

IRSNINSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

Toxicité d'un mélange binaire sur la daphnie *Daphnia magna*

Etude des effets biologiques de l'uranium et
du sélénium seuls et en mélange

Florence ZEMAN

Octobre 2008

N° ISRN/IRSN-2008/103

Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie



Système de management
de la qualité IRSN certifié

Université Montpellier II
Sciences et Techniques du Languedoc

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

spécialité : Evolution, Ecologie, Ressources génétiques, Paléontologie

Ecole doctorale : SIBAGHE

Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosociences, Environnement

Toxicité d'un mélange binaire sur la daphnie
Daphnia magna

Etude des effets biologiques
de l'uranium et du sélénium seuls et en mélange

Florence Zeman

Thèse soutenue le 30 octobre 2008 à Cadarache

Jury

Pr. Claude Casellas ,	Professeur à l'Université Montpellier I,	Présidente
Pr. Catherine Aliaume ,	Professeur à l'Université Montpellier II,	Directrice de thèse
Dr. Alexandre Péry,	Chercheur à l' INERIS, Verneuil en Halatte,	Rapporteur
Dr Patsy-Ann Thompson,	Chercheur à la CCSN, Ottawa,	Rapporteur
Pr. Guy Charmantier,	Professeur à l'Université Montpellier II,	Examineur
Dr. Rodolphe Gilbin,	Chercheur à l'IRSN, Cadarache,	Tuteur IRSN
Dr. Mathias Grote,	Chercheur à l'EDF, Chatou,	Examineur

Remerciements

J'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont contribué à mon travail de thèse et m'ont entourée au cours de ces trois années.

Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury. Je remercie particulièrement Mme Patsy Thompson et M. Alexandre Péry d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je souhaite aussi remercier sincèrement Mme Claude Casellas, M. Guy Charmentier et M. Mathias Grote d'avoir gentiment accepté de faire partie du jury.

J'adresse toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse, Mme Catherine Aliaume qui m'a guidée tout au long de ma thèse et m'a apporté aux moments importants le recul qui m'était nécessaire pour faire les bons choix.

Je tiens ensuite à remercier tous ceux avec qui j'ai travaillé lors de mes trois années de thèse au Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie et à leur exprimer toute mon amitié.

Je remercie tout d'abord Mme Jacqueline Garnier-Laplace pour son accueil au sein du LRE et l'intérêt qu'elle a porté à ma thèse.

Je tiens à remercier très particulièrement Rodolphe Gilbin qui m'a encadrée tout au long de ces années. Je lui suis reconnaissante de son écoute et son attention. Je le remercie pour sa grande implication dans ma thèse ainsi que pour sa disponibilité malgré son emploi du temps déjà bien chargé.

Merci à Catherine Pradines pour son aide et ses encouragements.

Merci à Claire Della-Vedova pour sa gentillesse et son aide dans les analyses statistiques pour les données mélange.

Merci à Magali Floriani pour son soutien ainsi que pour les images au microscope MET qui ont beaucoup apporté à mon rapport de thèse.

Merci également à Virginie Camilleri, Isabelle Cavalié et à Daniel Orjollet pour les mesures en ICP-AES, FIAS et chromatographie ionique.

Un grand merci à Nadine pour son énergie, sa bonne humeur et son soutien qui m'ont souvent redonné du cœur à l'ouvrage dans les petits moments de fatigue.

Je tiens à remercier très chaleureusement, Hervé, Sylvie, Aurélie, Jérôme, Pierre, Stéphanie, Laure, Olivia, Fred A, Fred C, Arnaud, Olivier et Christelle pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de ma thèse dont je garde un précieux souvenir.

Je tiens à adresser un merci tout particulier à Claudine pour toutes ses gentilles petites attentions.

Enfin merci à tous mes proches de m'avoir soutenue et encouragée tout au long de cette thèse.

Introduction	1
Chapitre 1. Synthèse bibliographique	5
1.1. Etude des effets d'un mélange simple	5
<i>1.1.1. Etude des effets d'une seule substance</i>	5
1.1.1.1. Valeurs remarquables	5
1.1.1.2. Modèle logistique	6
<i>1.1.2. Modèles d'additivité</i>	8
1.1.2.1. Modèle d'addition des effets	8
1.1.2.2. Modèle d'addition des concentrations (modèle CA)	9
1.1.2.3. Modèle d'indépendance d'action (modèle IA)	9
<i>1.1.3. Interactions</i>	11
<i>1.1.4. Outils disponibles pour l'identification et la quantification des interactions</i>	13
1.1.4.1. Modèles de mélange sans paramètres d'interaction	13
1.1.4.2. Modèles de mélange avec paramètres d'interaction	19
<i>1.1.5. Différents types de plans d'expérience pour l'étude des mélanges</i>	24
1.1.5.1. Design factoriel	24
1.1.5.2. Design en raies	24
1.1.5.3. Design composite (factoriel et design en raies)	25
1.2. Modèle biologique étudié : La daphnie	27
<i>1.2.1. Biologie et morphologie</i>	27
<i>1.2.2. Cycle de vie de la daphnie</i>	29
<i>1.2.3. Etude des effets aigus et chroniques de substances</i>	32
1.2.3.1. Etude des effets au niveau de l'individu	33
1.2.3.2. Etude des effets au niveau de la population	35
1.2.3.3. Etude des effets au niveau énergétique	36
1.3. Contaminants étudiés : l'uranium et le sélénium seuls et en mélange	42
<i>1.3.1. Uranium</i>	42
1.3.1.1. Sources et concentrations en U dans l'environnement	42
1.3.1.2. Formes chimiques et propriétés nucléaires	42
1.3.1.3. Effets sur les organismes	44
1.3.1.4. Mécanismes de toxicité	47
<i>1.3.2. Sélénium</i>	50
1.3.2.1. Sources et concentrations de Se dans l'environnement	50
1.3.2.2. Formes chimiques	50
1.3.2.3. Rôles physiologiques	52
1.3.2.4. Mécanismes de toxicité	53
1.3.2.5. Effets sur les organismes	53
<i>1.3.3. Uranium et Sélénium en mélange</i>	56
1.3.3.1. Formes chimiques	56
1.3.3.2. Uranium et sélénium dans l'environnement	57
Chapitre 2. Matériel et méthodes	59
2.1. Elevage de daphnie	59
<i>2.1.1. Origine et conditions d'élevage</i>	59
<i>2.1.2. Entretien de l'élevage</i>	60
2.2. Les contaminants étudiés	61
<i>2.2.1. Etude des effets du sélénium seul</i>	61
2.2.1.1. Solutions stock de sélénite et de séléniate	61
2.2.1.2. Concentrations étudiées	61
<i>2.2.2. Etude des effets de l'uranium seul</i>	61
2.2.2.1. Solutions stock d'uranium	61

2.2.2.2.	Concentrations étudiées	61
2.2.3.	<i>Etude des effets du mélange uranium-sélénium</i>	62
2.2.3.1.	Solutions stock d'uranium et de sélénium	62
2.2.3.2.	Concentrations étudiées	62
2.3.	Mesures d'effet des contaminants	62
2.3.1.	<i>Effets sur le développement des œufs de daphnies</i>	62
2.3.2.	<i>Tests aigus sur les daphnies juvéniles</i>	62
2.3.3.	<i>Tests chroniques sur les daphnies adultes</i>	63
2.3.3.1.	Conditions expérimentales	63
2.3.3.2.	Poids sec	63
2.3.3.3.	Respiration	64
2.3.3.4.	Ingestion	65
2.3.3.5.	Calcul d'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (AECR)	66
2.3.3.6.	Mesures des réserves énergétiques : mesures des lipides	66
2.3.3.7.	Calcul du budget énergétique et d'allocation d'énergie	66
2.3.3.8.	Matrices de Leslie	67
2.3.3.9.	Microscopie électronique à transmission	68
2.4.	Suivi des conditions expérimentales	70
2.4.1.	<i>Suivi des milieux d'exposition</i>	70
2.4.1.1.	Dosage des ions majeurs	70
2.4.1.2.	Suivi du pH	70
2.4.2.	<i>Suivi des concentrations de Se et d'U dans le milieu d'exposition</i>	70
2.4.2.1.	Dosage par ICP-AES	70
2.4.2.2.	Dosage par absorption atomique HG-QFAAS	71
2.5.	Modélisation de la spéciation de l'uranium et du sélénium	72
2.6.	Mesure de bioaccumulation de l'uranium et calcul de dose	73
2.6.1.	<i>Minéralisation</i>	73
2.6.2.	<i>Mesure des concentrations d'uranium par ICP-MS</i>	73
2.6.3.	<i>Calcul de doses</i>	73
2.7.	Traitements statistiques	75
2.7.1.	<i>Données des effets de l'uranium et du sélénium seul</i>	75
2.7.2.	<i>Données des effets du mélange uranium-sélénium</i>	76
2.7.2.1.	Test aigu	76
2.7.2.2.	Test chronique	77
Chapitre 3.	Effets de l'uranium	78
3.1.	Introduction	78
3.2.	Résultats	79
3.2.1.	<i>Toxicité aigüe</i>	79
3.2.2.	<i>Toxicité chronique</i>	81
3.2.2.1.	Mortalité	81
3.2.2.2.	Croissance	81
3.2.2.3.	Reproduction	83
3.2.2.4.	Allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction	86
3.2.2.5.	Effets sur la population	89
3.2.2.6.	Effets sur le tube digestif de la daphnie	90
3.2.2.7.	Bioaccumulation et doses radiologiques délivrées	91
3.3.	Discussion	93
3.3.1.	<i>Influence de la spéciation chimique sur la toxicité de l'uranium</i>	93
3.3.2.	<i>Effets de l'uranium à différents niveaux d'organisation : au niveau de la cellule, de l'individu et de la population.</i>	95
3.3.3.	<i>Chimiotoxicité et radiotoxicité de l'uranium</i>	97

3.4. Principales avancées et conclusions	99
3.4.1. <i>Choix du milieu d'exposition pour les expérimentations visant à étudier la toxicité du Se seul et du mélange U et Se</i>	99
3.4.2. <i>Un test chronique 21 jours raccourci à 7 jours</i>	99
3.4.3. <i>Paramètres d'étude retenus pour les expérimentations en mélange</i>	100
3.4.4. <i>L'uranium : principalement une substance chimique toxique et non un stresser radioactif</i>	100

Chapitre 4. Effets du sélénium **101**

4.1. Introduction	101
4.2. Résultats	102
4.2.1. <i>Toxicité aiguë</i>	102
4.2.2. <i>Toxicité chronique du sélénite</i>	104
4.2.2.1. Mortalité	104
4.2.2.2. Croissance	104
4.2.2.3. Reproduction	105
4.2.2.4. Coût métabolique	108
4.2.2.5. Effet sur la population	110
4.3. Discussion	111
4.3.1. <i>Effets aigus du sélénite et du séléniat</i>	111
4.3.2. <i>Différenciation entre la zone de carence et de toxicité du sélénium et sensibilité des différents critères d'effet du sélénite</i>	111
4.4. Principales avancées et conclusions	112
4.4.1. <i>Un test chronique raccourci à 7 jours pour les expérimentations en mélange</i>	112
4.4.2. <i>Paramètres d'étude retenus pour les expérimentations en mélange</i>	112
4.4.3. <i>Le sélénium, un élément toxique à partir de 22 µg.L⁻¹ Se</i>	113

Chapitre 5. Effets du mélange uranium-sélénium **114**

5.1. Introduction	114
5.2. Design expérimental – choix des concentrations	116
5.2.1. <i>Toxicité aiguë</i>	116
5.2.1. <i>Toxicité chronique</i>	117
5.3. Résultats	118
5.3.1. <i>Interactions au niveau de la spéciation chimique</i>	118
5.3.2. <i>Identification des interactions sur la toxicité aiguë</i>	119
5.3.2.1. Substances seules	119
5.3.2.2. Mélange binaire uranium-sélénium	119
5.3.3. <i>Identification des interactions sur la toxicité chronique</i>	124
5.3.3.1. Reproduction	124
5.3.3.2. Croissance	127
5.3.3.3. Réserves lipidiques	128
5.3.3.4. Evaluation de l'énergie disponible pour la croissance et la reproduction chez la daphnie : Calcul de l'allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction (AEER)	129
5.3.3.5. Budget énergétique	130
5.3.3.6. Bioaccumulation	132
5.3.4. <i>Effets sur les diverticules et sur le tube digestif de la daphnie</i>	133
5.4. Discussion	136
5.4.1. <i>Comparaison des conclusions issues de deux méthodes statistiques : méthode de Jonker vs. méthode de Sørensen</i>	136
5.4.2. <i>IA (Indépendance d'action) vs CA (Addition des concentrations)</i>	137

5.4.3. Etude des effets d'un mélange : Des conclusions différentes en fonction du temps, lien toxicité aigüe - toxicité chronique	138
5.4.4. Etude des effets d'un mélange : Des conclusions différentes en fonction des critères d'effet étudiés	139
5.4.5. De la spéciation à la bioaccumulation : démarche pour l'étude des effets d'un mélange	140
5.4.6. Vers une compréhension des mécanismes d'action	143

Conclusions et perspectives **145**

1. Effets du mélange uranium - sélénium sur <i>Daphnia magna</i>, identification d'une interaction	145
2. Pertinence et utilité des différentes méthodes mises en œuvre dans le cadre de l'étude des effets des mélanges binaires.	148

Références **151**

Annexes **163**

Annexe 1 : Méthode statistique de Jonker et al. (2005)	164
Annexe 2 : Observations des différents stades d'un développement embryonnaire définis par Kast-Hutcheson et al. (2001)	169
Annexe 3 : Données de toxicité aigüe de l'uranium chez les cladocères d'eau douce	172
Annexe 4 : Données test toxicité aigüe du sélénium sur <i>Daphnia magna</i> et sur <i>Daphnia pulex</i>	173
Annexe 5 : Préparation du milieu M4-pH 7 et M4-pH8	176
Annexe 6 : Protocole de préparation des algues pour les daphnies	179
Annexe 7 : Protocole d'extraction de lipides selon la méthode de Bligh et Dyer (1959)	181
Annexe 8 : Pourcentage moyen de survie et de fécondité en fonction des jours	183
Annexe 9 : Correction des effets de matrice engendrés par le milieu M4-pH7 lors du dosage de l'uranium par ICP-AES	184
Annexe 10 : Article : Effet de l'uranium sur la survie, la croissance, la reproduction et sur les processus physiologiques chez le cladocère d'eau douce <i>Daphnia magna</i>	185
Annexe 11 : Données de toxicité aigüe de l'uranium	193
Annexe 12 : Données de toxicité chronique de l'uranium	194
Annexe 13 : Données de toxicité aigüe du sélénium	196
Annexe 14 : Données de toxicité chronique du sélénite	198
Références des annexes	199

Introduction

Dans l'environnement en général, et plus particulièrement dans les écosystèmes aquatiques continentaux, les organismes vivants sont soumis à l'influence de multiples substances de nature et d'origine diverses. Les polluants se retrouvent dans la plupart des cas en mélange à des concentrations relativement faibles mais induisent cependant une contamination chronique d'un nombre croissant d'écosystèmes. Toutefois, les données d'effets relatives à des situations d'exposition chronique des écosystèmes concernent principalement l'effet de stressseurs isolés. En effet, la majeure partie des études se sont intéressées aux effets de substances isolées et les données sur les effets de mélanges sont assez limitées (Andersen et Dennison, 2004). Compte tenu du fait que les organismes sont soumis à une très grande diversité de stressseurs, tester expérimentalement toutes les combinaisons possibles des substances toxiques est simplement impossible.

Deux grands types d'approche ont donc été développés pour évaluer la toxicité des mélanges de produits chimiques (Figure 1). La première, appelée « approche bottom-up », s'intéresse à la toxicité des mélanges simples (Groten *et al.*, 2001). Cette approche est la plus utilisée pour évaluer la toxicité et le risque associé à l'exposition à des mélanges de produits chimiques. Dans le cas des mélanges simples les substances sont identifiées et n'excèdent pas le nombre de 10. Les données de toxicité sont recueillies, dans un premier temps pour tous les composants du mélange, puis la toxicité du mélange est estimée selon le principe d'additivité : la toxicité du mélange est considérée comme la résultante de la toxicité de chaque substance du mélange.

La seconde approche appelée « approche top-down » consiste quant à elle à évaluer directement la toxicité d'un mélange dans son ensemble afin de générer des données très appliquées pour l'évaluation du risque (Feron *et al.*, 1998). Cette approche considère donc des mélanges complexes dont tous les composants ne sont pas forcément identifiés ou quantifiés. Dans cette approche, l'effet du mélange est évalué dans son ensemble. En effet, le mélange complexe n'est plus considéré comme une somme de substances mais comme une seule entité.

Ces deux approches sont assez différentes, la première étant plus théorique et la seconde plus appliquée. L'approche théorique concernant les mélanges simples est très souvent loin de la réalité des écosystèmes aquatiques où les organismes sont soumis à de multiples stress. Cependant, en raison même de sa simplicité, elle apporte de nouvelles connaissances sur les interactions entre les substances et d'un point de vue méthodologique, elle permet de développer des modèles prédictifs de toxicité.

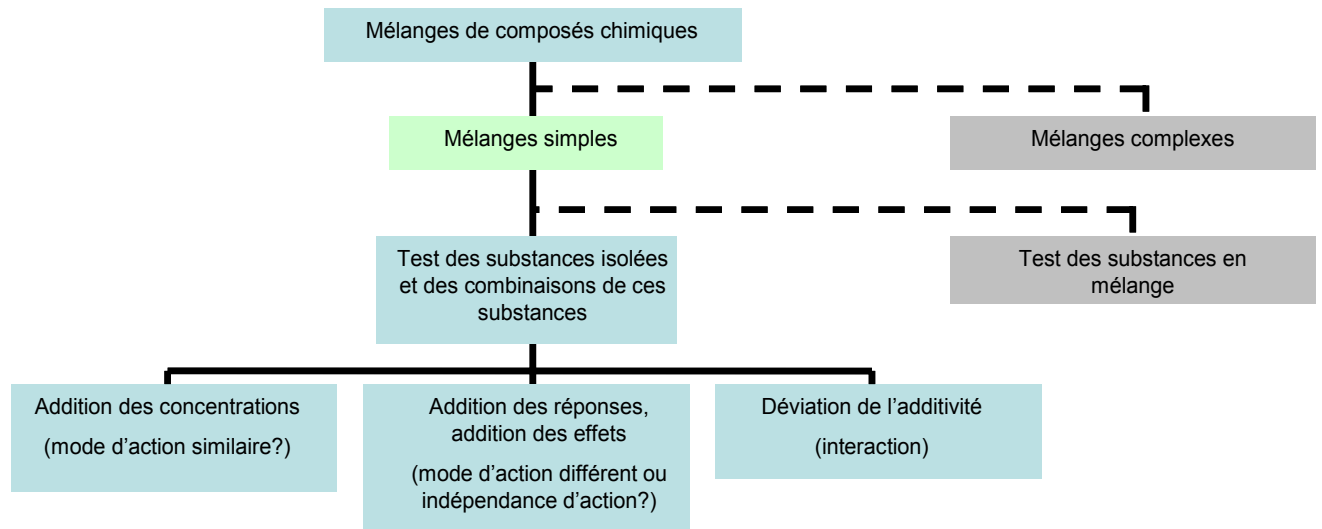


Figure 1: Différents cas d'étude de mélanges simples d'après Groten *et al.* (2001)

Parmi la multitude de polluants qui affectent les écosystèmes aquatiques continentaux, l'uranium et le sélénium sont deux éléments qui se retrouvent à l'échelle mondiale, seuls et en mélange dans l'environnement.

L'uranium et le sélénium sont tous les deux naturellement présents dans les écosystèmes aquatiques à l'état de trace (Coughtrey *et al.*, 1983 ; WHO, 2001). Cependant leurs concentrations dans l'environnement peuvent se retrouver très largement accrues par différentes activités anthropiques. Ainsi les concentrations naturelles d'uranium peuvent être augmentées par les activités liées au cycle du combustible nucléaire et les concentrations de sélénium par les activités liées à différents types de mines, comme celles de charbon ou de phosphate. Les concentrations dans l'environnement de ces deux substances peuvent donc croître de façon isolée dans des conditions particulières à chacune d'elles, mais il arrive aussi que leurs concentrations croissent de façon concomitante, en particulier au niveau de certaines mines d'uranium (Noller, 1991).

En effet aux abords de ces mines, diverses études ont montré que de l'uranium pouvait se retrouver dans les cours d'eau en aval de sites d'extraction et d'exploitation du minerai d'uranium (Holm *et al.*, 2005 ; Noller, 1991 ; Supervising Scientist, 2007). Dans ces régions, comme par exemple aux abords de la rivière Alligator en Australie (Noller, 1991) ou dans le Saskatchewan au Canada (Liber *et al.*, 2004 ; Muscatello *et al.*, 2006), l'uranium est rejeté en mélange avec d'autres substances non radioactives comme le sélénium qui pourraient moduler la toxicité de l'uranium (Noller, 1991).

Dans ce contexte, le but de cette thèse a été d'étudier les effets du mélange binaire uranium-sélénium. L'organisme qui a été choisi pour cette étude est la daphnie *Daphnia magna*. Représentative des communautés zooplanctoniques des écosystèmes aquatiques continentaux, cette espèce possède des caractéristiques, comme son cycle de vie court et sa reproduction par parthénogénèse, qui sont autant d'avantages pour la réalisation d'expérimentations et en font un sujet d'étude recommandé en écotoxicologie pour les bioessais standardisés.

L'étude des effets des mélanges peut se faire à différentes échelles, de l'échelle moléculaire à l'échelle de l'individu ou même d'une population.

En pharmacologie et en toxicologie humaine, la caractérisation des effets de mélange de substances est couramment réalisée au niveau moléculaire car les modes d'action des différents composés du mélange sont en partie ou même parfois complètement connus. Des modèles intégrant les mécanismes d'actions sont généralement utilisés dans ce cadre pour identifier les interactions entre les composés d'un mélange.

Dans le cas de l'étude des effets du mélange uranium-sélénium chez la daphnie, les modes d'action de chacun de ces éléments ne sont pas connus avec précision, comme souvent en écotoxicologie. Il n'a donc pas été possible de faire d'hypothèses sur les interactions éventuelles entre les mécanismes d'actions. Dans cette thèse, nous avons choisi d'étudier les effets à un niveau macroscopique « intégrateur » pour mettre en évidence, ou non, les interactions entre deux stressors et évaluer leur effet global sur l'individu et sur une population. Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement aux effets sur les différents traits de vie de la daphnie à l'échelle de l'individu et aux effets sur le bilan énergétique de la daphnie. Ces paramètres ont été choisis car ils apportent les premiers éléments nécessaires pour estimer les effets au niveau d'un écosystème. Nous avons choisi d'observer aussi les effets aux niveaux des tissus de daphnie afin d'apporter des éléments quant

aux mécanismes d'action mis en jeu. Ce niveau a été préféré aux niveaux moléculaire et cellulaire car étant plus intégrateur. Trouver un lien entre les effets observés à différents niveaux d'intégration biologique a permis de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et leur importance.

L'étude des actions combinées de stressseurs en mélange sur un organisme est généralement basée sur la comparaison des effets observés avec les effets théoriques prédits par les modèles de référence dits « modèles d'additivité ». Les valeurs théoriques des modèles d'additivité sont calculées à partir des effets connus pour chaque composé du mélange isolé. Concrètement, il est donc tout d'abord nécessaire d'acquérir les données de toxicité pour chaque substance isolée avant d'étudier les effets d'un mélange de substances.

Dans un premier chapitre est présentée une étude bibliographique portant sur les modèles d'effet des mélanges, sur la daphnie et sur les deux substances étudiées, uranium et sélénium.

Un second chapitre décrit le matériel utilisé et les méthodes appliquées.

Les deux chapitres suivants, chapitres 3 et 4, présentent les études réalisées sur les effets des substances seules : les effets de l'uranium seul (chapitre 3) et ceux du sélénium seul (chapitre 4). Pour chacun de ces deux chapitres, la démarche expérimentale mise en œuvre est exposée. Les résultats obtenus sur les substances seules sont ensuite présentés puis confrontés aux données de la littérature dans une partie discussion. L'étude des substances isolées permet d'obtenir, non seulement les valeurs de toxicité pour pouvoir appliquer les modèles de référence, mais apporte aussi différents éléments de réflexion importants pour la suite de notre étude des effets du mélange uranium-sélénium.

Le cinquième chapitre est consacré à l'étude des effets de l'uranium et du sélénium en mélange. Comme pour les deux chapitres précédents, la démarche expérimentale et les résultats sont présentés. Les résultats obtenus sont aussi ensuite discutés en lien avec les données de la littérature. Cette dernière partie permet à la fois d'étudier la toxicité du mélange uranium-sélénium sur la daphnie et de dégager les éléments importants à prendre en compte lors de l'étude des effets d'un mélange binaire.

Un dernier chapitre de conclusion permet de dresser un bilan des travaux réalisés et de présenter les perspectives d'études.

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1.1. Etude des effets d'un mélange simple

L'identification d'une interaction entre des stressés en mélange est généralement basée sur la comparaison des effets observés avec les effets théoriques prédits par différents modèles de référence. Dans ces modèles de référence, appelés « modèles d'additivité », il est considéré qu'il n'y a pas d'interaction entre les composés. Les valeurs théoriques des modèles d'additivité sont calculées à partir des effets connus pour chaque composé du mélange isolé. Il est donc tout d'abord nécessaire d'acquérir les données de toxicité pour chaque substance isolée.

1.1.1. Etude des effets d'une seule substance

1.1.1.1. Valeurs remarquables

En écotoxicologie, la réalisation d'expérimentations dose-réponse est une démarche couramment utilisée pour quantifier la toxicité d'une substance. Les données de toxicité obtenues lors des tests sont constituées de couples : dose d'exposition (concentrations croissantes du composé testé ou dilutions de l'échantillon naturel étudié) et effet toxique.

L'utilisation de tests pour caractériser l'effet d'une ou plusieurs substances passe par la définition de valeurs remarquables (Figure 2).

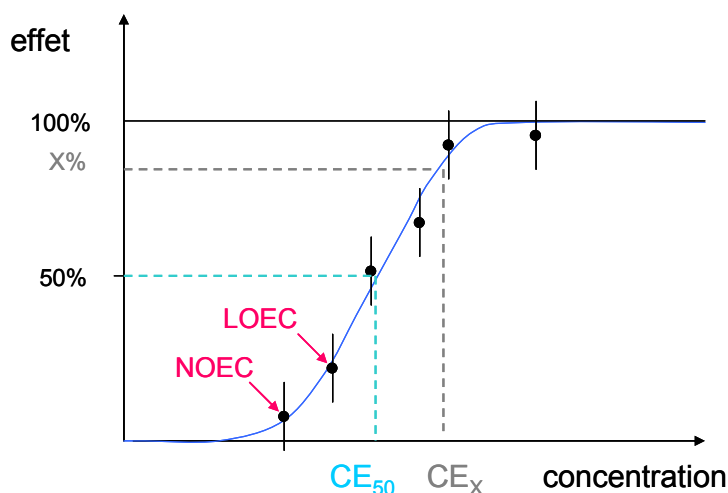


Figure 2: Exemple d'une courbe dose-réponse (concentration-effet) et valeurs remarquables NOEC, LOEC, CE50 .

Les résultats obtenus sont généralement exploités pour estimer la dose qui entraîne un effet de 50% par rapport à une valeur de référence. La *CEx* (Concentration Effective/Efficace) correspond à la concentration en toxique qui engendre un effet de x% par rapport à la réponse des contrôles (milieu de culture standard sans effet). La CE_{50} est alors la concentration affectant 50% de la réponse.

Il est aussi possible d'estimer la NOEC "No Observed Effect Concentration", concentration de toxique maximale qui ne cause pas d'effet et la LOEC "Lowest Observed Effect Concentration", concentration minimale pour laquelle un effet est observé. La détermination de ces valeurs s'effectue sur la base d'un test statistique de comparaison des moyennes. Selon Isnard *et al.* (2001), les valeurs de NOEC sont souvent critiquées puisqu'elles dépendent du plan expérimental choisi par l'expérimentateur (nombre et valeurs des concentrations testées). Un traitement statistique par régression (de type CE_{10} , CE_5 ou CE_1) est donc préférable.

1.1.1.2. Modèle logistique

Le modèle logistique est le modèle le plus fréquemment utilisé pour décrire cette relation dose-réponse de toxicité (Figure 3). C'est un modèle non linéaire qui s'exprime généralement à l'aide de 4 paramètres sous les formes suivantes (Streibig *et al.*, 1993) :

Le modèle logistique à 4 paramètres :

$$y = c + \frac{d - c}{1 + \left(\frac{x}{e}\right)^b}$$

Ou, lorsque le logarithme des doses est utilisé : $y = c + \frac{d - c}{1 + \exp[b(\ln(x) - \ln(e))]}$

Les paramètres du modèle sont :

c : la limite basse de la réponse (bornée à 0)

d : la limite haute de la réponse

e : la dose ou la concentration correspondant à une variation de 50% de la réponse (CE_{50})

b : la pente au point d'inflexion (CE_{50})

x : la concentration

y : la réponse ou la concentration

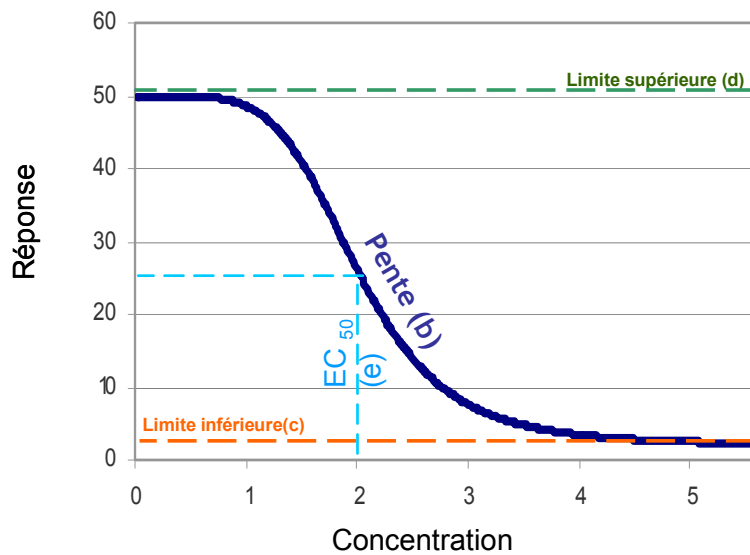


Figure 3 : Exemple d'une courbe dose-réponse logistique.
 Les paramètres dans cet exemple sont : $b=5$, $c=2$, $d=50$, $e=2$.

Si la limite basse n'est pas significativement différente de zéro, alors le paramètre c , peut être négligé. Dans ce cas, le modèle logistique ne comporte plus que 3 paramètres et s'écrit de la façon suivante :

$$y = \frac{d}{1 + \exp[b(\ln(x) - \ln(e))]}$$

Il peut également arriver, dans certains cas, que la limite basse soit fixée à un niveau différent de 0. De ce fait, le modèle logistique ne comporte également que 3 paramètres. Cette remarque peut évidemment s'appliquer de la même façon à la limite haute.

Dans le cas où c est fixé à 0 et d à 100%, le modèle logistique n'est plus qu'à 2 paramètres et s'écrit :

$$y = \frac{1}{1 + \left(\frac{x}{e}\right)^b}$$

Certains modèles, comme celui de l'effet médian proposé par Chou *et al.* (2006), permettent de généraliser d'autres modèles dont le modèle logistique qui vient d'être présenté. Ce modèle de l'effet médian est dérivé du principe de la loi d'action de masse à l'équilibre et permet ainsi de prendre en compte l'ensemble des équations non linéaires de type : Michaelis-Menten, logistique, Henderson-Hasselbalch et même Scatchard.

1.1.2. Modèles d'additivité

Pour essayer de prédire les effets de mélange de substances, trois modèles d'additivité de référence sont utilisés :

Le modèle d'addition des effets consistant à additionner les effets connus des substances constituant le mélange est le modèle le plus intuitif mais dans la majorité des cas ne peut être appliqué.

Les modèles d'addition des concentrations et d'indépendance d'action sont les plus classiquement utilisés pour modéliser la toxicité chimique de mélanges de stressors. Ils sont tous deux basés sur l'hypothèse qu'il n'y a pas d'interaction entre les constituants du mélange. Cette hypothèse est couramment appelée « hypothèse de non-interaction ».

1.1.2.1. Modèle d'addition des effets

Le modèle d'addition des effets est le modèle le plus simple des modèles d'additivité.

L'effet d'un mélange de substance A+B ($E(c_{mix})$) est égal à l'effet de A plus l'effet de B :

$$E(c_{mix}) = E(c_a) + E(c_b)$$

$E(c_{mix})$ = effet total d'un mélange avec une concentration totale c_{mix} ; $E(c_i)$ = effet individuel de la substance i présente à la concentration c_i .

Ce modèle est applicable uniquement dans le cas de réponse linéaire en fonction de la dose, ce qui est très rarement le cas. C'est pourquoi, il n'est que très peu utilisé dans la description des effets des mélanges.

1.1.2.2. Modèle d'addition des concentrations (modèle CA)

Le modèle d'addition des concentrations est le modèle le plus communément utilisé pour prédire l'effet d'un mélange. Il est aussi couramment appliqué pour l'évaluation des risques des mélanges de substances. Ce modèle est aussi appelé modèle d'additivité des doses ou modèle d'additivité de Loewe. Les concentrations de chaque constituant toxique du mélange sont ajoutées pour prédire la toxicité du mélange. Il est considéré que les deux substances ont le même mécanisme d'action de toxicité (Berenbaum, 1985 ; Drescher et Boedecker, 1995 ; Feron et Groten, 2002) :

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i^*}{CEx_i} = 1$$

c_i^* représente la concentration de la substance i d'un mélange de n composés ($i=1 \dots n$) ayant un effet total E .

CE_{xi} est la concentration de la substance i qui provoque l'effet E avec $x\%$ d'effet par rapport au contrôle dans le cas où elle est appliquée seule.

Si l'effet d'un mélange de substances peut être décrit par le modèle d'addition des concentrations, alors les substances sont dites additives.

1.1.2.3. Modèle d'indépendance d'action (modèle IA)

Le principe d'action indépendante a été défini pour la première fois par Bliss en 1939. Dans le modèle d'addition des réponses, les substances sont considérées comme ayant des mécanismes d'action différents et indépendants. Cette indépendance signifie que l'effet relatif d'un composé reste inchangé en présence d'un autre composé toxique. Ce modèle est rencontré sous différentes dénominations : action dissimilaire combinée, indépendance de Bliss, réaction indépendante, addition des réponses ou encore action indépendante (IA).

Dans le cas d'un mélange avec n composés ($i=1 \dots n$)

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(c_i))$$

$E(c_{mix})$ = effet total d'un mélange avec une concentration totale c_{mix} ; $E(c_i)$ = effet individuel de la substance i présente à la concentration c_i .

Par exemple : Considérons le cas d'un mélange binaire de deux substances A et B. Si les deux substances A et B sont ajoutées successivement à des concentrations connues pour avoir un effet sur 50% des organismes test quand les substances sont appliquées seules, alors la substance A aura un effet sur 50% des organismes puis la substance B aura un effet sur 50% des organismes qui n'ont pas été touchés par la substance A. Il restera donc 25% des organismes qui n'auront été affectés ni par A ni par B (Greco *et al.*, 1995).

Certains auteurs suggèrent que le modèle d'indépendance d'action est un modèle théorique qui pourrait être remis en cause dans le cas d'un effet joint de paramètres continus sur un organisme entier (Greco *et al.*, 1995). En effet, si deux substances ont des effets au niveau d'un organisme et même si ces deux substances ont des modes d'action totalement différents, le fait de regarder les effets à un niveau intégrateur, c'est-à-dire au niveau de l'individu, permet de considérer qu'à ce niveau tous les mécanismes d'actions jouent sur le même niveau et sont donc liés. Cependant ce modèle a été couramment utilisé pour prédire l'effet joint de substances chimiques sur les algues, les bactéries et les daphnies (Altenburger *et al.*, 2000 ; Backhaus *et al.*, 2000 ; Cerdergreen *et al.*, 2008 ; Faust *et al.*, 2001).

1.1.3. Interactions

Lorsque la réponse observée d'un mélange est significativement différente d'une réponse additive (c'est-à-dire de la réponse théorique calculée à partir des modèles d'additivité), il y a alors interaction entre les différents composés du mélange.

Différents termes ont été utilisés pour décrire la variété des actions de substances en mélange.

Lorsque l'effet observé d'un mélange est plus important que celui prédit par les modèles d'additivité (Addition des concentrations et indépendance d'action), l'effet est dit synergique; un effet plus faible que celui prédit est appelé effet antagoniste (Greco *et al.*, 1995).

Différents termes pour des effets supérieurs à l'addition, dits effets supra-additifs, ont été définis en fonction des effets connus des substances seules : la synergie, la potentialisation et la coalition (tableau 1).

Pour les effets inférieurs à ceux attendus avec les modèles d'addition, effets sub-additifs, deux termes ont été définis : l'antagonisme et l'inhibition (USEPA, 2000).

Les différents termes et synonymes des actions combinées les plus couramment rencontrés dans la littérature sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 1 : Définitions des actions combinées des composants d'un mélange (D'après USEPA, 2000)

Interactions	<u>Supra-additivité</u>	Synergie	L'effet combiné des composants est plus important que l'effet prédit par les modèles d'additivité.
	=Effet supérieur à l'effet additif	Potentialisation	L'effet d'un composant est accru par un autre composant qui, seul, n'a pas d'effet.
		Coalition	La toxicité des substances en mélange est supérieure à l'additivité, les substances seules sont non toxiques.
Pas d'interactions	<u>Additivité</u>	Additivité stricte	La toxicité observée d'un mélange correspond à la toxicité attendue en se basant sur les concepts d'addition des concentrations ou d'action indépendante.
Interactions	<u>Sub-additivité</u>	Antagonisme	L'effet des deux composants est moins important que l'effet prédit par les modèles d'additivité.
	=Effet inférieur à l'effet additif	Inhibition	L'effet d'un composant est réduit par un composé qui, seul, n'a pas d'effet.
-	-	Sans influence apparente	Les composants sont sans effet, seuls et en mélange.

Tableau 2 : Terme et synonyme des actions combinées (D'après UNSCEAR, 2000)

Effet inférieur à celui additif	Effet additif	Effet supérieur à celui additif
Antagonisme	Additivité	Synergie
Inhibition	Indépendance	Augmentation
Interaction négative	Non-interaction	Interaction positive
Infra-additivité	Sommation	Super-additivité
Sub-additivité	Zéro interaction	Supra-additivité
Synergie négative		Potentialisation

1.1.4. Outils disponibles pour l'identification et la quantification des interactions

Les méthodes d'analyse et d'interprétation des données de mélange sont assez nombreuses et peuvent être classées en plusieurs catégories. Statistiquement, il y a deux grands types d'approches pour évaluer les déviations à partir des modèles de références (modèles d'addition des concentrations et d'indépendance d'action) :

- (i) les méthodes où les valeurs observées sont comparées à celles prédites par les modèles de référence sans spécification d'un modèle possible d'interaction
- (ii) les méthodes où des modèles spécifiques sont utilisés pour décrire une interaction possible (Sorensen *et al.*, 2007).

1.1.4.1. Modèles de mélange sans paramètres d'interaction

Parmi les modèles de mélange sans paramètres d'interaction, il est possible de distinguer les approches statistiques graphiques des approches numériques. Des comparaisons graphiques sont parfois réalisées en traçant les courbes doses-réponse observées avec les courbes prédites selon les modèles des référence (Backhaus *et al.*, 2000 ; Faust *et al.*, 2001) mais plus généralement en traçant des graphiques appelés isobogrammes. (Altenburger *et al.*, 1990 ; Gessner *et al.*, 1995).

Les approches numériques sont basées sur les différences entre les données expérimentales et les données prédites grâce aux modèles de référence. Ces comparaisons numériques ont généralement été réalisées grâce à des index comme les indices de toxicité, ou grâce au calcul de surface de réponse. Les indices de toxicité ainsi que les surfaces de réponses utilisent des tests *t* pour comparer les données expérimentales aux données attendues par les modèles de références (IA et CA).

1) Isobogrammes

La méthode des isobogrammes est une approche expérimentale couramment utilisée qui applique directement la définition d'addition des concentrations. Un isobogramme est un graphique en deux dimensions avec sur chaque axe la concentration d'un composé. Les isoboles relient différentes combinaisons de doses qui produisent le même effet (Figure 4).

Dans le cas d'une addition des concentrations (donc pas d'interaction) :

$$\frac{c_a^*}{CE_{xa}} + \frac{c_b^*}{CE_{xb}} = 1$$

c_i^* représente la concentration de la substance i d'un mélange de n composés ($i=1\dots n$) ayant un effet total E .

CE_{xi} est la concentration de la substance i qui provoque l'effet E dans le cas où elle est appliquée seule.

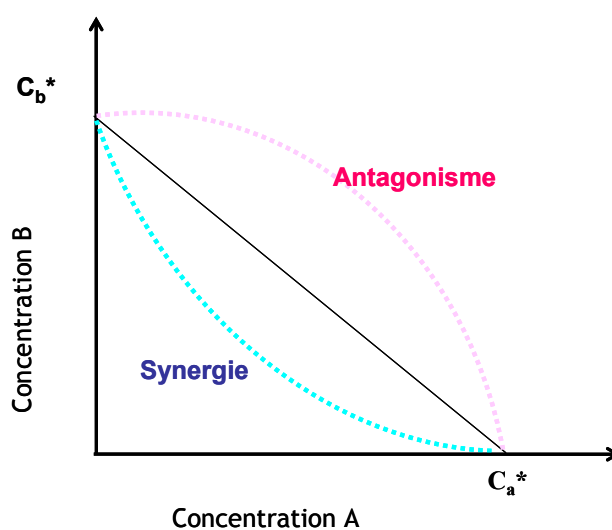


Figure 4 : Un isobogramme schématique.

Dans un isobogramme, le modèle d'addition des concentrations est caractérisé par une ligne droite qui relie les concentrations des deux composés A et B ayant un même effet. Une déviation de la ligne droite indique un antagonisme (courbe en pointillé en rose) ou une synergie (courbe en pointillé en bleu).

Certains auteurs se sont attachés à représenter le modèle d'indépendance d'action (IA) dans des isobogrammes afin d'identifier, comme pour le modèle d'addition des concentrations, si les effets sur différents modes d'action sont antagonistes, synergiques ou additifs. Si on considère deux substances A et B, leur toxicité en mélange peut être estimée par l'équation suivante (Faust *et al.*, 2004; Pösch, 1993 ; Syberg *et al.*, 2008) :

$$1 - E(c_a) = \left(\frac{1 - E(c_{mix})}{1 - E(c_b)} \right)$$

$E(c_{mix})$ = effet total d'un mélange avec une concentration totale c_{mix} ; $E(c_i)$ = effet individuel de la substance i présente à la concentration c_i .

Comme pour le modèle d'addition des concentrations (CA), les déviations de l'isobole du modèle IA sont déterminées graphiquement.

Les isobogrammes présentent de nombreux avantages comme leur simplicité, leur flexibilité et leur caractère intuitif (Greco *et al.*, 1995). De nombreuses études portent sur l'utilisation des isobogrammes (Cedergreen *et al.*, 2005 ; Kortenkamp et Altenburger, 1998 ; Syberg *et al.*, 2008). Cependant comme souligné dans la revue concernant l'utilisation des isoboles dans l'étude des effets des mélanges réalisée par Kortenkamp et Altenburger (1998), l'utilisation des isoboles présente un désavantage important quant à l'évaluation statistique de la différence entre les données théoriques et de la ligne d'additivité.

2) Indices de toxicité

Les isobogrammes combinés aux indices de toxicité sont couramment utilisés pour identifier une interaction entre les composants d'un mélange (Altenburger, 2003). Les indices de toxicité sont basés sur le modèle d'addition des concentrations (CA). Dans le modèle CA, les concentrations de chaque constituant toxique du mélange sont ajoutées pour prédire la toxicité du mélange. Cependant chaque contaminant peut avoir des potentialités différentes. Ainsi, différentes méthodes ont été proposées pour exprimer les concentrations des composés chimiques du mélange en des doses qui provoquent le même effet. Ces doses sont appelées doses équi-toxiques. Différents indices de toxicité ont été développés, dont l'unité toxique (Sprague, 1970).

L'unité Toxique

L'unité toxique (TU pour « Toxic Unit ») a été introduite par Sprague en 1970. Dans cette approche, la concentration de chaque composé présent dans le mélange est divisée par la concentration du composé produisant, lorsqu'il est seul, un effet toxique. Cet effet toxique (par exemple, la concentration entraînant 50% de mortalité) est le même pour tous les composés du mélange. Cette méthode permet ainsi de normaliser la concentration de chaque composé du mélange par rapport à une toxicité et donc de convertir la concentration de chaque composé en unité toxique (TU).

$$TU_i = \frac{c_i}{CE_{50xi}}$$

où c_i est la concentration du composé i dans le mélange et CE_{50xi} la concentration de la substance qui cause l'effet $E = 50\%$ si cette substance est seule.

Si la somme des unités toxiques observées est égale à 1, alors le mélange est strictement additif (CA), il n'y a donc pas d'interaction entre les différents composés du mélange. Si la somme des unités toxiques est inférieure à 1, l'effet est inférieur à une simple additivité (effet antagoniste) et s'il est supérieur à 1, l'effet est synergique. Pour tester si l'effet observé est statistiquement différent de celui attendu (TU), un test t est souvent réalisé (Ince *et al.*, 1999 ; Mahar et Watzin, 2005).

Autres indices de toxicité

D'autres indices de toxicité ont été développés comme l'index d'additivité (AI), l'index d'augmentation de toxicité (toxicity enhancement index, TEI) définis par Marking (1977) et l'index de toxicité de mélange (mixture toxicity index) défini par Könnemann *et al.* (1981). Tous ces indices peuvent être exprimés par rapport à l'unité toxique. Comme pour l'unité toxique, des tests t sont généralement utilisés pour comparer les effets observés aux effets attendus par les modèles de références IA et CA.

3) Surfaces de réponse de non-interaction

Principe

Les modèles basés sur les surfaces de réponses de non-interaction sont calculés à partir des relations dose-réponse des composés seuls pour les deux critères d'indépendance d'action et d'addition des concentrations (Figure 5).

Par exemple : Soient deux toxiques (c_1, c_2) ayant un effet E avec des courbes dose-réponse pouvant être décrites par des fonctions de Hill avec des CE_{50} différentes ($CE_{50\ x1}$ et $CE_{50\ x2}$ respectivement) et des index de coopération n différents (n_1 et n_2 , respectivement).

$$\text{Equation générale de la fonction de Hill : } y = E_{\max} \frac{c^n}{CE_{50}^n + c^n}$$

Avec E l'effet, E_{\max} l'effet maximum, x la concentration du composé toxique et n l'index de coopération.

Equation des surface de non-interaction (Vettori *et al.*, 2006 ; Goldoni *et al.*, 2007)

Addition de Loewe :

$$c_1 CE_{50\ x2} \left(\frac{E}{1-E} \right)^{\frac{1}{n_2}} + c_2 CE_{50\ x1} \left(\frac{E}{1-E} \right)^{\frac{1}{n_1}} = CE_{50\ x1} \times CE_{50\ x2} \left(\frac{E}{1-E} \right)^{\frac{n_1+n_2}{n_1 n_2}}$$

Indépendance de Bliss :

$$E = \frac{CE_{50\ x2}^{n_2} c_1^{n_1} + CE_{50\ x1}^{n_1} c_2^{n_2} + c_1^{n_1} c_2^{n_2}}{\left(CE_{50\ x1}^{n_1} + c_1^{n_1} \right) \left(CE_{50\ x2}^{n_2} + c_2^{n_2} \right)}$$

Le modèle d'additivité de Loewe est plus complexe à appliquer que le critère d'indépendance d'action de Bliss. Dans le modèle d'addition de Loewe, il est impossible d'écrire l'effet comme une fonction des concentrations des composés, car l'effet du mélange et les concentrations des composés du mélange ne sont mathématiquement pas séparables. L'expression mathématique de la surface de réponse de « non-interaction » peut être résolue par des techniques d'itération (logiciel Combitoool : Dressler *et al.*, 1999, logiciel Calculsyn distribué par Biosoft ®) ou graphiquement, comme proposé par Vettori *et al.* (2006).

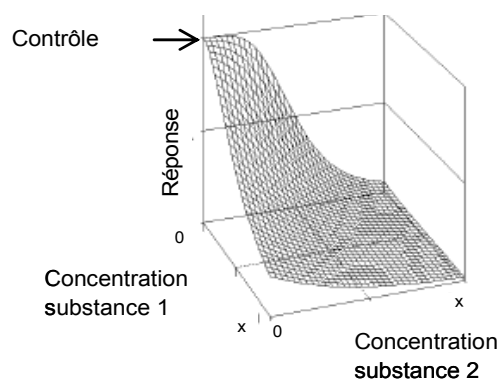


Figure 5 : Exemple de surface de réponse (d'après Jonker *et al.*, 2005)

Différents programmes (Combitool et Calculsyn) proposent de calculer les surfaces de réponse. Dans ces programmes, aucun test statistique n'est appliqué ; il est considéré que toute différence par rapport au modèle indique une interaction.

Une méthode d'analyse statistique, proposée par Goldoni *et al.* (2007), estime l'incertitude sur les surfaces de réponse calculées pour les deux modèles (addition des concentrations et indépendance d'action) à partir des incertitudes des paramètres des courbes doses-réponse des substances isolées. Dans ce modèle, les surfaces minimum et maximum peuvent être calculées en prenant en compte l'erreur standard sur les paramètres des courbes dose-réponse des composés isolés. Sur ces surfaces de non-interaction chaque point théorique a un intervalle de confiance. Avec un test *t* de Student, Goldoni *et al.* (2007) proposent d'évaluer si la différence entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques est significative.

1.1.4.2. Modèles de mélange avec paramètres d'interaction

Ces modèles qui cherchent à décrire les interactions sont plus robustes statistiquement que ceux décrits précédemment. En effet, contrairement aux modèles sans interactions, présentés précédemment, qui comparent chaque point observé à un point attendu, ils permettent de prendre en compte tous les points observés ensemble dans un même modèle, qui est ensuite comparé aux modèles de référence.

Différents modèles décrivant différents types d'interaction des modèles de référence d'indépendance d'action et d'addition des concentrations, ont été développés (Carter *et al.*, 1995 ; Chou *et al.*, 2006 ; Greco *et al.*, 1995 ; Haas *et al.*, 1996 ; Jonker *et al.*, 2005 ; Sorensen *et al.*, 2007).

Dans ces méthodes, une relation dose-réponse pour chaque substance isolée est associée à une relation entre les concentrations de chaque substance isolée dans le mélange et les concentrations des substances isolées nécessaires pour obtenir le même effet. Les modèles de surface de réponse permettent donc de définir de façon indirecte la relation entre la réponse du mélange et la concentration des substances du mélange. Des tests sont réalisés sur ces modèles prenant en compte les interactions. Ces modèles incluent un ou plusieurs paramètres qui déterminent le degré d'interaction.

Parmi les méthodes basées sur les surfaces de réponse qui prennent en compte les degrés d'interaction, deux méthodes se distinguent des autres : celles proposées par Sorensen *et al.* (2007) et par Jonker (2005).

La méthode proposée par Sorensen *et al.* (2007) se distingue par le fait qu'elle combine les surfaces de réponse avec les isobogrammes, ce qui lui confère de nombreux avantages : ceux apportés par les surfaces de réponse ainsi que les qualités illustratives des isobogrammes.

