocyte apoptosis, necrosis and respiratory burst analysis on the European bullhead, *Cottus* sp. *Environmental Pollution* 184, 9-17.

ARTICLE 20 : Le Guernic, A., Sanchez, W., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Turies, C., Chadili, E., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., Porcher, J.M., Geffard, A., Betoulle, S., **Gagnaire, B.**, **2016c**. *In situ* experiments to assess effects of constraints linked to caging on ecotoxicity biomarkers of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 42, 643-657.

ARTICLE 21 : **Gagnaire, B.**, Bado-Nilles, A., Betoulle, S., Amara, R., Camilleri, V., Cavalié, I., Chadili, E., Delahaut, L., Kerambrun, E., Orjollet, D., Palluel, O., Sanchez, W., **2015b**. Former uranium mine-induced effects in caged roach: a multiparametric approach for the evaluation of *in situ* metal toxicity. *Ecotoxicology* 24, 215-231.

ARTICLE 22 : Le Guernic, A., Sanchez, W., Bado-Nilles, A., Palluel, O., Turies, C., Chadili, E., Cavalié, I., Delahaut, L., Adam-Guillermin, C., Porcher, J.M., Geffard, A., Betoulle, S., **Gagnaire, B.**, **2016a**. *In situ* effects of metal contamination from former uranium mining sites on the health of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.). *Ecotoxicology* 25, 1234-1259

ARTICLE 23 : Le Guernic, A., Sanchez, W., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Floriani, M., Turies, C., Chadili, E., Vedova, C.D., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., Porcher, J.M., Geffard, A., Betoulle, S., **Gagnaire, B.**, **2016b**. Acclimation capacity of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure. *Ecotoxicology* 25, 1478-1499.