La méthode de Jonker *et al.* (2005) quant à elle permet de définir un nombre important de modèles d'interactions et de détecter des interactions dépendantes du niveau de dose et des ratios de doses étudiées.

C'est pourquoi ces deux méthodes seront présentées par la suite.

1) Le modèle combiné : isobogramme - surface de réponse (Sorensen *et al.*, 2007)

Le modèle statistique proposé par Sorensen *et al.* (2007) combine les surfaces de réponses avec la méthode des isobogrammes.

Ce modèle combine les courbes doses réponses pour chaque mélange d'une expérience avec un modèle d'isobole capable de décrire une déviation par rapport à l'addition des concentrations CA (Figure 6). Il est basé sur un modèle de régression non linéaire pour des designs en raies appliqué aux mélanges binaires.

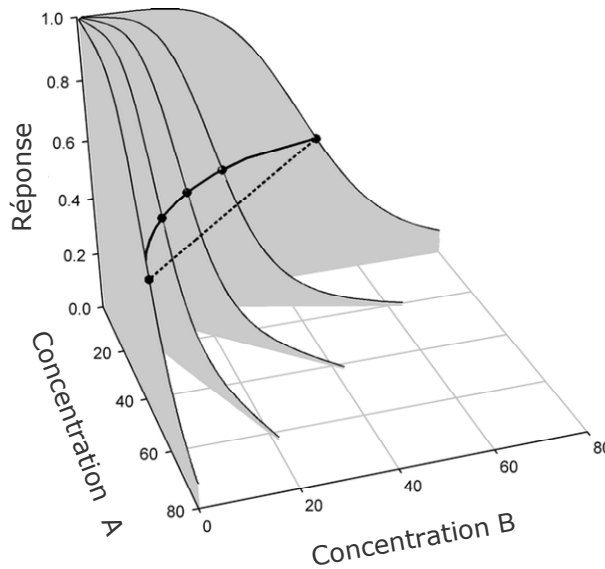


Figure 6 : Représentation d'une surface de réponse visualisée par un design en raies.

La CE_{50} pour chaque courbe est matérialisée par un point sur chaque courbe. La courbe en trait plein représente le modèle d'isobole ajustée et en trait pointillé le modèle d'isobole théorique pour l'addition des concentrations (Cedergreen *et al.*, 2007).

La projection des CE_{50} et des modèles d'isoboles sur un plan x-y donne un isobogramme similaire à celui représenté précédemment (Figure 4).

Pour un effet non-additif Hewlett (1969) propose d'intégrer un paramètre d'interaction λ pour modéliser l'isobole.

$$\text{Modèle de Hewlett : } \left(\frac{c_a^*}{CE_{xa}} \right)^{1/\lambda} + \left(\frac{c_b^*}{CE_{xb}} \right)^{1/\lambda} = 1$$

c_i^* représente la concentration de la substance i d'un mélange de n composés ($i=1 \dots n$) ayant un effet total E .

CE_{xi} est la concentration de la substance i qui provoque l'effet E dans le cas où elle est appliquée seule.

Dans le cas d'une isobole asymétrique ou d'un fort antagonisme, des modèles plus complexes sont utilisés comme le modèle de Vølund (1992). Dans la modélisation des isoboles, toutes les données, y compris les données des effets des substances seules, sont prises en compte.

$$\text{Modèle de Vølund: } \left(\frac{c_a^*}{CE_{xa}} \right)^{\eta_a} \left(\frac{c_a^*}{CE_{xa}} + \frac{c_b^*}{CE_{xb}} \right)^{1-\eta_a} + \left(\frac{c_b^*}{CE_{xb}} \right)^{\eta_b} \left(\frac{c_a^*}{CE_{xa}} + \frac{c_b^*}{CE_{xb}} \right)^{1-\eta_b} = 1$$

c_i^* représente la concentration de la substance i d'un mélange de n composés ($i=1 \dots n$) ayant un effet total E .

CE_{xi} est la concentration de la substance i qui provoque l'effet E dans le cas où elle est appliquée seule.

η_i est le paramètre d'interaction pour la substance i .

Pour évaluer quel modèle décrit le mieux les données expérimentales, les écarts entre le modèle CA et les deux modèles non additifs (Hewlett et Vølund) sont évalués en comparant l'ajustement de chacun des ces deux modèles au modèle CA en utilisant un test F.

2) La méthode de Jonker (2005)

Jonker *et al.* (2005) proposent une méthode où les effets des mélanges sont comparés aux deux modèles de référence (CA et IA) et à trois autres modèles illustrant des déviations possibles par rapport à ces mêmes modèles.

- Sans déviation par rapport au modèle de référence CA ou IA

Dans le cas où il n'y a pas de déviation, l'effet observé du mélange est en adéquation avec les modèles de référence CA ou IA (Figure 7).

- Avec déviation

Synergie ou Antagonisme

Dans ce premier modèle d'interaction, toutes les combinaisons causent un effet plus important (synergie) ou moins important (antagonisme) que celui calculé pour chaque modèle de référence (Figure 7). Dans ce modèle nommé S/A, un seul paramètre d'interaction a intervient.

Déviation dépendante des niveaux de dose

La déviation à partir du modèle de référence diffère à faibles et à fortes doses. Par exemple, un antagonisme peut être observé à de faibles doses et une synergie à de fortes doses (Figure 7). Dans ce modèle nommé DR, deux paramètres d'interaction a et b ont été définis pour estimer le degré d'interaction.

Déviation dépendante des ratios de doses

La déviation à partir de chaque référence dépend de la composition du mélange. Dans le cas de deux substances, un antagonisme peut être observé quand la toxicité du mélange est causée principalement par une substance 1, alors qu'une synergie peut être observée quand la toxicité est causée principalement par la substance 2 (Figure 7). Dans ce modèle nommé DL, deux paramètres d'interaction a et b ont été définis comme pour le modèle DR pour estimer le degré d'interaction.

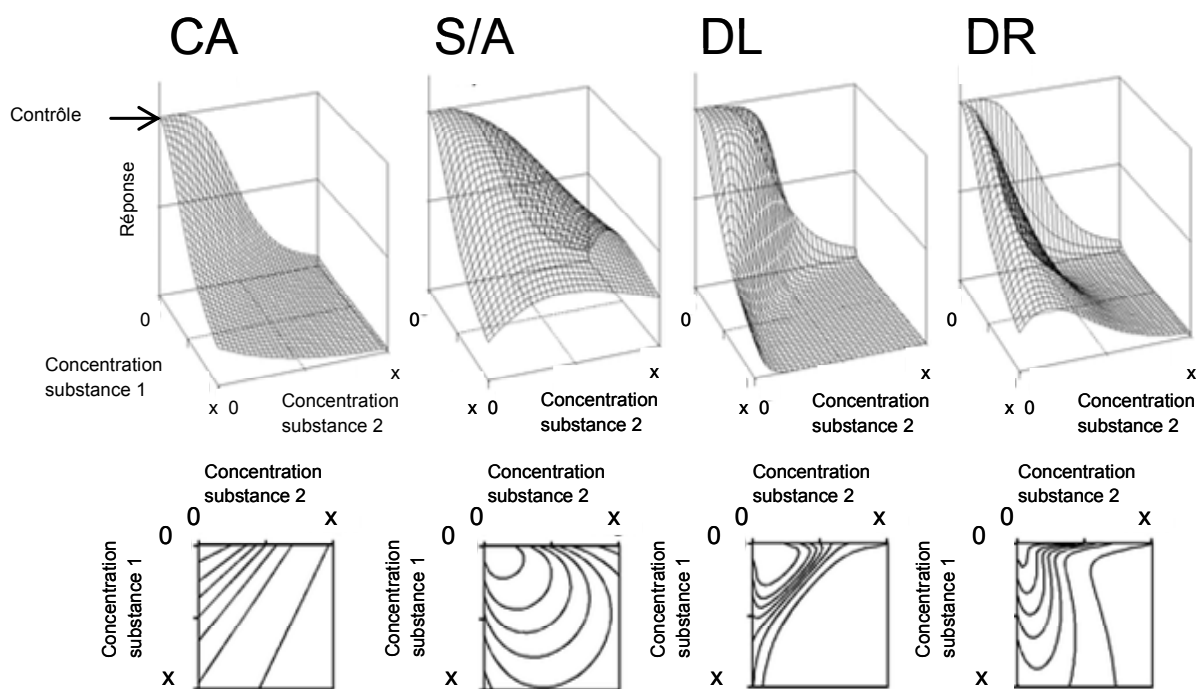


Figure 7: Relations dose-réponse de mélanges binaires illustrant le modèle d'addition des concentrations et trois déviations de cette référence: pas de déviation (CA), déviation antagoniste (S/A), déviation dépendante du niveau de dose (DL), et une déviation dépendante du ratio de dose (DR). En haut: 3D surfaces de réponse. En bas: 2D représentation sous forme d'isobole des surfaces de réponse. La réponse biologique est élevée pour le contrôle et décroît quand les doses de substances augmentent (e.g., survie ou reproduction) (Jonker *et al.*, 2005).

Le détail des formules de ces différents modèles sont présentés en annexe 1. Les modèles sont ajustés aux données expérimentales (ajustement par maximum de vraisemblance), les ajustements des différents modèles sont ensuite comparés (grâce à un test du Chi-Deux). Il est donc ensuite possible d'identifier quel modèle explique le mieux les données observées et ainsi d'appréhender les interactions possibles.

1.1.5. Différents types de plans d'expérience pour l'étude des mélanges

Parallèlement aux méthodes, des outils pour l'identification et la quantification des interactions ont été développés. Certains auteurs se sont attachés à définir les designs expérimentaux les mieux adaptés aux différents outils mis en œuvre (Cassee *et al.*, 1998 ; Coffey *et al.*, 2005 ; Meadows *et al.*, 2002) .

Pour des mélanges binaires de deux substances S_i , à différentes concentrations C_i , trois plans d'expériences de base sont décrits dans la littérature : le design factoriel, le design en raies et un design composite combinant le design factoriel et le design en raies (Altenburger, 2003) (Figure 8). Tous ces designs sont basés sur l'hypothèse que les courbes dose-réponse sont monotones.

1.1.5.1. Design factoriel

Le design factoriel est utilisé pour déterminer la relation dose-réponse d'une substance en présence d'un ou plusieurs niveaux d'un autre composé. Il est employé pour détecter les effets non additifs de deux substances dans un mélange. Son utilisation a été suggérée par USEPA (2000) comme une des approches valables dans l'évaluation des risques des mélanges chimiques. Les designs factoriels complets (c'est-à-dire en testant toutes les combinaisons de concentrations des substances) sont cependant très coûteux et longs à mettre en œuvre.

1.1.5.2. Design en raies

Le design en raies est basé sur des ratios constants de mélange. Il est celui qui convient le mieux pour la comparaison des réponses avec le modèle d'addition des concentrations ; il permet aussi une interprétation en accord avec le modèle d'action indépendante si les réponses individuelles sont estimées.

Un design en raies peut être utilisé pour calculer un index de combinaison ou des isoboles pour un mélange. Au moins 10 points (3 points sur chaque raie et un point de contrôle) sont nécessaires pour étudier un mélange de deux substances (Cassee *et al.*, 1998).

1.1.5.3. Design composite (factoriel et design en raies)

Le design composite combine les aspects du design factoriel et du design en raies (Figure 8). Il est souvent utilisé dans des cas où les relations dose-réponse des substances ne sont pas parallèles; différents ratios sont alors appliqués pour différents niveaux d'effet.

	[C1] S1	[C2] S1	[C3] S1	[C4] S1	[C5] S1	[C6] S1
[C1] S2	• ◊		× •		× •	
[C2] S2		◊				
[C3] S2			◊	×		
[C4] S2	•	×	•	◊	•	
[C5] S2					◊	×
[C6] S2				×		◊

Points de design théoriques pour des mélanges binaires avec un nombre identique d'observation selon les designs : • = design factoriel ; ◊ = design en raie; × = design composite

Figure 8: Illustration des différents designs pour l'étude l'un mélange binaire de substances (S1 et S2) à différentes concentrations allant de C1 à C6 selon (selon Altenburger *et al.*, 2003).

Pour détecter une interaction entre deux composés d'un mélange binaire, les données d'effet observées sont comparées aux données prédites par les modèles d'additivité. Les deux modèles d'additivité les plus couramment utilisés sont : le modèle d'addition des concentrations (CA) et le modèle d'indépendance d'action (IA). Les données d'effet du mélange prédites par ces deux modèles sont calculées à partir des données d'effet des substances seules.

Le modèle logistique est couramment appliqué à l'étude des effets de substances seules et il peut être envisagé d'utiliser dans le cadre de l'étude des effets du mélange U-Se chez la daphnie.

Parmi les différents outils développés pour identifier les interactions entre les composés des mélanges, les modèles prenant en compte les interactions semblent les plus robustes statistiquement. En effet, les tests statistiques appliqués dans ces méthodes permettent de prendre en compte toutes les données expérimentales pour les comparer, ensemble, au modèle de référence. Ces modèles avec des paramètres d'interactions présentent aussi l'avantage de pouvoir non seulement identifier mais aussi de quantifier les interactions.

Parmi ces modèles, deux méthodes se distinguent : la méthode de Sorensen *et al.* (2007) et celle de Jonker *et al.* (2005). La méthode de Sorensen *et al.* (2007) combine les surfaces de réponse et les isobogrammes et présente donc de nombreux avantages cependant elle ne permet d'identifier que les écarts avec le modèle d'addition des concentrations. La méthode proposée par Jonker *et al.* (2005) présente, quant à elle, l'avantage de s'intéresser aux deux modèles de référence (CA et IA) et est donc complémentaire à celle de Sorensen *et al.* (2007). Utilisée en parallèle à celle de Sorensen *et al.* (2007), elle permettrait de confirmer les résultats obtenus grâce aux deux méthodes pour le modèle de CA.

Les méthodes sélectionnées pour l'identification et la quantification des interactions, impliquent la mise en place d'un design expérimental important. Il semble donc nécessaire d'établir un plan d'expérience, comme le design en raies, afin d'optimiser le nombre de conditions à tester.

1.2. Modèle biologique étudié : La daphnie

Daphnia magna est un microcrustacé d'eau douce, de l'ordre des cladocères, recommandé en tant qu'espèce modèle dans différents bioessais standardisés pour l'évaluation de risques chimiques (ASTM, 2004; ISO, 1996; OCDE, 1998). Ce modèle biologique a été choisi car les daphnies sont des organismes dont la manipulation et l'élevage sont rendus aisés par leur taille relativement petite, leur cycle de vie court, leur fécondité élevée et leur mode de reproduction par parthénogenèse (Koiviso, 1995). Dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce, les daphnies ont une place importante dans les transferts de matière et d'énergie et occupent la place de consommateur primaire.

1.2.1. Biologie et morphologie

Le corps de la daphnie est protégé par une carapace transparente (Figure 9). Les yeux composés, sont fusionnés sur le plan sagittal et constituent un œil médian, mobile dans une cavité sans communication vers l'extérieur. Les antennes biramées assurent une progression par à-coups d'où l'appellation de Puce d'eau. Les pattes thoraciques assurent la filtration du plancton. Le cœur en forme de sac ne présente qu'une paire d'ostioles. La respiration est assurée par la carapace, les pattes et l'intestin postérieur qui aspire et rejette périodiquement l'eau (Beaumont et Cassier, 2004).

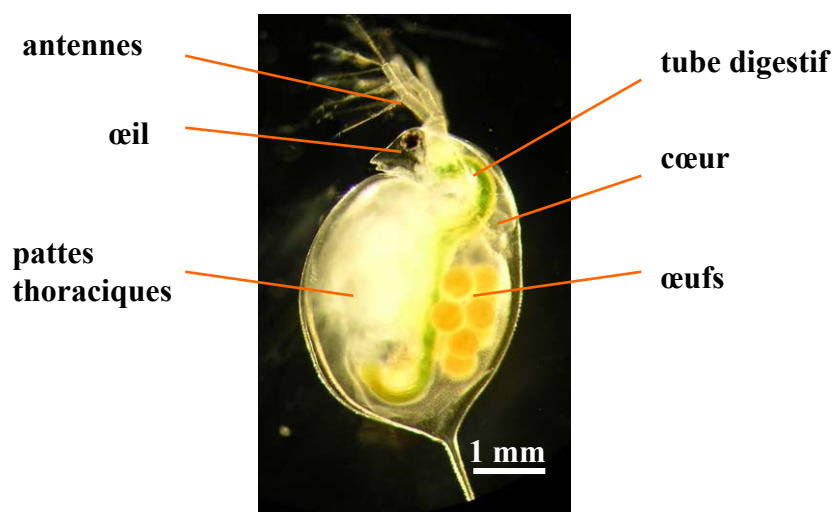


Figure 9 : Femelle *Daphnia magna* de 21 jours. Photographie réalisée avec un appareil Nikon Coolpix 8400 monté sur une loupe binoculaire à base diascopique Nikon SMZ 1000. (Zeman, 2007)

La partie dorsale constitue une chambre de maturation où sont déposés les œufs lors de chaque ponte. Ces œufs proviennent des ovaires situés de part et d'autre de l'intestin. Les ovaires sont plus ou moins apparents en fonction de l'avancée dans un cycle de ponte (Figure 10). Dans cette chambre, les œufs se transforment en juvéniles qui sont ensuite relâchés dans le milieu extérieur. La daphnie possède un cœur situé dorsalement. Le système nerveux est caractérisé par un ganglion cérébral, qui est situé près du système digestif et de l'œil. (Ebert, 2005).

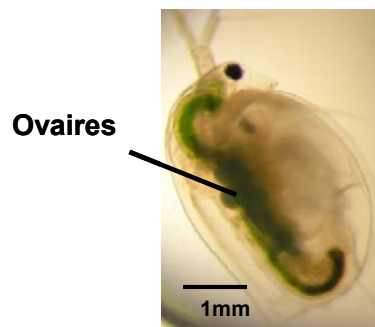


Figure 10 : Daphnie de 15 jours avec ovaires formés. Photographie réalisée avec un appareil Nikon Coolpix 8400 monté sur une loupe binoculaire à base diascopique Nikon SMZ 1000. (Zeman, 2007)

Le système digestif de la daphnie est assez simple, avec un tube digestif et deux diverticules (Figure 11). Le tube digestif est plus ou moins tubulaire et est composé de trois parties : l'œsophage, une partie médiane et terminale de l'intestin. La partie médiane de l'intestin est constituée de cellules épithéliales et possède des microvillosités. Cette partie permet la digestion de la nourriture ainsi que l'assimilation des nutriments. Les deux diverticules auraient, quant à eux, un rôle dans la production de fluides digestifs (Ebert, 2005).

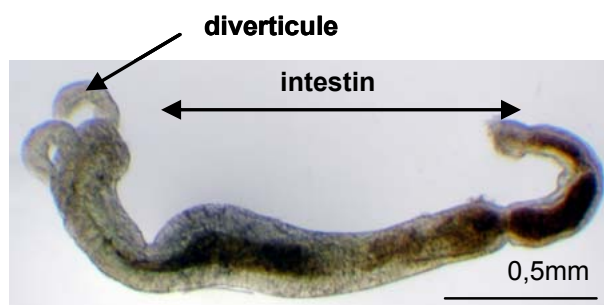


Figure 11 : Intestin disséqué de *Daphnia magna*. Photographie issue de Ebert (2005).

Sur la gauche, on peut distinguer les deux diverticules. L'œsophage n'est pas présent. L'intestin se termine à l'extrémité droite de la photographie. Les formes sombres dans le tube digestif sont des composés partiellement digérés.

Chez la daphnie, peu d'études ont été réalisées sur les effets de substances toxiques sur les cellules et les tissus. Néanmoins celles qui existent, portant sur les effets du sélénium et de cyanobactéries, ont pu mettre en évidence des effets délétères sur les tissus du système digestif de la daphnie, que ce soit au niveau de l'intestin ou des diverticules (Johnston *et al.*, 1989 ; Nogeria *et al.*, 2006 ; Schultz *et al.*, 1980).

1.2.2. Cycle de vie de la daphnie

Les cladocères pullulent dans les étangs, les lacs, les mares et les ruisseaux où ils se reproduisent par parthénogénèse cyclique. De nombreuses générations de femelles issues d'œufs parthénogénétiques à développement rapide alternent avec une génération bisexuée produisant des œufs fécondés, durables (œufs d'hiver ou éphippie) (Figure 12).

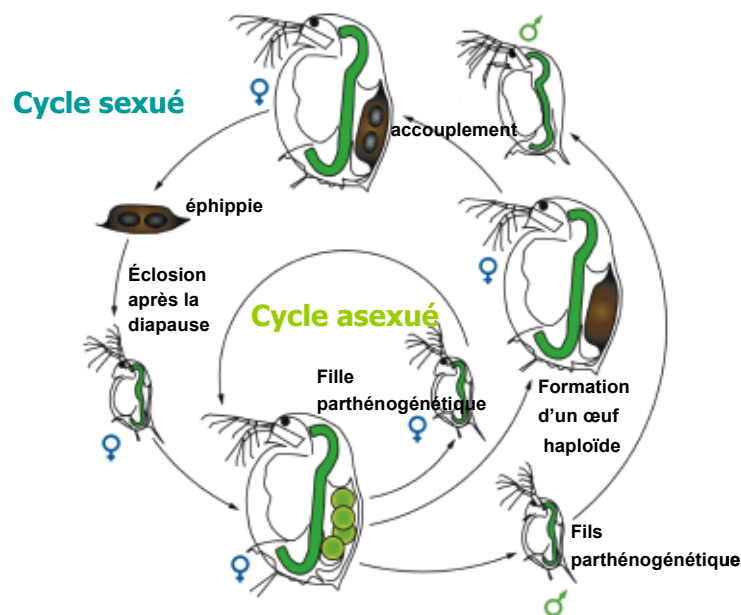


Figure 12 : Schéma du cycle de vie de la daphnie d'après Ebert (2005)

En effet, en conditions favorables, les daphnies se reproduisent par reproduction asexuée : la parthénogénèse. Les femelles existent seules et engendrent à partir d'ovules (non fécondés) d'autres daphnies filles identiques génétiquement à leur mère. Les générations parthénogénétiques, sans apparition de mâles, se succèdent tant que les conditions du milieu restent favorables. En condition favorable, les daphnies deviennent matures, c'est-à-dire ont leur 1^{ère} ponte, au bout de 6-7 jours (Figure 13). Les juvéniles de cette première ponte restent dans la poche incubatrice pendant 3 à 4 jours, le temps de leur développement (voir annexe 2 pour les différentes étapes de développement). Les juvéniles issus de la 1^{ère} ponte sont donc libérés lorsque la daphnie est âgée de 9 à 10 jours. Au plus tard une heure après cette libération, la daphnie mue et dépose une nouvelle ponte dans sa poche incubatrice. Une fois la daphnie devenue mature, elle pond tous les 3 à 4 jours jusqu'à sa mort (50-70 jours).

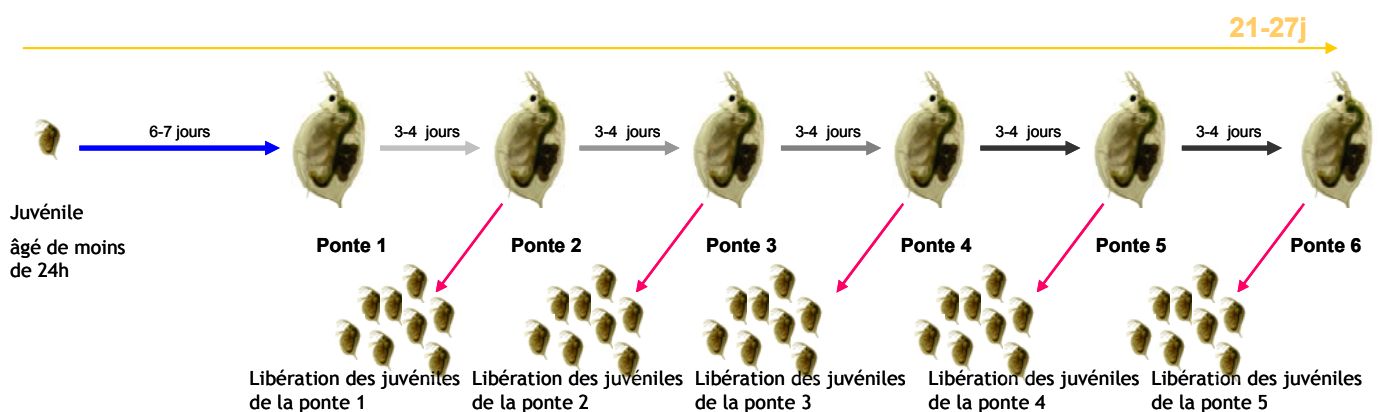


Figure 13: Reproduction de la daphnie en condition favorable par parthénogénèse

Si les conditions deviennent défavorables (manque de nourriture, pollution chimique, densité excessive, assèchement du volume d'eau, désoxygénation sévère, abaissement de la température, etc...), les daphnies femelles donnent alors naissance à des mâles. Ils sont plus petits et reconnaissables à l'absence de poche incubatrice (Figure 14).

La reproduction peut alors être sexuée. Les femelles fécondées portent dans la poche incubatrice une «éhippie» (Figure 15). Ces œufs de résistance à membrane épaisse n'éclosent

pas immédiatement. Ils restent enfermés dans leur membrane protectrice qui durcit et s'épaissit. Ils donneront naissance, lorsque les conditions deviennent à nouveau favorables, à une population génétiquement différente des daphnies mères (Chèvre, 2000).



Figure 14 : Photographie d'un mâle 21 jours

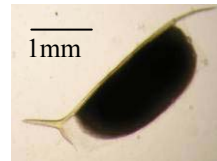


Figure 15 : Photographie d'une éphippie

Photographies réalisées avec un appareil Nikon Coolpix 8400 monté sur une loupe binoculaire à base diascopique Nikon SMZ 1000. (Zeman, 2007)

1.2.3. Etude des effets aigus et chroniques de substances

L'étude de la réponse des organismes vivants à un stress peut se faire à différents niveaux d'organisation allant de l'échelle moléculaire à l'échelle de l'individu, jusqu'à l'échelle des populations ou même des communautés (Figure 16). En écotoxicologie, les études réalisées ont pour but d'évaluer les effets d'une substance sur les écosystèmes. En effet, contrairement à la toxicologie humaine, l'unité biologique visant à être protégée n'est pas l'individu mais la population. Avant que les effets ne soient visibles à l'échelle de la population, il est souvent possible de mesurer les effets à des niveaux d'organisation inférieurs tels que l'individu, voire à des niveaux tissulaires, cellulaires et même moléculaires.

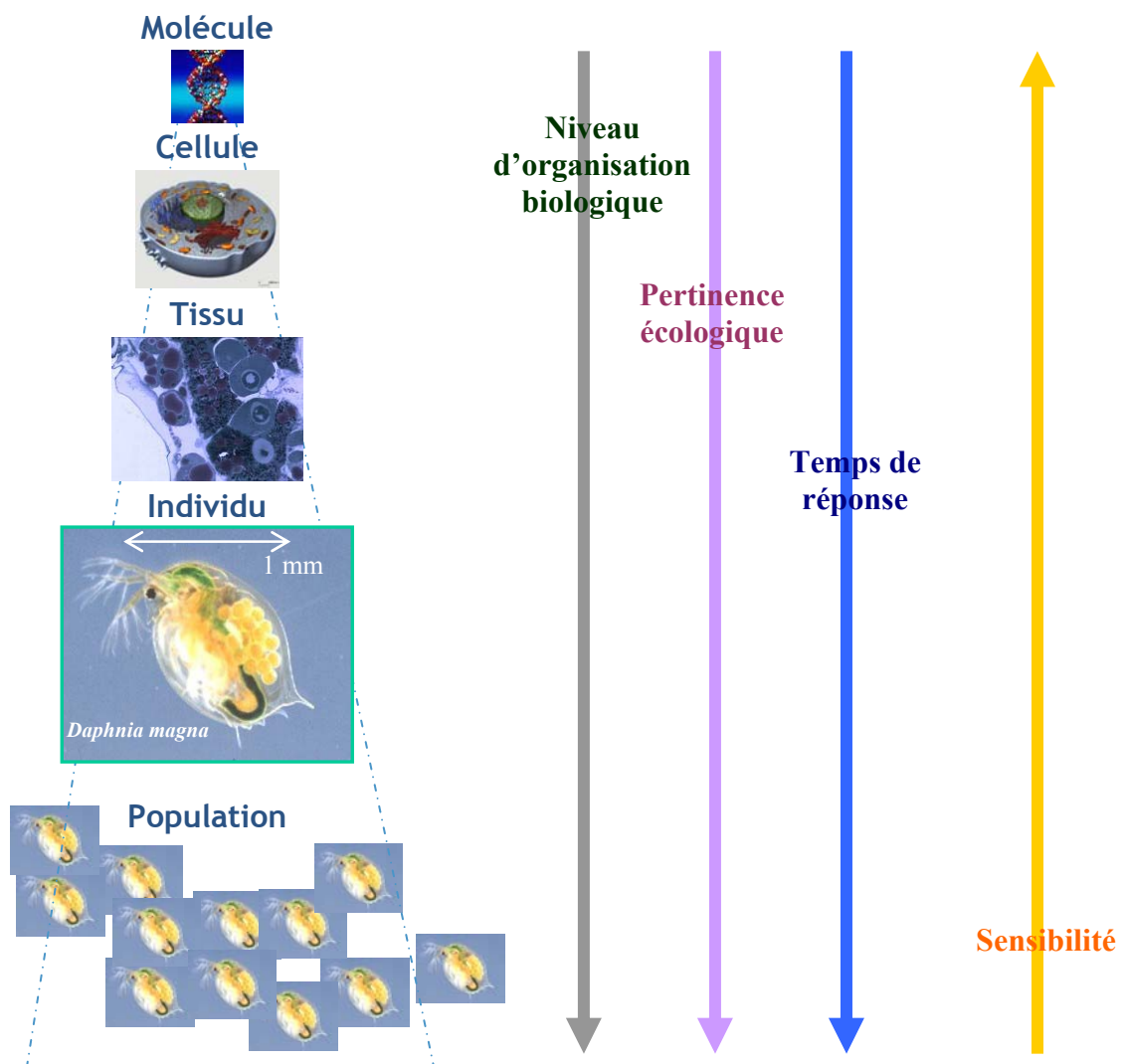


Figure 16: Les différents niveaux d'organisation (modifié d'après van der Oost *et al.*, 2003)

Pour évaluer les effets au niveau d'une population, la démarche la plus commune est d'étudier les effets sur les différents traits d'histoire de vie des individus pour ensuite les intégrer dans des modèles de dynamique de population.

Une approche énergétique permet quant à elle d'évaluer les effets sur l'état de santé des organismes en s'intéressant aux perturbations des processus métaboliques. Dans cette approche, les effets mesurés peuvent aussi être intégrés dans des modèles de budget énergétique dans le but d'évaluer les effets sur la population.

1.2.3.1. Etude des effets au niveau de l'individu

Pour l'étude des effets au niveau de l'individu, on peut distinguer les études réalisées sur les œufs, les juvéniles et celles sur les daphnies adultes.

Effets sur le développement des œufs

Les tests visant à étudier les effets de substances sur le développement des œufs de daphnies sont peu nombreux (Abe *et al.*, 2001 ; Baird *et al.*, 1991 ; Bodar *et al.*, 1989 ; Kast-Hutcheson *et al.*, 2001 ; Ohta *et al.*, 1998 ; Sobral *et al.*, 2001). Lors de ces tests, les œufs sont extraits de la chambre de ponte et leur développement est suivi jusqu'à ce qu'ils atteignent le stade de juvéniles. Les malformations de développement ainsi que les retards de développement sont les deux critères d'effet observés lors ces tests. Les différents stades de développement définis par Kast-Hutcheson *et al.* (2001) sont présentés en annexe 2.

Ces tests ont été utilisés pour étudier la toxicité de diverses substances comme l'aniline, le bromure de sodium, le cadmium, le zinc, le cuivre ou le plomb (Abe *et al.*, 2001 ; Baird *et al.*, 1991 ; Bodar *et al.*, 1989). Sobral *et al.* (2001) suggèrent que ces tests basés sur le développement des œufs permettraient d'évaluer dans un temps très court, les effets sublétaux classiquement étudiés dans les tests 21 jours sur des adultes et proposent même d'utiliser ce test « œufs » comme une alternative au test 21 jours.

Effets sur la survie des juvéniles

Les tests classiques réalisés sur les juvéniles visent à évaluer les effets aigus d'une substance. Ces tests sont normalisés (ASTM, 2004 ; ISO 1996). Ils consistent à déterminer la concentration de l'échantillon qui cause 50% de mortalité après 24h et 48h d'exposition (CE_{50} : concentration conduisant à 50% d'effet) dans un système statique et dans des conditions contrôlées. Lors de ces tests, les daphnies juvéniles sont considérées comme mortes si elles restent immobiles plus de 10s après une légère stimulation. Pour déterminer cette concentration (CE_{50}), des daphnies sont exposées à une série de concentrations croissantes d'une substance. Pour chaque concentration, et après 24 et 48h d'exposition, le nombre de daphnies survivantes par concentration est observé et le pourcentage de mortalité est déterminé.

Ces tests sont très couramment utilisés dans une première approche pour évaluer les effets aigus de substances sur les écosystèmes aquatiques car ils présentent de nombreux avantages : ils sont relativement faciles à mettre en œuvre et permettent dans des temps très courts (24 ou 48h) de tester un très grand nombre de conditions.

Effets sur la croissance et la reproduction

Pour évaluer la toxicité chronique d'une substance, des tests sont classiquement réalisés sur les 21 premiers jours de la vie de daphnies. Comme pour les tests aigus, ces tests sont normalisés (OCDE, 1998). Lors de ce test, les daphnies sont exposées à une série de concentrations croissantes d'une substance d'intérêt. Différents paramètres peuvent être étudiés comme la mortalité, la fécondité ou la croissance. Plus particulièrement, le nombre de juvéniles produits par daphnie en 21 jours est le critère d'effet couramment utilisé pour évaluer les effets chroniques. Comme pour le test précédent réalisé sur les juvéniles, la CE_{50} reproduction, représentant la concentration nécessaire pour entraîner une baisse de 50% de fécondité, est déterminée.

Cependant comme ces tests reproduction 21 jours sont assez longs à mettre en œuvre et à réaliser, et donc assez coûteux, différents auteurs proposent de raccourcir ce test 21 jours à 7 jours afin d'étudier les effets uniquement sur la 1^{ère} ponte (Guilhermino *et al.*, 1999 ; Santojanni, 1995). Dans le cadre de l'évaluation des effets chroniques d'un mélange binaire sur la daphnie, Barata *et al.*, (2007) utilisent eux aussi un test raccourci à 7 jours. Le test 7 jours semble donc une alternative intéressante au test 21 jours.

1.2.3.2. Etude des effets au niveau de la population

L'histoire de vie des organismes peut être décrite par différents traits de vie comme la longévité, l'âge à la maturité sexuelle et la fécondité. Ces mesures au niveau de l'individu peuvent être intégrées dans des modèles de dynamique de population, comme par exemple dans des matrices de Leslie, afin d'évaluer les effets au niveau de la population. Une altération des traits de vie des organismes peut donc avoir des effets rapides et directs sur la population comme une diminution de l'effectif, de la biomasse ou une altération de la structure de la population (Durou *et al.*, 2008).

Il existe divers modèles de dynamique de population plus ou moins complexes. Le modèle de Leslie présente l'avantage d'être simple et facile à mettre en œuvre.

Ce modèle est un modèle de dynamique de population structurée en classes d'âge qui permet de suivre l'évolution de l'effectif d'une population au cours du temps. Dans ce modèle matriciel, le système est considéré comme fermé; la population n'est pas limitée par les ressources du milieu et il n'y a pas de phénomènes de densité-dépendance.

Ce modèle repose sur trois variables :

- > l'âge (variable continue), divisé en classes qui sont numérotées de 1 à n ,
- > le temps (variable discrète), noté t ,
- > et le pas de temps, égal à la durée de chacune des classes d'âge, c'est-à-dire que de t à $t+1$ tous les individus de la classe d'âge i passent à la classe d'âge $i+1$.

Le cycle de vie est représenté par les classes d'âge (schématisées sous forme de nœuds) et les transferts d'individus d'une classe à l'autre (schématisés par une flèche).

La structure du modèle est la suivante (Figure 17):

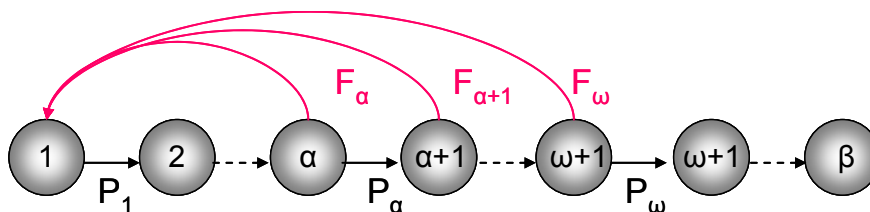


Figure 17 : Schéma représentant la structure d'une population (voir la signification des symboles dans le texte)
Avec : α : l'âge de la première reproduction, ω : l'âge de la dernière reproduction et β : la longévité maximum.
Les termes F_α à F_ω représentent les taux de fécondité et les termes P_1 à P_ω les taux de survie.

Grâce à ce modèle assez simple, il est possible de mettre en évidence les effets mesurés d'une substance sur des paramètres à l'échelle de l'individu (fécondité, survie ...) qui ont le plus d'impact sur la dynamique des populations (Stark *et al.*, 2004).

1.2.3.3. Etude des effets au niveau énergétique

1) Les bilans énergétiques

Chez tous les organismes vivants, l'ensemble des processus biochimiques et physiologiques est étroitement lié au métabolisme énergétique. Chez les animaux, l'énergie qu'ils acquièrent vient de la nourriture qui est ingérée puis assimilée. Cette énergie acquise par les organismes est allouée à différentes fonctions biologiques telles que la maintenance, le stockage de réserves, la reproduction et la croissance somatique (Baillieul *et al.*, 2005, Glazier et Calow, 1992 ; Knops *et al.*, 2001). Ces différents processus peuvent donc être reliés au sein de modèles énergétiques (Figure 18).

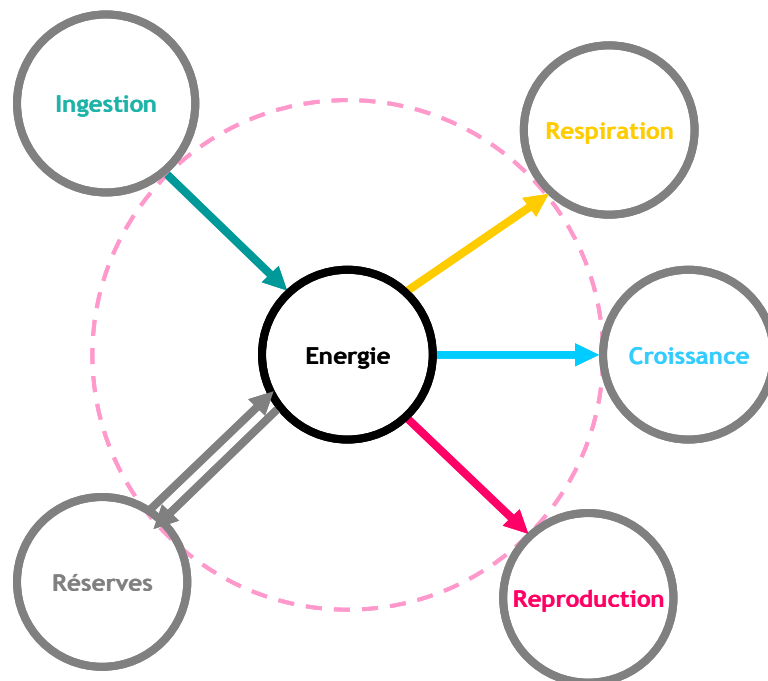


Figure 18 : Modèle énergétique au niveau individuel

2) L'hypothèse du coût métabolique

L'approche énergétique est basée sur l'hypothèse que les organismes ne peuvent pas accroître indéfiniment leur acquisition d'énergie, en raison à la fois de la limitation de la nourriture dans le milieu et des contraintes propres aux organismes. Une hausse des dépenses énergétiques pour le métabolisme de base afin de faire face à un stress enduré peut conduire à une réduction de l'investissement énergétique dans la croissance ou la reproduction par exemple. Toute augmentation des coûts métaboliques associée à l'exposition à un stress intervient donc aux dépens de processus important dans la dynamique de population (Calow et Sibly, 1990; Calow, 1991).

3) Les différents paramètres énergétiques

Tous ces paramètres (nutrition, réserves énergétiques et énergie allouée aux processus de fécondité et croissance) peuvent être intégrés dans des modèles énergétiques comme le DEB (Dynamic Energy Budget) afin d'évaluer les effets à la fois au niveau de l'individu et à celui de la population. Cependant ces modèles sont assez complexes et demandent une grande quantité de données.

Différents paramètres énergétiques simplifiés sont couramment utilisés en écotoxicologie. Ils ne permettent pas d'évaluer les effets au niveau de la dynamique des populations mais d'avoir une idée de l'état de santé des organismes. Parmi les différents paramètres liés au métabolisme énergétique, les plus connus sont (Figure 19) :

- la charge énergétique en adénylate (CEA)
- les réserves énergétiques
- l'allocation énergétique cellulaire (AEC)
- l'allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction (AECR)

Ces différents paramètres, permettant d'évaluer l'état de santé des organismes grâce à une approche énergétique, peuvent être mesurés à différents niveau d'organisation biologique et permettent ainsi d'obtenir des réponses plus ou moins précoces et avec plus ou moins de pertinence au niveau écologique.

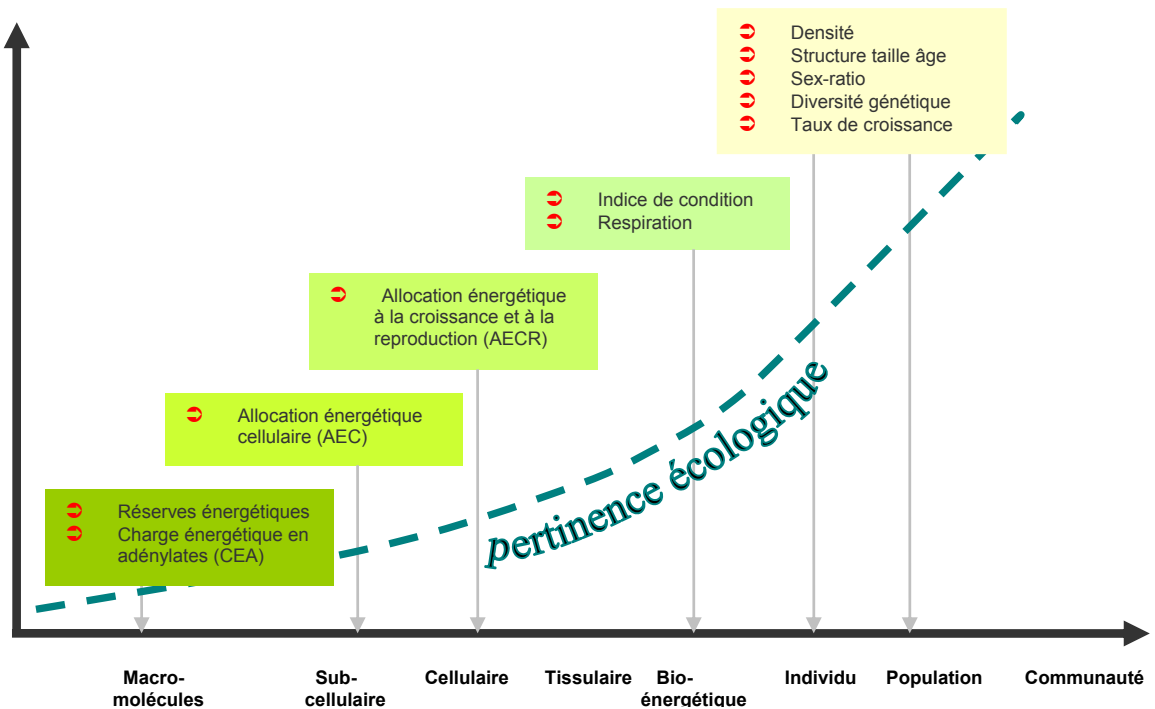


Figure 19 : Marqueurs d'effet en lien avec le métabolisme énergétique et la bioénergétique selon le niveau d'organisation (d'après Durou *et al.*, 2008).

La charge énergétique en adénylate (CEA)

La charge énergétique en adénylate est classiquement définie comme la mesure de l'énergie disponible, au sein d'un organisme vivant sous la forme adénylique (Atkinson et Walton, 1967). Elle est calculée à partir des concentrations en ATP, ADP et AMP et permet d'estimer l'état physiologique des cellules (état optimal, état perturbé de façon partielle, état présentant des perturbations sévères) (Thompson *et al.*, 1987). La CEA est un des biomarqueurs les plus anciennement utilisés. Durou *et al.*, dans leur synthèse de 2008, concluent que les valeurs de CEA sont corrélées à certains traits de vie mais qu'en cas d'atteinte sévère, ces valeurs peuvent varier fortement, vraisemblablement en raison d'une multiplication des atteintes physiologiques des organismes.

Les réserves énergétiques

Chez les animaux, les principales formes de stockage de l'énergie sont représentées par le glycogène et les lipides. Lorsque les besoins sont importants, par exemple en période de reproduction ou à la suite d'un stress, ces réserves énergétiques peuvent être mobilisées (Thompson et Couture, 1991 et 1993). Lors d'un stress, une mobilisation des réserves pour alimenter des mécanismes de compensation ou de défense peut entraîner une réduction des

réserves d'un organisme (Mayer *et al.*, 2002). Les mesures de réserves énergétiques peuvent alors être utilisées pour évaluer l'effet d'un stress.

L'allocation énergétique cellulaire (AEC)

Alors que la charge en adénylates ou les réserves énergétiques rendent compte de l'énergie disponible des organismes, l'AEC est un paramètre qui intègre l'énergie disponible et aussi l'énergie dépensée par les organismes (Durou *et al.*, 2008). Cette mesure d'AEC a été développée pour évaluer les effets d'un stress sur le budget énergétique (De Coen et Janssen, 1997). Elle est basée sur l'évaluation biochimique de changements des réserves énergétiques (composition en sucres, protéines et lipides) et de la consommation d'énergie (respiration cellulaire). Cette mesure d'allocation d'énergie cellulaire (AEC) permet donc d'évaluer les effets d'un stress toxique sur le budget énergétique des organismes et ainsi de corrélérer des mesures énergétiques à des niveaux d'organisation supérieurs (De Coen et Janssen, 2003).

L'allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction (AECR) ou « scope for growth » (SFG)

Lors d'un stress, un organisme met généralement en place des processus compensatoires, qui requièrent de l'énergie (Knops *et al.*, 2001). Ainsi, le taux métabolique se retrouve accru lors d'une exposition à une substance toxique (Callow, 1991). L'AECR représente la fraction d'énergie assimilée qui n'est pas consommée par le métabolisme de base et qui est alors disponible pour la croissance et la reproduction (Smolders *et al.*, 2003). Une AECR positive indique un gain d'énergie net et indique ainsi un excès d'énergie disponible qui peut être investi dans les réserves énergétiques, la croissance ou la reproduction. Une AECR négative indique que l'animal est en train de perdre ses réserves énergétiques. L'AECR est une mesure qui a été fréquemment utilisée pour étudier les effets de conditions environnementales ou les effets de pollutions sur les conditions physiologiques des organismes mais aussi comme indicateur de la croissance et de la reproduction (Baillieul *et al.*, 2005 ; Calow et Sibly, 1990 ; Smolders *et al.*, 2002).

Généralement l'assimilation par individu et la consommation d'oxygène liée au métabolisme de base par individu changent en fonction de la taille des organismes (Kooijman, 2001). En accord avec l'hypothèse du coût métabolique, la croissance est affectée par un stress environnemental. Les animaux stressés sont donc généralement plus petits. L'AEER chez des organismes peut se retrouver réduite par rapport à celle mesurée chez des témoins lorsque les organismes sont exposés à un stress, mais aussi lorsque leur taille est réduite. Il est donc difficile de distinguer l'effet direct du stress et de l'effet dû uniquement à la taille. Une AEER masse spécifique est particulièrement intéressante car elle permet de s'affranchir de l'effet lié à la taille des organismes (Baillieul *et al.*, 2005).

La revue bibliographique réalisée sur les différents critères d'effets mettant en évidence la toxicité de substances sur la daphnie *D.magna*, a permis de définir les critères retenus dans le cadre de la présente étude.

Les deux tests les plus couramment utilisés pour étudier les effets de substances seules chez les daphnies, sont les tests aigus ainsi que le test de reproduction 21 jours.

Pour étudier les effets des mélanges, le test aigu semble particulièrement adapté car il permet de tester un grand nombre de conditions dans un temps relativement court compatible avec un grand nombre de conditions à tester et un nombre de réplicats important.

Le test de reproduction 21 jours classique semble quant à lui très laborieux à utiliser dans le cadre d'expérimentations visant à identifier les interactions entre les différents composants d'un mélange. Il existe deux alternatives au test reproduction 21 jours : le test reproduction raccourci à 7 jours et le test « œufs ». Ils permettent sur un temps plus court de tester un plus grand nombre de conditions qu'avec le test classique 21 jours tout en évaluant tout de même les effets sublétaux pertinents d'un point de vue écologique. Le test raccourci à 7 jours permet comme le test 21 jours d'étudier les effets grâce à différents paramètres comme la fécondité, la croissance, la respiration ou l'ingestion et est donc particulièrement intéressant. Grâce à ces différentes mesures il est possible de calculer des bilans d'énergie simples. Parmi les paramètres énergétiques permettant de faire des bilans d'énergie simplifiés, on peut citer les mesures d'allocation énergétique cellulaire (AEC) et les mesures d'allocation à la croissance et à la reproduction (AEER). Ces deux mesures pourront être appliquées pour évaluer les effets

de diverses substances chez la daphnie. La mesure d'AEC nécessite plusieurs dizaines de daphnies pour chaque replicat (De Coen *et al.*, 1995) alors que la mesure d'AECR peut se faire sur une seule daphnie grâce à des méthodes de mesure non destructives comme proposé par Alonzo *et al.* 2006. Ce test à 7 jours permettrait donc grâce à la mesure de l'AECR d'évaluer l'état de santé des organismes. Ce test raccourci semble donc très intéressant à développer et à mettre en œuvre dans le cadre de l'étude des effets des mélanges simples.

1.3. Contaminants étudiés : l'uranium et le sélénium seuls et en mélange

1.3.1. Uranium

1.3.1.1. Sources et concentrations en U dans l'environnement

L'uranium est un élément ubiquiste dans les eaux naturelles à l'état de trace, avec des niveaux de concentration allant de $0,02\mu\text{g.L}^{-1}$ à $6\mu\text{g.L}^{-1}$. De façon naturelle, des concentrations élevées d'uranium peuvent atteindre localement 2 mg.L^{-1} , reflétant principalement la composition des roches sous-jacentes (Bonin et Blanc, 2001; WHO, 2001). Les concentrations d'uranium peuvent aussi être accrues dans certains écosystèmes à cause des activités anthropogéniques comme les processus d'extraction et d'exploitation de l'uranium. Dans ces zones d'exploitation de l'uranium, des teneurs en uranium pouvant atteindre 10, voire 20 mg/L ont été mesurées dans l'eau (Ragnarsdottir et Charlet, 2000).

1.3.1.2. Formes chimiques et propriétés nucléaires

1) Propriétés chimiques

L'uranium (symbole U, numéro atomique 92) appartient au groupe des actinides et est l'élément naturel le plus lourd. Les deux états d'oxydation majeurs de l'U sont (+VI) et (+IV) parmi les 4 états d'oxydation que possède l'U (allant de (+III) à (+VI)). En milieu aqueux, à l'état d'équilibre, l'état d'oxydation de l'uranium dépend des conditions oxydo-réductrices du milieu et du pH (Figure 20).

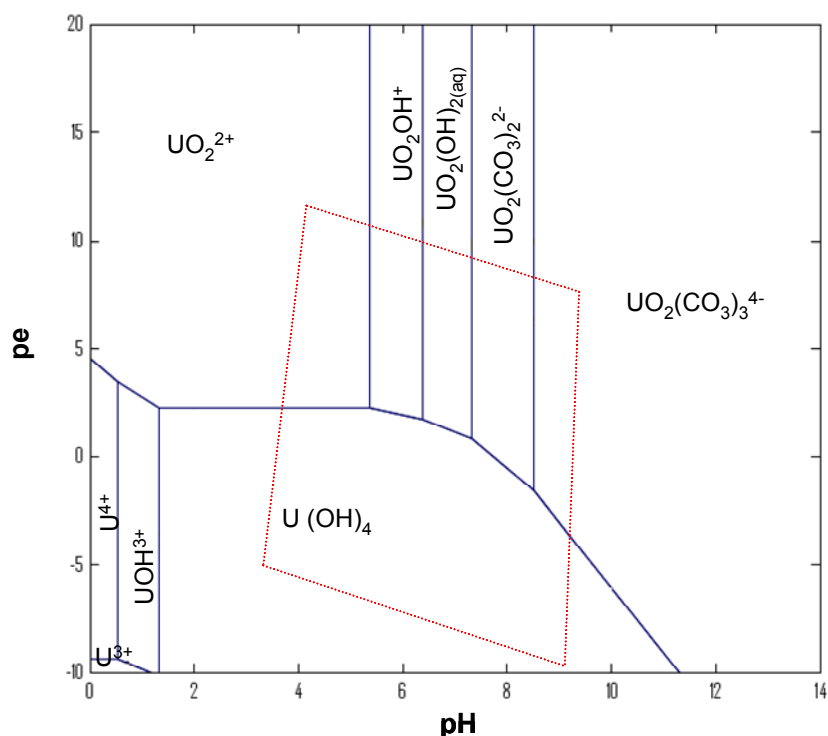


Figure 20 : Diagramme pe-pH de l'uranium obtenu avec le logiciel J-Chess, la base de données thermodynamique décrite dans le chapitre 3 et avec $[U] = 300 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans le milieu M4. La zone en rouge représente la zone de pH et de potentiel d'oxydo-réduction susceptible d'être rencontrée dans l'environnement.

Dans des milieux oxydants, l'ion uranyle (+VI), UO_2^{2+} est l'espèce la plus stable et c'est aussi la forme prédominante dans l'environnement (Sheppard, 2005). L'ion uranyle se complexifie facilement avec les carbonates, les phosphates et les ions sulfates. La spéciation d'un élément dans un milieu, et en particulier celle des métaux, dépend des paramètres physico-chimiques du milieu comme la dureté, l'alcalinité, le pH ou la présence de ligands (organiques ou inorganiques). La répartition de l'uranium en fonction des différentes espèces formées dépend du pH de la solution, de la concentration en ligand et de la concentration en uranium total.

L'uranium, dans des conditions oxydantes, peut aussi facilement former des complexes organiques avec des ligands organiques et des substances humiques ou fulviques de faible poids moléculaire. (Sheppard, 2005).

Dans des conditions réductrices, comme celles trouvées dans les eaux anoxiques et dans les sédiments, l'U est sous la forme tétravalente U (+IV) qui a tendance à se lier avec les matériaux organiques, à précipiter et, de ce fait, a tendance à être immobile (Gascoyne, 1992).

2) Propriétés radiologiques

L'uranium est un radioélément qui possède dix-sept isotopes, dont trois seulement sont présents à l'état naturel : ^{234}U , ^{235}U et ^{238}U (WHO, 2001). Leur abondance naturelle est résumée dans le tableau 3 :

Tableau 3: Propriétés nucléaires des 3 isotopes constitutifs de l'uranium naturel, (d'après Colle *et al.*, 2001)

Isotope	Abondance naturelle en %	Période radioactive en années	Activité spécifique en $\text{Bq}\cdot\text{g}^{-1}$	Energie des principaux rayonnements émis en KeV (% d'émission)
^{234}U	0,006	$2,45\cdot 10^5$	$2,30\cdot 10^8$	α 4777 (72%) ; 4723 (23%)
^{235}U	0,719	$7,13\cdot 10^8$	$8,00\cdot 10^4$	α 4397 (57%) ; 4367 (18%) γ 186
^{238}U	99,275	$4,47\cdot 10^9$	$1,24\cdot 10^4$	α 4196 (77%) ; 4149 (23%)

1.3.1.3. Effets sur les organismes

1) Bioaccumulation

La bioaccumulation des éléments traces comme l'uranium peut avoir lieu selon deux voies différentes : la voie de contamination directe et la voie trophique.

- Voie de contamination directe

Pour la voie directe, différentes études ont montré que la toxicité d'un métal n'était pas corrélée à sa concentration totale dans un milieu mais à sa fraction biodisponible pour les organismes. Deux modèles sont couramment utilisés pour évaluer la toxicité chimique de métaux : le modèle de l'ion libre (FIAM, Free-Ion Activity Model) ainsi que le modèle BLM (Biotic Ligand Model). Ces deux modèles, assez proches, proposent d'attribuer la toxicité d'un métal à sa concentration sous forme d'ion libre plutôt qu'à sa concentration totale.

Dans le modèle de l'ion libre (FIAM), formulé par Morel (1983), la toxicité ou la biodisponibilité d'un métal (l'entrée d'un métal dans un organisme) varie en fonction de la concentration de l'ion métallique libre en solution. Le modèle du BLM, quant à lui, intègre la spéciation de l'élément en solution, la formation du complexe métal/ligand biotique et la réponse toxique induite par le complexe (Denison, 2004 ; De Schamphelaere et Janssen, 2002; Paquin, 2002).

De précédentes études sur la toxicité de l'uranium indiquent que la bioaccumulation (Fortin *et al.*, 2004) ainsi que la toxicité de l'uranium (Markich, 1996) sont proportionnelles à la concentration en métal sous forme ion libre (UO_2^{2+}). Cependant, des études plus récentes ont rapporté un certain nombre d'exceptions quand le pH varie (Fournier *et al.*, 2004 ; Fortin *et al.*, 2007 ; Markich *et al.*, 2000).

Lorsque le pH augmente, d'une part la complexation de l'ion uranyle par les hydroxydes et les carbonates est plus importante et réduit ainsi la toxicité de l'uranium mais d'autre part, la compétition de l'ion libre (UO_2^{2+}) avec les protons diminue et peut ainsi augmenter la biodisponibilité de l'uranium (Fortin *et al.*, 2004).

Cependant, Fortin *et al.* (2007) ont montré qu'une simple compétition proton – métal ne permet pas d'expliquer les interactions uranium-algue lorsque le pH varie et suggèrent un effet physiologique qui entraînerait une augmentation du taux d'internalisation ou une augmentation du nombre de transporteurs spécifiques avec une augmentation du pH.

Markich *et al.* (2000) , quant à eux, concluent qu'à la fois l'ion libre UO_2^{2+} mais aussi la forme hydroxylée UO_2OH^+ seraient toxiques, ce qui pourrait expliquer l'effet pH observé.

Ces différentes études suggèrent que le lien entre la spéciation et la biodisponibilité de l'uranium pourrait être plus complexe que celui attendu par les modèles du FIAM et BLM.

- Voie trophique

Peu d'études ont été réalisées sur la bioaccumulation de l'uranium chez les consommateurs primaires par des transferts via la chaîne trophique. Sur d'autres métaux comme le cadmium, quelques études ont été réalisées comme celle Barata *et al.* (2002) et celle de Taylor *et al.* (1997). Dans l'étude réalisée par Barata *et al.* (2002), il a pu être mis en évidence que l'assimilation de cadmium était plus efficace par la voie trophique (13% contre 0,3% par le milieu), bien que les concentrations dans le milieu soient plus importantes que celles dans la nourriture. Taylor *et al.* (1997) ont montré que la contamination indirecte par l'ingestion était significative. La fraction du métal (cadmium) adsorbée à la surface de l'algue pourrait être suffisante pour contaminer des daphnies et augmenter les effets sublétaux comme l'inhibition du taux d'ingestion. Une étude réalisée par S. Bourrachot (2005) portant sur les effets de l'uranium sur la daphnie par voie trophique a montré une diminution de l'ingestion sans mettre en évidence d'effet sur la reproduction ni sur la mortalité.

2) *Données de toxicité aigüe*

La plupart des données d'écotoxicité de l'uranium sur différents organismes d'eau douce concernent les effets aigus. Ces données montrent une très forte variabilité en fonction des caractéristiques physico-chimiques et des paramètres étudiés.

En effet, Sheppard *et al.* ont montré dans leur synthèse bibliographique de 2005, que la sensibilité des organismes à l'uranium était dépendante de plusieurs paramètres environnementaux comme l'alcalinité, due à la complexation de l'ion uranyle UO_2^{2+} avec les carbonates, et la dureté, due à la complexation avec le calcium et le magnésium. Ils ont aussi pu mettre en évidence, à partir des données de la littérature sur la toxicité de l'uranium chez les poissons, une relation significative entre la mortalité des poissons et la dureté du milieu :

$$\text{CL}_{10} = -0,52 + 0,96 \log_{10}(\text{dureté du milieu})$$

avec la CL_{10} , la concentration entraînant 10% de létalité.

A partir des données de la littérature concernant le crustacé cladocère *Daphnia magna* (Poston *et al.*, 1984 ; Barata *et al.*, 1998), une même influence de la dureté du milieu sur la toxicité de l'uranium semble exister. En effet, Poston *et al.* (1984) décrivent une toxicité aigüe de l'U (48h CL_{50}) allant de 5,3 à 74,3 mg.L^{-1} U dépendante de la composition du milieu des tests. Barata *et al.* (1998) rapportent une valeur de CL_{50} 48h similaire à celle de Poston *et al.* allant de 5,87 à 25,4 mg.L^{-1} U, dépendante du clone de daphnie étudié mais aussi de la composition chimique du milieu.

Les données disponibles sur la toxicité aigüe de l'uranium sur les invertébrés d'eau douce montrent aussi des valeurs de toxicité assez variables en fonction des espèces et des paramètres étudiés. Les données de toxicité aigüe rapportées pour divers invertébrés sont comprises entre 0,16 et 70 mg.L^{-1} , (Barata *et al.*, 1998; Bywater *et al.*, 1991; Kuhne *et al.*, 2002; Poston *et al.*, 1984; Semaan *et al.*, 2001) et sont présentées en annexe 3.

3) Données de toxicité chronique

Les données de toxicité chronique de l'uranium sur les invertébrés d'eau douce sont, quant à elles, très limitées. Une LOEC reproduction 5 jours chez *Moinodaphnia macleayi* a été observée à 20-49 mg.L⁻¹ U (Semaan *et al.*, 2001) alors que chez *Ceriodaphnia dubia* elle était de 3,91 mg.L⁻¹ U (Kuhne *et al.*, 2002). D'autres résultats suggèrent une plus grande sensibilité de *Ceriodaphnia dubia* avec une EC₂₅ sur la reproduction à 7 jours de 3 µg.L⁻¹ U (Pickett *et al.*, 1993). Chez *Daphnia magna* une seule étude s'est intéressée aux effets chroniques (Poston *et al.*, 1984). Dans leur étude, ils ont pu montrer une inhibition de la reproduction lors d'un test de reproduction 21 jours à des concentrations allant de 0,5 à 3,5mg.L⁻¹ U (Poston *et al.*, 1984).

1.3.1.4. Mécanismes de toxicité

L'évaluation de l'impact des radionucléides est généralement basée sur la dose radiologique totale délivrée à l'organisme concerné. Cependant, la toxicité des radionucléides peut être attribuée d'une part aux propriétés chimiques de l'élément et d'autre part aux rayonnements, en particulier pour les radionucléides à faible activité spécifique comme les isotopes de l'uranium (Figure 21).

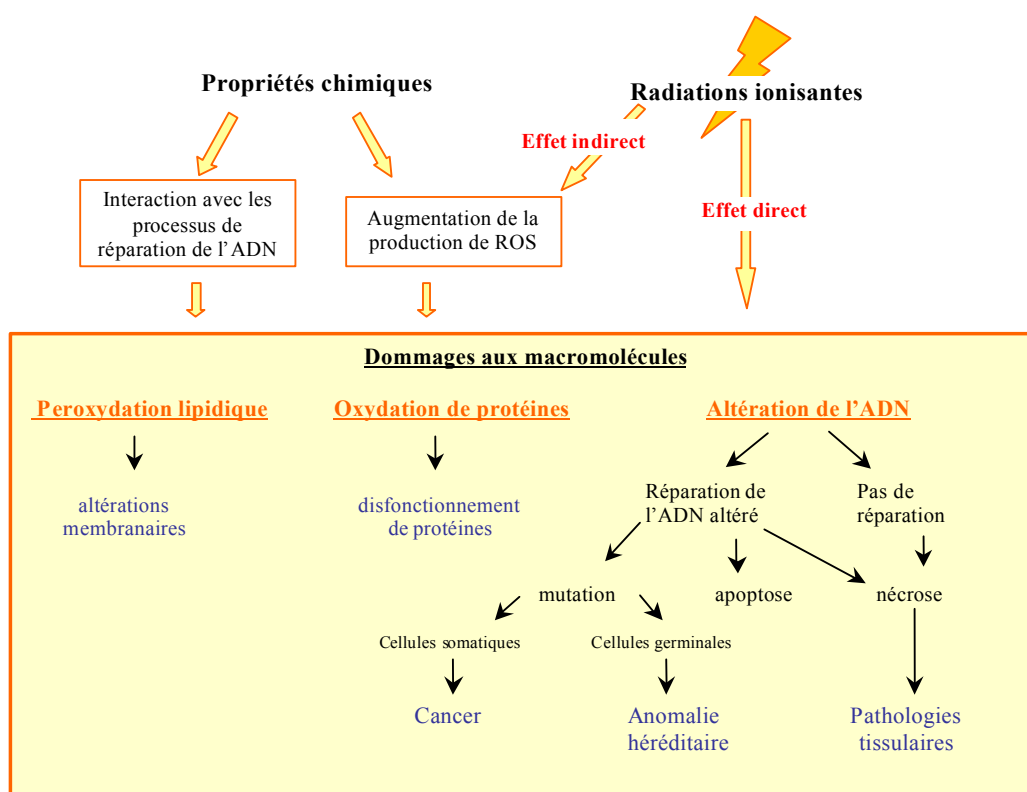


Figure 21: Les effets biologiques induits par une exposition à un radionucléide (d'après Ercal *et al.*, 2001).

1) Toxicité chimique

La toxicité chimique de l'uranium a fait l'objet de plusieurs études *in vitro*. Ces études ont montré que l'uranium augmentait la production de ROS (Reactive Oxygen Species) et aussi suggéré qu'il pouvait réagir directement avec l'ADN (Miller *et al.*, 2002). Des études réalisées par la méthode de piégeage de spin par spectrométrie par RPE (Résonance Paramagnétique Electronique) ont montré que l'uranium peut réagir avec H₂O₂ pour donner des radicaux hydroxyles (Miller *et al.*, 2002). L'uranium serait en effet capable d'interagir avec les ROS de façon similaire au nickel. De plus, comme la chimie de l'uranium est proche de celle des métaux de transition comme le fer, Miller *et al.* (2002) suggèrent que l'uranium se comporterait comme le fer dans la réaction de Fenton et génère ainsi des ROS.

Outre le stress oxydant et les effets génotoxiques induits par l'uranium au sein des organismes, des perturbations au niveau des cellules du système nerveux ont été observées. En effet, la toxicité chimique de l'uranium peut être rapprochée de celle des métaux lourds. Diverses études sur les effets de l'uranium ont pu montrer que l'uranium est susceptible de s'accumuler principalement à la surface des os ainsi qu'au niveau des tissus rénaux (Cooley et Klaverkamp, 2000). Outre ces principaux sites d'accumulation, l'uranium peut s'accumuler aussi dans les intestins, le foie ainsi que dans les gonades (Labrot *et al.*, 1996; Ribera *et al.*, 1996).

2) Toxicité radiologique de l'uranium

Les propriétés radiologiques de l'uranium peuvent aussi augmenter la production de radicaux libres par radiolyse de l'eau, ce qui peut conduire à l'altération des macromolécules biologiques. Des études *in vitro* ont montré que les particules α émises par l'uranium peuvent causer directement des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides (Miller *et al.*, 2002) (Figure 21).

L'étude bibliographique concernant les effets de l'uranium sur les invertébrés aquatiques a mis en évidence des valeurs de toxicité variables. Pour expliquer ces différences, certains auteurs s'appuient sur la théorie de l'ion libre et ses dérivés (Morel, 1983; Campbell, 1995) qui considère que les effets biologiques de métaux traces sont gouvernés non pas par la concentration totale du métal, mais par l'activité de l'ion libre métallique en solution. La concentration de l'ion uranyle étant influencée par sa complexation avec des ligands organiques et inorganiques (Denison, 2004 ; Madic et Genet, 2001), le choix des caractéristiques du milieu expérimental (dureté, pH, alcalinité) est donc important pour contrôler la biodisponibilité. Une comparaison des données de toxicité aiguë de la littérature en fonction de la spéciation de l'uranium pourrait permettre d'expliquer les différences observées.

Les données de la littérature sur les effets chroniques de l'uranium sur les daphnies sont assez restreintes. En effet, seule une étude réalisée par Poston *et al.* (1984) porte sur les effets sur la fécondité de la daphnie. Etudier l'effet chronique de l'uranium sur la reproduction mais aussi sur des paramètres tels que la croissance, l'ingestion ou d'allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction, permettrait d'approfondir les données d'effet existantes.

D'autres études se sont intéressées aux modes d'action toxique de l'uranium et ont révélé qu'en raison de ses propriétés radiologiques et chimiques, l'uranium pouvait engendrer des effets délétères sur les macromolécules. Comparer les effets de l'uranium à ceux connus lors d'expositions à des substances radioactives et à des métaux traces stable permettrait d'évaluer l'importance relative de la chimiotoxicité et de la radiotoxicité de l'uranium.

1.3.2. Sélénium

1.3.2.1. Sources et concentrations de Se dans l'environnement

Le sélénium est naturellement présent dans l'écorce terrestre à une concentration d'environ $0.05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Coughtrey *et al.*, 1983). Les concentrations en Se dans les eaux de surface, marines et continentales, sont rarement supérieures au $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en milieu non contaminé (allant du $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ au $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Cependant son utilisation par l'homme peut induire une augmentation de ces niveaux, jusqu'à des concentrations pouvant atteindre plusieurs centaines de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Le sélénium est en effet largement utilisé à des fins industrielles et médicales. Dans le domaine médical, le sélénium est utilisé comme complément alimentaire, mais aussi dans différents traitements de la peau (George, 2003). D'autres activités anthropiques peuvent conduire à des rejets de Se dans l'environnement, allant jusqu'au $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, issus de déchets venant de la production et la combustion du charbon, de l'exploitation de différentes mines (Cu, Zn, Ni, Ag et U), des décharges municipales, des eaux usées, de la production de fertilisants à des fins agricoles, de divers processus industriels (Lemly, 2004).

1.3.2.2. Formes chimiques

Le sélénium (symbole Se, numéro atomique 34) est un métalloïde qui appartient au groupe VI (oxygène, soufre, polonium, tellurium) du tableau périodique. Ses propriétés chimiques sont comparables à celles du soufre (S) au niveau de la taille atomique, des énergies de liaison, des potentiels d'ionisation et des principaux degrés d'oxydation (Tinggi, 2003; Johansson *et al.*, 2005).

Il existe différentes formes organiques et inorganiques du sélénium (Tableau 4). Dans les écosystèmes aquatiques, le sélénium existe sous quatre états de valence : séléniate (+VI) ; sélénite (+IV) ; sélénium élémentaire (0) et séléniure (-II).

Dans les écosystèmes aquatiques, le séléniate (+VI) et le sélénite (+IV) sont les formes les plus communes des eaux de surface, en conditions oxydantes à modérément oxydantes (Coughtrey *et al.*, 1983).

Tableau 4 : Principales formes chimiques des composés naturels séléniés.

Formes	Nom	Etat de valence	Formes chimiques
Inorganiques	séléniate	Se(+VI)	H_2SeO_4 ; $HSeO_4^-$; SeO_4^{2-}
	sélénite	Se(+IV)	H_2SeO_3 ; $HSeO_3^-$; SeO_3^{2-}
	sélénium élémentaire	Se(+0)	
	séléniure	Se(-II)	H_2Se ; HSe^- ; Se^{2-}
Organiques	sélélocystéine		Se- CH_2CHNH_2COOH
	sélénométhionine		$CH_3Se(CH_2)_2CHNH_2COOH$
	diméthylséléniure		$(CH_3)_2Se$
	diméthylséléniate	Se(-II)	$(CH_3)_2Se_2$
	diméthylsélénone		$(CH_3)_2SeO_2$
	Se-méthylsélénocystéine		$CH_3SeCH_2CHNH_2COOH$
	Se-méthylsélénométhionine		$(CH_3)_2Se(CH_2)_2CHNH_2COOH$

En milieu aqueux, à l'équilibre, l'état d'oxydation du sélénium inorganique dépend des conditions oxydo-réductrices et du pH (Figure 22).

On s'attend à ce que le séléniate soit la forme prédominante dans les environnements neutres ou alcalins, ou fortement oxydés, tandis que le sélénite est prédominant dans les environnements plutôt acides, ou réduits. Cependant, le domaine d'oxydo-réduction des eaux douces correspond à la zone de transition entre les deux formes ; la transformation d'un état à l'autre est lente, et donc l'équilibre thermodynamique n'est pas forcément atteint dans l'environnement. En particulier, l'oxydation du sélénite en séléniate est un processus lent, ce qui permet au sélénite thermodynamiquement instable de persister, même dans des eaux bien oxygénées. Finalement, dans l'environnement, on trouve aussi bien des systèmes dominés par le sélénite que des systèmes dominés par le séléniate (Conde et Sanz Alaejos, 1997).

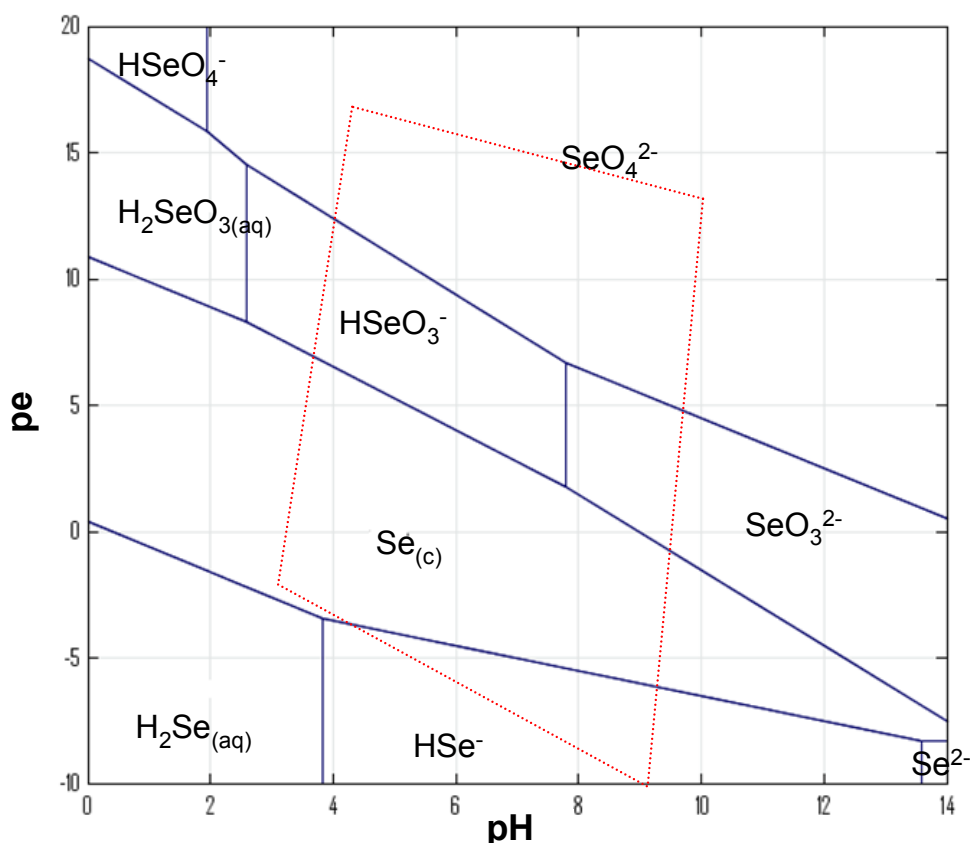


Figure 22 : Diagramme pe-pH du sélénium obtenu avec le logiciel J-Chess et la base de données thermodynamique décrite dans le chapitre 3. $[\text{Se}] = 2200 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans du milieu M4-pH7. La zone en rouge représente de pH et de potentiel d'oxydo-réduction susceptible d'être rencontrée dans l'environnement.

1.3.2.3. Rôles physiologiques

Le sélénium est un élément essentiel pour la majorité des organismes vivants. A faible concentration, il permet de lutter contre les dommages engendrés par le stress oxydant en entrant dans la composition de sélénoprotéines telles que la glutathion peroxydase (GPx) (Ducros et Favier, 2004; Tapiero *et al.*, 2003; Tinggi, 2003). Les GPx sont des enzymes antioxydantes qui constituent une des principales lignes de défense contre les agressions produites par les radicaux libres de l'oxygène.

D'autres sélénoprotéines, comme la thiorédoxine réductase impliquée dans des mécanismes importants de régulation de la croissance cellulaire normale ou tumorale, ont aussi un rôle protecteur (Ducros et Favier, 2004) ou la sélénoprotéine P ayant un rôle antioxydant extracellulaire et une activité peroxydase spécifique des phospholipides. Un effet anti cancer est aussi attribué à certains métabolites du sélénium (Tapiero *et al.*, 2003).

Keating et Dagbusan (1984) ont montré notamment qu'une population de daphnies (*Daphnia magna*) ne pouvait être maintenue indéfiniment dans un milieu contenant moins de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de sélénium mais qu'une concentration de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ est suffisante pour satisfaire ses besoins en sélénium.

1.3.2.4. Mécanismes de toxicité

Le sélénium est non seulement un élément essentiel mais aussi toxique. En effet, à forte concentration, le sélénium peut devenir un pro-oxydant. Le caractère pro-oxydant du sélénium provient de la génération d'anions superoxydes due à l'interaction du sélénium avec des groupements thiols. Un mécanisme important met en cause la formation de méthyl sélénium CH_3Se^- qui entre dans le cycle redox et génère des anions superoxydes ou forme des radicaux libres qui inhibent d'importantes enzymes ou protéines en se liant à elles (Fournier, 2005).

La toxicité du sélénium peut aussi être due au remplacement du soufre par le sélénium lors de la synthèse de protéines (Lemly, 2002). En effet, le soufre est un constituant clé des protéines qui forme des ponts disulfures entre les différents acides aminés. Ces ponts confèrent à la protéine sa structure tertiaire. Cette structure est nécessaire pour le bon fonctionnement des protéines en tant que composant cellulaire ou comme enzyme. Lorsque le sélénium est présent en trop grande quantité, il se substitue au soufre et forme des ponts triséleriures (Se-Se-Se) ou sélénotrisulfures (S-Se-S) qui empêchent la formation des ponts disulfures nécessaires à la bonne conformation des protéines. Les protéines ne sont alors plus fonctionnelles et ne peuvent plus jouer leur rôle.

Dans le cas où le sélénium est incorporé à la place du soufre dans la méthionine, on parle alors de sélénométhionine. La sélénométhionine n'altère pas la structure des protéines mais peut influencer l'activité des enzymes, en particulier si la sélénométhionine remplace la méthionine à proximité du site actif de la protéine (Schrauzer, 2000).

1.3.2.5. Effets sur les organismes

La gamme de concentrations où le sélénium passe d'élément essentiel à élément toxique est très étroite (Hodson et Hilton, 1983; USEPA, 2004) comme illustré dans la figure 23.

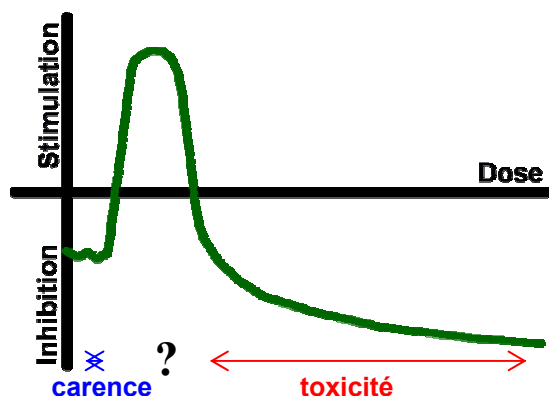


Figure 23 : Profil dose-réponse caractéristique d'un élément essentiel

De nombreuses études se sont intéressées aux effets toxiques du sélénium (sélénite et séléniate) dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Elles ont montré que les invertébrés sont à la fois les espèces les plus sensibles et les plus tolérantes au sélénite et au séléniate avec des valeurs de toxicité aiguë (valeurs moyennes par espèce) pour le sélénite allant de $440 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se pour le crustacé, *Ceriodaphnia dubia*, à $203\,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se pour la sangsue, *Nephelopsis obscura*, et pour le séléniate allant de $593 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se pour le crustacé, *Daphnia pulex*, à $1\,515\,616 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se pour la sangsue, *Nephelopsis obscura* (USEPA, 2004). Chez les poissons, la toxicité du sélénite s'échelonne entre $1\,783 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour le bar américain, *Morone saxatilis*, et $35\,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se pour la carpe commune *Cyprinus carpio*. La toxicité du séléniate chez les poissons est comprise entre $10\,305 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se pour le catostome *Xyrauchen texanus*, et $226\,320 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se pour le barbeau de rivière, *Ictalurus punctatus* (USEPA, 2004).

Plus particulièrement, certaines études se sont intéressées à la toxicité aiguë du sélénium chez les daphnies (*Daphnia magna* et *Daphnia pulex*). Les résultats obtenus sont assez proches pour les deux espèces (annexe 4). Les études de toxicité aiguë du sélénite présentent une CL_{50} 48h variant de $0,685 \text{ mg.L}^{-1}$ Se (Adams et Heildolph, 1984) à $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ Se (Bringmann et Kuhn, 1959). Celles visant à étudier la toxicité aiguë du séléniate donnent des valeurs de CL_{50} qui varient de $0,55$ (Johnston, 1987) à $5,3 \text{ mg.L}^{-1}$ Se (Dunbar *et al.*, 1983). Les différences entre les tests s'expliquent en partie par les compositions différentes dans les milieux de culture des daphnies ainsi que par les conditions différentes d'élevage, comme la température. En effet, différents paramètres environnementaux sont connus pour influencer la toxicité du sélénium comme, la présence de sulfates (Maier *et al.*, 1993; Ogle et Knight, 1996),

la dureté du milieu (Ingersoll *et al.*, 1990) ainsi que la présence de métaux lourds, la température ou la longueur du jour (USEPA, 2004).

Seules deux études (Halter *et al.*, 1980 ; Adams et Heildolph, 1985 ; Johnston, 1987) se sont intéressées à l'effet du chronique du sélénium sur *Daphnia magna* et se sont focalisées uniquement sur les effets sur la reproduction et la croissance. Ces études donnent des valeurs de CE_{50} fécondité 14 jours allant de 430 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se à 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se. Adams et Heildolph, (1985) donnent aussi une valeur de CE_{50} fécondité à 21 jours de 350 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se. Johnston (1987) a montré un retard de maturation à partir de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se avec une proportion de daphnies devenant matures au 6^{ème} stade de mue, alors que pour les témoins et pour une concentration d'exposition de 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se, toutes les daphnies sont matures au 5^{ème} stade de mue. Les données d'effets du sélénium sur la croissance sont encore plus limitées. Johnston (1987) a montré une réduction de la croissance des daphnies pour des concentrations en sélénium de 200 et 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se.

De nombreuses études se sont intéressées aux effets du sélénium sur la daphnie. Il ressort de ces études que les valeurs de toxicité aiguë pour chacune des formes de sélénium sont relativement proches entre elles.

Les études sur les effets chroniques du sélénium sont moins nombreuses que celles sur les effets aigus et sont basées pour la plupart sur des effets sur la reproduction avec des données de CE_{50} reproduction (14 ou 21 jours). Des études portant sur d'autres paramètres comme la croissance ou la respiration permettraient de compléter les données de la littérature, et aussi de déterminer à partir de quelle concentration le sélénium peut être considéré comme toxique pour la daphnie.

1.3.3. Uranium et Sélénium en mélange

1.3.3.1. Formes chimiques

1) Formes aqueuses et précipitées

Le sélénium et l'uranium peuvent former dans l'eau des complexes comme $\text{UO}_2(\text{SeO}_4)_2^{2-}$, $\text{UO}_2 \text{SeO}_{4(\text{aq})}$ ou $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2\text{SeO}_{3(\text{aq})}$ et des précipités comme USe , USe_2 , U_2Se , U_2Se_3 , UO_2SeO_3 , dont les constantes thermodynamiques sont plus ou moins bien connues selon les différentes formes (OCDE-NEA, 1996 ; Séby *et al.*, 2001).

2) Minéraux de sélénite d'uranyle

Les minéraux de sélénite d'uranyle ont été découverts dans différentes mines d'uranium du Zaïre (mines de Shinkolobwe et de Musonoi) et des Etats-Unis (mine de Repete, dans l'Utah) (Smith, 1984 ; Gaines, 1997 ; Cejka, 1996). Le sélénium présent dans tous les minéraux d'uranium connus est sous forme d'ion sélénite (Se (IV)). Aucune donnée n'est disponible sur la solubilité de ses minéraux. Seulement sept sont connus actuellement et sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5: Sélénite d'uranyle (d'après Finch et Murakami, 1999)

Nom	Formes chimiques
Demesmaekerite	$\text{Pb}_2\text{Cu}_5(\text{UO}_2)_2(\text{SeO}_3)_6(\text{OH})_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Derriksite	$\text{Cu}_4\text{UO}_2(\text{SeO}_3)_2(\text{OH})_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Guilleminite	$\text{Ba}(\text{UO}_2)_3(\text{SeO}_3)_2(\text{OH})_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
Haynesite	$(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_2(\text{SeO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Larisaite	$\text{Na}(\text{H}_3\text{O})(\text{UO}_2)_3(\text{SeO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Marthozite	$\text{Cu}(\text{UO}_2)_3(\text{SeO}_3)_3(\text{OH})_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Piretite	$\text{Ca}(\text{UO}_2)_3(\text{SeO}_3)_2(\text{OH})_4 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$

1.3.3.2. Uranium et sélénium dans l'environnement

Comme nous l'avons évoqué précédemment, lors d'opérations d'extraction et d'exploitation du minerai d'uranium, différentes études ont montré que des éléments traces comme l'U mais aussi Ni, As, Mo ou Se peuvent se retrouver dans les déchets des mines (Holm *et al.*, 2005; Noller, 1991 ; Supervising Scientist, 2007). Les deux éléments uranium et sélénium peuvent se retrouver alors en mélange dans les cours d'eau en aval des sites. Des concentrations élevées en Se ont été mesurées dans l'eau, les sédiments et dans les tissus de poissons (de Rosemond *et al.*, 2005 ; Klaverkamp *et al.*, 2002 ; Muscatello *et al.*, 2006 ; Muscatello *et al.*, 2008). Cependant, même si dans certaines études les concentrations mesurées en Se dans l'eau sont très faibles, inférieures au $\mu\text{g.L}^{-1}$, une forte accumulation du Se le long de la chaîne trophique, et en particulier chez les poissons, a été mise en évidence (Holm *et al.*, 2005 ; Pyle *et al.*, 2001). En effet, Holm *et al.* (2005) ont montré que, dans les écosystèmes aquatiques proches de mines d'uranium, que la concentration en Se de certains poissons excède le seuil toxique pour les poissons de $7,91\mu\text{g.g}^{-1}\text{Se}$ (poids sec) donné par l'USEPA (2004) pour une exposition à une concentration mesurée dans l'eau de $0,009\mu\text{g.L}^{-1}\text{Se}$. Pyle *et al.* (2001) ont montré des résultats similaires avec une accumulation de sélénium atteignant $10\mu\text{g.g}^{-1}$ dans le poisson *Pimephales promelas* alors que les concentrations mesurées dans l'eau étaient inférieures à $1\mu\text{g.L}^{-1}$. Muscatello *et al.* remarquent même, dans leur étude publiée en 2008 visant à étudier l'accumulation de sélénium dans le chaîne trophique des écosystèmes aquatiques, que la mesure de concentration en sélénium dans l'eau a un faible pouvoir de prédiction de la concentration dans les invertébrés et les poissons. Dans cette étude réalisée aux abords de mines du Saskatchewan au Canada, Muscatello *et al.* ont aussi pu montrer que les organismes contenaient de concentrations supérieures au seuil de toxicité du Se pour les poissons, suggérant que le sélénium relargué dans ces écosystèmes aquatiques peut se bioaccumuler et atteindre des concentrations pouvant affecter la reproduction des poissons.

Les données sur les concentrations en uranium sont beaucoup moins nombreuses ainsi que les données d'effets sur les écosystèmes environnant les mines.

Une étude récente réalisée par Antunes *et al.*, (2007) dans des étangs aux abords de mines d'uranium abandonnées au Portugal, rapporte des valeurs de concentrations en uranium de $1400\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec de poisson alors que les concentrations en sélénium mesurées dans l'eau étaient inférieures à $25\mu\text{g.L}^{-1}$.

Les données de la littérature concernant les écosystèmes aux abords de mines d'uranium soulignent l'intérêt d'étudier l'impact du mélange uranium-sélénium sur les organismes aquatiques. Des études dans des conditions contrôlées sur les effets du mélange binaire uranium-sélénium permettraient d'identifier une éventuelle interaction entre U et Se.

Des tests aigus en mélange permettraient de déterminer le type d'interaction. Des tests chroniques avec la mesure de différents paramètres à différents niveaux d'organisation permettraient d'appréhender les mécanismes mis en jeu.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1. Elevage de daphnie

2.1.1. Origine et conditions d'élevage

Dans l'élevage, les microcrustacés cladocères *Daphnia magna* Straus (clone A, INERIS, France) sont maintenus en phase de reproduction parthénogénétique conformément aux lignes directrices 211 de l'OCDE (1998). L'élevage de daphnies est maintenu dans deux eaux de composition différente : le milieu M4-pH8 (Elendt, 1990) et le milieu M4-pH7. La composition du milieu M4-pH8 est de: 2mM Ca; 0,5mM Mg; 0,87mM Na; 0,081mM K; 0,51mM SO₄; 3,2 M NO₃; 2,1 M PO₄; 4,9nM NH₄; 35 M SiO₃; 46 M B; 1,8 M Mn; 7,2 M Li; 0,59 M Rb; 0,57 M Sr; 0,16 M Br; 0,31 M Mo; 98nM Cu; 50nM Zn; 43nM Co; 19nM I; 11nM Se; 4,9nM V; 7,2 M Fe; 13,4 M EDTA and 4,1mM Cl. La composition du milieu M4-pH7 diffère seulement du M4-pH8 au niveau de la concentration de Cl qui est de 4,8 mM dans le M4-pH7.

Ces milieux ont été préparés à partir d'eau ultrapure (18MΩ.cm) et de différentes solutions mères dont la préparation est décrite en annexe 5.

L'élevage est réalisé dans des bouteilles de Pyrex® de 2 litres couvertes de leur bouchon mais non fermées (Figure 24). Les bouteilles sont maintenues dans une enceinte climatisée assurant des conditions stables et optimales (20 ± 1°C, éclairage de 300 lux, Photopériode 16 heures de lumière /8 heures d'obscurité). Chaque bouteille contient 40 individus.



Figure 24 : Photographie de l'élevage de daphnies

2.1.2. Entretien de l'élevage

L'élevage est nourri avec des algues fraîches cultivées au laboratoire, *Chlamydomonas reinhardtii*, (voir protocole en annexe 6). La ration quotidienne pour une daphnie est d'approximativement $4,5 \cdot 10^6$ cellules (soit $100 \mu\text{g C.daphnie}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$). Les daphnies sont nourries tous les matins excepté le samedi et le dimanche. Pour les nourrir, les algues sont centrifugées ($1000 \text{ g} / 15 \text{ min}$) avant d'être remises en suspension dans du milieu d'élevage.



Figure 25 : Photographie des cultures d'algues (© NOAK/Le Bar Floréal pour l'IRSN)

Pour les daphnies élevées dans le milieu M4-pH8, le milieu de chaque bouteille est renouvelé de moitié une fois par semaine. Pour celles élevées dans le milieu M4-pH7, le milieu est renouvelé en entier deux fois par semaine. Le milieu est préparé au moins 24h avant chaque changement de milieu et aéré par bullage pendant 24h (air filtré $<0,2 \mu\text{m}$).

Tous les 2 jours (sauf le week-end), chaque bouteille est triée grâce à 2 tamis superposés permettant de récupérer séparément les mères (tamis $1000 \mu\text{m}$) et les juvéniles (tamis $100 \mu\text{m}$). Les juvéniles ($<24\text{h}$) issus de la 3^e à la 5^e ponte des mères, servent selon les besoins, aux tests ou à la mise en place de nouvelles bouteilles d'élevage.

2.2. Les contaminants étudiés

2.2.1. Etude des effets du sélénium seul

2.2.1.1. Solutions stock de sélénite et de séléniate

Les solutions stock de sélénite et de séléniate) ont été préparées par dilution de sels de Na_2SeO_3 (Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)) et de Na_2SeO_4 (Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)) dans de l'eau ultra-pure (UHQ). Deux solutions mère ont été établies :

- solution mère de sélénite Na_2SeO_3 à 2 g.L^{-1} Se
- solution mère de séléniate Na_2SeO_4 à 1 g.L^{-1} Se

2.2.1.2. Concentrations étudiées

Pour les tests aigus visant à étudier les effets du sélénite et du séléniate, les concentrations en étudiées ont été de 0; 0,5; 1; 2 ; 4; 8; 16 mg.L^{-1} Se.

Lors du test chronique, les concentrations en sélénite étudiées ont été de: 0; 1; 22; 110; 220 et 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se.

2.2.2. Etude des effets de l'uranium seul

2.2.2.1. Solutions stock d'uranium

L'uranium a été obtenu par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) sous forme de nitrate d'uranyle hexahydrate qui a été mis en solution à 0.2% d'acide nitrique (1 g.L^{-1} U).

2.2.2.2. Concentrations étudiées

Pour les tests aigus visant à étudier les effets de l'uranium dans le milieu M4-pH7, les concentrations en étudiées ont été de 0; 0,3; 0,6 ; 0,8; 1,2; 1,4; 1,7 mg.L^{-1} U et dans le M4-pH8 de : 0; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 120 mg.L^{-1} U

Lors du test chronique dans du milieu M4-pH7, les concentrations en uranium étudiées ont été de: 0; 10; 25; 50; 75; 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U.

2.2.3. Etude des effets du mélange uranium-sélénium

2.2.3.1. Solutions stock d'uranium et de sélénium

Les mêmes solutions stock que pour les expérimentations sur les substances seules ont été utilisées.

2.2.3.2. Concentrations étudiées

Les effets aigus du mélange U-Se ont été étudiés à des concentrations pour le sélénium allant de 200 à 3000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se et pour l'uranium allant de 37,5 à 750 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U. Le détail des mélanges réalisés est présenté dans le chapitre 7.

Les effets chroniques du mélange U-Se aux concentrations suivantes : 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U - 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se; 75 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U - 375 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se ; 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U - 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se; 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U - 125 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se., 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U - 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se.

2.3. Mesures d'effet des contaminants

2.3.1. Effets sur le développement des œufs de daphnies

Lors de ce test, les daphnies adultes ont été suivies toutes les heures au moment de la première ponte pour déterminer l'heure de la libération des œufs dans la poche. Les œufs issus de la première ponte seront extraits par dissection 6 heures après la libération des œufs dans la poche. Les œufs disséqués sont ensuite délicatement disposés dans une microplaque en polycarbonate avec 1 œuf par puits dans 200 μL de milieu (comme dans les études réalisées précédemment par Kast-Hutcheson *et al.*, 2001 ; Ohta *et al.*, 1998). Leur développement a été suivi pendant 72h, toutes les heures pendant les 8 premières heures, puis toutes les 8 heures. Tout retard de développement ou tout développement anormal a été noté.

2.3.2. Tests aigus sur les daphnies juvéniles

La toxicité des substances sur les juvéniles a été évaluée en observant la survie après 24 et 48 h d'exposition et en appliquant la méthodologie de l'OCDE (OCDE, 1998) dans le milieu M4-pH7 et M4-pH8. Les tests ont été réalisés en utilisant des juvéniles âgés de moins de 24h. Pour chaque condition, 10 réplicats de 5 daphnies juvéniles âgées de moins de 24h ont été

exposées dans les tubes en polycarbonate de 15 mL contenant 10 mL de milieu non renouvelé au cours de l'expérience. Après 24 et 48 h d'exposition, le nombre de daphnies survivantes dans chaque tube a été observé. Les individus immobiles pendant plus de 10 secondes ont été considérés comme morts.

2.3.3. Tests chroniques sur les daphnies adultes

Des tests chroniques ont été réalisés pour évaluer les effets des substances étudiées sur les daphnies.

2.3.3.1. Conditions expérimentales

Lors des tests chroniques, les expositions ont été conduites en conditions semi-statiques sur des individus âgés de moins de 24h au début de l'expérience, pour une durée de 21 à 23 jours. Les flacons en polycarbonate contenaient 50 mL de milieu ainsi qu'une daphnie isolée.

Le milieu a été renouvelé quotidiennement pendant les 23 jours du test. Les daphnies ont été nourries tous les jours avec des algues fraîches (*Chlamydomonas reinhardtii*; $4,5 \cdot 10^6$ cellules.daphnie⁻¹.jour⁻¹). A chaque changement de milieu, les mues ainsi que les juvéniles ont été dénombrés et récoltés pour la mesure de biomasse.

Pour les études des effets du sélénium, les mesures de respiration, taille, biomasse et fécondité (nombre d'œufs présents) ont été réalisées sur 3 daphnies de chaque condition aux temps de prélèvement suivants : 1^{ère} (ponte 2), 3^{ème} (ponte 4) et 5^{ème} (ponte 6) libération de juvéniles.

Pour les études des effets de l'uranium et du mélange uranium-sélénium, les mêmes mesures ont été réalisées sur 10 daphnies sauf pour la respiration et l'ingestion avec 3 daphnies. Les temps de prélèvement étaient au moment de la 1^{ère}, 3^{ème} et 5^{ème} ponte.

2.3.3.2. Poids sec

Les biomasses sèches (séchage à l'étuve 24 h, 60 °C après rinçage à l'eau ultrapure – pesée avec une précision 0.1µg sur ultra-microbalance SE2, Sartorius, Goettingen, Allemagne) des individus, des mues, des juvéniles et des œufs ont été suivis au cours des expériences. Pour chaque unité expérimentale, une observation quotidienne permet d'enregistrer l'occurrence des mues, la déposition des œufs dans la poche et la libération des juvéniles.

2.3.3.3. Respiration

La respiration a été mesurée grâce à un système d'analyse de microrespiration (Unisense S/A, Denmark) sur les daphnies échantillonnées pour les analyses de poids sec. Les individus sont placés dans des chambres de respiration contenant 1 mL de milieu (Figure 26) thermostatées à 20 °C. Le suivi des concentrations en oxygène dissous dans les chambres est réalisé pendant 1 h (électrode à oxygène de type Clarke miniaturisée, connectée à un pico ampèremètre). Une calibration est effectuée avec un milieu saturé en oxygène dissous et une solution exempte d'oxygène (ascorbate de sodium 0,1M en milieu NaOH 0,1 M). Le pourcentage de saturation mesuré a été converti en concentration en utilisant la concentration d'oxygène dans l'eau (20 °C, 1 atm) à l'équilibre de 282,3 $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{L}^{-1}$.



Figure 26 : Photographie d'une chambre de respiration (© NOAK/Le Bar Floréal pour l'IRSN)

Le taux de consommation d'oxygène est calculé selon la formule :

$$m_{respi}(i) = \frac{[O_2]_0 \cdot (1 - e^{-k \cdot \Delta t}) \cdot V}{\Delta t}$$

où $[O_2]_0$ est la concentration en oxygène dissous ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) mesuré à $t = 0$, V le volume (mL) de milieu dans la chambre de respiration, k le coefficient de consommation (min^{-1}) et $t = 1$ min, obtenus en calant un modèle exponentiel aux données mesurées :

$$[O_2]_t = [O_2]_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

Les taux de respiration sont normalisés par le poids sec des daphnies ($\mu\text{mol O}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$) afin d'éliminer les différences individuelles de poids sec entre les conditions d'exposition.

2.3.3.4. Ingestion

L'activité de nutrition a été mesurée, sur la base des changements de densités algales dans le milieu au cours du temps (entre 0 et 6 h). Les densités algales sont mesurées par comptage au Coulter Z2 (dilution 1:10 avec de la solution isotonique ISOTON II , Beckman Coulter France SA, Villepinte, France). Deux modèles exponentiels sont utilisés pour calculer le taux d'ingestion (Frost, 1972).

$$\begin{cases} C_a(t) = C_0 \cdot e^{k \cdot t} \\ C_d(t) = C_0 \cdot e^{(k-f)t} \end{cases}$$

Avec pour les conditions sans daphnies $C_a(t)$ et pour celles avec les daphnies $C_d(t)$: la densité algale au temps t , C_0 la densité algale au temps 0, k la constante de croissance algale mesurée dans une unité expérimentale sans daphnie, f le coefficient de broutage de la daphnie.

La concentration algale moyenne C (cellule.mL⁻¹) et l'ingestion de la daphnie I (cellules.daphnie⁻¹.jour⁻¹) ont été calculées suivant les équations:

$$C = \frac{C_d(t) - C_0}{(k - f) \cdot t} \qquad I = V \cdot f \cdot C \cdot t$$

où V est le volume expérimental par individu (mL) et considérant un temps de broutage de $t = 10$ h par jour. Les valeurs sont converties en assimilation de carbone en considérant une valeur de 25 pg C.cellule⁻¹, (valeur mesurée par ailleurs sur un aliquote d'algues par un analyseur de carbone organique TOC-5000, Shimadzu Europe, Duisburg, Allemagne).

2.3.3.5. Calcul d'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (AECR)

L'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (AECR) a été calculée grâce à l'équation suivante : $AECR = E_A - E_R$, où E_A = représente l'énergie assimilée à partir de la nourriture, E_R = l'énergie métabolisée (respiration). L'énergie perdue par excrétion est souvent inférieure à 10% (Baillieul *et al.*, 1996; Smolders *et al.*, 2002) et a été négligée. La conversion entre l'ingestion et l'énergie assimilée a été calculée en supposant une efficacité d'assimilation de 80% (Mayzaud et Razouls, 2002) et un équivalent énergétique de 36.8 mJ par μg de C assimilé. La respiration a été convertie en consommation d'énergie en utilisant un équivalent oxyjoule de 21 $\text{kJ.L}^{-1} \text{O}_2$ (Elliot and Davison, 1975). L'AECR a été rapportée à la masse sèche somatique (=AECR masse spécifique, $\text{J.mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) pour prendre en compte les changements de masse (Baillieul *et al.*, 2005).

2.3.3.6. Mesures des réserves énergétiques : mesures des lipides

Les mesures de réserves énergétiques ont été réalisées sur des daphnies congelées dans de l'azote liquide (4 daphnies par échantillon). Les échantillons ont été broyés. L'extraction des lipides a ensuite été réalisée selon la méthode de Bligh et Dyer (1959). Une fois les lipides extraits, ils ont été récupérés et déposés dans des coupelles en aluminium et séchés pour ensuite être pesés avec la microbalance. Le protocole est présenté annexe 7.

2.3.3.7. Calcul du budget énergétique et d'allocation d'énergie

Le budget énergétique complet a été calculé selon la formule :

$$B = E_A - E_R - E_{\text{Rep}} - E_{\text{Crois}} - E_{\text{Res}} - E_{\text{Mue}}$$

Où les différentes variables représentent E_A = l'énergie assimilée à partir de la nourriture, E_R = l'énergie métabolisée ou nécessaire à la maintenance, E_{Rep} = l'énergie allouée à la reproduction, E_{Crois} = l'énergie allouée à la croissance, E_{Res} = l'énergie allouée aux réserves lipidiques, E_{Mue} = l'allocation à la formation de la carapace.

La conversion entre l'ingestion et l'énergie assimilée a été calculée de la même manière que pour l'AEER. Pour l'énergie nécessaire à la maintenance, la respiration a été convertie en consommation d'énergie également selon le calcul de l'AEER. L'énergie allouée à la reproduction a été estimée grâce aux mesures de poids sec de pontes. Pour convertir cette masse moyenne d'œufs produite par daphnie, nous avons considéré une composition de 50% de lipides et de 50% de glucides et protéines. Nous avons utilisé les coefficients de conversion de 39,5 J.mg⁻¹ pour les lipides et de 23,6 J.mg⁻¹ pour les glucides et protéines (Winberg, 1961).

L'énergie dédiée à la croissance a été convertie en énergie grâce aux mesures de poids sec et du coefficient de conversion de 22,15 J.mg⁻¹ de daphnie (Paloheimo *et al.*, 1982, d'après Richman, 1958 et Schindler, 1968).

L'énergie allouée aux réserves énergétiques a été calculée grâce au coefficient de conversion pour les lipides (Winberg, 1961). L'énergie nécessaire à la formation de la carapace a été estimée grâce aux mesures du poids sec des mues. Les mues ont été considérées comme étant composées à 100% de protéines et de sucres. Le coefficient de conversion de 23,6 J.mg⁻¹ pour les glucides et protéines a été utilisé (Winberg, 1961).

L'allocation d'énergie aux différents processus a été exprimée en pourcentage de l'énergie totale dépensée pour tous les processus ($E_R + E_{Rep} + E_{Crois} + E_{Res} + E_{Mue}$).

2.3.3.8. Matrices de Leslie

Les matrices de Leslie ont été construites à partir des données de deux tests chroniques 21 jours sur l'uranium et le sélénium ainsi qu'en fonction d'une expérience sur des daphnies témoin avec un suivi quotidien de la mortalité et de la fécondité jusqu'à leur mort (annexe 8). Dans les deux expériences sur 21 jours, la mortalité, la fécondité ainsi que les jours de ponte ont été suivis quotidiennement sur 5 pontes (21 jours). Nous avons réalisé à partir de ce suivi quotidien des matrices de Leslie avec un pas de temps de 1 jour pour pouvoir prendre en compte l'âge de la maturité ainsi que les retards de ponte.

Pour estimer la fécondité des daphnies après 21 jours, nous nous sommes basés sur les observations recueillies lors de l'expérience témoin. En effet, lors de cette expérience témoin nous avons pu observer que la fécondité augmentait au cours des premières pontes pour atteindre une fécondité maximale à la 5^{ème} ponte et ensuite décroître à partir de la 17^{ème} ponte.

Grâce à aux observations réalisées sur les daphnies témoins suivies pendant toute leur vie, nous avons pu exprimer la fécondité à partir de la 5^{ème} ponte en pourcentage de cette dernière. Ces pourcentages ont été appliqués par simple multiplication aux données recueillies durant les tests 21 jours avec une exposition à l'uranium et au sélénium, pour ainsi pouvoir estimer la fécondité des daphnies exposées à l'uranium et au sélénium pendant toute leur vie.

Pour estimer la mortalité des daphnies après 21 jours nous nous sommes basés, comme pour la fécondité, sur les observations de la survie recueillies lors de l'expérience témoin. Toujours comme pour la fécondité, nous avons pu établir un pourcentage de mortalité au cours du temps que nous avons utilisés pour estimer à partir des données obtenues avec les tests de 21 jours, la mortalité des daphnies exposées à l'uranium et au sélénium pendant toute leur vie.

Ces différentes hypothèses impliquent que les effets mis en avant dans l'étude de la dynamique de population ne prennent pas en compte des effets qui surviendraient après la 5^{ème} ponte comme une longévité réduite.

Toutes les données observées et estimées ont été intégrées dans des matrices de Leslie et ont permis de montrer l'évolution de l'effectif des populations de daphnies en fonction de leur exposition à l'uranium ou au sélénium.

2.3.3.9. Microscopie électronique à transmission

L'étude des effets toxiques d'une substance au niveau cellulaire et tissulaire est un outil d'évaluation des effets biologiques complémentaire à ceux présentés précédemment. En effet, les paramètres morphologiques constituent des éléments dont l'examen permet de rendre compte d'effets observés à un niveau d'organisation biologique supérieur. La pertinence de l'utilisation des observations au niveau cellulaire et tissulaire chez les poissons en tant que biomarqueurs d'un évènement contaminant au niveau des écosystèmes aquatiques a fait l'objet de plusieurs articles de synthèse (Hinton *et al.*, 1992 ; van der Oost *et al.*, 2003).

1) Principe

Le principe de la microscopie électronique est de remplacer le faisceau lumineux (photons) du microscope optique par un faisceau convergent d'électrons. Cette technique permet de visualiser des structures avec une résolution bien meilleure que dans le cas de la

microscopie optique traditionnelle. De plus, l'interaction électrons/matière peut être mise à partie pour réaliser des analyses chimiques locales non destructives de la zone observée, par couplage du microscope avec une sonde EDS (Energy Dispersive Spectrometry).

Le microscope qui a été utilisé est le microscope Tecnai 12 G2 Biotwin (FEI, Eindhoven, Pays-Bas), avec une tension d'accélération maximale de 120 kV, une résolution de 0,2 nm, et un grossissement possible de 300 000 x. Le logiciel dont nous nous sommes servis pour effectuer des analyses morphométriques est le programme NIH image.

Le microscope était couplé à un détecteur EDS, équipé d'une fenêtre super ultra fine (SUTW, modèle SAPPHIR). L'analyse par EDS consiste en une détection de ces photons par un détecteur solide. Suite à l'excitation des atomes présents dans le matériau par interaction avec les électrons incidents, des photons X sont émis (processus de désexcitation). L'énergie des photons X étant caractéristique des atomes dont ils sont issus, cette technique permet de réaliser une analyse élémentaire.

2) Préparation des échantillons

Des daphnies ont été prélevées à 21 jours dans l'expérimentation visant à étudier les effets de l'uranium et à 7 jours pour celle du mélange U-Se. Elles ont été ensuite immédiatement immergées dans un tampon assurant une fixation chimique de la matière vivante (solution à 1,5 % de glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate maintenu à 4 °C). Les échantillons tissulaires y sont alors laissés au minimum 24 h à 4 °C.

Suite à cette fixation chimique, les échantillons ont ensuite été marqués à l'osmium permettant d'obtenir un meilleur contraste lors des observations sous le faisceau électronique. Les tissus ont été ensuite déshydratés par des bains successifs d'alcool éthylique avant d'être inclus dans des résines non hydrosolubles. Une fois déshydratés, les tissus ont été inclus dans des supports de résine (Epon 812).

Des coupes ultrafines de ces échantillons ont été ensuite réalisées au moyen d'un ultramicrotome (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France). Pour les observations au MET, des coupes de 110 nm ont été réalisées, déposées sur des grilles de cuivre. Pour les analyses X, les coupes réalisées étaient de 500 nm; elles ont été déposées sur des grilles de cuivre au préalable recouvertes d'un film formvar/carbone.

2.4. Suivi des conditions expérimentales

2.4.1. Suivi des milieux d'exposition

2.4.1.1. Dosage des ions majeurs

Les anions présents dans les milieux d'exposition ont été dosés par chromatographie ionique (DIONEX-120, Sunnyvale, CA, USA; limites de détection: Cl^- 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$; NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} et SO_4^{2-} : 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) et les cations par ICP-AES (Spectrométrie d'Emission Atomique – Source Plasma à couplage inductif; Optima 4300 DV, Perkin Elmer, USA; limites de détection: Mg^{2+} : 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$; Na^+ et Ca^{2+} 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$; K^+ : 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

2.4.1.2. Suivi du pH

Le pH des milieux contaminés a été mesuré, et ajusté si nécessaire, chaque jour avant le renouvellement des milieux et des mesures de contrôle ont aussi été réalisées juste avant le renouvellement des milieux (milieu d'exposition de 24h).

2.4.2. Suivi des concentrations de Se et d'U dans le milieu d'exposition

Le suivi des concentrations en U et Se dans les milieux d'exposition a été réalisé grâce à des dosages réalisés par ICP-AES et par un spectrophotomètre d'absorption atomique couplé à un générateur d'hydrures (HG-QFAAS). Les suivis réalisés tout au long des expérimentations ont montré que les différences entre concentrations mesurées et concentration nominales étaient toujours inférieures à 10%.

2.4.2.1. Dosage par ICP-AES

La méthode de dosage par ICP-AES (Spectrométrie d'Emission Atomique – Source Plasma à couplage inductif; Optima 4300 DV, Perkin Elmer) a été utilisée pour suivre les concentrations d'uranium et de sélénium dans les milieux d'exposition. Cette méthode consiste à exciter les éléments à l'aide d'un plasma (gaz partiellement ionisé et macroscopiquement neutre) atteignant la température de 8000 K. A cette température, tout élément est excité et pour revenir à un état stable, émet des photons de longueurs d'onde caractéristiques. La mesure

se décompose en plusieurs étapes. L'échantillon introduit sous forme liquide (dans 2 % HNO₃), est transformé en aérosol par nébulisation pneumatique. L'aérosol est alors transporté dans le plasma d'argon où les éléments sont atomisés et ionisés. Le retour à un état d'énergie stable s'accompagne de l'émission de radiations à des longueurs d'ondes caractéristiques de chaque élément, dispersées par un monochromateur puis analysées par un détecteur photométrique.

L'uranium a été dosé avec l'ICP-AES calibré pour une gamme de concentrations entre 10 et 400 µg.L⁻¹. La concentration en uranium a été obtenue en effectuant la moyenne sur 4 raies d'énergie (409, 417, 424, 386 nm). Un effet matrice a été mis en évidence dans le milieu M4-pH7 (annexe 9), une correction d'environ 7 µg.L⁻¹U a été appliquée pour toutes les mesures réalisées.

Le sélénium a été dosé avec l'ICP-AES calibré pour une gamme de concentrations entre 10 et 400 µg.L⁻¹. La concentration en sélénium a été obtenue avec la raie d'énergie (196 nm). Aucun effet matrice n'a été mis en évidence dans le dosage du sélénium.

2.4.2.2. Dosage par absorption atomique HG-QFAAS

Lors du dosage par absorption atomique HG-QFAAS, l'échantillon aqueux (sélénite) est introduit avec du HCl (10 % v/v) au niveau du générateur d'hydrures. Puis, un agent réducteur (NaBH₄) est ajouté et des hydrures de Se sont formés (SeH₂) à partir du sélénite. Les hydrures volatiles sont ensuite transportés par un gaz vecteur (argon) à l'intérieur d'une cellule en quartz (chauffée électriquement à 1000 °C) où ils sont atomisés. L'absorbance est mesurée à 196 nm à l'aide du spectromètre d'absorption atomique équipé d'une lampe EDL (*Electrodeless Discharge Lamp*). Un intégrateur permet l'enregistrement et le traitement du signal apporté par le sélénium.

Le suivi de la contamination en sélénium du milieu a été réalisé pour vérifier les plus faibles concentrations d'exposition en sélénite de 0 µg.L⁻¹ Se et de 1 µg.L⁻¹ Se à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique couplé à un générateur d'hydrures (FIAS-100 / AAS 4110-ZL Perkin, CT USA). Cette technique a été utilisée car elle est relativement sensible avec une limite de quantification de 0.04 µg.L⁻¹.

2.5. Modélisation de la spéciation de l'uranium et du sélénium

Des calculs de spéciation de l'uranium ont été réalisés dans les conditions d'exposition en utilisant la méthode de calcul de spéciation J-Chess, (Java Chemical Speciation Equilibrium Speciation with Surfaces, Van der Lee, 1998). J-Chess est, en effet, un modèle de spéciation chimique qui permet de calculer l'état de solutions aqueuses complexes, à l'équilibre ou sous contrainte cinétique, en prenant en compte des centaines d'espèces aqueuses, de minéraux, d'oxydes, de colloïdes organiques ou inorganiques, de gaz et les processus d'adsorption.

La base de données thermodynamique utilisée pour les calculs a été compilée par l'OCDE-NEA (Organization for Economic Cooperation and Development - Nuclear Energy Agency, 1996) et mise à jour dans une récente étude (Denison et Garnier-Laplace, 2005). Les paramètres d'entrée pour J-Chess ont été basés sur les données physico-chimiques mesurées au cours des expériences (température, pH et concentrations ioniques). Les calculs J-Chess ont été contraints à l'équilibre avec l'atmosphère ($p\text{CO}_2 = 3.16 \times 10^{-4}$ atm).

Pour l'étude des effets de l'uranium seul chez la daphnie, des calculs de spéciation chimique de l'uranium ont été réalisés à la CL₅₀ 48 h dans le milieu M4-pH8 et M4-pH7. Des calculs de spéciation ont été effectués pour les conditions de deux études qui se sont intéressées à la toxicité de l'uranium : celle de Poston *et al.* (1984) et celle de Barata *et al.* (1998). Les calculs ont permis d'estimer la limite de solubilité et les concentrations des complexes d'uranium ainsi que l'ion libre uranyle.

Pour l'étude des effets du sélénium seul chez la daphnie, des calculs de spéciation chimique du sélénium ont été réalisés à la CL₅₀ 48 h dans le milieu M4-pH7.

Dans un dernier temps, des calculs ont été réalisés pour les expériences de mélanges.

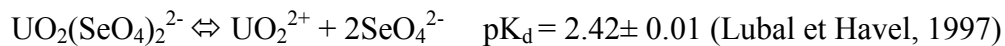
La base de données l'OCDE-NEA thermodynamique (Organization for Economic Cooperation and Development - Nuclear Energy Agency, 1996) mise à jour dans une récente étude (Denison et Garnier-Laplace, 2005) a été complétée avec les réactions suivantes :

Précipités uranium sélénium



pKs = 10.42 (Krylov et Chukhlantsev, 1975)

Complexes uranium-sélénium



2.6. Mesure de bioaccumulation de l'uranium et calcul de dose

2.6.1. Minéralisation

Pour mesurer la concentration de l'uranium appauvri présent dans les organismes, il est nécessaire de réaliser une étape de minéralisation qui permet d'obtenir un échantillon liquide. Cette minéralisation consiste en une digestion à chaud des échantillons de daphnies séchées dont le poids sec a été préalablement mesuré. Les échantillons ont été minéralisés dans 1 mL d'HNO₃ (69 %) et 1 mL d'H₂O₂ (30 %), évaporation à sec sur bain de sable (105°C) puis repris dans 15 ml d'HNO₃ 2 % (v/v).

2.6.2. Mesure des concentrations d'uranium par ICP-MS

L'uranium a été analysé par ICP-MS (Spectrométrie de masse – Source Plasma à couplage inductif, Varian 1000) avec une limite de détection de ~10 ng.L⁻¹ ²³⁸U. L'uranium a été analysé par ICP-MS et la bioaccumulation est exprimée en ng ²³⁸U .mg_{DW}⁻¹.

2.6.3. Calcul de doses

L'estimation des doses radiologiques a été réalisée grâce au logiciel EDEN-v2 (Beaugelin-Seiller *et al.*, 2006). Ce logiciel est dédié au calcul de doses pour le biota non humain. Cet outil permet de calculer une dose par unité de concentration (DPUC). Le principe de base de la méthode est de déterminer des DPUC mono-énergétiques basiques, correspondants à des énergies données représentatives des spectres alpha, bêta et gamma significatifs dans les cas d'exposition chronique.

La DPUC finale est obtenue par combinaison des DPUC mono-énergétiques (DPUC(Ei)), en fonction de l'importance des énergies Ei associées dans le spectre étudié selon l'équation :

$$DPUC_{tot} = \sum_i \%Ei \times DPUC(Ei)$$

Ce calcul est fonction des radionucléides étudiés, de la géométrie de l'organisme étudié et d'un scénario d'exposition défini. La longueur du corps de la daphnie (L, mm) a été estimée à partir des mesures de poids sec des daphnies (M, µg) en considérant un ellipsoïde constant (ratio axial de 1:0.6:0.4) et une relation linéaire (L=M.a + b; a= 0.005, b=2.44; R²= 0.81) obtenue par mesures à la loupe binoculaire.

Les concentrations en U dans les daphnies (µg.mL⁻¹ U) ont été considérées comme homogènes dans l'organisme et ont été converties en activité volumiques (Bq.mL⁻¹) en considérant une activité spécifique de 2.54 x 10⁴ Bq.g⁻¹ pour l'uranium naturel (Delacroix *et al.*, 2004). Les doses délivrées aux daphnies (mGy.h⁻¹) ont été calculées en considérant seulement l'énergie de déposition des particules alpha provenant de l'uranium bioaccumulé.

Les autres émissions provenant de l'uranium bioaccumulé (bêta et gamma) et l'exposition aux radiations externes provenant de l'uranium présent dans l'eau sont négligeables (<0.1%). Un DPUC de 2.2 x 10⁻³ mGy.h⁻¹/Bq.ml⁻¹ calculé par EDEN-v2 (Beaugelin-Seiller, 2006) a été utilisé.

2.7. Traitements statistiques

2.7.1. Données des effets de l'uranium et du sélénium seul

Toutes les analyses ont été réalisées en utilisant le langage et l'environnement R (R Development Core Team) avec le package drc <http://bioassay.dk>.

Les données de mortalité à 48h lors des tests aigus et les données de fécondité à 7 et 21 jours pour les tests de fécondité ont été utilisées pour établir des relations dose-réponse. La relation dose-réponse qui a été utilisée est un modèle logistique :

$$y = c + \frac{d - c}{1 + \exp[b(\log(x) - \log(e))]}$$

'c' est la limite inférieure, 'd' est l'effet maximum, 'e' est la concentration entraînant 50% d'effet, 'b' est la pente, 'x' est la concentration de la substance étudiée et 'y' est l'effet.

Toutes les autres données des tests ont été représentées graphiquement en indiquant la moyenne des réplicats (n) testés avec l'erreur standard (SE). Les différences d'effet entre conditions sont testées par ANOVA, pour des risques alpha $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,01$ (**) et $\leq 0,001$ (***) : après vérification de l'homogénéité de la variance (diagnostic de régression par QQ-plot, distribution des résidus) et de la normalité (test de Shapiro-Wilk). Un test de Tukey a été utilisé ultérieurement pour déterminer le degré de significativité (p value) entre les conditions prises deux à deux. Dans le cas où les données ne satisfaisaient pas les tests d'homogénéité de la variance ou de normalité, une transformation Boxcox a été appliquée avant de procéder à l'ANOVA (Box et Cox, 1964). Dans le cas où les données ne satisfaisaient pas les tests d'homogénéité de la variance ou de normalité, une transformation Boxcox a été appliquée avant de procéder au test de Tukey. Dans le cas où les données, même transformées, ne satisfaisaient pas les tests d'homogénéité de la variance ou de normalité, une ANOVA non paramétrique (test de Kruskal-Wallis) a été appliquée.

2.7.2. Données des effets du mélange uranium-sélénium

2.7.2.1. Test aigu

Les données des tests aigus ont été analysées en utilisant la méthode de Sørensen *et al.* (2007). Dans un premier temps, les courbes pour chaque ratio de mélange ont été ajustées de façon simultanée en utilisant un modèle logistique avec des EC_{50} variant librement. Dans un second temps, toutes les courbes ont été ajustées en utilisant le modèle d'addition des concentrations à 50% d'effet. Un test F basé sur la somme des résidus au carré de ces deux modèles a été utilisé pour évaluer lequel des deux ajuste au mieux les données. Deux modèles d'isoboles ont ensuite été utilisés. Le premier, le modèle de Hewlett inclut un seul paramètre d'interaction, λ . Le second modèle est celui proposé par Vølund, qui lui contient deux paramètres d'interaction (η_1 et η_2). Il permet de décrire un antagonisme plus fort que le modèle de Hewlett et ainsi de prendre en compte une certaine asymétrie. Les écarts entre le modèle CA et ces deux modèles non additifs ont été évalués en comparant leurs ajustements et à l'ajustement du modèle CA en utilisant un test F. Ces analyses ont été réalisées, comme pour les analyses précédentes, en utilisant le langage et l'environnement R avec le package *drc*.

Les données du test aigu ont aussi été analysées en utilisant la méthode proposée par Jonker *et al.* (2005) et le fichier d'analyse *MixTox* disponible sur <http://www.ceh.ac.uk/sections/er/csvedsen.html>. Dans cette méthode, les deux modèles de référence IA et CA sont considérés. Pour ces deux modèles, trois modèles dérivés ont été définis : le modèle de synergie ou antagonisme (S/A), le modèle dose ratio dépendant (DR), le modèle dépendant du niveau de dose (DL pour Dose Level). Un test du Chi-deux (X^2) basé sur le maximum de vraisemblance a été réalisé pour pouvoir mettre en évidence le modèle qui décrit le mieux les données. Les formules de ces différents modèles sont présentées en annexe 1.

2.7.2.2. Test chronique

Les données de fécondité du test chronique sur les effets du mélange uranium-sélénium ont été analysées grâce à la méthode de Jonker décrite précédemment dans la partie test aigu.

Les données de croissance, d'allocation d'énergie à la croissance et à la fécondité, de quantité de lipides ont été analysées quant à elles grâce à un test ANOVA. Comme pour les tests sur les substances seules, la normalité des résidus ainsi que l'homogénéité de la variance ont été vérifiées. Un test de Tukey a ensuite été utilisé pour déterminer le degré de significativité (p value) entre les conditions prises deux à deux. Les résultats ont été présentés avec la moyenne accompagnée de l'erreur standard (SE) et prenant des risques alpha ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**) et ≤ 0.001 (**).

Chapitre 3. Effets de l'uranium

3.1. Introduction

L'étude bibliographique portant sur les effets de l'uranium a permis de mettre en évidence le fait que les données de toxicité sont très variables. Afin de mieux comprendre la toxicité de l'uranium, un premier objectif de ce chapitre a été d'évaluer l'influence de la spéciation sur la toxicité de l'uranium. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la spéciation dans le milieu d'exposition des daphnies et avons cherché à optimiser la biodisponibilité de l'uranium tout en respectant la physiologie de la daphnie. Dans un second temps, les données d'effets de la littérature et celles obtenues dans le milieu défini dans le 1^{er} temps, ont été comparées en fonction de la spéciation chimique de l'uranium dans le milieu. Cette seconde partie a été réalisée afin de voir si la spéciation de l'uranium dans les différentes études permettait d'expliquer les différences de toxicité observées.

Compte tenu du fait que les données de la littérature concernant les effets chroniques de l'uranium sur la daphnie se sont limitées uniquement à la reproduction, le second objectif de cette étude a été d'acquérir des données d'effet sur les traits de vie. Des paramètres énergétiques comme des mesures d'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction (AECR) ont été réalisées pour évaluer les effets potentiels sur la population.

Les études de la littérature portant sur les mécanismes d'action de l'uranium ont montré que l'uranium était toxique non seulement en raison de ses propriétés radiologiques mais aussi en raison de ses propriétés chimiques. Le dernier objectif a consisté à évaluer la part de toxicité due aux propriétés radiologiques et celle due aux propriétés chimiques de l'uranium en comparant les résultats obtenus pour l'uranium avec ceux décrits dans la littérature pour les substances radioactives et les métaux trace.

Une partie des résultats sur les effets de l'uranium a fait l'objet d'une publication dans la revue *Aquatic Toxicology* (Zeman *et al.*, 2008) et est présentée en annexe 10.

3.2. Résultats

3.2.1. Toxicité aiguë

Le test de toxicité aiguë a permis de calculer une CE_{50} mortalité à 48h de $390 \pm 40 \mu\text{g.L}^{-1}$ U et une CE_{10} mortalité à 48h de $170 \pm 40 \mu\text{g.L}^{-1}$ U dans le milieu M4-pH7. Dans le milieu M4-pH8, la toxicité aiguë de l'uranium est largement plus faible que dans le milieu M4-pH7 avec une CE_{50} mortalité à 48h de $7.8 \pm 3.2 \text{ mg L}^{-1}$ U. Les courbes dose-réponse obtenues ainsi que les données à 24h sont présentées en annexe 11.

Dans le milieu M4, l'ion uranyle (UO_2^{2+}) fait partie des espèces dominantes de l'uranium jusqu'à pH 6 (Figure 27). Au-delà de ce pH, les formes hydroxylées, carbonatées et carbonatées calciques apparaissent. Les espèces d'uranium à pH 7 et à pH 8 diffèrent beaucoup : à pH 7, l'espèce $(\text{UO}_2)_2 \text{CO}_3 (\text{OH})^{3-}$ domine, alors qu'à pH 8 l'espèce $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3(\text{aq})$ est majoritaire. On peut aussi noter l'importance de l'EDTA sur la spéciation de l'uranium dans le milieu M4 et en particulier aux faibles pH. Son influence est cependant négligeable aux pH étudiés.

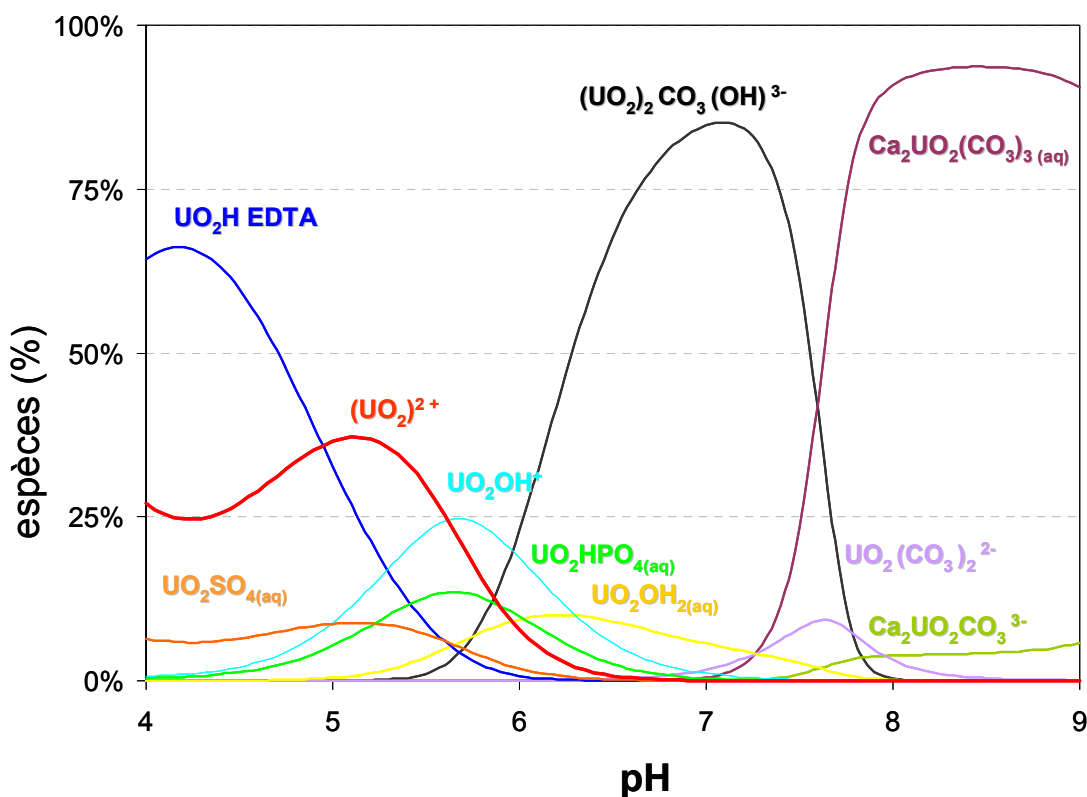


Figure 27: Exemple de la spéciation de l'uranium (VI) dans le milieu M4 en fonction du pH. (Simulation J-Chess réalisée à la CE_{50} mortalité à 48h de $390 \pm 40 \mu\text{g.L}^{-1}$ U)

Lors du test aigu, dans le milieu M4-pH8, un précipité jaune a été observé aux concentrations supérieures à $10 \text{ mg.L}^{-1} \text{ U}$. Ces observations sont en accord avec les calculs réalisés avec J-Chess, qui ont permis de déterminer la limite de solubilité de l'uranium dans nos milieux d'étude. Cette limite de solubilité pour l'uranium dans le milieu M4-pH7 et M4-pH8 est de 0,8 et $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivement.

Nous avons ensuite cherché à comparer nos données de toxicité aiguë aux valeurs de la littérature (Barata *et al.*, 1998 ; Poston *et al.*, 1984). Cette comparaison entre les différentes études a été réalisée sur la base de la spéciation prédite à CE_{50} mortalité à 48h (Tableau 6).

Tableau 6. Concentrations en uranium ($\mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$), paramètres chimiques de l'eau et estimation des concentrations en ion libre ($\mu\text{g.L}^{-1} \text{UO}_2^{2+}$) calculées en utilisant les simulations géochimiques (J-Chess, (Van der Lee, 1998) sur la base des compositions physico-chimiques des eaux) en se plaçant à la CE_{50} mortalité à 48h uranium pour les conditions données par Barata *et al.* (1998), Poston *et al.* (1984) et pour les conditions de notre étude (M4-pH8 et M4-pH7).

	M4-pH7	M4-pH8	Eau modérément-dure	Eau dure	Eau douce	Eau modérément-dure	Eau dure
	Eau synthétique (notre étude)		Eau synthétique Barata <i>et al.</i> (1998)		Eau de la rivière Columbia Poston <i>et al.</i> (1984)		
Concentration totale en U ($\text{mg.L}^{-1} \text{U}$) à la CE_{50} 48h	0.39	7.8	8.3	22.4	6.4	37.5	51.9
pH	7.0	8.0	7.7	8.1	7.9	8.3	8.6
Alcalinité ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)	2.7	34	62	126	57	93	129
Dureté ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)	250	250	90	179	70	133	197
UO_2^{2+} libre ($\mu\text{g.L}^{-1} \text{U}$)	$1.7 \cdot 10^{-1}$	$1.7 \cdot 10^{-4}$	$7.0 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$1.3 \cdot 10^{-3}$	$4.5 \cdot 10^{-4}$	$6.5 \cdot 10^{-6}$

Pour l'étude de Poston *et al.* (1984), nos calculs ont permis d'estimer des valeurs de $1,3 \cdot 10^{-3}$; $4,5 \cdot 10^{-4}$; $6,5 \cdot 10^{-6} \mu\text{g.L}^{-1} \text{UO}_2^{2+}$, respectivement pour les conditions 70, 133 et 197 mg.L^{-1} de CaCO_3 . (eau dure, modérément dure et douce). Les espèces majoritaires étaient $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3(\text{aq})$ et $(\text{UO}_2)_2\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$, avec une quantité de $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3(\text{aq})$ augmentant avec la dureté. Les concentrations en ion libre uranyle rapportées par Barata *et al.* dans ses deux conditions d'étude (eau modérément dure et dure) ont été en accord avec celles que nous avons recalculées dans notre étude à partir des paramètres chimiques des milieux qu'ils ont reportés dans leur article ($0,007$ et $0,0015 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivement pour l'eau modérément-dure et dure). Les concentrations en ion libre uranyle dans le milieu M4-pH7 au niveau de la CE_{50}

mortalité à 48h ($\sim 1.7 \times 10^{-1} \mu\text{g.L}^{-1} \text{UO}_2^{2+}$) était au moins de 25 fois supérieure aux concentrations calculées pour les milieux utilisés par Poston *et al.* (1984) et Barata *et al.* (1998).

3.2.2. Toxicité chronique

3.2.2.1. Mortalité

Dans le test ayant pour but de mettre en évidence les effets chroniques de l'uranium, aucun phénomène de mortalité n'a été observé, sauf pour les daphnies exposées à la plus forte concentration en uranium ($100 \mu\text{g.L}^{-1} \text{U}$) qui ont montré un taux de mortalité de 10% après 21 jours (2 daphnies mortes /20 daphnies).

3.2.2.2. Croissance

Le suivi de la masse des individus au cours de l'expérimentation a permis de mettre en évidence un effet de l'uranium sur la masse sèche des daphnies (Figure 28). Les résultats montrent que la masse sèche somatique (sans la ponte) est significativement réduite, par rapport à celle des daphnies témoin, après 7 jours d'exposition, à des concentrations en uranium $\geq 50 \mu\text{g.L}^{-1}$. Après 20 jours d'exposition, une diminution significative de la masse sèche des daphnies a ensuite été observée dès $25 \mu\text{g.L}^{-1} \text{U}$.

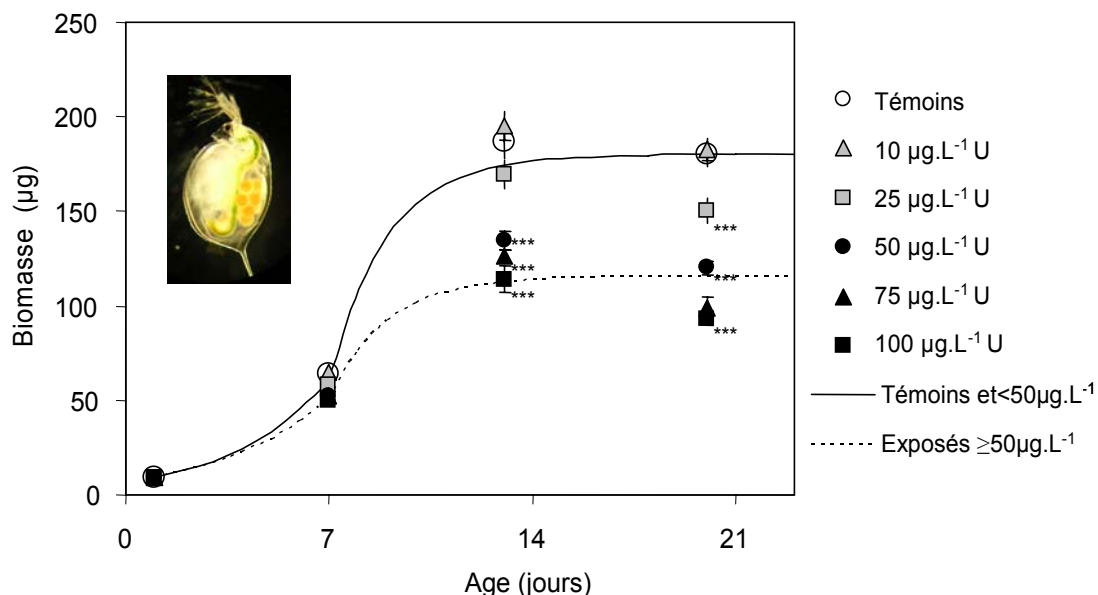


Figure 28: Biomasse sèche des daphnies en fonction du temps et de la concentration en uranium. ANOVA : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Barre d'erreur = SE. $n = 10$.

Les changements de masse sèche $w(i)$ avec l'âge i (en jours) ont été décrits en utilisant un modèle exponentiel pour le stade juvénile (âge $i \leq 7$ jours):

$$w(i) = w(1) \cdot e^{g \cdot (i-1)}$$

avec $w(1) = 9,4 \mu\text{g.daphnie}^{-1}$, $w(7) = 62,5 \mu\text{g.daphnie}^{-1}$ et $g = 0,32 \text{ jour}^{-1}$ (dans les témoins et aux concentrations 10 et $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ U) et avec $w(7) = 51,5 \mu\text{g.daphnie}^{-1}$ et $g = 0,28 \text{ jour}^{-1}$ (aux concentrations 50, 75 et $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ U). Dès que les daphnies commencent à produire des œufs (âge $i \geq 7$ jours, stade adulte), le poids sec $w(i)$ suit alors un modèle de Von Bertalanffy:

$$w(i) = w(\text{max}) - [w(\text{max}) - w(7)] \times \exp^{k \times (i-7)}$$

avec $k = -0,5 \text{ jour}^{-1}$ indépendant des conditions d'exposition et $w(\text{max})$ changeant entre les différentes conditions d'exposition: $w(\text{max}) = 180 \mu\text{g.daphnie}^{-1}$ (dans les contrôles et aux concentrations 10 et $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ U, n=90); $w(\text{max}) = 116 \mu\text{g.daphnie}^{-1}$ (aux concentrations 50, 75 et $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ U, n=90).

La masse des daphnies augmente très fortement durant le stade juvénile dans les conditions d'exposition 0, 10 et $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ U, d'environ 38% par jour et ensuite se stabilise avec un taux de croissance moyen proche de 0 % entre 14 et 21 jours. Les daphnies exposées à 50, 75 et $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ U sont légèrement plus petites que les individus exposés aux plus faibles concentrations en uranium avec un taux de croissance masse spécifique de 23% pendant le stade juvénile et proche de 0% entre 14 et 21 jours.

Le suivi des mues au cours du temps a permis de montrer que l'exposition à l'uranium des daphnies n'affecte pas leur fréquence. En effet, aucune différence concernant l'occurrence des mues n'a été observée entre les mues chez les témoins et les mues chez les daphnies exposées. Les mesures de poids sec des mues ont montré que la masse des mues (y) n'était pas affectée par l'exposition à l'uranium et qu'elle augmente avec l'âge des daphnies (x) en suivant une relation linéaire ($y = 0,18 x + 8,06$; $n = 12$; $r^2 = 0,70$).

3.2.2.3. Reproduction

La reproduction des daphnies a été affectée dès l'exposition à $25\mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$. La fécondité 21 jours (nombre de juvéniles par femelle produit en 21 jours) est le paramètre le plus sensible avec une CE_{50} et une CE_{10} estimées respectivement à 91 ± 15 et $14\pm 7\mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$ ($n=10$, $\alpha=0,05$) (Figure 29).

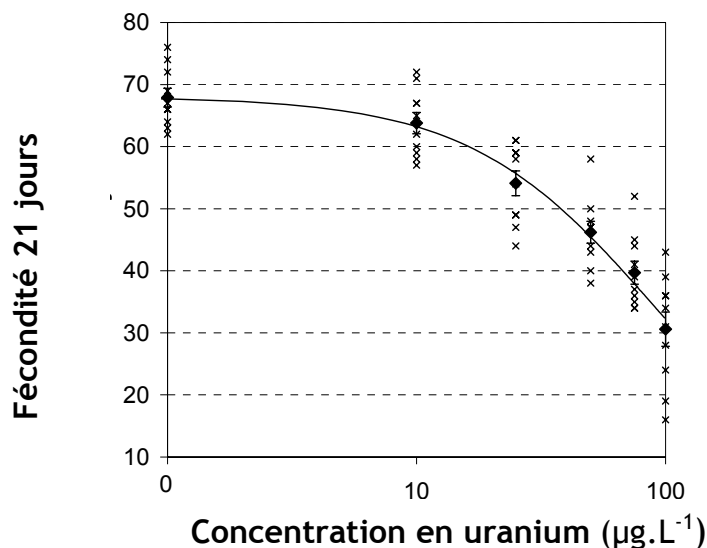


Figure 29 : Nombre total de juvéniles produits par femelle en 21 jours en fonction de la concentration d'exposition en uranium. Barre d'erreur =SE. $n=10$.

Au niveau des pontes 1, 3, et 5, deux paramètres ont été suivis : la fraction des daphnies se reproduisant ainsi que la fécondité (nombre de juvéniles par daphnie par ponte).

La fraction des daphnies se reproduisant n'a été affectée qu'à la première ponte : elle est de 60 % pour celles exposées à $75\mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$ et de 20 % seulement pour celles exposées à $100\mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$. Aux faibles concentrations en uranium (de 10 à $50\mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$) 100% des daphnies ont produit des œufs ($n=10$ par concentration testée) et 90% des daphnies ont produit des œufs parmi les daphnies témoin.

La fécondité des daphnies à la 1^{ère} et à la 3^{ème} ponte est significativement plus faible que celle des témoins aux trois plus fortes concentrations d'exposition (de 50 à $100\mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$). A la 5^{ème} ponte une réduction significative du nombre de juvéniles par daphnies a été mise en évidence à partir d'une exposition à $25\mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$ (Figure 30).

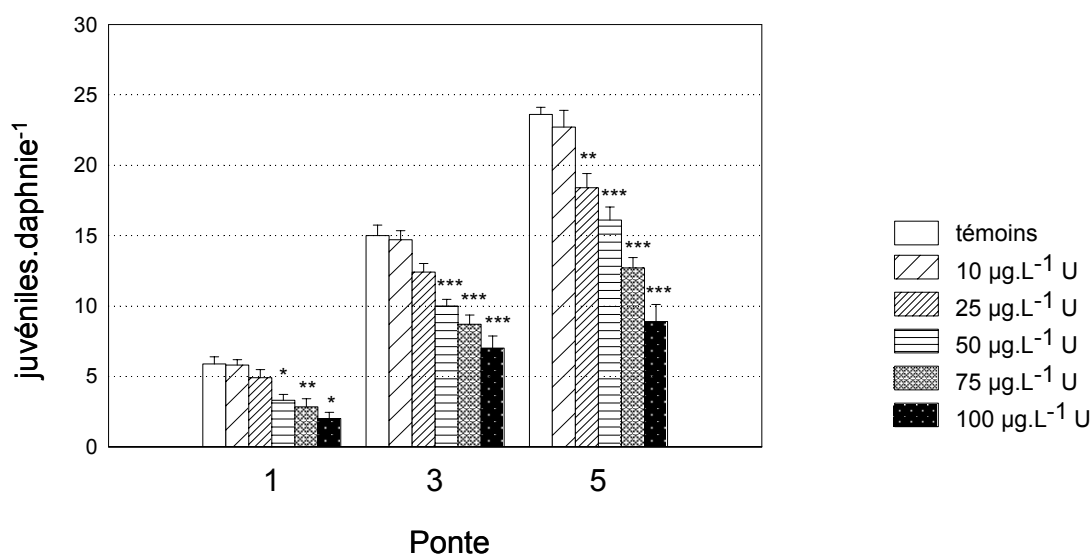


Figure 30 : Taille des pontes (nombre œufs par ponte) en fonction du numéro de ponte et de la concentration en uranium. ANOVA : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Barre d'erreur = SE. $n = 10$.

Le poids sec des œufs augmente de façon significative avec l'âge des femelles (Figure 31), avec des valeurs allant de $4,3 \pm 0,2 \mu\text{g}$ au jour 7 (ponte 1, $n = 10$, $p < 0,05$) à $8,5 \pm 0,4 \mu\text{g}$ au jour 21 (ponte 5, $n = 10$, $p < 0,05$). La masse sèche des juvéniles âgés de moins de 24h est, elle aussi, croissante en fonction de l'âge des mères, de $5,5 \pm 0,6 \mu\text{g}$ ($n = 10$, $p < 0,05$) pour la ponte 1 à $9,6 \pm 0,8 \mu\text{g}$ ($n = 10$, $p < 0,05$) pour la ponte 3, et ensuite se stabilise à $9,6 \pm 0,4 \mu\text{g}$ ($n = 10$, $p < 0,05$) pour la ponte 5. Ces observations ont été réalisées chez les daphnies témoins.

Le suivi des daphnies exposées à l'uranium a permis de montrer que l'uranium entraîne une réduction de la masse sèche des œufs. Une réduction significative a été observée pour les œufs issus de la 3^{ème} ponte lors d'une exposition à des concentrations en uranium supérieures ou égales à $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ U ($7,6 \pm 0,6 \mu\text{g}$ par œuf, $n = 10$, $p < 0,05$) et pour les œufs issus de la 5^{ème} ponte lors d'une exposition supérieure ou égale à $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ U ($6,8 \pm 0,3 \mu\text{g}$ par œuf, $n = 10$, $p < 0,05$).

Contrairement à la masse des œufs, la masse sèche des juvéniles âgés de moins de 24h n'a pas été significativement affectée.

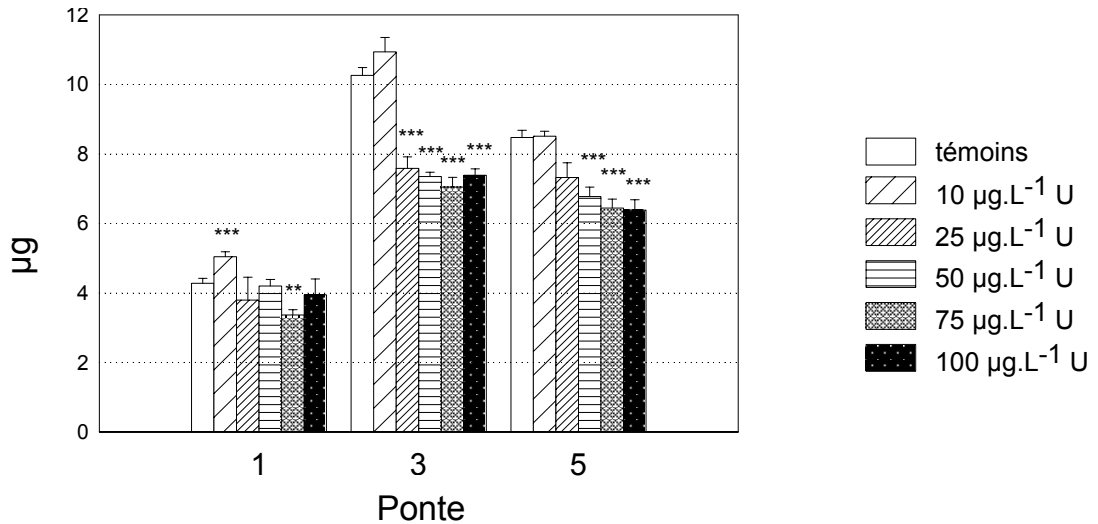


Figure 31 : Poids sec des œufs en fonction de la ponte et de la concentration en uranium. ANOVA : *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Barre d'erreur =SE

Nous avons réalisé une expérience complémentaire dans le but d'évaluer la sensibilité des œufs de daphnies à l'exposition à l'uranium. Dans cette étude, les œufs de daphnies témoin, disséqués et placés dans du milieu M4-pH7 avec une concentration de 0,4 mg.L⁻¹ U équivalente à la CE₅₀ mortalité 48h de l'uranium, n'ont montré aucun retard de développement par rapport aux œufs placés dans des conditions contrôle. Aucune malformation n'a été observée. Les œufs semblent donc moins sensibles que les juvéniles, ce qui est probablement dû au fait que les œufs sont protégés une grande partie de leur développement par la membrane embryonnaire très peu perméable.

3.2.2.4. Allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction

Pour réaliser un calcul simplifié de l'allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction, il est nécessaire de mesurer l'entrée d'énergie chez la daphnie, estimée grâce aux mesures d'ingestion et l'énergie du métabolisme, estimée grâce à la respiration.

Ingestion

Le taux de filtration masse spécifique ne montre pas de différence entre les daphnies contrôle et les daphnies exposées après 7 jours et 14 jours (pontes 1 et 3). A la 5^{ème} ponte (jour 21) le taux d'ingestion masse spécifique décroît significativement pour les daphnies exposées à des concentrations $\geq 75\mu\text{g.L}^{-1}$ U (Figure 32). Cependant, lorsque l'ingestion est exprimée par daphnie, elle est significativement réduite aux concentrations 25, 75 et $100\mu\text{g.L}^{-1}$.U au jour 7 (1^{ère} ponte) et à toutes les concentrations au dessus de $25\mu\text{g.L}^{-1}$ U au jour 21 (5^{ème} ponte). Aucun effet n'a été observé à la ponte 3.

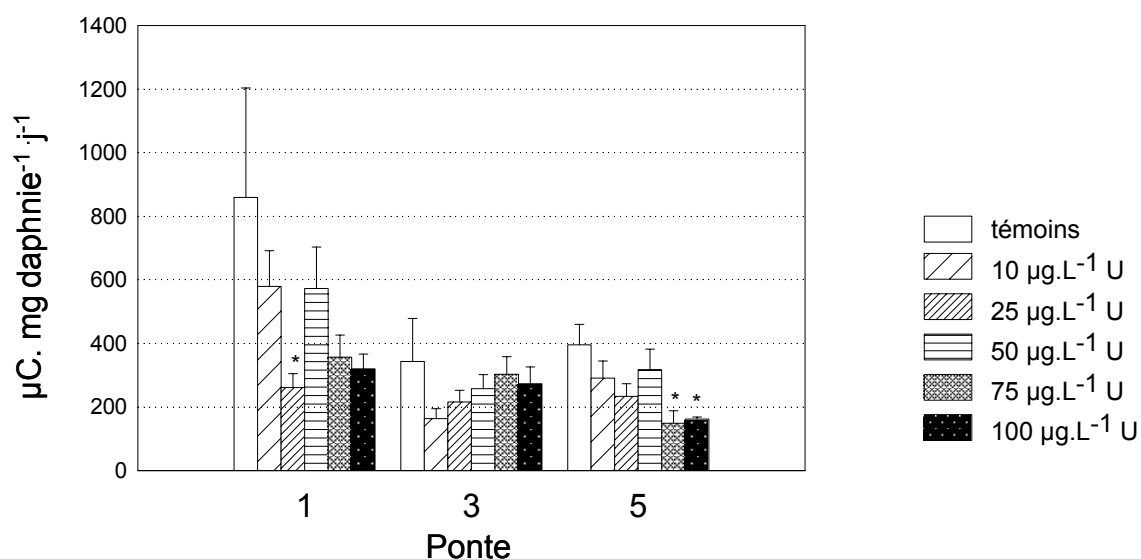


Figure 32 : Taux d'ingestion en fonction des pontes et de la concentration en uranium
ANOVA : * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Barre d'erreur =SE. $n=5$.

Respiration

Les taux de respiration masse spécifique (ou taux de consommation d'oxygène masse spécifique) étaient supérieurs au dessus de $25\mu\text{g.L}^{-1}$ U par rapport aux témoins au jour 7 (ponte 1) (Figure 33).

Au jour 14 (ponte 3), le taux de consommation d'oxygène masse spécifique est significativement plus élevé uniquement à la plus forte concentration d'exposition ($100\mu\text{g.L}^{-1}$ U).

A 21 jours (ponte 5), aucun effet de l'uranium n'est observé sur le taux de respiration.

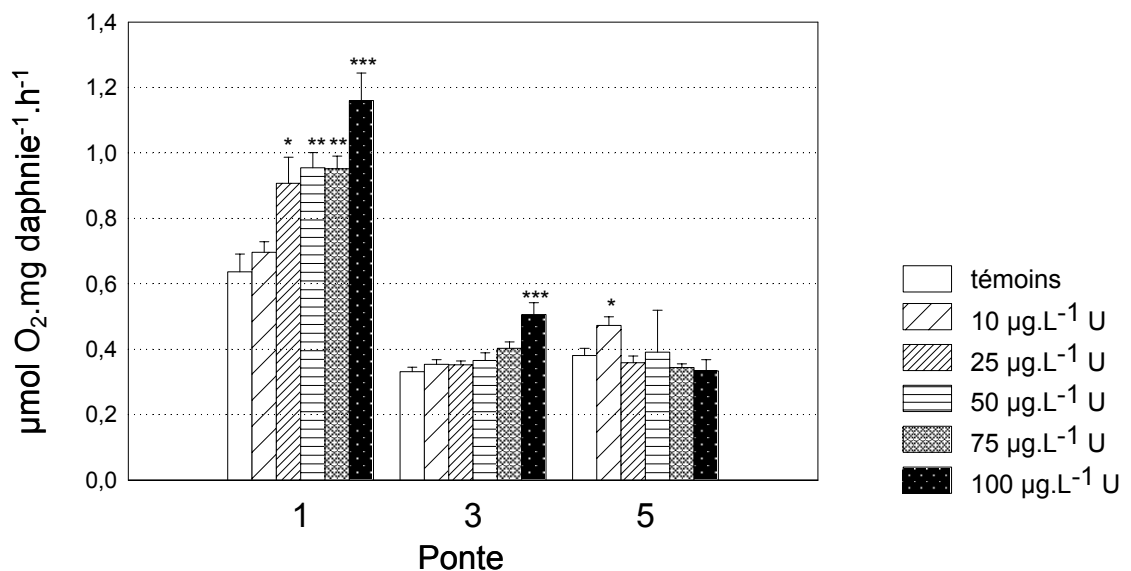


Figure 33: Taux de respiration en fonction des pontes et de la concentration en uranium
ANOVA : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Barre d'erreur = SE. $n=5$.

Allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction

Les calculs d'allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction masse spécifique (AECR) montrent une réduction significative de cette énergie à la première ponte aux concentrations 25 et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U (Figure 34). A la 5^{ème} ponte une réduction significative de l'AECR a été observée pour les concentrations d'exposition 25, 75 et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U.

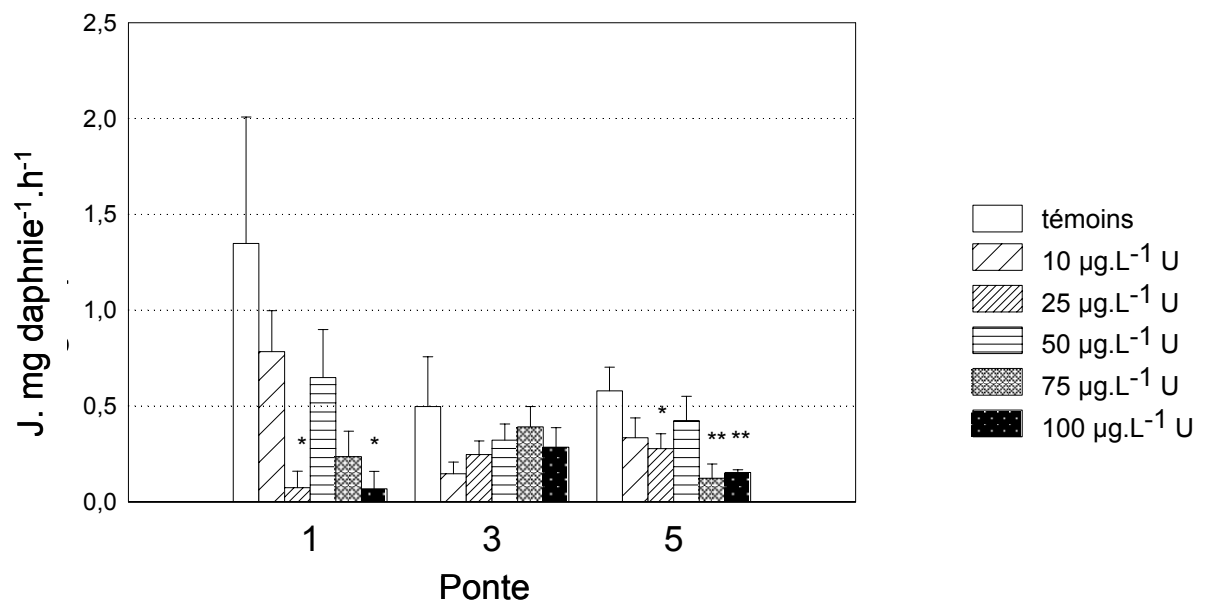


Figure 34 : Allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction en fonction des pontes et de la concentration en uranium. ANOVA : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Barre d'erreur =SE. $n=5$.

3.2.2.5. Effets sur la population

Les données de mortalité et de reproduction ont été intégrées dans une matrice de Leslie afin de les regrouper et d'évaluer l'impact de l'uranium sur la dynamique des populations (Figure 35).

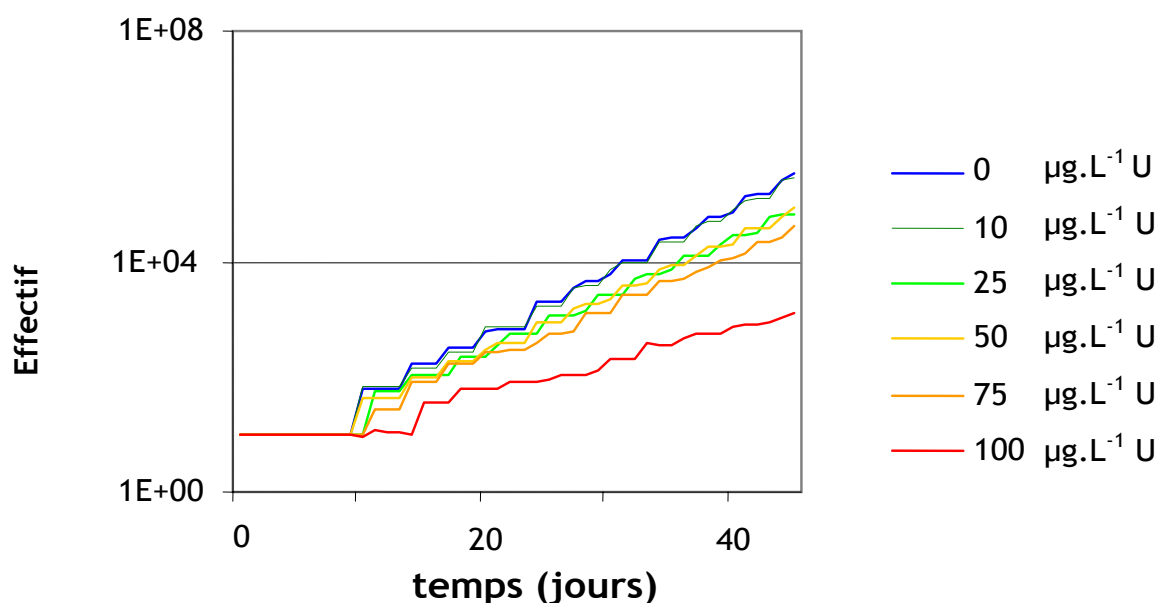
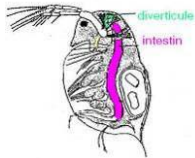


Figure 35 : Evolution de l'effectif au cours du temps en fonction de la concentration en uranium

Les résultats présentés dans la figure 35 mettent en évidence un fort impact de la baisse de reproduction pour la plus forte concentration (100 µg.L⁻¹ U). Les trois concentrations, 25 et 50 et 75 µg.L⁻¹ U, se détachent de la plus faible concentration d'exposition en uranium (10 µg.L⁻¹ U) et de la condition témoin et montrent ainsi un impact significatif de l'exposition à l'uranium à des concentrations supérieures ou égales à 25 µg.L⁻¹ U.



3.2.2.6. Effets sur le tube digestif de la daphnie

Suite aux observations réalisées au niveau de l'individu, et en particulier suite aux taux ingestion réduits pour les daphnies les plus exposées à l'uranium, nous nous sommes intéressés à l'état des cellules intestinales. Nos observations au microscope optique des cellules intestinales ont été réalisées sur des daphnies exposées pendant 21 jours à deux concentrations en uranium (50 et $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ U) et sur des daphnies témoins. Elles ont permis de révéler des altérations au niveau du tube digestif. Les daphnies témoin présentent une paroi intestinale assez régulière avec la présence de quelques espacements entre certaines cellules probablement dus à des cellules manquantes (Figure 36). Les intestins de daphnies exposées à $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ U présentent aussi les mêmes types d'espacements que ceux observés chez les daphnies témoin, leur nombre est cependant accru par rapport au témoin. Les cellules intestinales des daphnies exposées présentent aussi de nombreuses vacuoles qui, elles, n'ont pas été retrouvées dans les cellules des daphnies témoin. Les daphnies exposées à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ U présentent un nombre d'espacements encore accru par rapport aux daphnies exposées à $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ U avec une quantité de vacuoles supérieure à celle observée chez les daphnies exposées à $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ U. A cette concentration, nous avons aussi observé un gonflement des cellules reflétant une altération profonde de l'intégrité des cellules intestinales (Figure 36).

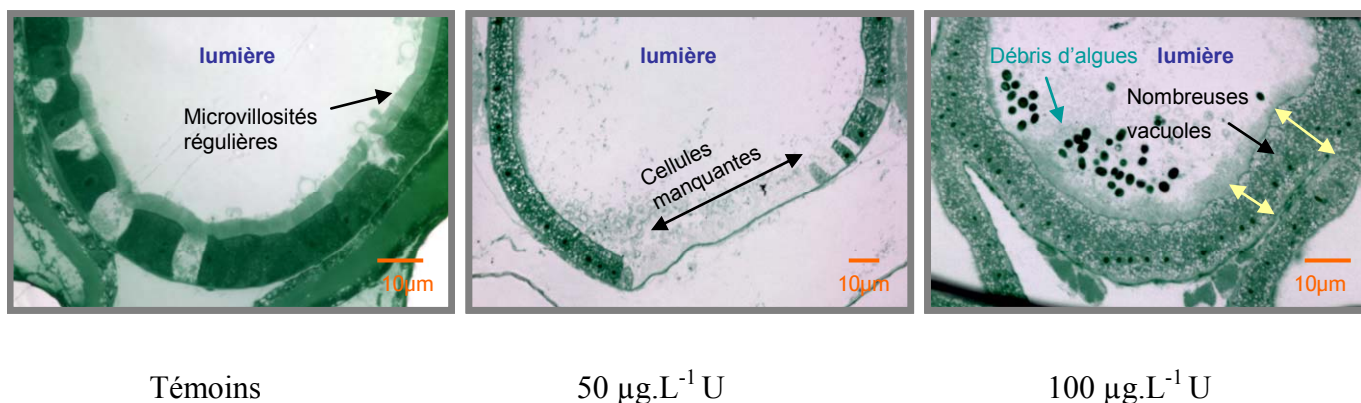


Figure 36 : Observations au microscope optique de tube digestif de daphnies contrôle et de daphnies exposées à 50 et $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ U

Les observations au microscope électronique à transmission réalisées sur ces mêmes daphnies ont permis de confirmer au niveau cellulaire les observations réalisées au microscope

optique. Ces observations ont été couplées à des mesures à la sonde X et ont permis de mettre en évidence une accumulation de l'uranium sous forme de précipité dans les cellules intestinales (Figure 37).

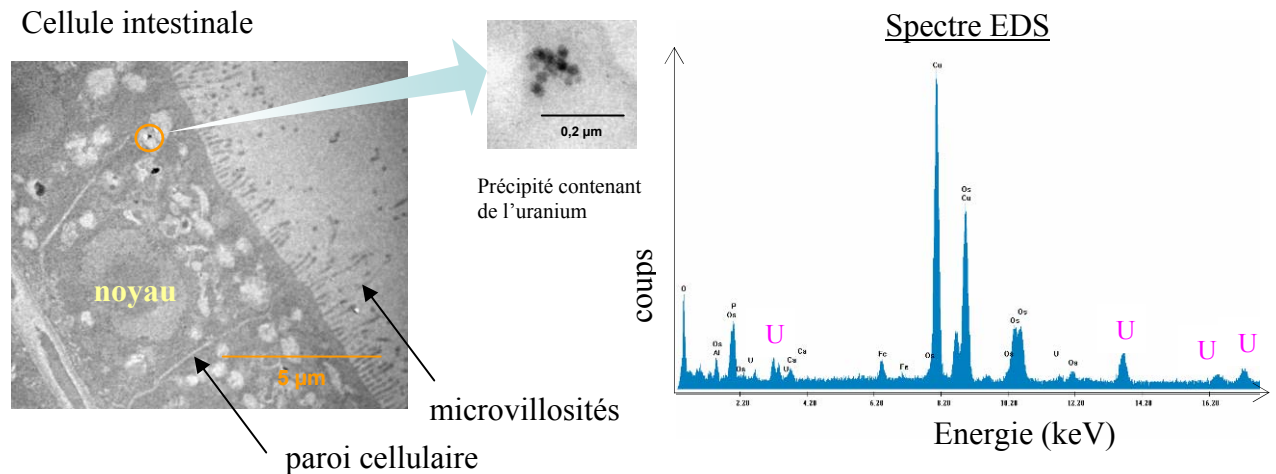


Figure 37 : Observations au microscope optique de tube digestif de daphnies exposées à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ U et spectre obtenu par EDS. La zone analysée est localisée sur le granule observé à l'intérieur d'une cellule intestinale.

3.2.2.7. Bioaccumulation et doses radiologiques délivrées

Les concentrations en uranium dans les daphnies augmentent avec la concentration d'exposition ainsi qu'avec le temps d'exposition (Figure 38).

La bioaccumulation ne diffère pas significativement pour les deux concentrations d'expositions 75 et $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ U à la ponte 1. Une réduction significative a même été observée entre ces deux concentrations d'exposition 75 et $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, aux pontes 3 et 5. Ce phénomène est probablement dû à l'altération élevée de la physiologie des daphnies à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ U.

Les débits de dose calculés à partir des mesures de bioaccumulation à 21 jours (5^{ème} ponte) sont de 0.02 ± 0.01 ; 2.1 ± 0.2 ; 4.8 ± 0.3 ; 7.9 ± 0.5 ; 13.0 ± 0.3 ; $8.8 \pm 0.9 \mu\text{Gy.h}^{-1}$ ($n=5$; $p < 0,05$) respectivement pour les concentrations 0 , 10 , 25 , 50 , 75 et $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ U.

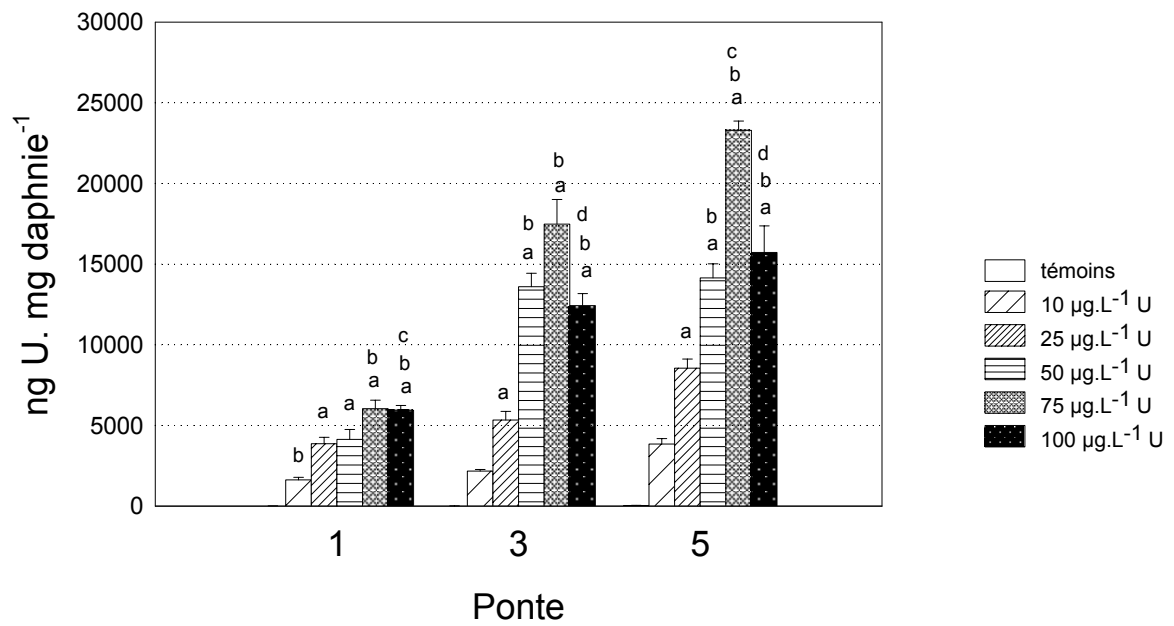


Figure 38. Bioaccumulation de l'uranium dans la masse somatique sèche des daphnies (ngU.mg⁻¹) en fonction de l'exposition en uranium et du numéro de ponte. "a" indique un effet significatif comparé au témoin et à la condition 10µg. L⁻¹ U ; "b" indique un effet significatif comparé à la condition 25µg. L⁻¹ U ; "c" indique un effet significatif comparé à la condition 50µg. L⁻¹ U ; "d" indique un effet significatif comparé à la condition 75µg. L⁻¹ U avec $p < 0,05$. Barre d'erreur =SE.

3.3. Discussion

3.3.1. Influence de la spéciation chimique sur la toxicité de l'uranium

La biodisponibilité et la toxicité des métaux trace dissous, comme l'uranium, sont connues pour dépendre de leur spéciation chimique en solution. Dans nos expériences, nous avons modifié la composition du milieu d'exposition pour augmenter la concentration des espèces biodisponibles de l'uranium tout en gardant des conditions compatibles avec la physiologie de la daphnie. Selon le modèle de l'ion libre (Campbell, 1995), l'entrée d'uranium et sa toxicité conséquente est proportionnelle à la concentration de l'ion libre UO_2^{2+} plutôt qu'à la concentration en uranium total. Ainsi, la complexation de UO_2^{2+} avec des ligands inorganiques (comme les carbonates et les hydroxydes) conduit à une diminution de la biodisponibilité de l'uranium (Fortin *et al.*, 2004). De plus, d'autres cations (comme Ca^{2+} et Mg^{2+}) peuvent aussi contribuer à réduire l'entrée de métal et ainsi sa toxicité à travers des phénomènes de compétition au niveau des sites de liaison de surface (Di Toro *et al.*, 2005 ; Riethmuller *et al.*, 2001). En effet, la dureté du milieu et l'alcalinité sont deux paramètres entraînant une réduction de la toxicité de l'uranium pour les organismes aquatiques (Barata *et al.*, 1998 ; Parkhurst *et al.*, 1984 ; Poston *et al.*, 1984 ; Sheppard *et al.*, 2005).

Dans notre étude, en réduisant le pH et donc l'alcalinité, la proportion de UO_2^{2+} s'est retrouvée alors accrue, ce qui a eu pour résultat une diminution de la CL_{50} 48h (exprimée en concentration d'uranium total). A une compétition constante avec les cations (dureté identique), la CL_{50} 48h devrait logiquement être associée à une concentration constante d' UO_2^{2+} . Cependant, la concentration de UO_2^{2+} calculée à la CL_{50} 48h varie de $1,7 \cdot 10^{-1}$ à $1,7 \cdot 10^{-4} \mu\text{g.L}^{-1}$ entre pH 7 et pH 8, et jusqu'à $6,5 \cdot 10^{-6} \mu\text{g.L}^{-1}$ à pH 8,6 dans les conditions des eaux rapportées dans les études précédentes (Tableau 5).

Une corrélation entre la concentration en ion libre uranyle dans les différents milieux à la CE_{50} mortalité à 48h et le pH a pu être mise en évidence ($-\log [\text{UO}_2^{2+}] = 2.55 \text{ pH} - 8.84$, $R^2=0.89$; Figure 39). Toutes les valeurs (Barata *et al.*, 1998; Poston *et al.*, 1984; notre étude) ont été prises en compte pour établir cette relation.

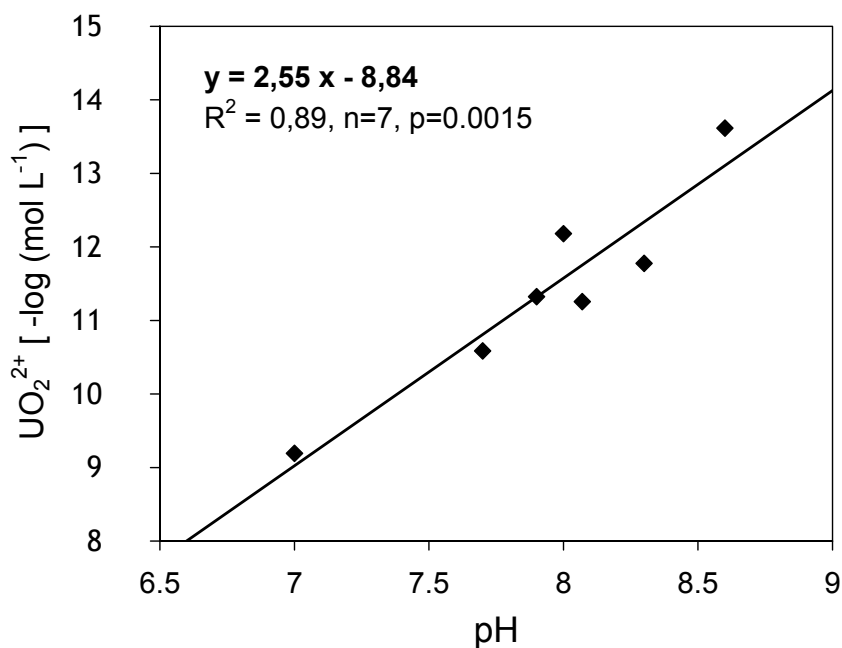


Figure 39: Concentration en ion libre uranyl ($-\log \mu\text{g.L}^{-1} UO_2^{2+}$) à la CE_{50} mortalité à 48h uranium en fonction du pH dans différentes conditions chimiques de milieu : celles de notre étude (M4-pH8 et M4-pH7), celles de l'étude de Poston *et al.* (1984) et de Barata *et al.* (1998).

La compétition avec Ca^{2+} et Mg^{2+} ne peut pas, à elle seule, expliquer cette variation, comme la dureté de l'eau ne varie que de 70 à 250 $\text{mg L}^{-1} CaCO_3$. Ces observations suggèrent que l'influence de la spéciation chimique et du pH est plus complexe que celle attendue.

Différentes hypothèses peuvent être formulées quant au rôle du pH sur la toxicité de l'uranium comme:

- une compétition de l'ion UO_2^{2+} avec le proton H^+ , comme le suggère la relation linéaire entre CL_{50} 48h (exprimée en $-\log [UO_2^{2+}]$ concentration) et le pH (Figure 39), en accord avec Di Toro *et al.* (2005),
- une inhibition non-compétitive du transport du métal par les protons, comme récemment reporté par Fortin *et al.* (2007) chez les algues (avec une plus grande entrée de UO_2^{2+} à pH=8 plutôt qu'à pH=7).,
- une contribution d'autres espèces toxiques de l'uranium, incluant UO_2OH^+ ou des complexes carbonatés (Fortin *et al.*, 2007 ; Markich *et al.*, 2000).

3.3.2. Effets de l'uranium à différents niveaux d'organisation : au niveau de la cellule, de l'individu et de la population.

Les effets chroniques de l'uranium ont tout d'abord été étudiés à l'échelle de l'individu grâce à différentes mesures. Les paramètres les plus sensibles, comme la reproduction et la croissance, sont affectés par une exposition à de l'uranium dès $25 \mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$. Comme nous l'avons montré précédemment, parallèlement à cette diminution de croissance et de reproduction, une diminution de l'ingestion ainsi qu'une augmentation significative de la respiration ont été observées.

Ces deux paramètres ont permis d'évaluer l'allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction (AEER). En effet, l'AEER est définie comme la différence entre l'énergie assimilée à partir de la nourriture et l'énergie métabolisée pour la maintenance de l'organisme (respiration et excrétion). Ce paramètre donne une indication valable de l'état de santé d'un organisme (Baillieul *et al.*, 2005). Dans notre étude, l'uranium a été montré comme induisant une réduction significative de l'AEER masse spécifique dès $25\mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$ (Figure 34). A la plus forte concentration, l'AEER représente seulement 10% de la valeur mesurée chez les témoins. Cette forte diminution de l'AEER est principalement associée à une réduction de l'ingestion. En effet, la baisse d'ingestion observée explique 64% de la réduction de l'énergie disponible à la 1^{ère} ponte et 100% celle observée à la 5^{ème}. Ces effets ont été complétés par des observations au niveau cellulaire. Les observations des daphnies exposées à 50 et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$ au microscope optique et au microscope électronique à transmission nous ont permis de mettre en évidence une profonde altération du tube digestif avec une accumulation d'uranium dans ses cellules. Ces effets délétères au niveau du tube digestif peuvent être reliés au niveau supérieur c'est-à-dire au niveau de l'individu à la baisse d'ingestion observée.

L'augmentation de la demande énergétique pour lutter contre le stress engendré par l'uranium (mesuré grâce à la respiration) explique quant à elle au maximum 28% de la diminution de l'énergie disponible pour la croissance et la reproduction (ponte 1). Ces observations sont en accord avec la théorie métabolique du coût énergétique (Calow et Sibly, 1990 ; Calow, 1991 ; De Coen et Janssen, 2003) qui considère que dans des conditions de stress, un organisme met en place des défenses et des mécanismes de réparation qui coûtent de l'énergie. Ainsi tout stress induit une réduction de l'énergie disponible pour la croissance et la reproduction.

Dans notre étude, la croissance et la reproduction montrent la même sensibilité à l'exposition à l'uranium, les deux étant réduites à la concentration de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$, dès la 1^{ère} ponte, et à $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ U lors de la 5^{ème} ponte. Pour la reproduction, le nombre d'œufs produits en 21 jours ainsi que la masse des œufs produits aux pontes 3 et 5 ont été affectés par les concentrations croissantes d'uranium, ce qui potentiellement entraînerait des conséquences majeures pour la dynamique des populations. En effet, Ebert (1991) a montré que la production de petits œufs aurait pour résultat une croissance somatique réduite et aussi une reproduction retardée de cette descendance. Les effets significatifs au niveau de l'AEER reflètent l'importance du stress de l'uranium sur les réserves énergétiques de la daphnie et ainsi la capacité de la population à se maintenir dans un écosystème.

Les effets mesurés sur la fécondité et sur la mortalité à l'échelle de l'individu ont été intégrés dans un modèle de dynamique de population simple, une matrice de Leslie. Ce modèle permet de mettre en évidence les effets de l'uranium au niveau de la population et confirme les conclusions formulées à partir des données d'allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction.

3.3.3. Chimiotoxicité et radiotoxicité de l'uranium

La toxicité chimique de l'uranium est couramment considérée comme plus importante que sa radiotoxicité (Miller *et al.*, 2002 ; Sheppard *et al.*, 2005). Pour pouvoir comparer l'uranium aux substances radioactives, sa radiotoxicité a été évaluée grâce à des calculs de doses réalisés à partir des données de bioaccumulation. La bioaccumulation maximale a été observée chez les daphnies exposées à $75 \mu\text{g.L}^{-1} \text{U}$. Dans cette condition, les daphnies ont été exposées à un débit de dose maximal de $13 \mu\text{Gy.h}^{-1}$.

Une précédente étude réalisée par Alonzo *et al.* (2006), s'est intéressée aux effets de l'américium 241 (^{241}Am , émetteur alpha) sur *Daphnia magna*. Les effets observés lors de cette exposition à l' ^{241}Am sont beaucoup moins importants que ceux obtenus dans notre étude avec l'uranium, alors que les doses dans l'étude des effets de l' ^{241}Am étaient bien plus élevées que celles de l'U. En effet, lors d'une exposition à l' ^{241}Am , l'ingestion et la fécondité ne sont pas affectés jusqu'à un débit de dose de $7900 \mu\text{Gy.h}^{-1}$ alors que la masse sèche des œufs et la survie des juvéniles non nourris décroît à partir d'un débit de dose de $160 \mu\text{Gy.h}^{-1}$. La croissance somatique est, quant à elle, réduite après 16 jours à $900 \mu\text{Gy.h}^{-1}$ et la respiration augmente après 23 jours à $7900 \mu\text{Gy.h}^{-1}$.

Une autre étude (Gilbin *et al.*, 2007) s'est, quant à elle, attachée aux effets d'une exposition à une radiation gamma sur la daphnie, avec des débits de doses allant de 400 à $3100 \mu\text{Gy.h}^{-1}$. Cette étude a montré que l'irradiation gamma affecte la reproduction de *Daphnia magna* avec un temps de libération des pontes raccourci pour les daphnies irradiées (1 ou 2 jours d'avance à $3100 \mu\text{Gy.h}^{-1}$). A ce débit de dose, une réduction de la taille des pontes après 15 jours d'exposition a causé une réduction de la fécondité 21 jours de 21%. Contrairement aux résultats obtenus avec l'uranium, aucun changement n'a été détecté ni au niveau de la masse des œufs, ni au niveau de la respiration, de l'ingestion, ou de la croissance somatique.

Au regard de ces deux études, en comparaison avec le débit de dose maximum issu de l'exposition à l'uranium ($13 \mu\text{Gy.h}^{-1}$), il est donc peu probable que les effets du stress lié à la radiation alpha soient significatifs. Les effets observés dès $25 \mu\text{g.L}^{-1} \text{U}$ sur la reproduction et l'AECR résultent probablement en grande partie de sa toxicité chimique.

Comme les effets de l'uranium semblent liés principalement à sa toxicité chimique, les similitudes avec les autres métaux semblent donc intéressantes à examiner. Nous avons estimé dans notre étude une CE_{10} 21 jours de $59 \mu\text{M}$ ($14 \mu\text{g.L}^{-1} \text{U}$) pour la reproduction. Cette concentration est comparable aux valeurs rapportées dans la littérature pour le cadmium (33

μM) et le cuivre (118 μM), suggérant que l'uranium pourrait être considéré comme faisant partie des métaux les plus toxiques. Il est aussi important de noter que la toxicité du Cd et du Cu ressemble à celle rapportée pour l'uranium, en termes de nature d'effet produit. En effet, l'AEER lors d'un stress au cadmium ou au cuivre est fortement réduite résultant principalement d'une ingestion réduite. Les conséquences d'une exposition au Cu ou au Cd pour les organismes sont une croissance somatique réduite et une fécondité fortement altérée (Bodar *et al.*, 1988 ; Baird *et al.*, 1990 ; Knops *et al.*, 2001 ; Baillieul *et al.*, 2005). Ces résultats sont très différents de ceux obtenus avec l'Am-241 où le taux ingestion n'était pas touché et la fécondité des daphnies restait constante (Alonzo *et al.*, 2006).

Les mécanismes de toxicité du cadmium et du cuivre sont connus pour induire la production d'espèces réactives à l'oxygène lesquelles affectent les processus physiologiques (Stohs et Bagchi, 1995 ; Livingston, 2001). Comme certains métaux de transition, l'uranium active chimiquement des espèces réactives à l'oxygène via des réactions redox (Miller *et al.*, 2002 ; Yazzie *et al.*, 2003). Des recherches complémentaires seraient nécessaires pour tester si l'uranium, le cadmium et le cuivre partagent les mêmes mécanismes d'action et ainsi améliorer la compréhension des conséquences de l'exposition à l'uranium des organismes d'eau douce.

3.4. Principales avancées et conclusions

Cette étude de la toxicité de l'uranium a permis non seulement de mieux comprendre les effets de l'uranium chez la daphnie sur différents paramètres mais a permis aussi d'apporter des éléments pour l'étude du mélange binaire uranium-sélénium. Ces différents éléments ont été développés en plusieurs points :

3.4.1. Choix du milieu d'exposition pour les expérimentations visant à étudier la toxicité du Se seul et du mélange U et Se

Cette étude réalisée sur l'uranium a montré l'importance d'utiliser le milieu M4-pH7 pour les expérimentations concernant la toxicité de l'uranium, pour que l'uranium ne précipite pas et que sa biodisponibilité soit optimisée. Nous avons donc choisi de réaliser les prochaines expériences sur la toxicité du sélénium et sur la toxicité du mélange binaire uranium-sélénium dans ce milieu. Ce milieu même milieu bien que moins favorable aux daphnies que le milieu recommandé dans les tests normalisés, le M4-pH8 (Elendt, 1990), il permet malgré tout de maintenir l'élevage dans des conditions qui répondent aux critères de validité des tests normalisés. En effet, la fécondité de l'élevage est supérieure à 60 juvéniles par daphnie en 21 jours. De plus, l'élevage a été maintenu dans ce milieu M4-pH7 pendant 4 années consécutives sans qu'aucun phénomène de carence n'apparaisse au cours du temps, démontrant que ce milieu permet bien aux daphnies de se maintenir.

3.4.2. Un test chronique 21 jours raccourci à 7 jours

La revue bibliographique réalisée sur l'étude des effets des mélanges a mis en évidence qu'un grand nombre de conditions testées avec un nombre de réplicats important était nécessaire. Certains auteurs ont proposé de raccourcir le test reproduction classique 21 jours à 7 jours. Cette alternative nous a semblé intéressante à envisager, car elle nous permet multiplier les expériences, la durée d'expérience étant divisée par 3, et d'augmenter le nombre de conditions lors de chaque test. Les résultats obtenus de CE_{50} fécondité à 7 jours et 21 jours sont assez proches avec un effet plus fort à 7 jours qu'à 21 (annexe 12) avec une CE_{50} fécondité à 7 jours de $61 \pm 12 \mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$ et celle à 21 jours de $91 \pm 15 \mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$.

A 7 jours, la fécondité est estimée à partir des œufs présents dans la poche de ponte. Or le nombre d'œufs peut ne pas être représentatif de la capacité reproductive, dans le cas où une partie des œufs ne sont pas viables. Cependant, des tests réalisés sur les œufs ont montré que la viabilité des œufs n'était pas affectée pour la gamme de concentrations étudiées en exposition chronique. Ainsi, le nombre d'œufs peut être considéré comme représentatif du nombre de juvéniles viables. Le test 7 jours semble donc, dans ce cas de l'étude, représentatif des effets observés à 21 jours.

3.4.3. Paramètres d'étude retenus pour les expérimentations en mélange

Parmi tous les paramètres étudiés lors du test chronique 21 jours, la fécondité est le paramètre le plus sensible avec une CE_{10} de $14 \pm 7 \mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$. La fécondité a été choisie en premier pour l'étude des effets des mélanges car non seulement elle est sensible mais une relation dose-réponse suivant un modèle logistique a pu être mise en évidence. Ce paramètre ainsi qu'une gamme de concentration allant 10 à 100 $\mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$ (permettant d'avoir un effet attendu de 0 à 100%), ont alors été retenus pour établir le design expérimental des expériences de mélange.

Les autres paramètres étudiés ne présentent pas de relation dose-réponse aussi claire que celle observée pour la fécondité mais sont assez sensibles et permettent de mettre en évidence des effets dès la concentration d'exposition 25 $\mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$. Ces paramètres ont donc été mesurés par la suite même s'ils n'ont pas été intégrés dans des modèles permettant d'identifier les interactions entre les différents composés d'un mélange.

3.4.4. L'uranium : principalement une substance chimique toxique et non un stressor radioactif

Les résultats de cette étude ont montré que la toxicité de l'uranium était principalement due à sa chimiotoxicité. Le fait que l'uranium puisse être considéré comme une substance chimique est important pour la suite des expérimentations car cela permet d'exprimer l'exposition des daphnies à l'uranium en concentration dans le milieu. Dans le cas des stressors radioactifs, où la toxicité est due principalement à leurs propriétés radiologiques, l'exposition des individus est exprimée en dose en lien avec concentration internalisée. Exprimer l'exposition à l'uranium des daphnies en dose aurait rendu plus difficile l'utilisation des modèles dose-réponse utilisés dans le cadre de l'étude des effets de mélange.

Chapitre 4. Effets du sélénium

4.1. Introduction

Comme l'étude bibliographique nous l'a montré, il existe dans les écosystèmes aquatiques continentaux principalement deux formes de sélénium : le sélénite et le séléniate. De nombreuses études se sont intéressées à la toxicité du sélénium sous ces deux formes chez les organismes aquatiques. Les données de la littérature ont aussi montré pour chacune des formes des toxicités assez proches.

Un premier objectif de cette étude des effets du sélénium chez la daphnie a été de vérifier que la toxicité du sélénite et du séléniate était assez proche comme le suggéraient les résultats de la littérature. Ces expérimentations ont eu pour but de déterminer la toxicité du sélénite et du séléniate dans les conditions physico-chimiques de notre milieu choisi suite aux expériences réalisées sur l'uranium.

La seconde partie de ce travail avait non seulement pour but d'étudier les effets chroniques du sélénium, mais aussi d'essayer de mettre en évidence les zones de carence et de toxicité du sélénium grâce à différents paramètres et surtout de déterminer la concentration à partir de laquelle le sélénium peut être considéré comme toxique. En effet, dans les expérimentations en mélange il est nécessaire, pour appliquer les modèles de mélange utilisés habituellement pour les substances chimiques, que les deux éléments soient considérés comme toxiques. La difficulté de cette étude a résidé dans le fait que la gamme de concentrations pour laquelle le sélénium passe d'essentiel à toxique est très étroite (Hodson et Hilton, 1983 ; USEPA, 2004). Différents paramètres, tels que la survie, la croissance, la reproduction et la respiration ont donc été choisis pour identifier ces différentes zones.

4.2. Résultats

4.2.1. Toxicité aigüe

L'objectif du test a été d'étudier les effets aigus du sélénite et du séléniate sur *Daphnia magna*. Dans un tout premier temps, nous avons réalisé les calculs J-Chess pour avoir une idée du comportement du sélénite et du séléniate dans l'eau. Ces simulations ont pu mettre en évidence que, dans le milieu M4-pH7, le sélénite s'oxyde théoriquement entièrement sous forme de séléniate à l'équilibre thermodynamique.

Cependant les mesures réalisées par HG-QFAAS nous ont permis de nous assurer que, dans les expérimentations visant à étudier la toxicité du sélénite, le sélénite que l'on introduisait dans nos échantillons test n'était pas oxydé le temps de l'expérimentation (moins de 10% de séléniate présent correspondant à l'incertitude de mesure de la technique).

Les tests aigus réalisés sur les deux formes de sélénium ont donc permis d'établir des courbes dose-réponse pour chaque substance (Annexe 13). Les concentrations létales entraînant 50% de mortalité (CE₅₀) calculées à partir de ces tests ont été présentées dans le tableau 7.

Tableau 7: CE₅₀ issues des courbes doses réponse établies pour le sélénite et séléniate après 24 et 48 heures d'exposition. Toutes les valeurs sont données avec l'intervalle de confiance à 95%.

	Sélénite ($\mu\text{g.L}^{-1}$ Se)		Séléniate ($\mu\text{g.L}^{-1}$ Se)	
	24h	48h	24h	48h
CE ₅₀	4120±145	1868±85	4635±269	1985±180

Les données présentées dans le tableau 7 montrent des valeurs de toxicité très proches pour les deux formes de sélénium (sélénite et séléniate) comme cela avait été précédemment observé dans la littérature. En effet, il a été montré que la bioaccumulation du sélénium était très semblable pour les deux formes : Besser *et al.* (1993) ont mesuré une concentration

bioaccumulée de sélénium au bout de 48h d'exposition de $18,0 \pm 1,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec de daphnie pour une exposition à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se sous forme de sélénite et de $12,4 \pm 1,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec pour une exposition à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se sous forme de séléniate.

De plus, les valeurs obtenues lors de nos expériences sont très proches des données de la littérature. En effet, Johnston *et al.* (1987) ont mesuré une CE_{50} 48 h de $1680 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se sous forme de sélénite. Les données obtenues par cette même étude pour le séléniate sont un peu plus faibles avec une CL_{50} 48 h de $550 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se. Cependant d'autres études présentent des valeurs de toxicité très comparables à nos données avec une CE_{50} 48 h allant de 2560 à 5300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se sous forme de séléniate (Ingersoll *et al.*, 1990 ; Dunbar *et al.*, 1983 ; Maier *et al.*, 1993). Ces informations confirment que la toxicité aigüe du sélénium chez *Daphnia magna* est peu sensible à la composition du milieu (résultats dans le milieu M4-pH7 en accord avec les données de la littérature) et ainsi confirment que l'utilisation du milieu M4-pH7 n'a pas d'influence majeure inattendue sur la toxicité du sélénium. Au vu de ces résultats, seule la forme sélénite a été retenue pour la poursuite des expérimentations (effets chroniques et effets en mélange).

4.2.2. Toxicité chronique du sélénite

Dans cette étude, différents paramètres ont été choisis pour étudier la toxicité chronique du sélénite comme la mortalité, la reproduction, la croissance et la respiration. Un suivi du sélénite dans notre milieu d'exposition a été réalisé afin de nous assurer que le sélénite n'était pas oxydé durant le temps de l'exposition.

4.2.2.1. Mortalité

La survie des adultes a été affectée uniquement à la plus forte concentration de sélénite étudiée ($450\mu\text{g.L}^{-1}\text{ Se}$): à 21 jours, 4 daphnies sur 13 ont survécu, ce qui équivaut à un taux de survie de 30,8%.

4.2.2.2. Croissance

Le poids sec des adultes à la ponte 2 est plus faible pour les daphnies exposées à 0, 110, 220 $\mu\text{g.L}^{-1}\text{ Se}$ que pour les daphnies témoin (Figure 40). Après la libération des pontes 4 et 6, cette réduction de masse sèche n'est pas significative par rapport au témoin quelle que soit la concentration appliquée.

La croissance des adultes est réduite seulement après la libération des juvéniles de la 3^{ème} ponte pour les concentrations 0, 110 et 220 $\mu\text{g.L}^{-1}\text{ Se}$, un phénomène de compensation semblerait aussi se mettre en place pour ce paramètre à partir de cette ponte.

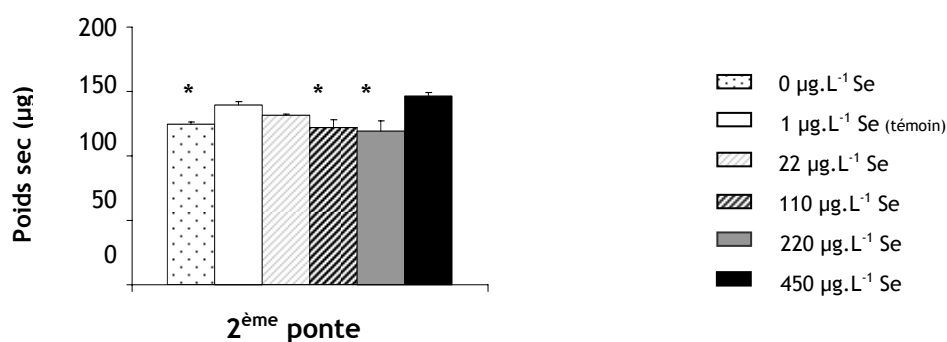


Figure 40: Masse sèche des adultes en μg à la 2^{ème} ponte en fonction de la concentration en sélénium dans le milieu d'exposition. . ANOVA : * $p < 0,05$, Barre d'erreur =SE, $n=10$.

4.2.2.3. Reproduction

1) Jour de 1^{ère} ponte

Les observations quotidiennes des daphnies ont pu mettre en évidence que la 1^{ère} ponte (jour de maturation) des daphnies exposées à la plus forte concentration en Se ($450\mu\text{g.L}^{-1}$ Se) a été plus tardive que celle des témoins. Un décalage de 3,42 jours par rapport au témoin a été observé.

Le suivi des mues a montré que la maturation a été non seulement plus tardive mais aussi décalée au niveau des mues (Figure 41). Les durées entre les mues ont été aussi significativement plus longues au niveau des pontes suivantes pour les trois plus fortes concentrations 110, 220 et $450\mu\text{g.L}^{-1}$ Se, avec un décalage de plus d'un jour et demi.

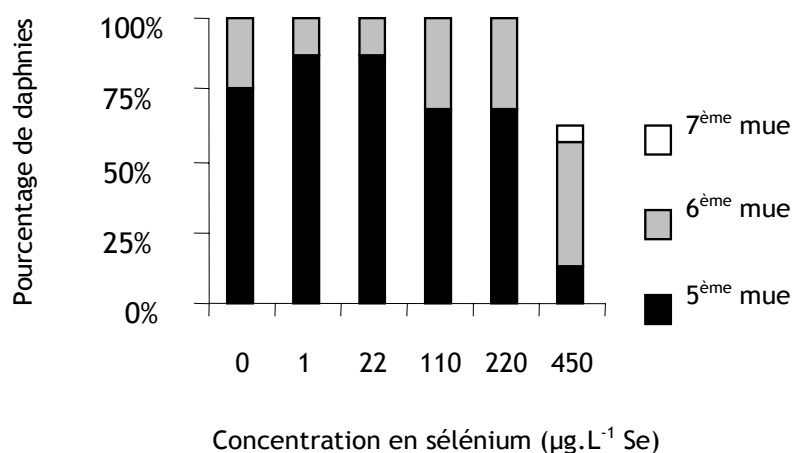


Figure 41: Répartition du pourcentage des daphnies devenant matures à la 5^{ème}, la 6^{ème} ou la 7^{ème} mue en fonction de la concentration en sélénium dans le milieu d'exposition. n =10

Le retard de maturité significatif qui a été observé pour la plus forte concentration ($450\mu\text{g.L}^{-1}$ Se) indique que la reproduction est affectée, et aussi que la dynamique des populations serait à cette concentration fortement touchée. En effet, un retard de la première ponte peut avoir des conséquences majeures au niveau de la dynamique de population.

2) Fécondité 7 jours et 21 jours

Concentration entraînant 50% d'effet sur la fécondité au bout de 21 jours (CE_{50} fécondité 21 j)

Une valeur de CE_{50} fécondité 21 jours de $330 \pm 30 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se a été calculée. Cette valeur est très proche de celle rapportée par Adams et Heildolph, (1985) : CE_{50} fécondité 21 jours de $350 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se (Figure 42).

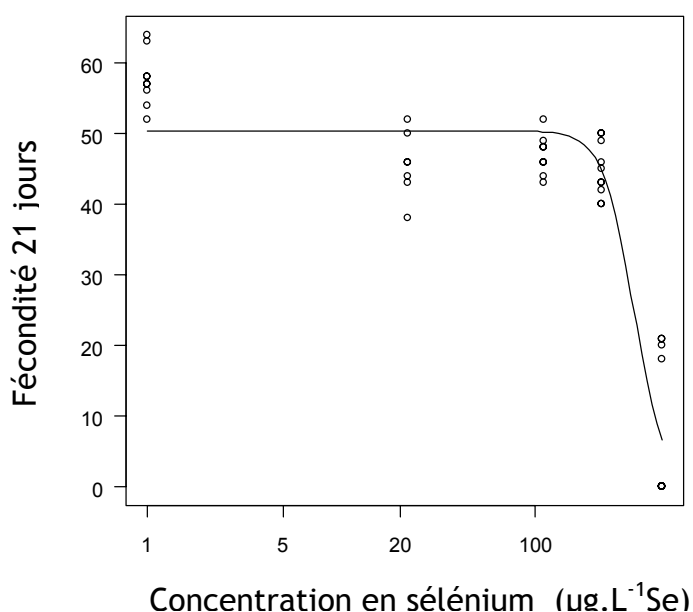


Figure 42 : courbe dose-réponse de l'effet sur la fécondité 21 jours en fonction de la concentration en sélénium dans le milieu d'exposition en $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se

Concentration entraînant 50% d'effet sur la fécondité au bout de 7 jours (CE_{50} fécondité 7 j)

Une CE_{50} fécondité 7 jours a été calculée en considérant que le nombre de juvéniles libérés par daphnie à la 1^{ère} ponte (à ~ 10 jours) était égal au nombre d'œufs à 7 jours ; les œufs non viables n'ont pas été pris en compte. Une valeur de CE_{50} reproduction 7 jours = $350 \pm 50 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se a alors été calculée (Annexe 14). Les deux valeurs de CE_{50} fécondité calculées à 7 et 21 jours sont similaires.

3) Fécondité en fonction des pontes

Lors des changements de milieu quotidiens, les juvéniles libérés par les mères ont été récupérés et comptés. Ce suivi quotidien a permis de montrer que le nombre de juvéniles par ponte est significativement plus faible aux trois plus fortes concentrations (110, 220 et 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se) par rapport au témoin pour les pontes 1 et 2 et est plus variable pour les autres pontes (Figure 43).

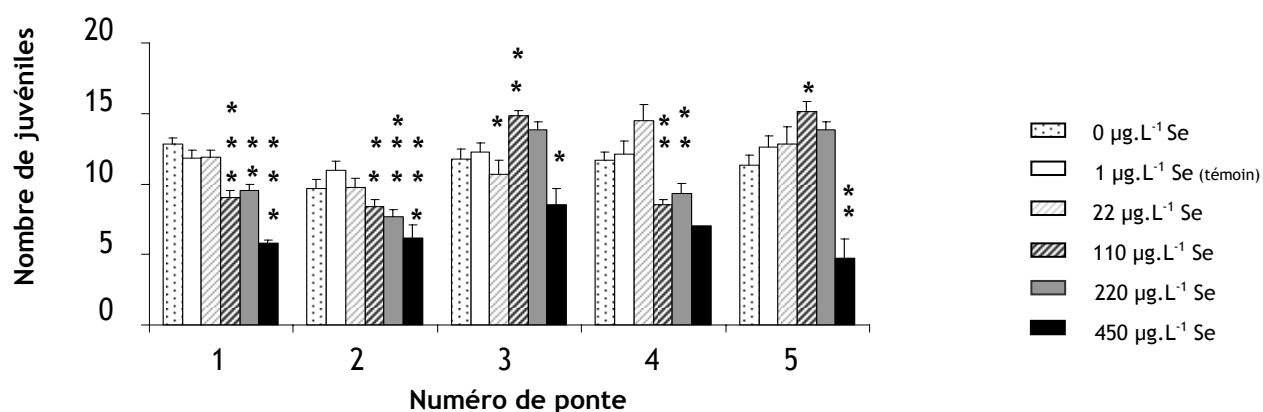


Figure 43: Nombre de juvéniles par ponte en fonction de la concentration en sélénium dans le milieu d'exposition. . ANOVA : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Barre d'erreur = SE. $n=10$.

Le nombre de juvéniles est réduit pour les concentrations en Se $\geq 110 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour les deux premières pontes. Pour les pontes suivantes, le nombre de juvéniles est très variable. Le suivi des pontes et des mues a mis en évidence un temps entre les pontes allongé aux plus fortes concentrations en sélénium ($\geq 110 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se), ce qui suggère un phénomène de compensation.

4) Poids sec des juvéniles et des œufs

Le poids sec des juvéniles a été mesuré pour toutes les pontes de chaque daphnie. Ce suivi du poids sec des juvéniles, a montré une réduction significative de la masse des juvéniles issus de la 5^{ème} ponte, pour toutes les concentrations comparées au contrôle (Figure 44). Pour les autres pontes, aucune différence significative n'a été observée.

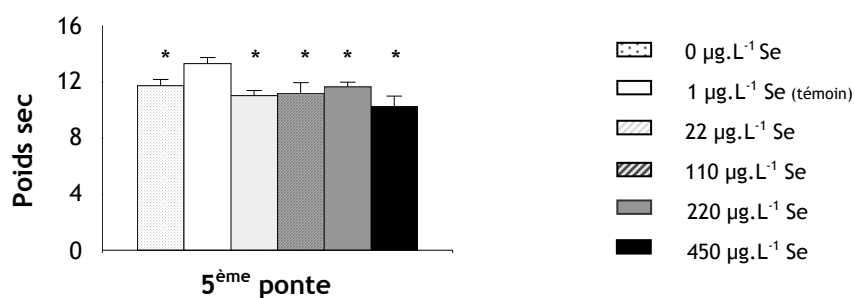


Figure 44 : Poids sec des juvéniles en µg issus de la 5^{ème} ponte en fonction de l'exposition en sélénium
ANOVA : *p<0,05, Barre d'erreur =SE. n=10.

Le suivi du poids sec des œufs n'a pas montré de différences significatives (résultats non présentés).

5) Sensibilité des œufs

Les œufs de daphnies disséqués et placés dans une concentration de 2 mg.L⁻¹ Se équivalente à la CE₅₀ 48h du sélénite, n'ont montré aucun retard de développement par rapport aux œufs placés dans des conditions contrôle. Aucune malformation n'a été observée. Comme pour l'uranium, les œufs semblent donc moins sensibles au sélénite que les juvéniles, ce qui est probablement dû au fait que les œufs sont protégés une grande partie de leur développement par la membrane embryonnaire très peu perméable.

4.2.2.4. Coût métabolique

La respiration, c'est-à-dire la consommation en oxygène, a été mesurée à la libération des pontes 2,4 et 6. Une augmentation significative de la consommation en oxygène a été observée aux concentrations 110, 220 et 450 µg.L⁻¹ Se à la 2^{ème}, 4^{ème} ponte (pas de données pour la condition 450 µg.L⁻¹ Se) et 6^{ème} ponte (Figure 45). A la 6^{ème} ponte, cette augmentation est aussi significative pour les daphnies exposées à la concentration 22 µg.L⁻¹ Se.

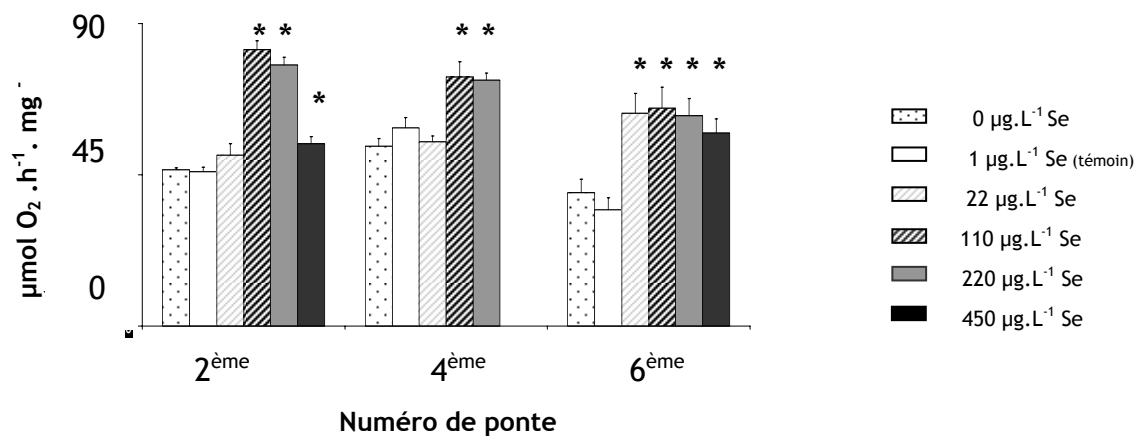


Figure 45 : Consommation en oxygène ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) en fonction de la concentration en sélénium dans le milieu d'exposition et du numéro de ponte. ANOVA : * $p < 0,05$. Barre d'erreur = SE. $n=3$

La respiration est le paramètre le plus sensible suivi lors de cette étude. A la 6^{ème} ponte, une consommation en oxygène plus élevée des daphnies exposées à des concentrations supérieures ou égales à $22 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se révèle un coût métabolique plus élevé de survie en condition de stress.

4.2.2.5. Effet sur la population

Les données de mortalité et de reproduction ont été intégrées dans une matrice de Leslie afin de les regrouper et d'évaluer l'impact du sélénium sur la dynamique des populations (Figure 46).

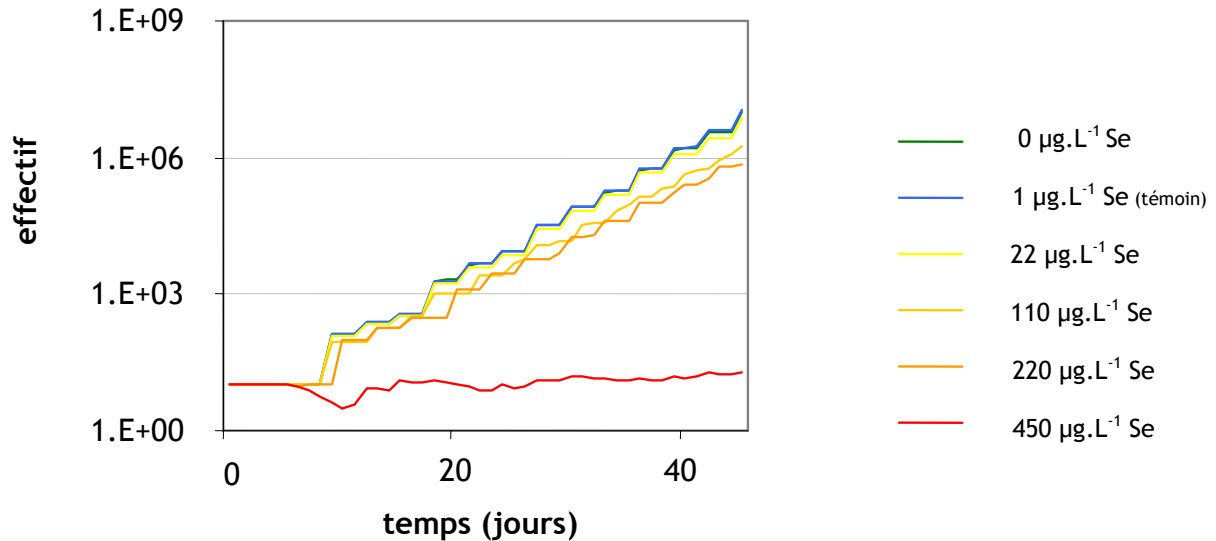


Figure 46 : Evolution de l'effectif au cours du temps en fonction de la concentration en sélénium

Les résultats présentés dans la figure 46 mettent en évidence le fort impact de la baisse de reproduction pour la plus forte concentration (450 µg.L⁻¹ Se). Les deux concentrations, 110 et 220 µg.L⁻¹ Se, se détachent des plus faibles concentrations d'exposition et montrent ainsi un impact significatif de l'exposition au sélénium à ces deux concentrations.

4.3. Discussion

4.3.1. Effets aigus du sélénite et du séléniate

Le test aigu a permis de comparer nos données à celles de la littérature et de confirmer que, chez la daphnie, le sélénite et le séléniate avaient des valeurs de toxicité aigüe proches.

4.3.2. Différenciation entre la zone de carence et de toxicité du sélénium et sensibilité des différents critères d'effet du sélénite

Le test chronique de toxicité du sélénium a pu montrer qu'à la plus forte concentration étudiée, $450\mu\text{g.L}^{-1}$ de Se (concentration létale), des effets ont été observés sur tous les paramètres suivis au cours de l'expérimentation.

Pour une exposition à des concentrations sub-létales ($110\text{-}220\mu\text{g.L}^{-1}$ Se), une croissance réduite a été observée uniquement au moment de la 1^{ère} ponte. Une réduction significative du nombre de juvéniles par daphnie a été mise en évidence pour les deux premières pontes. A partir de la 3^{ème} ponte, une durée plus grande du temps entre les mues illustrerait le phénomène de compensation observé. Cependant malgré cette compensation, la masse sèche des juvéniles issus de la 5^{ème} ponte est réduite. Une augmentation significative de la consommation en oxygène chez les daphnies exposées à ces concentrations en sélénium sub-létales traduirait le coût métabolique supplémentaire lié au stress engendré par le sélénium. Une modélisation simple de dynamique de population grâce à des matrices de Leslie utilisant les paramètres démographiques issus des expériences a permis de mettre en évidence l'impact potentiel sur la population.

L'exposition des daphnies à $22\mu\text{g.L}^{-1}$ Se n'a apparemment pas d'effet significatif étudié sur la croissance et la fécondité, pendant la durée d'exposition. Néanmoins à la 5^{ème} ponte, une réduction du poids sec des juvéniles ainsi qu'une augmentation de la consommation en oxygène semblent montrer que le sélénium à cette concentration induit déjà un stress qui pourrait potentiellement s'accroître aux générations suivantes. Le sélénium semble donc toxique chez la daphnie dès une concentration d'exposition de $22\mu\text{g.L}^{-1}$ Se.

L'exposition des daphnies à un milieu ne contenant pas de sélénium entraîne une réduction des poids secs des adultes à la 2^{ème} ponte. Cependant aucun effet n'a été observé à la première génération sur la fécondité et sur la respiration. Seuls les poids secs des juvéniles issus de la 5^{ème} ponte sont significativement plus faibles. Pour observer des effets de carence en sélénium plus marqués, il serait nécessaire de réaliser des tests multi-génération.

4.4. Principales avancées et conclusions

4.4.1. Un test chronique raccourci à 7 jours pour les expérimentations en mélange

L'étude des effets chroniques du sélénium a montré grâce aux différents paramètres pris en compte que des phénomènes de compensation semblaient se mettre en place au cours du temps. Dans le cas de l'étude des effets des mélanges, il semble très difficile de pouvoir distinguer les effets de compensation des interactions entre les différents composés du mélange. Ces phénomènes conduiraient à une interprétation difficile des résultats de mélange.

Néanmoins, les résultats sur 7 jours ont démontré que l'on pouvait estimer une CE₅₀ proche de celle déterminée sur le critère fécondité à 21 jours. En effet, la CE₅₀ fécondité 7 jours et la CE₅₀ fécondité 21 jours sont quasiment identiques.

Comme pour l'étude réalisée sur les effets de l'uranium, des tests œufs ont été réalisés. Ils ont montré que la viabilité des œufs n'était pas affectée pour la gamme de concentrations étudiées. Lors une exposition à du sélénite, le nombre d'œufs peut donc être considéré comme représentatif du nombre de juvéniles viables. Des tests chroniques sur une durée de 7 jours sembleraient donc tout à fait adaptés à l'étude des mélanges, en particulier sélénium-uranium.

4.4.2. Paramètres d'étude retenus pour les expérimentations en mélange

Comme pour l'uranium, parmi les paramètres étudiés lors du test chronique 21 jours, la fécondité est le paramètre le plus sensible et le seul où une relation dose-réponse a pu être mise en évidence. Ce paramètre ainsi qu'une gamme de concentration allant 22 à 450 µg.L⁻¹U (permettant d'avoir un effet attendu de 0 à 100%), ont alors été retenus pour établir le design expérimental des expériences de mélange.

Parmi les autres paramètres, la mesure de respiration semble assez sensible (effet significatif dès $22 \mu\text{g.L}^{-1}\text{Se}$) et intéressante à étudier dans le cadre des effets du mélange uranium-sélénium (même si ce paramètre n'a pas permis d'établir de relation dose-réponse et ne pourra pas être intégré dans des modèles de mélange permettant d'identifier les interactions).

4.4.3. Le sélénium, un élément toxique à partir de $22 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se

Le test chronique 21 jours avec la mesure de différents paramètres au niveau macroscopique a permis de mettre en évidence que le sélénium est un élément toxique pour la daphnie à partir d'une exposition à $22 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se. Cette concentration toxique était importante à déterminer car dans l'étude des effets de mélange, il est nécessaire d'appliquer les différents modèles sur deux éléments toxiques.

En conclusion, un test de 7 jours avec des concentrations en sélénium supérieures à $22 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se semble, au vu des résultats de toxicité du sélénium, adapté pour étudier les effets du mélange uranium-sélénium chez *Daphnia magna*.

Chapitre 5. Effets du mélange uranium-sélénium

5.1. Introduction

Les deux premières parties de cette étude consacrées à la détermination des effets des substances seules, ont permis non seulement d'améliorer les connaissances sur les effets toxiques de ces deux éléments sur la daphnie, mais aussi d'obtenir les données nécessaires pour établir le design expérimental à utiliser et de dégager un certain nombre de points à prendre en compte dans l'étude du mélange uranium-sélénium.

Il nous a été possible d'établir que le mélange uranium-sélénium pouvait être étudié comme un mélange de deux substances chimiques classiques. En effet, l'étude des effets de l'uranium a mis en évidence le fait que l'uranium était principalement chimiotoxique. L'étude consacrée aux effets du sélénium a, quant à elle, pu montrer que, bien que le sélénium soit un élément essentiel, il est toxique pour la daphnie dès $22 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se. Grâce aux modèles classiques d'additivité, d'indépendance d'action et d'addition des concentrations, nous avons pu définir un design expérimental adéquat.

Deux grands objectifs se dégagent de l'étude des effets du mélange uranium-sélénium. Le premier est de tester les outils, les modèles et les méthodes d'analyses utilisés afin d'identifier une interaction entre deux substances d'un mélange. Le second, plus spécifique, est d'identifier et de caractériser les éventuelles interactions entre l'uranium et le sélénium.

Etude des mélanges binaires

Dans le cadre du premier objectif, nous avons choisi deux méthodes d'analyse des effets de mélanges binaires : celle de Sorensen *et al.* (2007) et celle de Jonker *et al.* (2005). Ces deux méthodes ont été choisies car elles permettent de mettre en évidence une interaction de façon robuste entre deux substances d'un mélange et aussi de définir un paramètre d'interaction.

La première partie a été consacrée à la comparaison des deux méthodes statistiques de Sorensen *et al.* (2007) et de Jonker *et al.* (2005).

La deuxième partie a été de s'attacher à la comparaison des résultats des deux modèles de références CA et IA pour ainsi observer lequel de ces deux modèles est le plus proche de nos données.

Dans un troisième point, nous avons cherché si les conclusions étaient différentes en fonction du temps et s'il était possible d'établir un lien entre les effets aigus et chroniques.

La quatrième partie a eu pour but de présenter les résultats obtenus pour les différents paramètres étudiés et montrer l'intérêt des mesures intégratrices comme les bilans d'énergie pour mieux appréhender les interactions.

Etude du mélange uranium-sélénium

Le second objectif était d'identifier une éventuelle interaction entre l'uranium et le sélénium lorsqu'ils sont en mélange. Utiliser deux méthodes d'analyse statistique pour traiter les données d'effet aigu du mélange, nous a permis de tester la cohérence de leur conclusion. Les effets aigus mais aussi chroniques du mélange nous ont semblé complémentaires et nécessaires pour essayer de comprendre les mécanismes d'actions mis en jeu.

Les précédentes expériences sur substances seules ont permis de montrer l'intérêt d'un test raccourci à 7 jours et de choisir les paramètres les plus sensibles : fécondité, croissance et allocation de l'énergie à la croissance et à la reproduction (AEER). Des mesures de la quantité de lipides par daphnie ont été ajoutées à cette liste dans le but d'estimer les réserves énergétiques des daphnies. Les différents paramètres mesurés ont été choisis afin d'établir des bilans d'énergie.

Pour répondre à ces deux principaux objectifs, nous avons choisi de réaliser deux tests : un test aigu et un test chronique. Différents paramètres, différents temps d'exposition ainsi que différentes méthodes d'analyses statistiques ont été choisis.

5.2. Design expérimental - choix des concentrations

5.2.1.1. Toxicité aigüe

A partir des données de toxicité aigüe obtenues à 48h avec les substances seules, nous avons choisi de nous placer à 5 ratios fixes de mélanges différents (le ratio des CE₁₀, CE₂₅, CE₅₀, CE₇₅, CE₉₀) avec 5 concentrations sur chaque ratio.

Pour se placer, par exemple, au ratio des CE₁₀, comme la CE₁₀ U 48h ~ 170µg.L⁻¹ U et CE₁₀ Se 48h ~ 1600µg.L⁻¹ Se, le rapport des CE₁₀ est de 9,5 soit un ratio d'environ 1:10 (U:Se). Pour ce ratio des CE₁₀, nous avons réparti les concentrations du mélange pour obtenir des effets prédits par le modèle d'indépendance d'action (IA) et celui d'addition des concentrations (CA) entre 0 et 100% d'effet. Sur le même principe, les calculs ont été réalisés pour les autres ratios et sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Design expérimental avec les concentrations étudiées du mélange et l'effet attendu de chaque mélange selon les modèles d'addition des concentrations (CA) et d'indépendance d'action (IA).

	Concentration en µg.L ⁻¹			Effet attendu calculé à partir des données des substances seules	
	U	Se	dilution	IA	CA
Ratio de mélange 1 Ratio des EC ₁₀ U et Se Ratio de concentration 1:10 (U:Se)	300	3000		87%	72%
	240	2400	1.25	73%	55%
	150	1500	2	34%	19%
	75	750	4	6%	2%
	37.5	375	8	1%	0%
Ratio de mélange 2 Ratio des EC ₂₅ U et Se Ratio de concentration 2:15 (U:Se)	300	2250		76%	51%
	240	1800	1.25	58%	33%
	150	1125	2	24%	9%
	75	562.5	4	5%	1%
	37.5	281.25	8	1%	0%
Ratio de mélange 3 Ratio des EC ₅₀ U et Se Ratio de concentration 1:5 (U:Se)	500	2500		90%	63%
	400	2000	1.25	80%	44%
	250	1250	2	47%	13%
	125	625	4	13%	1%
	62.5	312.5	8	3%	0%
Ratio de mélange 4 Ratio des EC ₇₅ U et Se Ratio de concentration 2:7 (U:Se)	750	2800		97%	73%
	600	2240	1.25	91%	56%
	375	1400	2	68%	19%
	187.5	700	4	27%	2%
	93.75	350	8	7%	0%
Ratio de mélange 5 Ratio des EC ₉₀ U et Se Ratio de concentration 2:5 (U:Se)	640	1600		88%	30%
	512	1280	1.25	80%	14%
	320	800	2	55%	3%
	160	400	4	20%	0%
	80	200	8	5%	0%

5.2.1.2. Toxicité chronique

Pour étudier la toxicité chronique, nous avons choisi le design expérimental en raies en fonction des données de reproduction 7 jours obtenues précédemment avec une EC_{50} pour le sélénium et pour l'uranium respectivement de $350 \pm 50 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se et de $61 \pm 15 \mu\text{g.L}^{-1}$ U. Les expérimentations chroniques étant expérimentalement plus lourdes à mettre en œuvre que les expérimentations aiguës, nous avons choisi d'étudier un seul ratio de mélange sur lequel, comme pour le test aigu, 5 concentrations de mélange ont été réparties.

Un ratio 1:5 a donc été choisi car il permet à la fois d'être proche du ratio des CE_{50} et des concentrations déjà étudiées pour la toxicité des substances isolées qui sont pour l'uranium de 100, 75, 50, 25 et $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ U et pour le sélénium de 450, 220, 110, 22 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se. Nous avons donc étudié les effets du mélange U-Se aux concentrations suivantes :

Tableau 9 : Design expérimental avec les concentrations étudiées du mélange et l'effet attendu de chaque mélange selon les modèles d'addition des concentrations (CA) et d'indépendance d'action (IA).

	Concentration en $\mu\text{g.L}^{-1}$			Effet attendu calculé à partir des données des substances seules	
	Se	U	dilution	IA	CA
	500	100		97%	70%
Ratio des EC_{50} U et Se	375	75	1.33	94%	44%
Ratio de concentration 1:5 (U:Se)	250	50	2	85%	13%
	125	25	4	49%	0%
	50	10	10	10%	0%

5.3. Résultats

5.3.1. Interactions au niveau de la spéciation chimique

Des calculs de spéciation ont été réalisés dans le but de s'assurer que, dans nos conditions M4-pH7, il n'y a pas de modification de la concentration de l'ion libre uranium dans le milieu contenant uniquement de l'uranium et dans celui contenant le mélange uranium-sélénium.

Les calculs ont été réalisés grâce au logiciel J-Chess et avec la base de données OEDC-NEA complétée avec des données de Séby *et al.*, (2001) permettant de prendre en compte la formation de complexes entre l'uranyle et le séléniate (il n'y a pas de complexes connus pour le sélénite) UO_2SeO_4 et $\text{UO}_2(\text{SeO}_4)^{2-}$. Ces calculs ont été réalisés pour l'EC₅₀ U (~390 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U) et l'EC₅₀ Se (~2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se) à 48h en prenant en compte ou non l'oxydo-réduction. Dans le cas où l'oxydo-réduction est prise en compte, le sélénite introduit est majoritairement transformé en séléniate à l'équilibre (voir chapitre 4). Les résultats des simulations J-Chess sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Concentrations en UO_2^{2+} , UO_2SeO_4 et $\text{UO}_2(\text{SeO}_4)^{2-}$ dans du milieu M4-pH7 à l'EC₅₀ U (~390 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U) et l'EC₅₀ Se (~2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se) obtenues grâce à des simulations J-Chess en prenant en compte l'oxydo-réduction (redox) ou non.

concentration en U en $\mu\text{g.L}^{-1}$	concentration en Se en $\mu\text{g.L}^{-1}$	concentration en UO_2^{2+} en mol.L^{-1}	concentration en UO_2SeO_4 en mol.L^{-1}	concentration en $\text{UO}_2(\text{SeO}_4)^{2-}$ en mol.L^{-1}	redox
390	-	$6,019 \times 10^{-10}$	-	-	non
390	-	$6,019 \times 10^{-10}$	-	-	oui
390	2000	$6,019 \times 10^{-10}$	-	-	non
390	2000	$6,018 \times 10^{-10}$	$3,436 \times 10^{-13}$	$5,477 \times 10^{-18}$	oui

Les résultats montrent que la concentration en ion libre UO_2^{2+} n'est pas significativement modifiée par l'ajout de sélénite dans le milieu. Les deux espèces UO_2SeO_4 et $\text{UO}_2(\text{SeO}_4)^{2-}$ ne sont formées que dans les conditions où l'oxydo-réduction est prise en compte, c'est-à-dire quand le sélénite s'oxyde en de séléniate. Or les mesures précédentes (chapitre 4) ont montré que l'oxydation du sélénite en séléniate n'était pas visible (<10%, au regard des incertitudes de mesures).

Ces calculs nous ont ainsi permis de nous assurer que, même avec la présence résiduelle de séléniate, la spéciation de l'uranium n'était pas modifiée dans nos conditions de mélange uranium-sélénium. Ainsi, aucune interaction n'est attendue au niveau de la spéciation chimique des deux substances dans le milieu, ni au niveau de la biodisponibilité.

5.3.2. Identification des interactions sur la toxicité aigüe

5.3.2.1. Substances seules

Une relation dose-réponse suivant un modèle logistique a été observée dans les expériences où les substances seules ont été testées allant de 0 à 100% d'effet. Les paramètres dose-réponse des expériences de toxicité de l'uranium et du sélénium sont donnés dans le tableau 11. Pour l'uranium et le sélénium les valeurs des CE_{50} (e) sont plus faibles à 48h qu'à 24h. La différence entre les effets de l'uranium à 24h et 48h d'exposition est d'un facteur 8 environ alors que cette même différence pour le sélénium est d'un facteur 2 environ.

Tableau 11 : Paramètres dose-réponse de la courbe logistique ajustés sur les données des substances seules (U et Se). Dans cette équation logistique $c=0$, $d=1$, b est la pente au niveau de e qui est la CE_{50} de la courbe dose-réponse. Toutes les valeurs sont données +/- leur erreur standard.

<u>Paramètres</u>	<u>U</u>		<u>Se</u>	
	<u>24h</u>	<u>48h</u>	<u>24h</u>	<u>48h</u>
b (pente)	2.2 ± 0.4	2.2±0.3	4.9±0.8	3.6±0.5
e (CE_{50})	2514±321	303±32	4141±217	2217±147

5.3.2.2. Mélange binaire uranium-sélénium

Les résultats d'analyse des données avec les méthodes proposées par Sørensen *et al.* (2007) et Jonker *et al.* (2005) sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12: Valeurs issues des analyses de données du mélange binaire uranium-sélénium réalisées avec les deux méthodes: Sørensen *et al.* (2007) et Jonker *et al.* (2005).

Sørensen <i>et al.</i> (2007)				Jonker <i>et al.</i> (2005)						
Paramètres du modèle	CA			Paramètres du modèle	CA			IA		
	ref	Hewlett	Vølund		S/A	DR	DL	S/A	DR	DL
Paramètre(s) d'interaction (λ, η_1, η_2)		$\lambda=1.1$	$\eta_1=-0.08$	Paramètre(s) d'interaction (a, b_{DR}, b_{DL})	$a=0.713$	$a=3.699$	$a=1.117$	$a=-1.994$	$a=-3.707$	$a=-2.179$
Comparaison avec le modèle des CE ₅₀ variant librement (p), test F	0.506	0.410	$\eta_2=2.43$	Comparaison avec le modèle de référence CA ou IA (p[X ₂])		$b=-4.365$	$b=0.404$	$b=-8.918$	$b=-0.246$	
Comparaison avec le modèle de référence CA (p), test F		0.563	0.664	Comparaison avec le modèle S/A (p[X ₂])	2.00E-03	2.00E-03	9.00E-03	0.012	0.011	0.046
Conclusion	CA			Conclusion	Antagonisme	x	x	Synergie	x	x
Paramètre(s) d'interaction (λ, η_1, η_2)		$\lambda=0.08$	$\eta_1=1.82$	Paramètre(s) d'interaction (a, b_{DR}, b_{DL})	$a=2.346$	$a=3.506$	$a=0.811$	$a=1.473$	$a=4.201$	$a=2.064$
Comparaison avec le modèle des CE ₅₀ variant librement (p), test F	8.92E-14	0.035	$\eta_2=1.86$	Comparaison avec le modèle de référence CA ou IA (p[X ₂])		$b=2.101$	$b=1.040$	$b=-4.568$	$b=0.465$	
Comparaison avec le modèle de référence CA (p), test F		9.66 E-15	1.39 E-12	Comparaison avec le modèle S/A (p[X ₂])	6.84E-28	4.27E-28	1.52E-20	0.033	0.106	0.091
Conclusion	Antagonisme			Conclusion	Antagonisme	dépendance DR	x	Antagonisme	x	x

L'estimation des paramètres et de la valeur de p avec la méthode de Sørensen *et al.* (2007) ont été présentés dans le tableau 12 avec :

- la valeur moyenne des paramètres d'interaction des modèles d'isobole de Hewlett (λ) et de Vølund (η_1, η_2).
- la valeur de p du test F pour la comparaison du modèle de l'isobole avec le modèle des CE_{50} variant librement
- la valeur de p du test F pour la comparaison du modèle de référence d'addition des concentrations CA avec l'isobole de Hewlett et de Vølund.

L'estimation des paramètres et de la valeur de p des tests de Chi-deux avec la méthode de Jonker *et al.* (2005) ont été présentés de la façon suivante dans le tableau 12: Pour les deux modèles de référence d'addition des concentrations (CA) et d'indépendance d'action (IA), trois types de déviation de ces deux modèles (CA) et (IA) ont été testés: le modèle de déviation synergique et antagoniste (S/A), le modèle dépendant du niveau (DL) et le modèle dépendant du ratio de dose (DR). Le modèle S/A présente un paramètre d'interaction (a), alors que les modèles DR et DL en ont deux (a et b). Pour tous les tests de Chi-deux la valeur de p correspondante indique si la surface de réponse dévie significativement du modèle de référence et du modèle S/A. Les formules ainsi que la signification des paramètres des différents modèles sont présentés en annexe 1.

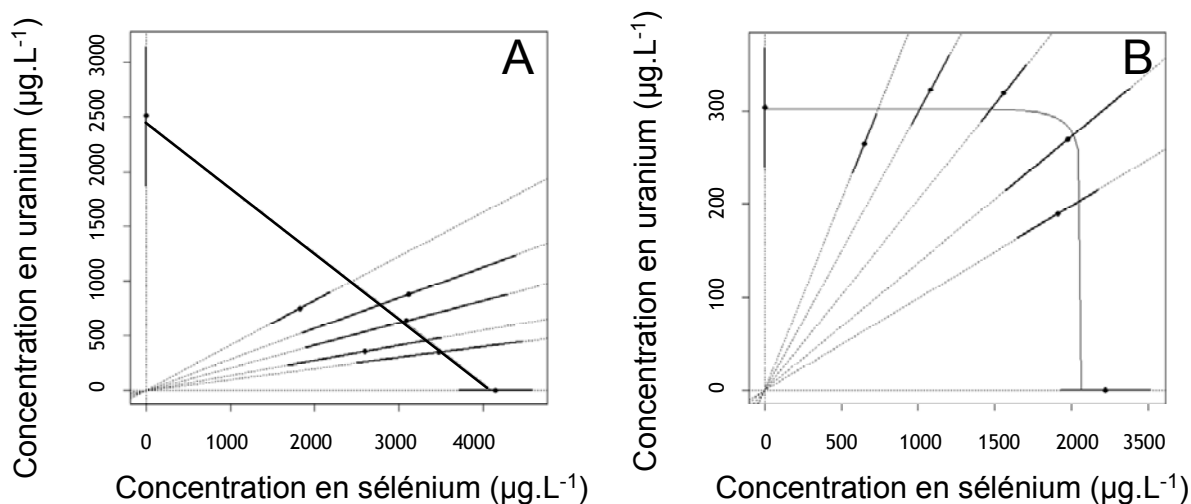


Figure 47 : Isobologramme pour le mélange uranium-sélénium à la concentration d'effet entraînant 50% de mortalité après 24h (A) et 48h (B) d'exposition. La ligne en trait plein décrit les isoboles ajustées. Les données des CE_{50} sont présentées \pm leur erreur standard. Les traits pointillés représentent les ratios de mélange.

1) Analyse des données à 24h

L'analyse des données de toxicité après 24h d'exposition par la méthode de Sørensen *et al.* (2007) montre que l'hypothèse de non interaction par le modèle d'addition des concentrations (CA) n'est pas rejetée. En effet, des tests F ont été réalisés pour comparer l'ajustement par le modèle de référence CA avec celui du modèle Hewlett, puis avec celui du modèle Vølund. Ces tests F n'ont pas montré de différences statistiques significatives ($p=0,563$ pour le modèle de Hewlett et $p=0,664$ pour le modèle de Vølund). De plus, selon la règle de parcimonie, le modèle CA est le modèle qui apparaît comme convenir le mieux. L'isobole correspondante est représentée sur la figure 47.

Contrairement aux résultats obtenus en utilisant la méthode statistique proposée par Sørensen *et al.* (2007), l'analyse des données de toxicité à 24h d'exposition par la méthode proposée par Jonker *et al.* (2005), amène à rejeter l'hypothèse de non interaction, pour les deux concepts de références IA et CA. En effet, pour ces deux concepts, l'ajustement du modèle synergie/antagonisme (S/A) est celui qui apparaît comme étant significativement meilleur que celui des modèles de référence IA et CA (test du chi-deux, $p=0,002$ pour le concept CA et $p=0,012$ pour le concept IA). Deux autres déviations possibles de ces modèles de référence ont été testées: le modèle DL (Niveau de dose), le modèle DR (Dose Ratio). Les résultats montrent que les deux modèles DL et DR ne décrivent pas mieux les données que les modèles S/A. Selon la règle de parcimonie, il a donc été conclu que les modèles S/A étaient ceux qui convenaient le mieux. Cependant, les types d'interaction qui ont été identifiés pour les deux concepts de IA et de CA ne vont pas dans le même sens. En effet, le modèle S/A présente une valeur positive du paramètre d'interaction ' a ' de 0,713 ; conduisant à la conclusion qu'il y a un phénomène antagoniste entre l'uranium et le sélénium. Pour le modèle de référence IA, le S/A modèle ajuste aussi mieux les données que le modèle de référence IA. Cependant, dans ce cas, ' a ' est négatif ($a = -1,99$) indiquant un effet synergique.

2) Analyse des données à 48h

L'analyse des données de toxicité après 48h d'exposition par la méthode de Sørensen *et al.* (2007), amène à rejeter l'hypothèse de non-interaction CA. Les comparaisons des 3 modèles (CA, Hewlett et Vølund) avec le modèle avec les CE_{50} variant librement montrent que le meilleur modèle est celui de Hewlett et cela même si la valeur de p du test F est seulement légèrement significative (0,035). Le paramètre d'interaction du modèle de Hewlett est positif ($\lambda=0,08$) indiquant que, dans le mélange U-Se, il y a un effet antagoniste, ce qui apparaît clairement sur l'isobole représentée sur la figure 47 B.

De la même façon, l'utilisation de la méthode d'analyse statistique de Jonker *et al.* (2005) conduit à rejeter les deux hypothèses de non interaction des concepts IA et CA, pour conclure à un effet antagoniste. Pour l'addition des concentrations, il apparaît que le modèle DR ajuste mieux les données (test du chi-deux, $p=0,0128$). Comme les valeurs des deux paramètres 'a' et 'b' sont positives, cela indique un effet antagoniste quand l'effet du mélange est considéré comme principalement causé par l'uranium et un effet encore plus antagoniste si l'effet du mélange est principalement attribué au sélénium. Pour le concept du IA, le modèle S/A apparaît comme celui qui ajuste au mieux les données. En effet, la comparaison de l'ajustement de ce modèle avec celui des deux modèles DL et DR n'est pas significative (test du chi-deux, $p= 0,106$ et $0,091$ respectivement pour les modèles DR et DL). Le paramètre d'interaction du modèle S/A 'a' est positif indiquant un effet antagoniste.

Pour conclure, quel que soit le concept de non interaction IA ou CA considéré et quelle que soit la méthode statistique utilisée, celle de Sorensen ou de Jonker, toutes les analyses convergent et montrent un effet antagoniste du mélange uranium-sélénium à 48h.

5.3.3. Identification des interactions sur la toxicité chronique

5.3.3.1. Reproduction

Substances seules

Une relation dose-réponse suivant un modèle logistique a été observée dans les expériences où les substances seules ont été testées allant de 0 à 100% d'effet. La CE_{50} fécondité à 7 jours pour le sélénium calculée est de 315 ± 15 Se $\mu\text{g.L}^{-1}$ et de 61 ± 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U pour l'uranium. Ces deux valeurs sont très proches de celles obtenues à 21 jours lors de nos précédentes études et de celles reportées dans la littérature. Ces résultats confirment l'intérêt d'un test chronique raccourci à 7 jours pour évaluer les effets sur la reproduction de la daphnie.

Mélange binaire

Les résultats des effets du mélange d'uranium-sélénium sur la fécondité ont été présentés dans la figure 48 ainsi que les effets théoriques calculés selon les concepts de référence CA et IA. La toxicité du mélange observée est plus faible que celle prédite à partir des deux modèles de référence indiquant un effet antagoniste. Si on compare la CE_{50} calculée à partir des valeurs observées et celle prédite par les deux modèles CA et IA, on remarque que la différence entre la CE_{50} calculée à partir des valeurs observées et celle prédite par le modèle de IA est plus faible que celle entre la CE_{50} calculée à partir des valeurs observées et celle prédite par le modèle de CA.

En effet, un facteur de 1,9 est observé entre la CE_{50} calculée à partir des valeurs observées ($340 \mu\text{g.L}^{-1}$ exprimé en concentration du mélange) et celle prédite par le modèle de CA ($180 \mu\text{g.L}^{-1}$ mélange). Ce facteur n'est plus que de 1,13 si l'on compare CE_{50} des valeurs observées et CE_{50} calculée par le modèle IA qui est de $300 \mu\text{g.L}^{-1}$.

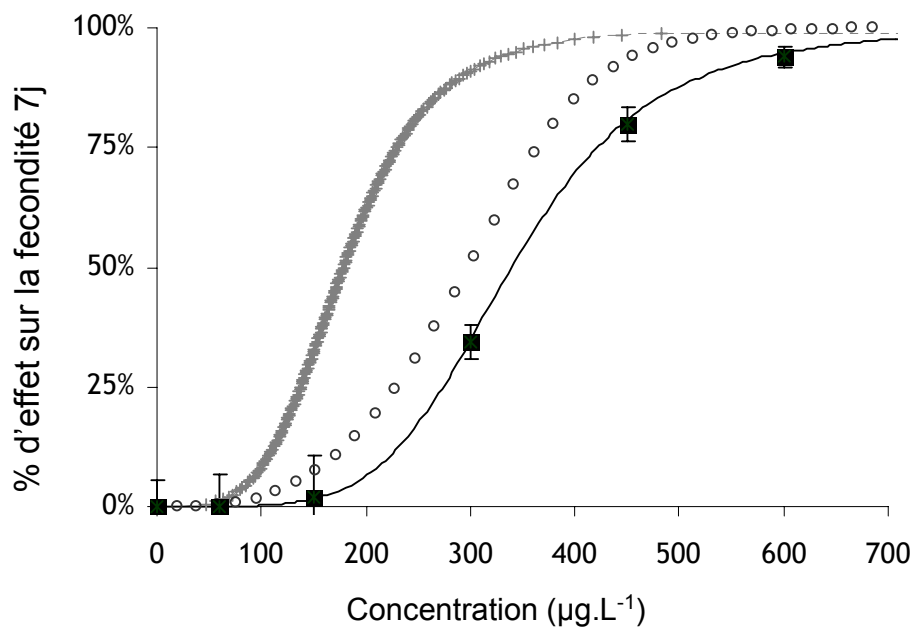


Figure 48 : Toxicité prédite et observée. Le ratio du mélange étudié est le ratio des CE_{50} s des substances seules U et Se, ---+--- Modèle de CA; $\circ \circ \circ$, Modèle IA. \blacksquare Valeurs observées (moyenne \pm erreur standard)

Les données de mélange ont été analysées avec la méthode statistique proposée par Jonker *et al.* (2005). Les résultats montrent un paramètre d'interaction 'a' positif quand le concept du IA ou du CA est considéré (tableau 12), indiquant un effet antagoniste ($a=2,41$ pour le modèle S/A venant du modèle CA et $a=2,34$ pour le modèle S/A venant du modèle IA). Les tests du Chi-deux utilisés pour comparer les modèles S/A avec les modèles de référence de non interaction CA ou IA présentent des valeurs ($p[X^2]$) significatives indiquant que le modèle antagoniste décrit mieux les données observées que le modèle de référence. Cependant cette valeur de p pour le modèle de IA comparée au modèle S/A est de 0,034 ; ce qui confirme que même s'il y a un effet antagoniste, le modèle IA est relativement proche des données observées. Pour conclure, les résultats obtenus à 7 jours confirment l'antagonisme observé à 48h d'exposition.

Tableau 13: Paramètres d'interaction de la méthode de Jonker *et al.* (2005) pour les modèles S/A dérivés des modèles de référence CA et IA ainsi que les valeurs de p des tests de comparaison des modèles de référence et leur modèle dérivé S/A.

Paramètre d'interaction (a) comparaison avec les modèles de référence IA ou CA (p) conclusion	Jonker <i>et al.</i> (2005)	
	CA, S/A	IA, S/A
	a=2,41	a=2,34
	4,49 10 ⁻¹⁷	0,034
	Antagonisme	Antagonisme

Les résultats de fécondité et de mesure du poids sec des œufs montrent que les œufs des daphnies exposées au sélénium sont moins nombreux aux plus fortes concentrations mais leur masse reste constante (Figure 49). Le nombre d'œufs ainsi que leur masse sont significativement réduits aux deux plus fortes concentrations en uranium ainsi qu'aux trois plus fortes concentrations du mélange uranium-sélénium.

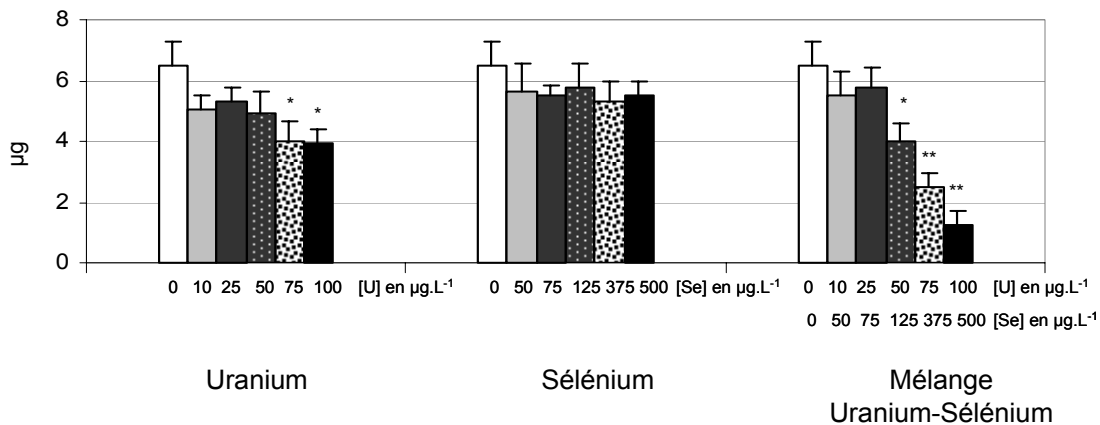


Figure 49 : Poids sec moyen des œufs en fonction des concentrations d'exposition en uranium et en sélénium (µg). ANOVA: *** $p < 0,01$, ** $p < 0,1$ par rapport au contrôle. Barre d'erreur: SE.

Ces résultats sur le poids sec des œufs mettent en évidence la difficulté d'appréhender les interactions d'un mélange binaire quand un des deux composés du mélange est sans effet. L'effet du mélange uranium-sélénium sur la masse des œufs semble donc principalement dû à la toxicité de l'uranium, et semble être accru par la présence de sélénium

5.3.3.2. Croissance

A 7 jours, les daphnies exposées à l'uranium présentent un poids sec réduit (Figure 50). Cette masse sèche somatique, c'est-à-dire sans les œufs, est significativement réduite comparée à celle des daphnies contrôle après 7 jours d'exposition pour des concentrations en uranium $\geq 50 \mu\text{g.L}^{-1}$. La masse sèche des daphnies exposées au sélénium est significativement plus faible que chez les contrôles mais seulement à la plus forte des concentrations étudiées ($500 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se). Pour les daphnies exposées au mélange uranium-sélénium, la masse somatique sèche est significativement réduite aux trois plus fortes concentrations par rapport aux daphnies contrôles : $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ U - $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se; $75 \mu\text{g.L}^{-1}$ U - $375 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se ; $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ U - $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se.

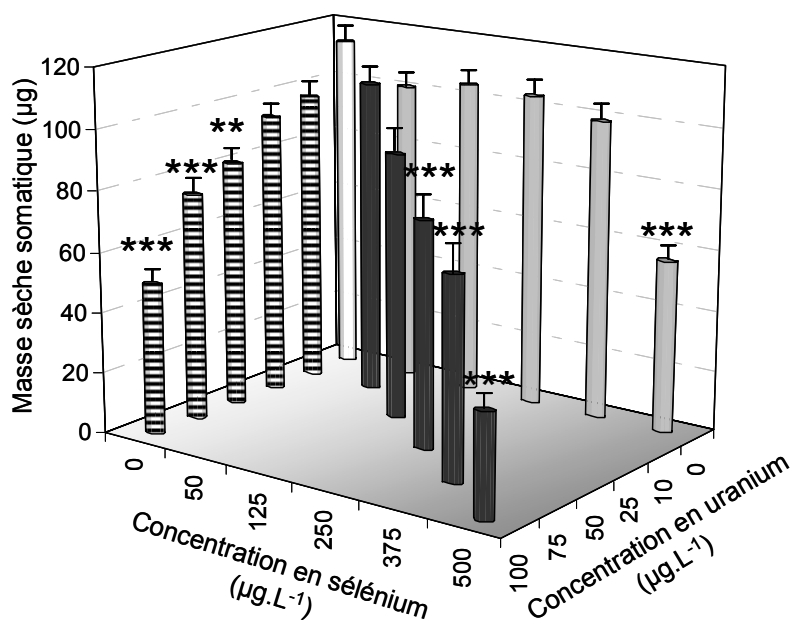


Figure 50: Masse somatique sèche après 7 jours d'exposition en fonction des concentrations d'exposition en uranium et en sélénium (μg). ANOVA: *** $p < 0,01$, ** $p < 0,1$ par rapport au contrôle. Barre d'erreur: SE.

Les analyses statistiques ont montré que le poids sec des daphnies exposées à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ U n'est pas différent de celui des daphnies exposées au mélange $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ U + $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se. Il en est de même pour celles exposées à $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ U et celles exposées au mélange $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ U + $125 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se ; à $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ U et au mélange $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ U + $250 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se ; à $75 \mu\text{g.L}^{-1}$ U et au

mélange 75 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U+375 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se ; à 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U et au mélange 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U+500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se. Il ne semble donc pas y avoir d'influence du sélénium, lorsqu'il est en mélange avec l'uranium, sur la masse somatique.

Ces mêmes comparaisons deux à deux montrent que la masse sèche somatique n'est pas différente pour les daphnies exposées à 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se et au mélange 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U+ 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se ; 125 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se et 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U+ 125 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se ; 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se et au mélange 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U+ 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se. Une différence significative a été observée pour les daphnies exposées à 375 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se et au mélange 75 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U+ 375 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se. Il en est de même pour celles exposées à 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se et à 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U+ 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se. La diminution du poids sec observée dans les conditions de mélange uranium-sélénium semble donc principalement due à la toxicité de l'uranium.

5.3.3.3. Réserves lipidiques

La quantité de lipides par daphnie pour une exposition à l'uranium est significativement plus faible par rapport aux témoins à partir de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U de même une diminution significative est observée à partir de la plus faible concentration en sélénium (50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se) et à partir de la plus faible concentration du mélange uranium-sélénium (50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se+10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U)(Figure 51).

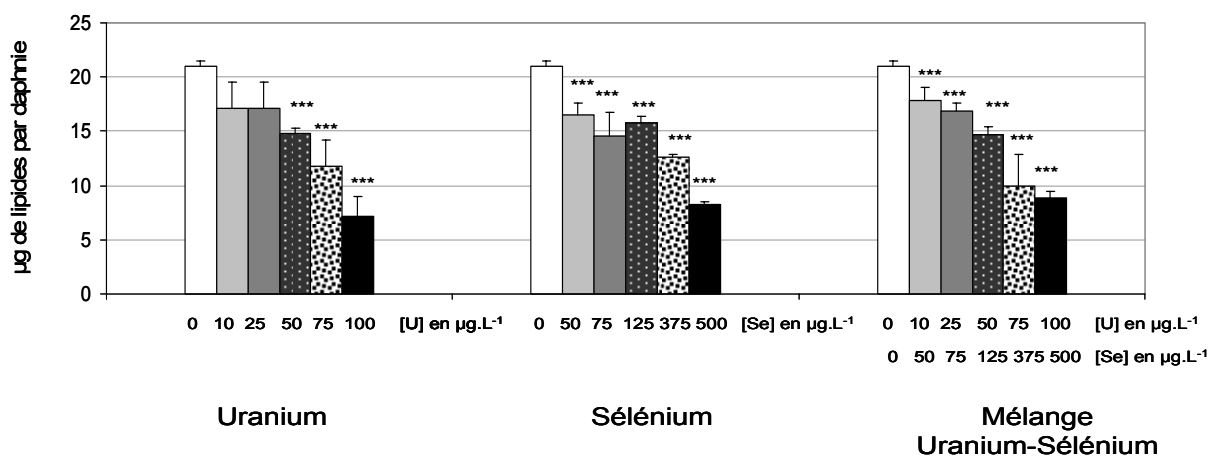


Figure 51 : Masse sèche de lipide par daphnie en fonction de la concentration en uranium et en sélénium dans le milieu d'exposition (%). ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ par rapport au témoin. Barre d'erreur: SE.

Cependant, parallèlement à cette diminution de la quantité de lipides, une diminution de la masse sèche a été observée. Nous avons donc choisi d'exprimer la quantité de lipides (μg) en fonction du poids sec des daphnies (μg), c'est-à-dire en pourcentage de lipides par daphnie.

Les résultats montrent que le pourcentage de lipides par daphnie n'est pas affecté significativement par une exposition à l'uranium allant jusqu'à $100\mu\text{g.L}^{-1}$ U (Figure 52). Une diminution significative de ce pourcentage a néanmoins été observée pour toutes les concentrations en sélénium étudiées (de 50 à $500\mu\text{g.L}^{-1}\text{Se}$) alors que pour les daphnies exposées au mélange, aucune tendance n'a pu être identifiée.

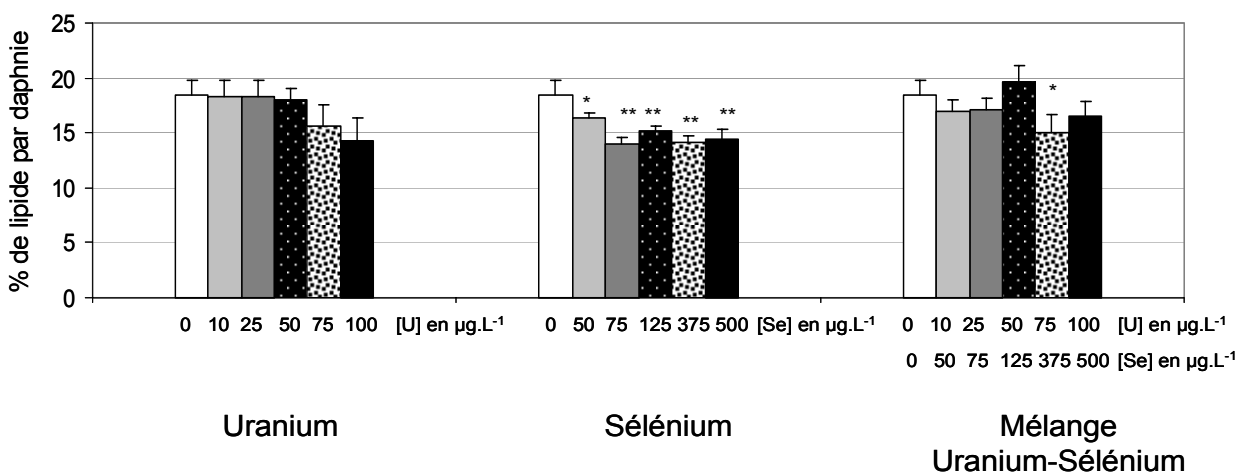


Figure 52 : Mesure du pourcentage de lipides par daphnie en fonction de la concentration en uranium et en sélénium dans le milieu d'exposition (%). ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ par rapport au témoin. Barre d'erreur: SE.

5.3.3.4. Evaluation de l'énergie disponible pour la croissance et la reproduction chez la daphnie : Calcul de l'allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction (AECR)

L'allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction est un paramètre qui est calculé en faisant la différence entre l'énergie ingérée et celle métabolisée. Les résultats de calculs d'allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction montrent que cette énergie décroît significativement aux deux plus fortes concentrations d'exposition à l'uranium (Figure 53). Aucune différence significative n'a été observée entre l'AECR calculée pour les daphnies contrôle et celle calculée pour les daphnies exposées à toutes les concentrations de sélénium et du mélange uranium-sélénium ainsi qu'aux 3 plus faibles concentrations en uranium.

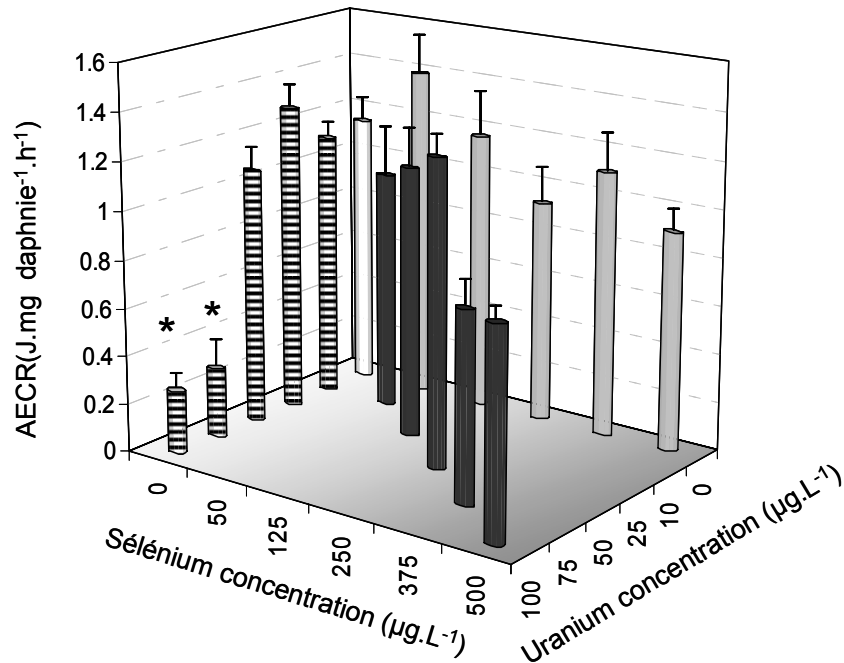


Figure 53 : Allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction en fonction de la concentration en uranium et en sélénium dans le milieu d'exposition (J.mg daphnies⁻¹.h⁻¹). ANOVA: * $p < 0,05$ par rapport au témoin. Barre d'erreur: SE.

5.3.3.5. Budget énergétique

Le budget énergétique total a été calculé en faisant la différence entre l'énergie assimilée et celle allouée à la croissance, la reproduction, la formation de la carapace (mue), les réserves énergétiques, la maintenance (respiration). Les résultats montrent des données très similaires à celle de l'AECR (Figure 54). La seule différence est une diminution significative du budget énergétique pour la concentration 50µg.L⁻¹. Ces résultats montrent que la mesure du paramètre d'AECR est une bonne approximation de l'énergie disponible pour la daphnie.

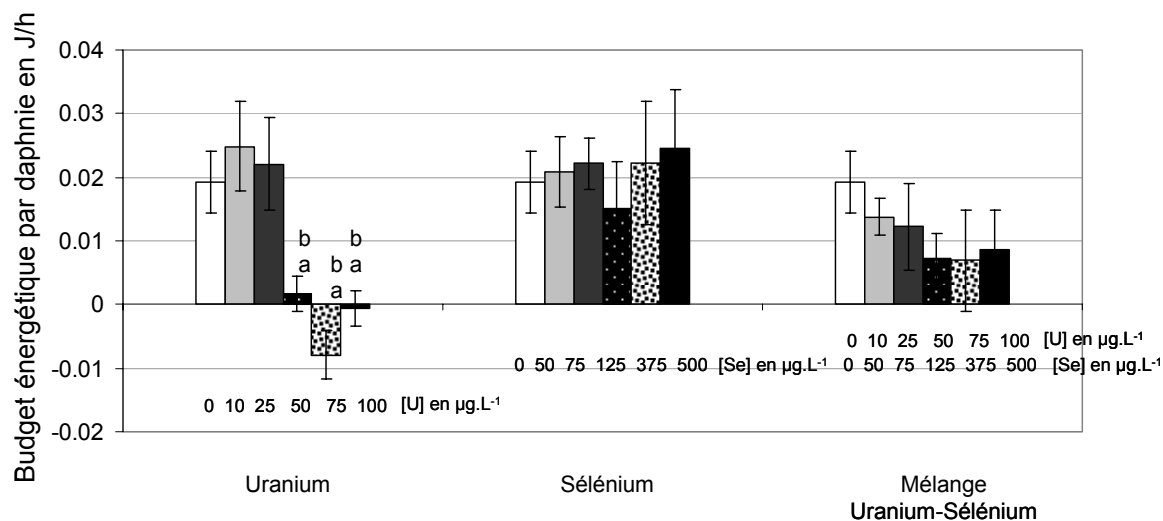


Figure 54 : Budget énergétique total par daphnie exprimé en J/h. ANOVA: (a) $p < 0,05$ par rapport au témoin et (b) $p < 0,05$ par rapport à la même concentration en mélange. Barre d'erreur: SE.

Le pourcentage du budget énergétique total alloué à la croissance, la reproduction, la maintenance (respiration), la formation de la carapace (mue), les réserves énergétiques (lipides) est représenté figure 55.

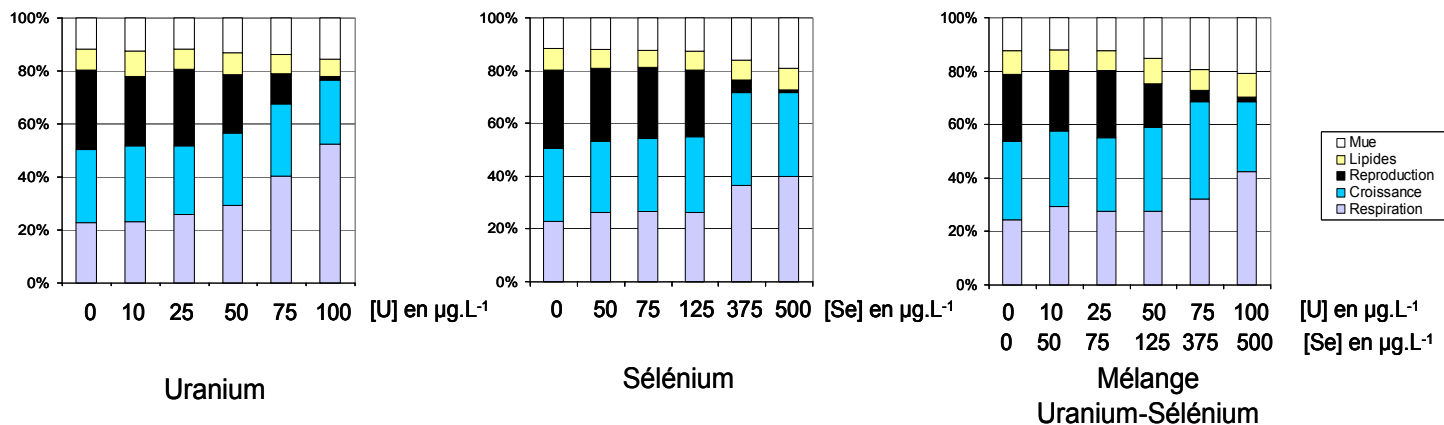


Figure 55 : Pourcentage du budget énergétique alloué à la mue, aux lipides, à la reproduction, à la croissance et à la respiration en fonction de la concentration en uranium et en sélénium dans le milieu d'exposition (%).

La figure 55 montre que quelle que soient les conditions, une partie importante de l'énergie est allouée à la maintenance (respiration) et à la formation de la carapace. Les résultats montrent aussi que la croissance prend une part importante de l'énergie avec une forte diminution de l'énergie allouée à la reproduction aux plus fortes concentrations en U, en sélénium et en mélange (75 et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U, 375 et 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se ; 75 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U+ 375 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U+500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se).

5.3.3.6. Bioaccumulation

La bioaccumulation de l'uranium a été mesurée pour les daphnies exposées à de l'uranium et au mélange U et Se (Figure 56). Les résultats montrent que lorsque l'uranium est mélangé au sélénium, la quantité d'uranium bioaccumulée dans les daphnies est significativement plus faible dès 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se .

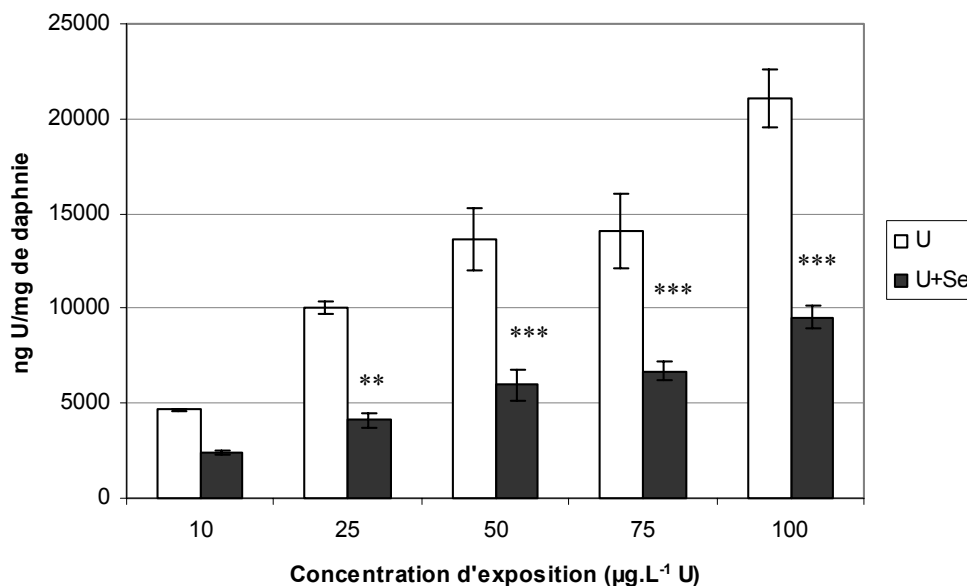


Figure 56 : Bioaccumulation de l'uranium en (ngU/ mg de daphnie) en fonction de la concentration d'exposition en uranium. ANOVA (comparaison des conditions U et U+Se): ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.3.4. Effets sur les diverticules et sur le tube digestif de la daphnie

1) Effets sur les diverticules

L'observation par microscopie optique des diverticules a été réalisée sur 3 daphnies par condition. Ces observations ont permis de montrer les effets de l'uranium, du sélénium et du mélange U-Se (Figure 57). Les diverticules des daphnies témoin présentent des cellules régulières ainsi que des microvillosités dans l'ensemble régulières. Les diverticules des daphnies exposées à l'uranium ($75\mu\text{g.L}^{-1}$) montrent également des cellules régulières comme chez les témoins, cependant on observe une vacuolisation des cellules. Les microvillosités de ces diverticules sont aussi plus courtes et moins régulières que chez les témoins. Les effets observés pour l'uranium à 7 jours sont proches de ceux qui ont été observés à 21 jours où les effets étaient plus marqués avec notamment beaucoup de cellules manquantes et une très forte vacuolisation des cellules.

Pour les diverticules des daphnies exposées au sélénium, l'épaisseur de la paroi est très irrégulière. Il n'y a pas de cellules manquantes.

Chez les daphnies exposées au mélange uranium-sélénium, les mêmes effets que ceux observés pour le sélénium ont été observés avec une paroi plus ou moins épaisse en fonction des endroits.

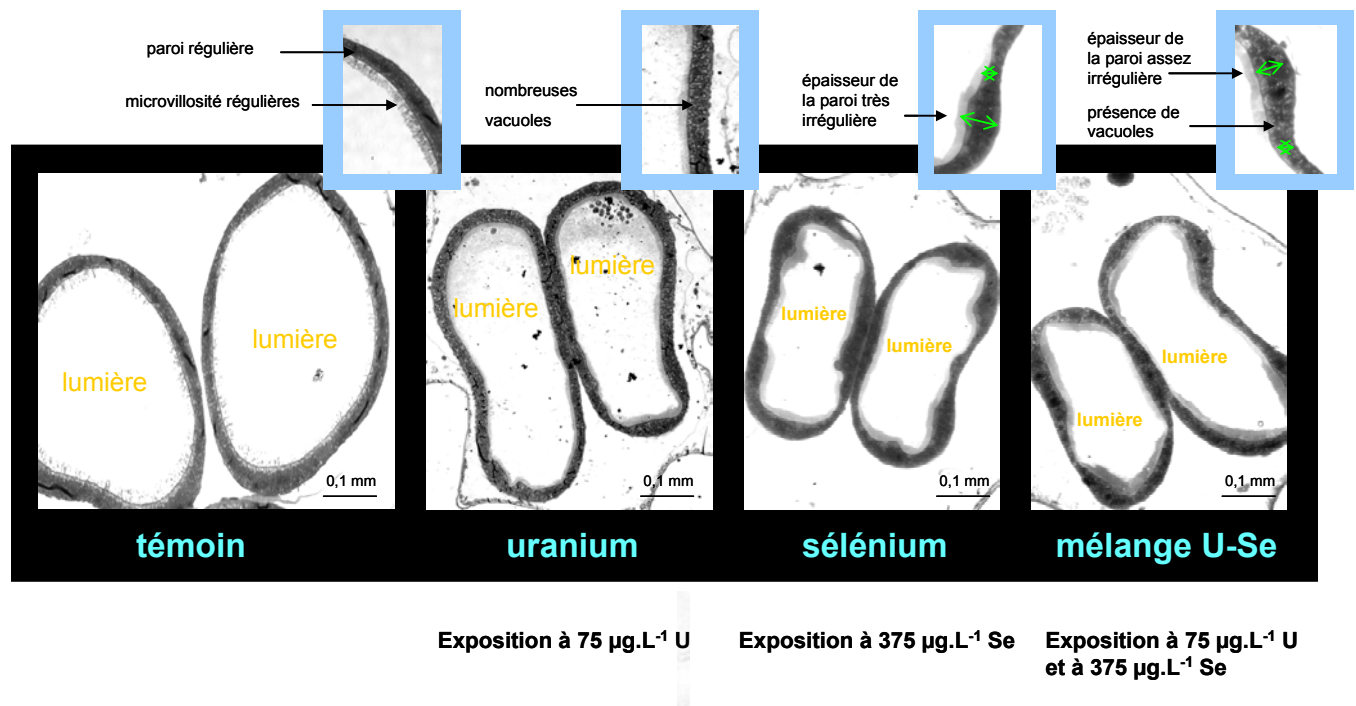
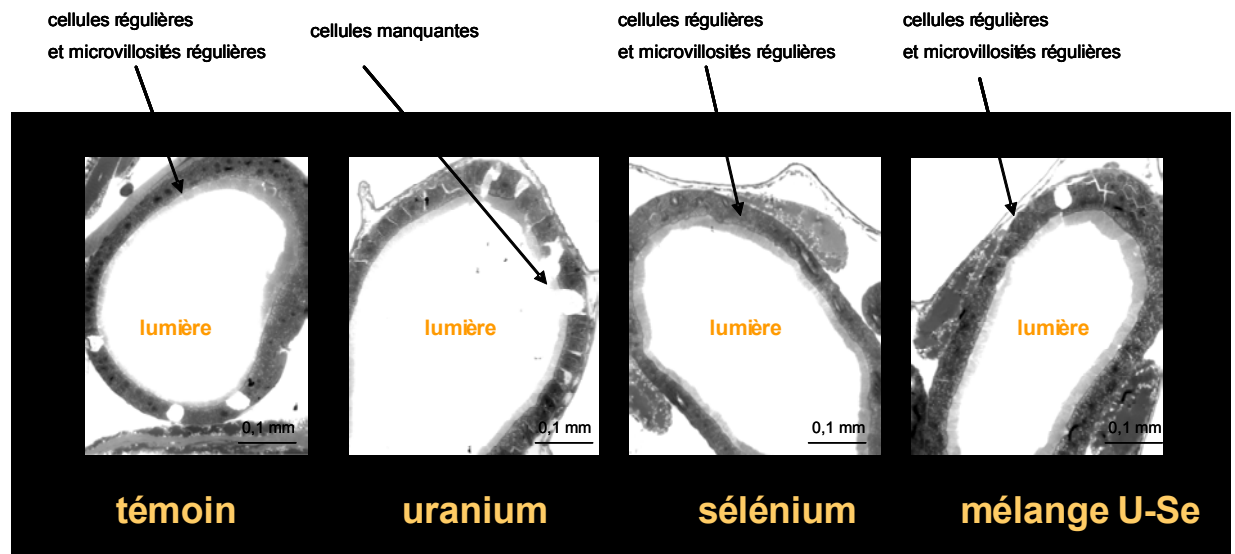


Figure 57 : Observations au microscope optique des effets de l'uranium, du sélénium, du mélange uranium-sélénium sur les diverticules des daphnies.

2) Effets sur le tube digestif

Les effets sur le tube digestif ont été observés par microscopie optique sur 3 daphnies par condition (Figure 58). L'observation du tube digestif des daphnies exposées à de l'uranium montrent des manques de cellules intestinales et la présence de vacuoles. Aucun effet du sélénium par rapport au témoin n'est visible par microscopie optique. L'examen des tubes digestifs de daphnies exposées au mélange U-Se ne montre pas de différence par rapport au témoin.



Exposition à 75 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U Exposition à 375 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se Exposition à 75 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U et à 375 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se

Figure 58 : Observations au microscope optique des effets de l'uranium, du sélénium, du mélange uranium-sélénium sur le tube digestif des daphnies.

Pour conclure ces observations, le sélénium aurait un effet plutôt sur les diverticules, l'uranium plutôt sur l'intestin. Pour le mélange U-Se, les effets au niveau du diverticule seraient très semblables à ceux observés chez les daphnies exposées au sélénium alors qu'au niveau de l'intestin les effets sembleraient beaucoup moins prononcés que ceux observés chez les daphnies exposées à l'uranium. Les observations du tube digestif semblent donc corroborer un effet antagoniste de l'uranium et du sélénium.

5.4. Discussion

5.4.1. Comparaison des conclusions issues de deux méthodes statistiques : méthode de Jonker vs. méthode de Sørensen

Deux méthodes ont été utilisées pour détecter les différences statistiques entre nos données et celles prédites par le modèle de CA : la méthode des isoboles décrite par Sørensen *et al.* (2007) et celle sur les surfaces de réponse décrite par Jonker *et al.* (2005).

Les conclusions de ces deux modèles concernant la toxicité du mélange uranium-sélénium à 24h sont contradictoires (Tableau 12). En effet, la méthode de Sørensen conduit à la conclusion que le modèle de non interaction selon CA est celui qui décrit le mieux les données observées, alors que le modèle de Jonker conclue que le modèle antagoniste ajuste mieux les données que le modèle CA. Cependant, il y a plusieurs données dans le modèle de Sørensen qui confirment un antagonisme potentiel. En effet, les résultats de la comparaison du modèle de Hewlett et de Vølund avec le modèle des ‘CE₅₀ variant librement’ montrent pour le test F des valeurs de p non significatives indiquant que ces deux modèles peuvent être utilisés aussi bien que le modèle de CA pour expliquer les données. De plus, les résultats du test F pour le CA et pour les deux modèles ne sont pas significatifs. Seule la règle de parcimonie nous permet de choisir le modèle de CA parmi les deux autres modèles.

Pour la méthode de Jonker, le paramètre d’interaction est relativement faible, indiquant que l’antagonisme détecté dans ce modèle n’est pas très important. Même si les conclusions sont opposées, les résultats des deux modèles ne sont pas complètement différents. Nos résultats confirment l’observation faite par Cedergreen *et al.* (2007) que la méthode des isoboles a donc généralement tendance à accepter plus souvent le modèle de non interaction que la méthode de Jonker.

Pour les données de toxicité 48h, les modèles mènent à la même conclusion d’un effet antagoniste. Dans la méthode de Sørensen, le modèle de Hewlett est celui qui a été choisi pour décrire les données, même si la valeur de p du test F visant à comparer ce modèle avec le modèle des ‘CE₅₀ variant librement’ est significative. Ce phénomène pourrait s’expliquer par l’effet dose-ratio détecté dans la méthode de Jonker. La similarité des résultats des deux méthodes confirme l’effet antagoniste.

5.4.2. IA (Indépendance d'action) vs CA (Addition des concentrations)

Pour les données de toxicité à 24h, la méthode de Jonker appliquée au modèle d'indépendance d'action met en évidence un effet synergique, alors qu'un effet antagoniste est observé si on considère le modèle de CA. Ce résultat indique que les données sont comprises entre les valeurs prédites des deux surfaces de réponse de IA et CA. La légère surestimation observée avec le modèle de CA par rapport à nos données est en accord avec l'étude de Faust et Scholze, (2004) qui ont remarqué dans leurs études que le modèle de CA entraîne la plupart du temps une surestimation de la toxicité des mélanges.

Pour les données de toxicité 48h, les deux modèles de référence CA et IA montrent tous deux un effet antagoniste. La comparaison des paramètres d'interaction entre CA et IA indiquent que l'effet antagoniste détecté pour le modèle de CA est plus important que celui observé pour le modèle IA, indiquant que le modèle IA est plus proche des données, que le modèle CA. En effet, le modèle IA semble être pour différents auteurs celui conduisant à une meilleure prédiction des effets d'un mélange (Faust *et al.*, 2001; Backhaus *et al.*, 2000).

Pour le test chronique, la différence entre la CE_{50} observée pour la fécondité et celle prédite par les modèles de référence est assez faible bien qu'une différence significative ait été détectée. Ces résultats montrent que le modèle IA est plus proche de nos données, ce qui est en opposition avec les observations de Cedergreen *et al.* (2008) qui montrent que le modèle IA est plus pertinent que le modèle CA dans les études de mélange chez *Daphnia magna*.

5.4.3. Etude des effets d'un mélange : Des conclusions différentes en fonction du temps, lien toxicité aiguë - toxicité chronique

Dans l'évaluation des risques environnementaux, l'estimation des effets chroniques sur les espèces aquatiques à partir des données de toxicité aiguë est souvent nécessaire. Certains auteurs suggèrent l'utilisation de ratios aigu-chronique ACR (Lange *et al.*, 1998; Bianchini *et al.*, 2008) mais pour l'étude des mélanges de tels ratios semblent difficiles à appliquer. Dans cette étude, les résultats de toxicité aiguë et chronique ont été comparés. Les paramètres classiquement étudiés comme la mortalité pour le test aigu et la fécondité pour le test chronique ont été comparés. Ces paramètres couramment utilisés ont été choisis car les modes d'action de ces deux composés du mélange ne sont pas connus. En effet, Cedergreen *et al.* (2005) ont montré que le choix du paramètre étudié peut conduire à des résultats contradictoires dans les expérimentations de toxicité des mélanges. De façon similaire nous avons montré que les résultats pouvaient être fonction du temps d'exposition. Les expérimentations réalisées sur les substances seules ont montré une très forte variation de la toxicité de l'uranium entre 24 et 48h, qui pourrait expliquer les différences de conclusion pour l'étude des effets du mélange entre 24 et 48h. Le choix du temps d'exposition pour étudier les effets d'un mélange est donc un paramètre très important à prendre en compte avant de tirer des conclusions générales sur la toxicité d'un mélange. Il semble donc judicieux d'étudier les interactions à différents temps d'exposition.

5.4.4. Etude des effets d'un mélange : Des conclusions différentes en fonction des critères d'effet étudiés

Les mesures de fécondité ont montré grâce à la méthode d'analyse statistique de Jonker *et al.* (2005) qu'il y a une interaction entre l'uranium et le sélénium avec un effet antagoniste.

Les données de croissance ne nous ont pas permis d'appliquer les modèles statistiques classiquement utilisés comme celui de Jonker *et al.* (2005). En effet, dans notre cas, les effets du sélénium ne suivent pas une relation dose-réponse nous permettant d'appliquer les modèles d'addition des concentrations et d'indépendance d'action puisque son effet est très limité. Ces données mettent en lumière la difficulté d'appliquer ces différents modèles de mélange pour les substances sans effet sur les paramètres observés. Les effets du mélange uranium-sélénium sur la croissance sont très proches des effets observés pour l'uranium seul.

Les données de mesures de réserves énergétiques, montrent que le pourcentage de lipides par daphnie est plus faible pour les daphnies exposées au sélénium que pour celles exposées à l'uranium ou au mélange U-Se.

Suite à ces différentes mesures, il semble alors assez difficile d'établir une conclusion générale pour l'interaction uranium-sélénium. En effet, les différents paramètres étudiés amènent à des conclusions différentes. Cette observation a aussi été faite par Cedergreen *et al.* (2005) qui ont montré qu'en fonction des paramètres étudiés, les conclusions sur les effets d'un mélange pouvaient être contradictoires et que la sensibilité des processus physiologiques pouvaient expliquer les différences observées.

Pour compléter ces observations il nous a semblé intéressant d'étudier les effets du mélange au niveau énergétique. En effet, chez tous les organismes vivants, l'ensemble des processus biochimiques et physiologiques sont étroitement dépendants de la quantité d'énergie disponible. Cette approche énergétique permet de relier les différents paramètres étudiés, qui sont, la croissance, la reproduction, la respiration et les réserves énergétiques. Cette approche intégrée permet d'avoir une vision plus globale des effets et ainsi d'estimer les effets sur l'état de santé des organismes, c'est-à-dire, sur la capacité des organismes à résister à un stress supplémentaire. Les paramètres énergétiques sont particulièrement adaptés dans le cadre de

l'étude des effets d'un mélange au niveau de l'individu. Parmi les différents paramètres énergétiques, la mesure d'allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction (AECR) nous a permis de montrer que pour les deux plus fortes concentrations en uranium, il y avait un effet très important qui ne se retrouve pas pour l'exposition au mélange U-Se et au sélénium seul (Figure 53). Le budget énergétique total, représentant la différence entre l'énergie assimilée et celle allouée à la croissance, la reproduction, la formation de la carapace (mue), les réserves énergétiques et la maintenance (respiration), a montré des résultats très similaires à ceux obtenus avec l'estimation de l'AECR (Figure 54). Ces résultats montrent que la mesure du paramètre d'AECR est une bonne approximation des calculs plus complets de budget énergétique. Les résultats des calculs du paramètre énergétique AECR et de budget énergétique confirment l'effet antagoniste de l'uranium et du sélénium.

5.4.5. De la spéciation à la bioaccumulation : démarche pour l'étude des effets d'un mélange

Après avoir identifié le type d'interaction entre uranium et sélénium, nous avons essayé de déterminer à quel niveau se situait l'interaction.

Les interactions entre deux substances d'un mélange peuvent avoir lieu à différents niveaux (Figure 59):

- ◆ Au niveau de la biodisponibilité :

En effet, dans un mélange les substances peuvent interagir chimiquement et modifier la spéciation chimique.

- ◆ Au niveau de la concentration au niveau du site d'action :

Ces interactions sont alors qualifiées de toxico-cinétiques. Elles ont lieu quand un des composants d'un mélange joue sur la concentration d'un autre composant au niveau du site d'action.

- ◆ Au niveau des mécanismes d'action :

Ces interactions, appelées interactions toxico-dynamiques, ont lieu quand un des composants d'un mélange modifie la réponse d'un autre composant.

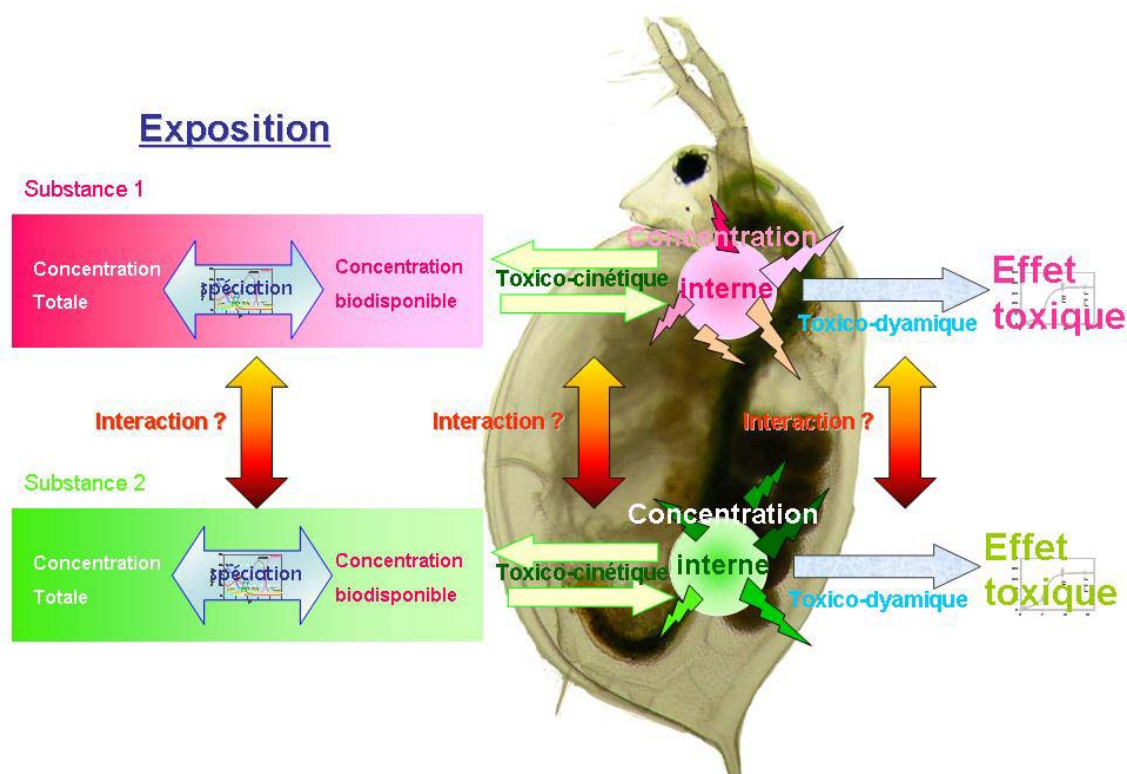


Figure 59 : Les différents niveaux d'interaction

Les calculs de spéciation (Tableau 10) ont montré qu'il n'y a pas d'interaction U-Se dans nos conditions d'étude entraînant une diminution de la biodisponibilité de l'uranium et du sélénium. L'interaction U-Se ne se situe donc pas à ce niveau.

Pour pouvoir estimer les interactions toxico-cinétiques, la bioaccumulation de l'uranium a été mesurée chez les daphnies exposées à l'uranium et au mélange uranium-sélénium. Les résultats montrent une accumulation plus faible de l'uranium chez les daphnies exposées au mélange U-Se (Figure 56).

La majorité des interactions connues sont de nature toxico-cinétique (Hertzberd et MacDonnel, 2002). Les interactions toxico-dynamiques sont, quant à elles, plus difficiles à caractériser car la réponse d'un organisme à un élément toxique peut apparaître à de multiples niveaux d'organisation et que le niveau auquel l'interaction a lieu n'est très souvent pas connu (Rider *et al.*, 2005). Rider *et al.* suggèrent alors d'étudier les effets toxico-dynamiques grâce à des paramètres du budget énergétique.

Nous donc avons ensuite choisi d'exprimer les calculs d'AECR en fonction de la concentration en uranium bioaccumulé et de la concentration en sélénium dans le milieu (Figure 60). L'AECR exprimé en fonction de la bioaccumulation de l'uranium permet de mettre en évidence le fait que, pour les conditions de mélange, l'AECR n'est pas affectée, ce qui peut être lié à la baisse d'accumulation d'uranium dans les daphnies exposées au mélange par rapport aux conditions d'exposition à l'uranium seul (Figure 60).

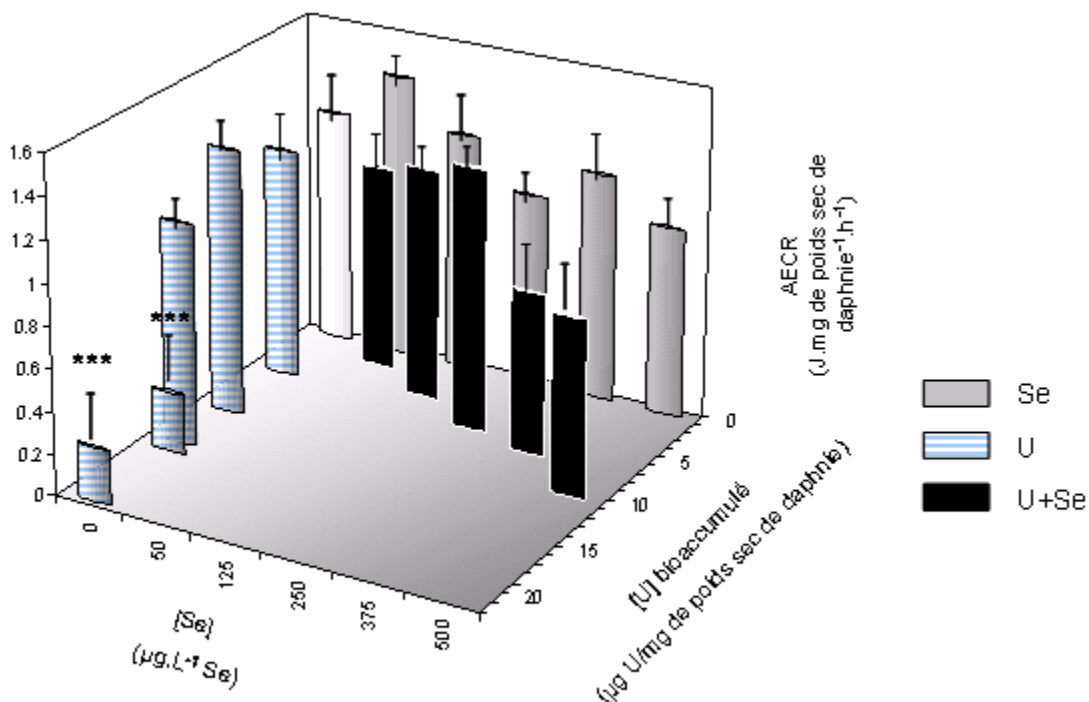


Figure 60: Allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction (AECR) en fonction de la concentration en uranium bioaccumulé dans les daphnies et en sélénium dans le milieu d'exposition ($J.mg\ daphnies^{-1}.h^{-1}$). ANOVA: $***p < 0,001$ par rapport au témoin. Barre d'erreur: SE

La bioaccumulation permet de fournir des éléments permettant d'expliquer l'antagonisme détecté et de montrer qu'il y a une interaction entre l'uranium et le sélénium au niveau de l'entrée de l'uranium dans l'organisme. Ces résultats suggèrent qu'il n'y avait pas d'interaction toxico-dynamique entre l'uranium et le sélénium mais que l'interaction aurait plutôt lieu au niveau de l'entrée de l'uranium dans l'organisme.

L'antagonisme détecté entre uranium et sélénium serait donc dû à une interaction toxicocinétique entre les deux substances. Pour vérifier cette hypothèse, des mesures de bioaccumulation du sélénium n'ont pas pu être envisagées du fait de la limite de détection élevée de la méthode utilisée par rapport aux niveaux d'accumulation du Se. En effet, d'après différents auteurs, Besser *et al.* (1993), Ingersoll *et al.* (1990) et Ogle et Knight (1996), nous avons pu estimer pour la plus forte de nos concentrations d'exposition de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se une bioaccumulation de 40 ng Se /g de daphnie, ce qui nous amène à $2,28 \text{ ng Se}$ par daphnie, difficilement quantifiable au HG-QAASF.

5.4.6. Vers une compréhension des mécanismes d'action

L'observation des diverticules par microscopie optique a mis en évidence un effet du sélénium et du mélange uranium-sélénium. Une étude précédente a montré que lors d'une exposition au sélénium, les diverticules des daphnies étaient très affectés (Johnston *et al.*, 1989). Ces diverticules seraient l'équivalent de l'hépatopancréas de crustacés supérieurs, comme l'écrevisse, et joueraient un rôle dans les processus d'assimilation par la production de fluides digestifs (Ebert *et al.*, 2005). Johnston *et al.*, concluent, dans leur étude de 1989, à une profonde altération des processus d'assimilation, chez la daphnie, lors d'une exposition au sélénium.

L'observation du tube digestif a pu mettre en évidence le fait que les effets du mélange sur les cellules étaient peu visibles et différents de ceux observés pour l'uranium. Deux hypothèses ont pu alors être formulées :

La première est que les effets du mélange sont moins importants car l'uranium rentre moins dans les cellules du tube digestif comme le suggèrent les résultats de bioaccumulation.

La seconde est que le sélénium « protégerait » les cellules de l'intestin. En effet, les résultats de toxicité aiguë ont montré que le sélénium avait un effet plus rapide sur la daphnie que l'uranium, suggérant que le sélénium agirait plus tôt que l'uranium.

Les mesures de budget énergétique montrent une diminution significative pour les daphnies exposées aux plus fortes concentrations en uranium et aucun effet sur les autres

conditions testées. Les mesures de l'allocation de l'énergie ont montré que malgré le stress subi par les daphnies, les profils restaient assez similaires avec une grande partie allouée à la maintenance et à la formation de la carapace. Les résultats d'allocation de l'énergie mettent aussi en évidence le fait que les daphnies, à la première ponte et quelles que soient les conditions de stress, allouent en majorité leur énergie à la croissance plutôt qu'à la reproduction. Cette même relation de priorité a été observée par Glazier et Calow (1992) chez *Daphnia magna* lors d'une limitation de la quantité de nourriture. Cette priorité d'allocation d'énergie à la croissance se fait aussi au détriment des réserves énergétiques pour les daphnies exposées au sélénium. En effet, dans ces conditions, une diminution significative du pourcentage de lipides est observée.

Pour conclure, aucune baisse significative de l'énergie totale n'a été observée pour les daphnies exposées au sélénium et au mélange uranium-sélénium. Cependant, la reproduction et la croissance des daphnies exposées au mélange uranium-sélénium, sont fortement affectées. L'ensemble des résultats montrent alors que nos calculs énergétiques ne reflètent pas les observations faites au niveau de la croissance et de la fécondité pour les daphnies exposées au mélange uranium-sélénium.

Différentes hypothèses peuvent expliquer le fait que bien que l'AEER ne soit pas réduite, la reproduction et la croissance sont affectées :

- ◆ La première hypothèse est que le sélénium ainsi que le mélange uranium-sélénium affectent directement les processus impliqués dans la croissance et la reproduction. Dans ce cas, la croissance et la reproduction seraient affectées bien que l'AEER ne soit pas modifiée.

- ◆ La seconde serait liée aux hypothèses des calculs de l'AEER qui ne seraient pas vérifiées. En effet, une explication possible vient du fait que pour réaliser ces bilans d'énergie plus ou moins simplifiés (AEER ou budget énergétique), nous posons l'hypothèse que l'assimilation est fonction de l'ingestion et que ce pourcentage d'assimilation en fonction de l'ingestion n'est pas modifié par l'exposition des daphnies à nos contaminants. L'atteinte des cellules des diverticules chez les daphnies exposées au sélénium et au mélange U-Se soutient cette hypothèse.

Conclusions et perspectives

1. Effets du mélange uranium - sélénium sur *Daphnia magna*, identification d'une interaction

Conclusion

L'étude des effets du mélange uranium-sélénium a pu montrer grâce aux différents paramètres et aux différents temps d'exposition choisis que l'uranium et le sélénium ont des effets antagonistes. Les mesures de bioaccumulation ont pu mettre en évidence, que l'entrée de l'uranium était modifiée par la présence de sélénium et donc qu'une interaction toxicocinétique semblait avoir lieu entre ces deux éléments

Le système digestif de la daphnie est une interface importante où a lieu à la fois l'entrée des éléments toxiques et des nutriments. Notre étude a montré que le système digestif de la daphnie semblait être un élément clé dans la compréhension des mécanismes d'interaction entre uranium et sélénium. Un effet antagoniste au niveau des cellules du tube digestif semble se dégager des observations microscopiques ainsi qu'une atteinte différente des diverticules selon une exposition à l'uranium, au sélénium et au mélange.

Perspectives

Pour mieux comprendre les mécanismes d'interaction entre uranium-sélénium chez la daphnie, différentes pistes peuvent être envisagées comme :

- L'étude des effets U-Se sur l'état oxydatif de la daphnie:

Le sélénium est à la fois un antioxydant et un pro-oxydant. L'uranium quant à lui est un pro-oxydant. Dans un contexte de multipollution uranium-sélénium, il pourrait être intéressant

d'étudier l'état oxydatif des cellules de daphnies. En effet, un dérèglement de la balance entre mécanismes pro-oxydants et mécanismes antioxydants conduit à des dommages oxydatifs impliquant les lipides, les protéines et l'ADN (Bonfont-Rousselot *et al.*, 1994). Il pourrait donc être intéressant de mesurer la production de radicaux libres (par exemple par la méthode de détermination de la production de ROS par H₂DCFDA (dichlorofluorescéine) en fluorescence (Xie *et al.*, 2006)). L'étude du stress oxydatif pourrait être réalisée grâce à la mesure d'activités enzymatiques antioxydantes comme la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase, la catalase. D'autres antioxydants non enzymatiques comme le glutathion réduit et oxydé ou l'ascorbate sont importants dans la régulation de la balance oxydative des cellules.

Un stress oxydatif peut entraîner une atteinte des membranes biologiques par oxydation, fragmentation ou formation de nouvelles liaisons au niveau des lipides membranaires (Gardner, 1989). L'observation des cellules digestives des daphnies exposées à de l'uranium ont montré une atteinte des membranes cellulaires. Ces effets pourraient être potentiellement liés au stress oxydatif engendré par l'uranium qui se retrouve bioaccumulé dans ces cellules. Une mesure de la peroxydation de lipides peut donc être un outil intéressant pour évaluer les dommages liés au stress oxydatif chez les daphnies lors des expérimentations. Toutes ces mesures biochimiques concernant le stress oxydatif permettraient de mieux comprendre les mécanismes d'action de l'uranium et du sélénium mis en jeu.

De façon complémentaire, une étude des effets de l'uranium sur des daphnies carencées en sélénium grâce à des paramètres liés au stress oxydatif permettrait de mieux comprendre le caractère antioxydant du sélénium et son rôle protecteur lors d'une exposition à un élément pro-oxydant.

- L'étude des effets U-Se sur les enzymes digestives :

Les observations histologiques ont montré une atteinte des diverticules. Les diverticules sont connus pour avoir un rôle clé dans les processus d'assimilation chez la daphnie. Des mesures d'activité d'enzymes digestives comme l'amylase, la cellulase, la β galactosidase, la trypsine, l'estérase semblent donc intéressantes pour faire le lien entre atteinte cellulaire et effet au niveau de l'individu. En effet, De Coen et Janssen (2003) ont montré qu'il y a un lien entre l'activité des enzymes digestives et les valeurs de CEA (Allocation d'énergie cellulaire).

Ces mesures permettraient aussi de faire le lien avec les mesures de réserves énergétiques ainsi que les calculs de bilan d'énergie qui ont été réalisés dans cette étude. La mesure de ces activités enzymatiques permettrait de détecter une atteinte au niveau de l'assimilation et de mieux comprendre les mécanismes d'action du sélénium en particulier.

- L'étude des effets U-Se sur l'assimilation avec des mesures de ^{14}C :

Pour mieux comprendre les effets sur la nutrition, des mesures au ^{14}C permettraient de dissocier une atteinte de l'ingestion de nourriture de l'assimilation du carbone. De précédentes études ont montré qu'il était, en effet, possible d'établir des bilans de carbone et d'estimer en particulier l'efficacité d'assimilation des daphnies adultes et juvéniles (He et Wang, 2006). Ces mesures d'assimilation au ^{14}C au combinées à des mesures des enzymes digestives permettraient de comprendre les atteintes au niveau des processus d'assimilation.

Un marquage au ^{14}C permettrait d'estimer non seulement l'assimilation mais aussi la respiration et les phénomènes d'excrétion. Ces différentes mesures seraient utiles pour établir les bilans énergétiques. Les mesures au ^{14}C semblent des outils intéressants pour d'établir des bilans énergétiques précis.

- L'étude des effets U-Se grâce à des outils de génomique fonctionnelle:

Les études basées sur les profils d'expression génétique sont de plus en plus utilisés en écotoxicologie afin d'identifier ou de confirmer des modes d'action de substances toxiques (Lettieri, 2006 ; Poynton *et al.*, 2007 ; Soetaert *et al.*, 2006 et 2007 ; Watanabe *et al.*, 2007). Des études utilisant des méthodes de génomique fonctionnelle comme les puces à ADN permettraient d'identifier les mécanismes d'action mis en jeu lors d'une exposition à du sélénium et de l'uranium seuls et en mélange ainsi que les interactions potentielles.

De telles études en complément de celles citées précédemment avec des marqueurs biochimiques permettraient de mieux comprendre les mécanismes d'action des substances seules et en mélange.

-L'étude toxico-cinétique avec double marquage ^{233}U - ^{75}Se

Pour vérifier l'hypothèse qu'il n'y pas d'interaction toxico-dynamique entre l'uranium et le sélénium mais que l'interaction aurait plutôt lieu au niveau de l'entrée de l'uranium dans l'organisme, il serait intéressant de réaliser des mesures précises de bioaccumulation de l'uranium et du sélénium. Ces mesures de bioaccumulation pourraient se faire grâce à un double marquage ^{233}U - ^{75}Se par scintillation liquide α et par spectrométrie γ . Ce double marquage nécessiterait au préalable une mise au point pour ajuster les fenêtres de mesure et s'assurer qu'il n'a pas de phénomène d'interférence entre les deux mesures.

2. Pertinence et utilité des différentes méthodes mises en œuvre dans le cadre de l'étude des effets des mélanges binaires.

Conclusion

L'étude du mélange uranium-sélénium permet de conclure sur la pertinence et l'utilité des différentes méthodes mises en œuvre dans le cadre de l'étude des effets des mélanges binaires. Les résultats de cette étude ont montré un effet antagoniste de l'uranium et du sélénium. La comparaison des résultats estimés dans le cas de l'absence d'interaction U-Se grâce au modèle de référence d'indépendance d'action (IA) avec nos données expérimentales a mis en évidence que les différences bien que significatives étaient assez faibles (<20%). Ces résultats nous amènent donc à la conclusion que le modèle IA semble un modèle très utile en première approximation pour prédire les effets toxiques entre deux substances bien qu'il soit parfois remis en cause (Greco *et al.*, 2005). Cette conclusion est en accord avec celles formulées précédemment par d'autres auteurs sur des mélanges différents et des organismes différents (Altenburger *et al.*, 2000 ; Backhaus *et al.*, 2000 ; Faust *et al.*, 2001).

Pour évaluer le niveau d'interaction entre deux substances, une étude de la bioaccumulation des éléments ainsi que des formes biodisponibles des éléments toxiques du mélange est nécessaire. En effet, lorsque les mécanismes d'action des composés des mélanges ne sont pas connus, il semble important avant de s'intéresser aux mécanismes, de déterminer si

l'interaction entre deux composés d'un mélange est d'ordre toxico-dynamique ou toxico-cinétique.

L'étude des effets du mélange uranium-sélénium sur la daphnie a notamment permis de mettre en évidence l'importance des choix réalisés pour les expérimentations. En effet, l'étude des effets des mélanges multiplie le nombre de conditions à tester et un effort particulier quant au choix des paramètres d'étude ainsi qu'aux différents temps d'exposition est nécessaire. Notre étude a permis de montrer qu'un test raccourci à 7 jours (1^{ère} ponte) permettait d'alléger les expérimentations au niveau du temps au profit du nombre de conditions testées, ce qui serait particulièrement intéressant dans les expérimentations de mélange où il faut précisément tester un très grand nombre de conditions. Ces expérimentations raccourcies permettent néanmoins d'obtenir des données écologiquement pertinentes sur des paramètres tels que la reproduction, la croissance ou des données de budget énergétique.

Lors d'expérimentations visant à identifier des interactions entre substances, une fois les données récoltées sur les différents paramètres choisis, il est souvent difficile de tirer des conclusions sur l'interaction ou non des composés du mélange. En effet, les réponses obtenues suivant les différents paramètres d'étude choisis ne vont pas toujours dans le même sens. Dans notre étude, nous avons obtenu, en fonction du temps d'exposition ainsi que des paramètres choisis, des conclusions contradictoires. Cette observation a également été faite par Cedergreen *et al.* dans son étude de 2005. Il semble donc nécessaire lors d'une étude des effets d'un mélange de ne pas se limiter à un seul paramètre à un temps donné et de s'intéresser également à des paramètres intégrateurs. Les paramètres énergétiques sont intégrateurs d'un certain nombre de processus et sont donc très utiles pour l'étude des mélanges. Ces paramètres permettent aussi d'évaluer les effets potentiels au niveau de la population et en font donc des outils particulièrement adaptés à l'étude des effets des mélanges.

Perspectives

Il serait intéressant suite à cette étude de valider l'utilisation des modèles énergétiques dans le cadre de l'étude des effets des mélanges simples mais aussi des mélanges complexes. En effet, il serait intéressant d'intégrer les mesures énergétiques pour connaître l'effet de substances en mélange dont on ne connaît pas les mécanismes d'actions.

Des études futures sur différents toxiques appliqués pendant 48 heures et 21 jours pourraient être intéressantes aussi à mettre en œuvre pour déterminer si dans la majorité des cas le type d'interaction identifié à 48h est conservé à 7 et 21 jours. Ces études permettraient de faire le lien entre la toxicité aiguë et la toxicité chronique d'un mélange et de valider l'alternative d'un test réduit à 7 jours pour effectuer des plans d'expérience complexes.

Toutes ces études permettraient de mieux comprendre les interactions entre les différents stressors auxquels sont soumis les organismes pour ensuite mieux évaluer les risques qui leur sont associés.

Références

- Abe, T., Saito, H., Niikura, Y., Shigeoka, T., Nakano, Y., 2001. Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives. *Chemosphere*, 45, 487-495.
- Adams, W.J., Heidolph, B.B., 1985. Short-cut chronic Toxicity Estimates Using *Daphnia magna*, *ASTM Special Technical Publication*, pp. 87.
- Alonzo, F., Gilbin, R., Bourrachot, S., Floriani, M., Morello, M., and Garnier-Laplace, J., 2006. Effects of chronic internal alpha irradiation on physiology, growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *Aquat. Tox.*, 80, 228-236.
- Altenburger R., Bodeker W., Faust M., Grimme H., 1990. Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals. *Ecotox Environ Saf.*, 20, 98-114.
- Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2000. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 2341-2347.
- Altenburger R., 2003. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22, 1900-1915.
- Andersen, M.E., Dennison, J.E., 2004. Mechanistic approaches for mixture risk assessments-present capabilities with simple mixtures and future directions. *Environ. Toxicol. Pharm.*, 16, 1-11.
- Antunes, S.C., Pereira, R., Gonçalves, F., 2007. Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 53, 207-213.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 2004. Standard guide for conducting *Daphnia magna* Life-Cycle Toxicity Tests. 1193-1197.
- Atkinson, D. E., et Walton, G.M., 1967. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *J.Biol.Chem.*, 242, 3239-3241.
- Backhaus, T., Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2000. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 2348-2356.
- Baillieul, M., Selens, M., Blust, R., 1996. Scope for growth and fitness of *Daphnia magna* in salinity-stressed conditions. *Funct. Ecol.*, 10, 227-233.
- Baillieul, M., Smolders, R., Blust, R., 2005. The effect of environmental stress on absolute and mass-specific scope for growth in *Daphnia magna* Strauss. *Comp. Biochem. Physiol.,C*, 364-373.
- Baird, D.J., Barber, I., and Calow, P., 1990. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. I. Chronic life-history effects. *Funct. Ecol.*, 4, 399-407.
- Baird, D.J., Barber, I., Soares, A.M.V.M., Callow, P., 1991. An early lifestage test with *Daphnia magna* Straus: an alternative to the 21-day chronic test? *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 22, 1-7.
- Barata, C., Baird, D.J., and Markich, S.J., 1998. Influence of genetic and environmental factors on the tolerance of *Daphnia magna* Straus to essential and non-essential metals. *Aquat. Tox.*, 42, 115-137.

- Barata, C., Markish, S.J., Baird, D.J., Soares, A., 2002. The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.*, 61, 143-154.
- Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, A.J.A., Agra, A.R., Soares, A., 2007. Life-history responses of *Daphnia magna* Straus to binary mixtures of toxic substances: pharmacological versus ecotoxicological modes of action. *Aquat. Toxicol.*, 84, 439-449.
- Beaugelin-Seiller, K., Jasserand, F., Garnier-Laplace, J., and Gariel, J.C., 2006. Modeling radiological dose in non-human species: Principles, computerization, and application. *Health Physics*, 90, 485-493.
- Beaumont, A., Cassier, P. 2004. Biologie animale : Des protozoaires aux métazoaires épithélioneuriens, Tome 2. Eds, Sciences Sup, Dunod.
- Berenbaum, M.C., 1985. The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J.Theor.Biol.*, 114, 413-431.
- Besser, J.M., Canfield, T.J., La Point, T.W., 1993. Bioaccumulation of organic and inorganic selenium in a laboratory food chain. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 57-72.
- Bianchini, A., Wood, C.M., 2008. Does sulfide or water hardness protect against chronic silver toxicity in *Daphnia magna*? A critical assessment of the acute-to-chronic toxicity ratio for silver? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* In press doi:10.1016/j.ecoenv.2008.03.006.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.*, 26, 585-615.
- Bodar, C.W.M., Van der Sluis, I., Voogt, P.A., Zandee, D.I., 1988. Effects of cadmium on consumption, assimilation and biochemical parameters of *Daphnia magna*: Possible implication for reproduction. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90C, 341-346.
- Bodar, C.W.M., Zee, A.v.d., Voogt, P.A., Wynne, H., Zandee, D.I., 1989. Toxicity of heavy metals to early life stages of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 17, 333-338.
- Bonin, B., Blanc, P.L., 2001. L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine. In L'uranium de l'environnement à l'homme, pp. 8-41. *EDP Sciences*, Les Ulis, France.
- Bonnefont-Rousselot, D., Gardes-Albert, M., Delattre, J., Ferradini, C. 1994. Quantitative low-density lipoprotein oxidation by gamma radiolysis. *Methods in Enzymology*, 233, 441-452.
- Box, G.E. P., Cox, D.R., 1964. An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society*, Series B 26, 296-311.
- Bourrachot, S., 2005. Effets de l'uranium sur les écosystèmes d'eau douce. Application au modèle biologique *Daphnia magna* Strauss. Rapport de stage de master 2 Recherche « Sciences et Technologies » Mention « Systèmes écologiques aquatiques » de l'université de Bordeaux 1.
- Bringmann, G., Kuhn, R., 1959. The toxic effects of waste water on aquatic bacteria, algae and small crustaceans. *Gesundh.-Ing.*, 80, 115-120.
- Bywater, J.F., Banackowski, R., Bailey, M., 1991. Sensitivity of uranium of six species of tropical freshwater fishes and four species of cladocerans from northern Australia. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10, 1449-1458.

- Calow, P., Sibly, R.M., 1990. A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Funct. Ecol.*, 4, 283-288.
- Calow, P., 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 3-6.
- Campbell, P.G.C., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: Tessier, A., Turner, D.R. Eds. *Metal speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Wiley, New York, 45-102.
- Carter, W.H., 1995. Relating isobolograms to response surfaces. *Toxicology*, 105, 181-188.
- Cassee, F.R., Groten, J.P., van Bladeren, P.J., Feron, V.J., 1998. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Critical Reviews In Toxicology.*, 28, 73-101.
- Cedergreen, N., Streibig, J.C., 2005. Can the choice of endpoint lead to contradicting results of mixture toxicity experiments? *Environ. Toxicol. Chem.*, 24, 1676-1683.
- Cedergreen, N., Kudsk P., Mathiasen, S., Streibig, J.C., 2007. Combination effects of herbicides: Do species and test system matter? *Pestic Manag Sci* 63:282-295.
- Cedergreen, N., Christensen, A.M., Kamper, A., Kudsk, P., Mathiasen, S., Streibig, J.C., Sørensen, H., 2008. A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environ. Toxicol. Chem.*, *In press*.
- Cejka, J., Sejkora, J., Deliëns, M., 1996. New data on studdite from Shinkolobwe, Shaba, Zaire. *Neues Jahrbuch für Mineralogie*, 125-134.
- Chèvre N., 2000. Etude et modélisation des effets écotoxicologiques d'un micropolluant organique sur *Daphnia magna* et *Pseudokirchneriella subcapitata*, Ecole Polytechnique fédérale de Lausanne, Lausanne, 206p.
- Chou, T.-C., 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58, 621-681.
- Coffey, T., Gennings, C., Simmons, J.E., Herr, D.W. 2005. D-Optimal experimental designs to test for departure from additivity in a fixed-ratio mixture ray. *Toxicological Sciences*, 88, 467-476.
- Colle, C., Garnier-Laplace, J., Roussel-Debet, S., Adam, C., Baudin, J.-P., 2001. Comportement de l'uranium dans l'environnement. In: *L'Uranium de l'environnement à l'homme* pp. 187-211. EDP Sciences, Les Ulis, France.
- Conde, J. E. and Sanz Alaejos, M., 1997. Selenium Concentrations in Natural and Environmental Waters. *Chem. Rev.*, 97, 1979-2004.
- Cooley H.M. and Klaverkamp J.F., 2000. Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*), *Aquat. Tox.*, 48, 477-494.
- Coughtrey, P. J., Jackson, D. and Thorne, M. C. ,1983. Selenium. in "Radionuclide distribution and transport in terrestrial and aquatic ecosystems." . vol 3. A. Balkema. Rotterdam.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing: IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery* 6, 43-55.

- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 2003. The missing biomarker link: relationship between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Env. Toxicol. Chem.*, 22, 1632-1641.
- Delacroix, D., Guerre, J.-P., Leblanc, P., 2004. Guide pratique : Radionucléides et Radioprotection, 4rd ed., EDP Science, Les Ulis, France.
- Denison, F., 2004. Uranium (VI) speciation: modelling, uncertainty and relevance to bioavailability models. Application to uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve. Sciences De L'environnement. Aix Marseille 1, Université de Provence.
- Denison, F.H. et Garnier-Laplace, J., 2005. The effects of database parameter uncertainty on uranium (VI) equilibrium calculations. *Geochim. and Cosmochim. Acta*, 69, 2183-2191.
- De Rosemond, S.C., Liber, K., Rosaasen, A., 2005. Relationship between embryo selenium concentration and early life stage development in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a northern Canadian lake. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 74, 1134- 42.
- De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., 2002. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia magna*: The effects of calcium, magnesium, sodium, potassium, and pH. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 48-54.
- Dreschner K, Boedeker W. 1995. Assessment of the combined effects of substances: The relationship between concentration addition and independent action. *Biometrics*, 51, 716-730.
- Dressler, V., Muller, G., Suhnel, J., 1999. CombiTool—a new computer program for analyzing combination experiments with biologically active agents. *Comp. Biomed. Res.*, 32, 145–160.
- Di Toro, D.M., McGrath, J.A., Hansen, D.J., Berry, W.J., Paquin, P.R., Mathew, R., Wu, K.B., Santore, R.C., 2005. Predicting sediment metal toxicity using a sediment biotic ligand model: Methodology and initial application. *Env. Toxicol. Chem.*, 24, 2410-2427.
- Ducros, V., Favier, A., 2004. Selenium metabolism. *EMC-endocrinologie* 1, 19-28.
- Dunbar, A.M., Lazorchak, M., Waller, W.T., 1983. Acute and chronic toxicity of sodium selenate to *Daphnia magna* *Strauss. Env. Toxicol. Chem.*, 2:239-244.
- Durou, C., Mouneyrac, C., Pellerin, J., Déry, A., 2008. Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. In : Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Eds : Amiard, Jean-Claude et Amiard-triquet, Claude, Éditions Tec et Doc, Lavoisier 2008 ; pp. 273-294.
- Ebert, D., 1991. The effect of size at birth, maturation threshold and genetic differences on the life-history of *Daphnia magna*. *Oecologia*, 86, 243-250.
- Ebert, D., 2005. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Eldendt, B.P., Bias, W.R., 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Research*, 24 , 1157-1167.
- Elliot, J.M. and Davison, W., 1975. Energy equivalents of oxygen consumption in animal energetics. *Oecologia*, 195-201.

- Ercal, N., Gurer-Orhan, H. and Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Cur. Top. Med. Chem.*, 1, 529-539.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H., 2001. Predicting the joint algal toxicity of multi component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat. Toxicol.*, 56,13-32.
- Faust, M., Scholze, M., 2004. Competing concepts for the prediction of mixture toxicity: Do the differences matter for regulatory purposes? EU project BEAM. *Final. European Commission*, Brussels, Belgium.
- Feron, V.J., Cassee, F.R., Groten, J.P., 1998. Toxicology of chemical mixtures: International perspective. *Environmental Health Perspectives*, 106, 1281-1289.
- Feron, V.J., Groten, J.P., 2002. Toxicological evaluation of chemical mixtures. *Food Chem. Toxicol.*, 40:825-839.
- Finch, R., Murakami, T., 1999. Systematics and paragenesis of uranium minerals. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 38, 91-179.
- Fortin, C., Dutel, L., and Garnier-Laplace, J., 2004. Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion. *Env. Toxicol. Chem.*, 23, 974-981.
- Fortin, C., Denison, F.H., and Garnier-Laplace, J., 2007. Metal-phytoplankton interactions: Modelling the effect of competing ions (H^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+}) on uranium uptake. *Env. Toxicol. Chem.*, 26, 242-248.
- Fournier, E., Tran, D., Denison, F., Massabuau, J.C., Garnier- Laplace, J., 2004. Valve closure response to uranium exposure for a freshwater bivalve *Corbicula fluminea*: quantification of the influence of pH. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1108–1114.
- Fournier, E., 2005. Bioaccumulation du selenium et effets biologiques induits chez le bivalve filtreur *Corbicula fluminea*. Prise en compte de l'activité ventilatoire, de la spéciation du sélénium et de la voie de contamination. Thèse présentée à l'université de Bordeaux I, France
- Frost, B.W., 1972. Effects of size and concentration of food particles on the feeding behaviour of a marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. *Limnol. Oceanogr.*, 805-815.
- Gaines, R.V., Skinner, H.C.W., Foord, E.E., Mason, B., Rosenzweig, A., 1999. Dana's New Mineralogy, 8, John Wiley et Sons, New York, U.S.A.
- Gardner, H.W., 1989. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7, 65-86.
- Gascoyne, M., 1992. Geochemistry of the actinides and their daughters; *Uranium-series Disequilibrium: Applications to Earth, Marine and Environmental Sciences, second ed.*, pp. 34-61. Ivanovich, M., Harmon, R.S. (Eds.). Clarendon Press, Oxford, UK
- George, W.G., 2003. Selenium and tellurium. *U.S. geological survey minerals yearbook*, 65.1-65.5. <http://minerals.usgs.gov/>
- Gessner, P. K., 1995. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. *Toxicology*, 105, 161-179.
- Gilbin, R., Alonzo, F., and Garnier-Laplace, J., 2007. Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *J. Environ. Radioact.*, 99, 134-145.
- Glazier, D.S., Calow, P. 1992. Energy allocation rules in *Daphnia magna*: clonal and age differences in the effects of food limitation. *Oecologia*, 90, 540-549.

- Goldoni, M., Johansson, C., 2007. A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: Evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. *Toxicol. In Vitro*, 21, 759–769.
- Greco, W. R., G. Bravo, 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev.* 47, 331-385.
- Groten JP, Feron VJ, Suhnel J. 2001. Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends Pharmacol Sci* 22:316-322.
- Guilhermino, L., Sobral, O., Chastinet, C., Ribeiro, R., Gonçalves, F., Silva, M.C., Soares, A.M.V.M., 1999. A *Daphnia magna* first-brood chronic test: an alternative to the conventional 21-day chronic bioassay? *Ecotoxicol. Environ. Safety* 42, 67-74.
- Haas, C.N., Cidambi, K., Kersten, S., Wright, K., 1996. Quantitative description of mixture toxicity: Effect of level of response on interactions. *Env. Toxicol. Chem.*, 15, 1429-1437.
- Halter, M.T., Adams, W.J., and Johnson, H.E., 1980. Selenium toxicity to *Daphnia magna*, *Hyallolela azteca*, and the fathead minnow in hard water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 24, 102-115.
- He, X., and Wang, W.X., 2006. Release of Ingested phytoplankton carbon by *Daphnia magna*. *Freshwater Biology*. 51, 649-665.
- Hertzberg, R.C. and Macdonnell, M.M., 2002. Synergy and other ineffective mixture definitions. *Sci. Total Environ* . 288, 34-42.
- Hewlett, P.S., 1969. Measurement of the potency of drug mixtures. *Biometrics* ,25,478-487.
- Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.C. , 1992. Histopathologic biomarkers, in R. J. Huggett, R. A. Kimerly, P. M. J. Mehrle, and H. L. Bergman, eds., *Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*: Chelsea, MI, USA, Lewis Publishers, 155-210.
- Hodson, P.V., Hilton, J.W., 1983. The nutritional requirements and toxicity to fish of dietary and waterborne selenium. *Environmental biogeochemistry*. Proc. 5th international symposium, Stockholm, 1981, 335 pp.
- Holm, J., Palace, V.P., Siwik, P., Sterling, G., Evans, R.E., Baron, C.L., Werner, J., Wautier, K., 2005. Development effects of bioaccumulated selenium in eggs and larvae of two salmonid species. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24, 2373-2381.
- Ince, N.H., Dirilgen, N.G., Tezcanli, G., Üstün, B., 1999. Assessment of Toxic Interactions of Heavy Metals in Binary Mixtures: A Statistical Approach. Archives of *Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 365.
- Ingersoll, C.G., Dwyer, F.J., May, T.W., 1990. Toxicity of inorganic and organic selenium to *Daphnia magna* (cladocera) and *Chironomus riparius* (diptera). *Env. Toxicol. Chem.*, 9,1171-1181.
- Isnard, P., Flammarion, P., Roman, G., Babut, M., Bastien, Ph., Bintein, S., Esserméant, L., Féraud, J.F., Gallotti-Schmitt, S., Saouter, E., Saroli, M., Thiébaud, H., Tomassone, R., Vindimian, E., 2001. Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere*. 45, 659-669.
- ISO (International Organisation for Standardisation). 1996. Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Strauss (Cladocera, Crustacea). NF EN ISO 6341.
- Johansson, L., Gafvelin, G., Arner, E. S. J., 2005. Selenocysteine in proteins properties and biotechnological use. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1726, 1-13.
- Johnston P.A., 1989. Morphological changes in *Daphnia magna* (Straus) exposed to inorganic selenium as sodium selenate. *Aquat. Tox.*, 14,95-107.

- Johnston, P.A., 1987. Acute toxicity of inorganic selenium to *Daphnia magna* (Straus) and the effect of sub-acute exposure upon growth and reproduction. *Aquat. Tox.* 10, 335-345.
- Jonker, M. J., C. Svendsen, 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Env. Toxicol. Chem.*, 24, 2701-2713.
- Kast-Hutchenson, K., Rider, C.V., LeBlanc, G.A., 2001. The fungicide Propiconazole interferes with embryonic development of crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 502-509.
- Keating, K.I., Dagbusan, B.C., 1984. Effect of selenium deficiency on cuticle integrity in the Cladocera (Crustacea). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 34-33.
- Klaverkamp, J. F.; Baron, C. L., Fallis, B. W., Ranson, C. R., Wautier, K. G., Vanriel, P., 2002. Metals and metallothionein in fishes and metals in sediments from lakes impacted by uranium mining and milling in northern Saskatchewan. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, 24-30
- Knops, M., Altenburger, R., and Segner, H., 2001. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquat. Tox.*, 53, 79-90.
- Könemann, H., 1981. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: a proposal for a quantitative approach and experimental results. *Toxicology*, 19, 229-238.
- Koivisto, S., 1995. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environmental Pollution*, 90, 263-267.
- Kooijman, S.A.L.M., 2001. Quantitative aspects of metabolic organization: A discussion of concepts. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356 (1407), pp. 331-349.
- Kortenkamp, A., Altenburger, R., 1998. Synergisms with mixtures of xenoestrogens: A reevaluation using the method of isoboles. *The Science of the Total Environment*, 22, 59-73.
- Krylov, E.I., Chukhlantsev, V.G., 1957. Uranyl and thorium selenites. *J. Anal. Chem. USSR_Engl. Transl.*, 12, 469-473.
- Kuhne, W.W., Caldwell, C.A., Gould, W.R., Fresquez, P.R., Finger, S., 2002. Effects of depleted uranium on the health and survival of *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. *Env. Toxicol. Chem.*, 21, 2198-2203.
- 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.
- Lange, J.H., Thomulka, K.W., 1998. Evaluation of mixture toxicity for nitrobenzene and trinitrobenzene at various equitoxic concentrations using the *Vibrio harveyi* bioluminescence toxicity test. *Fresenius Environmental Bulletin*, 7, 444-451.
- Lemly, A. D., 2002. Toxic effects of selenium in fish. in "Selenium Assessment in Aquatic Ecosystems. A guide for hazard evaluation and water quality criteria". S. series: 39-58.
- Lemly, A., 2004. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, 59, 44-56.
- Lettieri T. 2006. Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environ Health Perspect* 114, 4-9.

- Liber, K., Stoughton, S., Rosaasen, A. 2004. Chronic uranium toxicity to white sucker fry (*Catostomus commersoni*)? *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73, 1065-1071.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 42, 656-666.
- Lubal, P., Havel, J., 1997. The study of complex equilibria of uranium VI with selenate. *Talanta*, 44, 457-466.
- Madic C. and M. Genet. 2001. Propriétés physiques et chimiques de l'uranium. Pages 43-79 in Collection IPSN, Éditions de physique, Métivier H, editor. L'uranium de l'environnement à l'homme.
- Mahar ,A.M., Watzin M.C., 2005. Effects of metal and organophosphate mixtures on *Ceriodaphnia dubia* survival and reproduction. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24, 1579-1586.
- Maier, K.J., Foe, C.G., Knight, A.W., 1993. Comparative toxicity of selenate, selenite, seleno-DL-methionine and seleno-DL-cystine to *Daphia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 755-765.
- Markich S., Brown P.,Jeffree R., 1996, The use of geochemical speciation modeling to predict the impact of uranium to freshwater biota., *Radiochimica Acta*, 74, 321-326.
- Markich, S.J., Brown, P.L., Jeffree, R.A., and Lim, R.P., 2000. Valve movement responses of *Velesunio angasi* (Bivalvia: Hyriidae) to manganese and uranium: An exception to the free ion activity model. *Aquat. Tox.*, 51, 155-175.
- Marking, L.L. 1977 Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, 98-108. In: Mayer, FL and Hamelink, JL. eds American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Mayer, F.L., Versteeg, D.J., Folmar, L.C., Graney, R.L., McCume, D.C., Rattner, B.A. 2002. Physiological and non specific biomarkers. In: Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M.J., Bergman, H.L. biomarkers: Biochemical, physiological and Histological Markers of Arthropogenic Stress. SETAC Publication Series, Lewis Publishers, Boca Raton, Chelsea, USA, 5-85.
- Mayzaud, P. and Razouls, S., 2002. Degradation of gut pigment during feeding by a subantarctic copepod: importance of feeding history and digestive acclimation. *Limnol. Oceanogr.*, 393-404.
- Meadows, S. L., Gennings, C., Carter, W. H., Jr., Bae, D.-S. 2002. Experimental designs for mixtures of chemicals along fixed ratio rays. *Environ. Health Perspect.* 110(Suppl. 6), 979-983.
- Miller, A.C., Stewart, M., Brooks, K., Shi, L., and Page, N., 2002. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: Absence of significant alpha particle decay. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91, 246-252.
- Morel F.M.M., 1983. Principles of aquatic chemistry, New York, *Wiley-Intersciences*, 301p.
- Muscattello, J.R., Bennett, P.M., Himbeault, K.T, 2006. Larval deformities associated with selenium accumulation in northern pike (*Esox lucius*) exposed to metal mining effluent, *Environ. Sci. Technol.*, 40, 6506-6512.
- Muscattello, J.R. .A.M. Belknap and D.M. Janz, 2008. Accumulation of selenium in aquatic systems downstream of a uranium mining operation in northern Saskatchewan, Canada, *Environ. Pollut.*, *In press*, doi:10.1016/j.envpol.2008.01.039.
- Nogueira, I.C.G., Lobo-da-Cunha, A., Vasconcelos, V.M., 2006. Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanobacteria) ingestion on *Daphnia magna* midgut and associated diverticula epithelium *Aquat. Tox.*, 80, 194-203.

- Noller, B.N., 1991. Non-Radiological contaminants from uranium mining and milling at Ranger, Jabiru, Northern territory, Australia. *Environmental Monitoring and Assessment*, 19, 383-400.
- OCDE, 1998. *Daphnia magna* acute immobilisation test and reproduction test, guidelines for testing of chemicals, Rep. No. 211. *Organisation for Economic Cooperation and Development*, Paris, France.
- OCDE-NEA, 1996. Survey of Thermodynamic and Kinetic Databases. *Organisation for Economic Cooperation and Development and Development Nuclear Energy Authority*, Paris, France.
- Ogle, R.S. and Knight, A.W., 1996. Selenium bioaccumulation in aquatic ecosystems: 1. Effects of sulfate on the uptake and toxicity selenate in *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 30, 274-279.
- Ohta, T., Tokishita, S., Shiga, Y., Hanazato, H., Yamagata, H., 1998. An assay for detecting environmental toxicants with cultured cladoceran eggs in vitro: Malformations induced by ethylenethiourea. *Environ. Res.*, A 77, 43-48.
- Paquin, P.R.J.W., 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 133, 3-35.
- Parkhurst, B.R., Elder, R.G., Meyer, J.S., Sanchez, D.A., Pennak, R.A., and Waller, W.T., 1984. An environmental hazard evaluation of uranium in a Rocky Mountain stream. *Env. Toxicol. Chem.*, 113-124.
- Paloheimo, J.E., Crabtree, S.J., Taylor, W.D., 1982. Growth model of *Daphnia*. *Canadian Journal of fisheries and Aquatic Sciences*, 4, 598-606.
- Pickett, J.B., Specht, W.L., Keyes, J.L., 1993. Acute and chronic toxicity of uranium compounds to *Ceriodaphnia dubia*, Rep. No. WSRC-RP-92-995. Prepared for the Department of Energy under contract DE-AC09-89SR 18035.
- Pösch G. 1993. Combined Effects of Drugs and Toxic Agents. *Springer-Verlag*, Wien, Austria.
- Poston, T.M., Hanf Jr, R.W., Simmons, M.A., 1984. Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 22, 289-298.
- Poynton, H.C., Varshavsky, J.R., Chang, B., Cavigiolio, G., Chan, S., Holman, P.S., Loguinov, A.V., Bauer, D.J., Komachi, K., Theil, E.C., Perkins, E.J., Hughes, O., Vulpe, C.D., 2007. *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1044-1050.
- Pyle, G. G., Swanson, S. M., Lehmkuhl, D. M., 2001. Toxicity of uranium mine-receiving waters to caged fathead minnows, *Pimephales promelas*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 48, 202-214.
- R development Core Team, 2006. R: A language and Environment for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ragnarsdottir, K.V., Charlet, L., 2000. Uranium behavior in natural environments. In *Environmental Mineralogy: Microbial Interactions, Anthropogenic Influences, Contaminated Lands and Waste Management*, Vol. Series 9, pp. 333-377. *Mineralogical Society of Great Britain and Ireland*, London, UK.
- Ribera D., Labrot F., Tisnerat G., 1996. Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects, *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology*, 146, 53-89.
- Richman, S., 1958. The transformation of energy *Daphnia pulex*. *Ecol. Monogr.*, 28, 273-291.
- Rider, C., 2005. Development and application of an integrated addition and interaction model of mixture toxicity. Dissertation submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University.
- Riethmuller, N., Markich, S.J., van Dam, R.A., Parry, D., 2001. Effects of water hardness and alkalinity on the toxicity of uranium to a tropical freshwater hydra (*Hydra viridissima*). *Biomarkers*, 45-51.

- Santojanni, A., Gorbi, G., Sartore, F., 1995. Prediction of mortality in chronic toxicity tests on *Daphnia magna*. *Water Res.* 29, 1453–1459.
- Schindler, D.W., 1968. Feeding, assimilation and respiration rate of *Daphnia magna* under various environmental conditions and their relation to production estimates. *J. Anim. Ecol.*, 37, 369-385.
- Schrauzer, G. N., 2000. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J. Nutr.*, 130, 1653-1656.
- Schultz, T.W., Freeman, S.R., Dumont, J.N. 1980. Uptake, depuration, and distribution of selenium in *Daphnia* and its effects on survival and ultrastructure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 9, 23-40.
- Séby, F., Potin-Gautier, M., Borge, G. and Donard, O., 2001. A critical review of thermodynamic data for selenium species at 25°C. *Chemical Geology*, 171, 173-194.
- Semaan, M., Holdway, D., and van Dam, A.R.A., 2001. Comparative sensitivity of three populations of the cladoceran *Moinodaphnia macleayi* to acute and chronic uranium exposure. *Environ. Toxicol.*, 16, 365-376.
- Sheppard, S.C., Sheppard, M.I., Gallerand, M.O., and Sanipelli, B., 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *J. Environ. Radioact.*, 79, 55-83.
- Smith D. K. 1984. Uranium mineralogy. In *Uranium Geochemistry, Mineralogy, Geology, Exploration and Resources*. *Inst. Mining Metall.* 43-88.
- Smolders, R., Bervoets, L., and Blust, R., 2002. Transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as active biomonitors in an effluent-dominated river. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1889-1896.
- Smolders, R., De Boeck, G., Blust, R., 2003. Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) *Environ. Toxicol. Chem.*, 22, 890-899.
- Sobral, O., Chastinet, C., Nogueira, A., Soares, A.M.V.M., Gonçalves, F., Ribeiro, R., 2001. In vitro development of parthenogenetic eggs: a fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 50, 174–179.
- Soetaert, A., Moens, L.N., van der Ven, K., Van Leemput, K., Naudts, B., Blust, R., De Coen, W.M., 2006. Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comp. Biochem. Physiol. C* 142, 66–76.
- Soetaert, A., Moens, L.N., van der Ven, K., Van Leemput, K., Naudts, B., Blust, R., De Coen, W.M., 2006. Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comp. Biochem. Physiol. C* 142, 66–76.
- Sørensen, H., Cedergreen, N., Skovgaard, I., Streibig, J.C., 2007. An isobole based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. *Environmental and Ecological Statistics* 14, 383-397.
- Sprague, J.B., 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Res.* 4,3-32.
- Stark, J.D., Banks, J.E., Vargas, R., 2004. How risky is risk assessment: the role that life history strategies play in susceptibility of species to stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 732-736.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 321-336.

Streibig, J.C., Rudemo, M., Jensen, J.E., 1993. Dose–response curves and statistical models. In: Streibig, J.C., Kudsk, P. (Eds.), *Herbicide Bioassay*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 29-55.

Supervising scientist 2007. Annual report 2006-2007, *Supervising scientist*, Darwin, Australia.

Syberg, K., Elleby, A., Pedersen, H., Cedergreen, N., Forbes, V.E., 2008. Mixture toxicity of three toxicants with similar and dissimilar modes of action to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 69: 428-436

Tapiero, H., Townsend, D., 2003. The antioxydant role of selenium and selenocompounds. *Biomedecine and Pharmacotherapy* 57: 134-144.

Taylor, G., Baird, D.J., Soares, A., 1997. Surface binding of contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Strauss. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 3: 412-419.

Tinggi, T., 2003. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology Letters* 137, 103-110.

Thompson, P.-A., Couture, P., Thellen, C., Auclair, J.-C. 1987. Sturcture-Function relationship for monitoring cellular stress and recovery responses with *Selenastrum capricornum*. *Aquatic Toxicology*. 10: 291-305.

Thompson, P.-A., Couture, P. 1991. Short- and Lon-terme changes in growth and biochemical composition of *Selenastrum capricornutum* populations exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*. 21: 135-144.

Thompson, P.-A., Couture, P. 1993. Physiology of carbon assimilation in a green alga during exposure to recovery from cadmium. *Ecotoxicology and Environmental safety*. 26: 205-215.

UNSCEAR. 2000. Sources and effects of ionizing radiation: Annex H (Combined effects of radiation and other agents): 179-271.

USEPA. 2000. Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures. *U.S. Environmental Protection Agency*: Washington, DC; 143p.

USEPA. 2004. Draft aquatic life water quality criteria for selenium, Office of Water, Office of Science and Technology, *U.S. Environmental Protection Agency*: Washington, DC; 334 pp.

Van der Lee, J., 1998. Thermodynamic and mathematical concepts of Chess. GIG-Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau, France.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003, Fish bioaccumulation and biomarkers inenvironmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149.

Vettori, M.V., Goldoni, M., Caglieri, A., Poli, D., Folesani, G., Ceccatelli, S., Mutti, A., 2006. Antagonistic effects of methyl–mercury and PCB153 on PC12 cells after a combined and simultaneous exposure. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1505-1512.

Vølund A. 1992. Dose response surface bioassay. Proceedings, XVIth International Biometric Conference, Hamilton, New Zealand, December 7–11, p 249.

Watanabe, H.; Takahashi, E.; Nakamura, Y.; Oda, S.; Tatarazako, N.; Iguchi, T. 2007. Development of a *Daphnia magna* DNAmicroarray for evaluating the toxicity of environmental chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26, 669–76.

Winberg,G.G., 1961. New information on metabolic rate in fishes *Trans. Ser. No. 362, Fish. Res. Bd Can. Nanaimo*, British Columbia (translated from Russian). Distributed by the Fisheries Research Board of Canada, Nanaimo, B.C., 11pp.

WHO, 2001. Depleted uranium: sources, exposure, and health effects, Rep. No. WHO/SDE/PHE/01.1, Geneva, Switzerland.

Xie, F., Koziar, S. A., Lampi, M. A., Dixon, D. G., Huang, X. D., Greenberg, B. M., Norwood, W. P., Borgmann, U. 2006. Assessment of the toxicity of mixtures of copper, 9,10-phenanthrenequinone, and phenanthrene to *Daphnia magna*: Evidence for a reactive oxygen mechanism. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25:613.

Yazzie, M., Gamble, S.L., Civitello, E.R., and Stearns, D.M., 2003. Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chem. Res.Toxicol.*, 16, 524-530.

Zeman, F.A., Gilbin, R., Alonzo, F., Pradines, C., Garnier-Laplace, J., Aliaume, C., 2008. Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *Aquat. tox.* 86 : 370-378.

Annexes

Annexe 1 : Méthode statistique de Jonker *et al.* (2005)

Annexe 2 : Observations des différents stades d'un développement embryonnaire définis par Kast-Hutcheson *et al.* (2001)

Annexe 3 : Données de toxicité aigüe de l'uranium chez les cladocères d'eau douce

Annexe 4 : Données test toxicité aigüe du sélénium sur *Daphnia magna* et sur *Daphnia pulex*

Annexe 5 : Préparation du milieu M4-pH7 et M4-pH8

Annexe 6 : Protocole de préparation des algues pour les daphnies

Annexe 7 : Protocole d'extraction de lipides selon la méthode de Bligh et Dyer (1959)

Annexe 8 : Pourcentage moyen de survie et de fécondité en fonction des jours

Annexe 9 : Correction des effets de matrice engendrés par le milieu M4-pH7 lors du dosage de l'uranium par ICP-AES

Annexe 10 : Article : Effet de l'uranium sur la survie, la croissance, la reproduction et sur les processus physiologiques chez le cladocère d'eau douce *Daphnia*

Annexe 11 : Données de toxicité aigüe de l'uranium

Annexe 12 : Données de toxicité chronique de l'uranium

Annexe 13 : Données de toxicité aigüe du sélénium

Annexe 14 : Données de toxicité chronique du sélénite

Références des annexes

Annexe 1 : Méthode statistique de Jonker et al. (2005)

Relation dose-réponse pour les substances seules:

Il a été considéré que la réponse biologique de chaque paramètre change de façon monotone entre 0 et une réponse maximum et peut être exprimée de la façon suivante :

$$Y = u_{\max} h(c_i) = f(c_i) \quad (1)$$

Y est la réponse biologique mesurée, u_{\max} est à la fois la réponse maximum du contrôle quand le paramètre étudié diminue quand la dose augmente (par exemple la survie ou la reproduction) ou la réponse maximum pour les paramètres qui croissent avec une dose croissante (par exemple la mortalité ou l'induction d'enzyme), $h(c_i)$ est une fonction qui est liée à la concentration du composé c (par exemple un loi log-Weibull, log-logistic ou lognormal).

Les modèles de mélange

◆ Modèle d'addition des concentrations

Si on considère un mélange avec n composés chimiques qui a un pourcentage d'effet x% par rapport au témoin, alors le modèle d'addition des concentrations peut être formulé de la façon suivante :

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{CE_{xi}} = 1 \quad (2)$$

c_i représente la concentration de la substance i d'un mélange de n composés ($i=1 \dots n$) ayant un effet total E et CE_{xi} est la concentration de la substance i qui provoque l'effet E dans le cas où elle est appliquée seule.

Le quotient c_i/CE_{xi} est l'unité toxique sans dimension: (TU_{xi}) qui quantifie la contribution relative de chaque substance i à la toxicité du mélange de n substances.

Pour pouvoir quantifier les déviations du modèle d'addition des concentrations, l'équation 2 a été reformulée de la façon suivante:

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{f_i^{-1}(Y)} = \exp(G) \quad (3)$$

Y est la réponse biologique. La concentration de la substance isolée i qui donnera la même réponse que le mélange (Y) pourra être calculée en utilisant la relation dose-réponse inverse. ($f_i^{-1}(Y)$). La concentration calculée est reliée directement à la valeur numérique i pour la réponse biologique plutôt qu'un pourcentage de la réponse du contrôle comme dans l'équation 2. Le degré de déviation à partir de l'addition des concentrations est donné par la quantité G. L'équation 3 peut être résolue par itération.

◆ Modèle d'addition des concentrations

Pour l'indépendance d'action, la relation dose-réponse peut être calculée en multipliant les probabilités de non-réponse, $q_i(c_i)$ et peut être formulée de la façon suivante :

$$Y = u_{\max} \prod_{i=1}^n q_i(c_i) \quad (4)$$

Pour pouvoir quantifier les déviations du modèle d'indépendance d'action, une fonction de déviation a été introduite dans l'équation 4.

Une réponse qui diminue avec l'augmentation de la dose (en termes de probabilité de non-réponse) peut être généralisée grâce à l'équation 5a. Une réponse qui augmente avec la dose (en termes de probabilité de non-réponse $P_{1,\dots,n} = 1 - \prod_i q_i[c_i]$) amène à l'équation 5b :

$$Y = u_{\max} \Phi \left\{ \Phi^{-1} \left[\prod_{i=1}^n q_i c_i \right] + G \right\} \quad (5a)$$

$$Y = u_{\max} \Phi \left\{ \Phi^{-1} [P_{1,\dots,n}] - G \right\} \quad (5b)$$

Les fonctions de déviation

Les fonctions de déviation dépendent de la contribution de chaque substance chimique à la toxicité du mélange (TUx). La somme relative des unités toxiques de chaque substance chimique i dans un mélange peut être calculée de la façon suivante :

$$z_i = \frac{TUx_i}{\sum_{j=1}^n TUx_j}, \quad \text{avec} \quad TUx_i = \frac{c_i}{CEx_i} \quad (6)$$

La fonction de déviation est exprimée en fonction de la contribution relative des substances à la toxicité z_i et est notée $G = (z_1, \dots, z_n)$.

◆ Synergie/ Antagonisme (S/A)

La déviation appelée Synergie/ Antagonisme peut être formulée en substituant la fonction suivante dans l'équation 3 et/ou les équations 5a/b :

$$G = (z_1, \dots, z_n) = a \prod_{i=1}^n z_i \quad (7)$$

Cette fonction de déviation décrit un antagonisme si la valeur a est positive et une synergie si a est négatif (voir tableau récapitulatif).

◆ Déviation dépendante du ration de dose (DR)

Pour un mélange binaire, la fonction synergie/antagonisme exprimée dans l'équation 7 peut être rendue dose ratio dépendante grâce à l'équation suivante :

$$G(z_1, z_2) = (a + b_1 z_1) z_1 z_2 \quad (8)$$

z_1 et z_2 représentent respectivement la contribution de la substance 1 et 2 ; le paramètre b_1 représente l'amplitude de changement associé à la substance 1 et le paramètre a celui associé à la substance 2.

◆ Déviation dépendante du niveau de dose (DL)

Pour décrire une synergie ou un antagonisme dépendant du niveau de dose, la fonction de base (S/A) est complétée en ajoutant des isoboles quantifiées. Comme les isoboles sont définies sur la base des concentrations d'effet pour l'addition des concentrations, alors qu'elles sont définies sur la base de probabilité de réponse pour le modèle d'indépendance d'action, leurs déviations doivent être considérées séparément.

Pour l'addition des concentrations, l'isobole à la CE_{50} est donnée par l'équation suivante : $\sum_i^n TU50_i = 1$ et peut être incorporée dans la fonction de déviation de la façon suivante :

$$G(z_1, \dots, z_n) = a \left(1 - b_{DL} \sum_{i=1}^n TU50_i \right) \prod_{i=1}^n z_i \quad (12)$$

Pour l'indépendance d'action l'isobole à la CE_{50} est définie par $P_{1, \dots, n} = 0,5$. Ainsi la fonction de déviation s'écrit de la façon suivante :

$$G = (z_1, \dots, z_n) = a \left(1 - b_{DL} P_{1, \dots, n} \right) \prod_{i=1}^n z_i \quad (13)$$

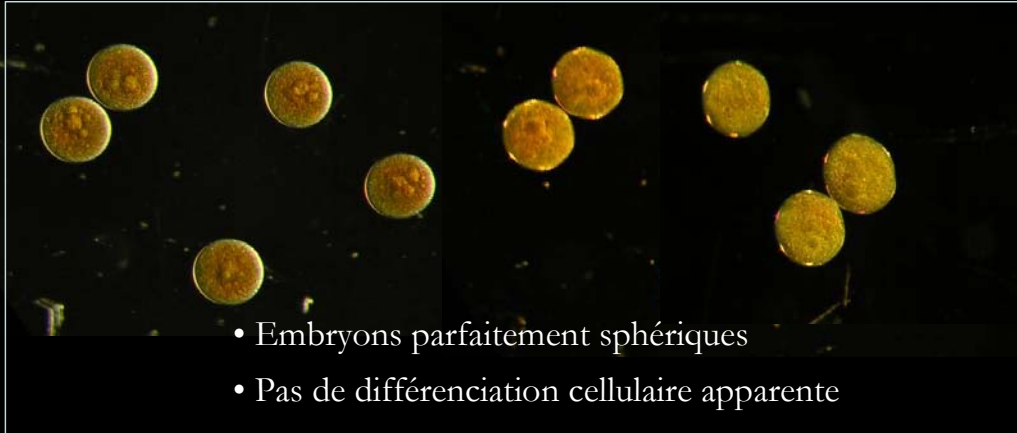
Tableau : Interprétation des paramètres introduits dans les modèles d'addition des concentrations (CA) et d'indépendance d'action (IA) qui définissent le type de déviation observée

paramètre	Valeur		Signification
	CA	IA	
Synergie/Antagonisme			
a	> 0	> 0	Antagonisme
	< 0	< 0	Synergie
Dépendance Dose-Ratio			
a	> 0	> 0	Antagonisme, excepté pour les ratios de dose où b_i est significativement négatif indiquant une synergie
	< 0	< 0	Synergie, excepté pour les ratios de dose où b_i est significativement positif indiquant un antagonisme
b_i	> 0	> 0	Antagonisme, où la toxicité du mélange est principalement causée par la substance i
	< 0	< 0	Synergie où la toxicité du mélange est principalement causée par la substance i
Dépendance Dose-Niveau			
a	> 0	> 0	Antagonisme aux niveaux de dose élevés et synergie aux faibles niveaux de dose
	< 0	< 0	Synergie aux niveaux de dose élevés et antagonisme aux faibles niveaux de dose
b_{DL}	> 1	> 2	Changement à des doses plus faibles que la CE_{50}
	= 1	= 2	Changement au niveau de la CE_{50}
	$0 < b_{DL} < 1$	$0 < b_{DL} < 2$	Changement à des doses plus élevées que la CE_{50}
	< 0	< 1	Pas de changement mais l'intensité de la synergie ou de l'antagonisme est dépendante du niveau de dose (CA) ou du niveau d'effet (IA)

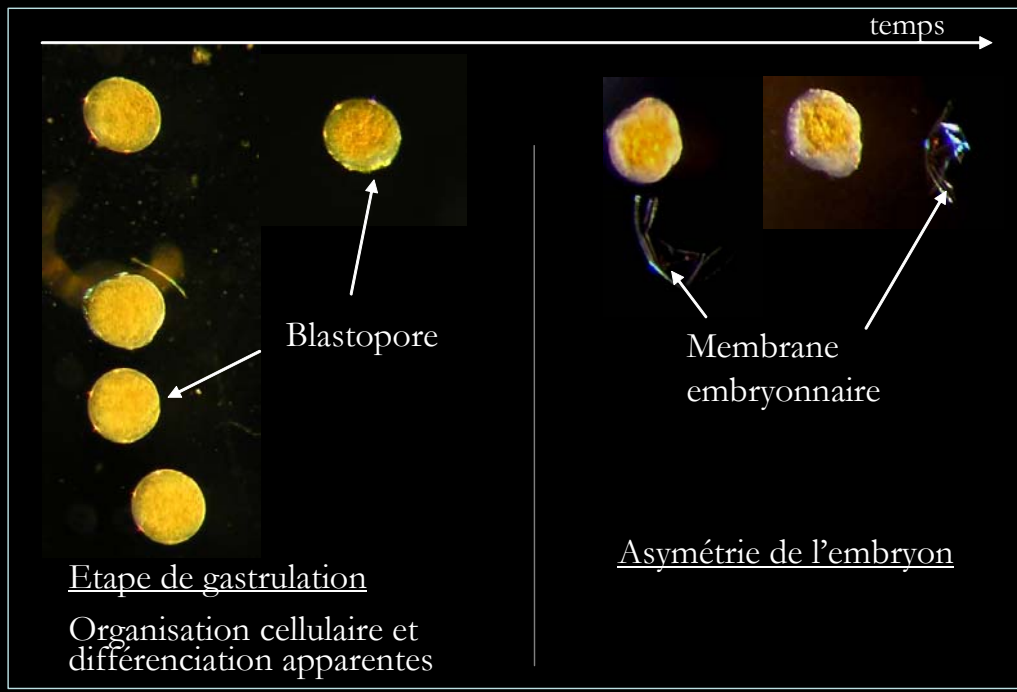
Annexe 2 : Observations des différents stades d'un développement embryonnaire définis par Kast-Hutcheson et al. (2001)

Les différents stades d'un développement embryonnaire normal

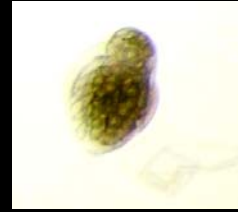
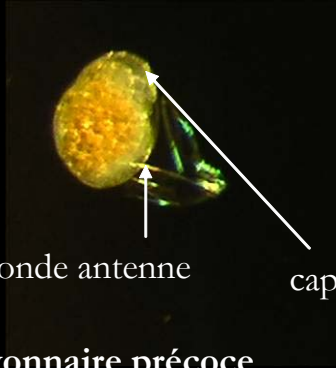
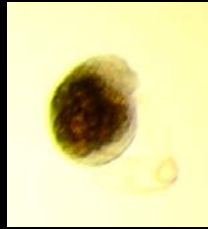
Stade 1 ~ (0-15h) après la déposition des œufs dans la chambre de ponte



Stade 2 ~ (15-25h) après la déposition des œufs dans la chambre de ponte



Stade 3 ~ (25-35h) après la déposition des œufs dans la chambre de ponte



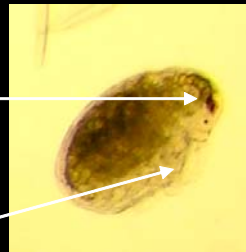
aeconde antenne

capsule de la tête

Maturation embryonnaire précoce

Stade 4 ~ (35-45h) après la déposition des œufs dans la chambre de ponte

œil pigmenté



antenne développée mais confinée dans la seconde membrane embryonnaire

Maturation embryonnaire moyenne

Fin stade 4

seconde membrane embryonnaire



Stade 5 (45-50h) après la déposition des œufs dans la chambre de ponte

extension partielle de la seconde antenne

setae des antennes peu développées

épine caudale pliée contre la carapace

Maturation embryonnaire tardive

Fin stade 5: début de nage



Stade 6 ~ (50h) après la déposition des œufs dans la chambre de ponte



setae des antennes développées



épine caudale totalement déployée de la carapace

Le juvénile nage librement.

Juvénile complètement développé

tube digestif



Annexe 3 : Données de toxicité aigüe de l'uranium chez les cladocères d'eau douce

Espèce de cladodère étudiée	Paramètre observé	mg.L ⁻¹ U	Référence
<i>Moinodaphnia macleayi</i>	24h CE ₅₀	1,29	(Bywater <i>et al.</i> , 1991)
<i>Diaphanosoma excisum</i>		0,41	
<i>Latonopsis fasciculata</i>		1,10	
<i>Moinodaphnia macleayi</i>	48h CE ₅₀	0,16-0,39	(Seeman <i>et al.</i> , 2001)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	96h CE ₅₀	10,5	(Kuhne <i>et al.</i> , 2002)
<i>Daphnia magna</i>	48h CE ₅₀	5,8-25,4	(Barata <i>et al.</i> , 1998)
<i>Daphnia magna</i>	48h CE ₅₀	5,3-74,3	Poston <i>et al.</i> , 1984)

Annexe 4 : Données test toxicité aigüe du sélénium sur *Daphnia magna*
et sur *Daphnia pulex*

Daphnia magna

forme chimique	paramètres observés	mg.L ⁻¹ Se	[SO ₄ ²⁻]	dureté (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	pH	particularité du test	Références
Na₂SeO₃	LC ₅₀ 48h	2,5		214			(Bringmann et Kuhn, 1959)
	LC ₅₀ 48h	1,10		129	8,15-8,4		(Dunbar <i>et al.</i> , 1983)
	LC ₅₀ 48h	0,70	41	45,5			(Ingersoll <i>et al.</i> , 1990)
	LC ₅₀ 48h	3,02	68	136			
	LC ₅₀ 48h	0,55	82	80-100	8,2±0,1		(Maier <i>et al.</i> , 1993)
	LC ₅₀ 48h	0,71		329	7,3		(Halter <i>et al.</i> , 1980)
	LC ₅₀ 96h	0,43					
	LC ₅₀ 48h	0,685		240-310			(Adams et Heildolph, 1985)
	LC ₅₀ 24h	1,65					
	LC ₅₀ 48h	1,68			8,4	test sur adultes	(Johnston, 1987)
LC ₅₀ 96h	0,44						

Na₂SeO₄	LC ₅₀ 48h	2,56	41	45,5			(Ingersoll <i>et al.</i> , 1990)
	LC ₅₀ 48h	4,07	68	136			
	LC ₅₀ 48h	2,84	82	80-100	8,2±0,1		(Maier <i>et al.</i> , 1993)
	LC ₅₀ 48h	5,30	163	129	8,15-8,4		(Dunbar <i>et al.</i> , 1983)
	LC ₅₀ 24h	1,51					
	LC ₅₀ 48h	0,75				test sur adultes	(Johnston, 1987)
	LC ₅₀ 96h	0,58			8,4		
	LC ₅₀ 48h	0,55				test sur jévénilés	
LC ₅₀ 72h	1,4				test sur oeufs		

Daphnia pulex

forme chimique	paramètres observés	mg.L ⁻¹ Se	[SO ₄ ²⁻]	dureté (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	pH	particularité du test	Références
Na₂SeO₃	LC ₅₀ 48h	2,5	0,6	70	7,4+/-0,1		(Schultz <i>et al.</i> , 1980)
	LC ₅₀ 96h	1,10	0,1				
	LC ₅₀ 48h	0,70	1,375				
	LC ₅₀ 48h	3,02	0,098				
	LC ₅₀ 96h	0,55	0,5				
	LC ₅₀ 96h	0,71	0,071				

Annexe 5 : Préparation du milieu M4-pH 7 et M4-pH8

Préparation du milieu M4-pH 7

Solutions mères	Pour préparer 1L de milieu M4-pH7 (mL)	Pour préparer 10L de milieu M4-pH7 (mL)
Solution mère I	50	500
Chlorure de calcium $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	10
Sulfate de magnésium $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	5
Chlorure de potassium KCl	0,1	1
Hydrogencarbonate de sodium NaHCO_3	0,67	10
Sodium métasilicate $\text{Na}_2\text{SiO}_3, 5\text{H}_2\text{O}$	0,2	2
Nitrate de sodium NaNO_3	0,1	1
Potassium dihydrogénophosphate KH_2PO_4	0,1	1
Di-potassium Hydrogénophosphate K_2HPO_4	0,1	1
Solution mère de vitamines	0,1	1

Préparation du milieu M4-pH 8

Solutions mères	Pour préparer 1L de milieu M4-pH8 (mL)	Pour préparer 10L de milieu M4-pH8 (mL)
Solution mère I	50	500
Chlorure de calcium $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	10
Sulfate de magnésium $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	5
Chlorure de potassium KCl	0,1	1
Hydrogencarbonate de sodium NaHCO_3	1,0	10
Sodium métasilicate $\text{Na}_2\text{SiO}_3, 5\text{H}_2\text{O}$	0,2	2
Nitrate de sodium NaNO_3	0,1	1
Potassium dihydrogénophosphate KH_2PO_4	0,1	1
Di-potassium Hydrogénophosphate K_2HPO_4	0,1	1
Solution mère de vitamines	0,1	1

Préparation de la solution de vitamines

Vitamine	Concentration (mg.L ⁻¹)
Chlorhydrate de thiamine C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS.HCl.5H ₂ O	750
Cyanocobalamine (B ₁₂) C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P ⁻	10
Biotine C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	7,5

Cette solution est à conserver en petites portions aliquotes au congélateur -18°C. Les ajouter au milieu juste avant emploi.

Solutions mères de macro-nutriment

Solutions mères	Concentration (mg.L ⁻¹)	g/200mL
Chlorure de calcium CaCl ₂ .2H ₂ O	293 800	58,76
Sulfate de magnésium MgSO ₄ .7H ₂ O	246 600	49,32
Chlorure de potassium KCl	58 000	11,6
Hydrogénocarbonate de sodium NaHCO ₃	64 800	12,96
Sodium métasilicate Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	37 324	7,4648
Nitrate de sodium NaNO ₃	2 740	0,548
Potassium dihydrogénophosphate KH ₂ PO ₄	1 430	0,286
Di-potassium Hydrogénophosphate K ₂ HPO ₄	1 840	0,368

Ces solutions sont à conserver au réfrigérateur +4°C et doivent être renouvelées au maximum tous les 3 mois.

Solution mère 1

Eléments traces	Concentration des éléments trace (mg.L ⁻¹)	g/100mL	Volume à introduire pour préparer la solution mère I (mL/L)
Acide borique H ₃ BO ₃	28 595	2,8595 Faire 200mL soit 5,719g/200mL	2
Chlorure de Manganèse MnCl ₂ .4H ₂ O	7 210	0,721	1
Lithium hydroxylé LiOh,H ₂ O	6 054	0,6054	1
Carbonate de rubidium Rb ₂ CO ₃	1355	0,1355	1
Chlorure de strontium hexahydraté SrCl ₂ .6H ₂ O	3 040	0,304	1
Bromure de sodium NaBr	320	0,032	1
Sodium molybdate Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1 260	0,126	1
Sulfate de cuivre CuSO ₄ . 5H ₂ O	490	0,049	1
Sulfate de zinc ZnSO ₄ .7H ₂ O	285,4	0,2854g/100mL 1/10 : 0,02854g/100mL	1
Chlorure de cobalt CoCl ₂ . 6H ₂ O	200	0,020	1
Iodure de potassium KI	65	0,65g/100mL 1/100: 0,0065g/100mL	1
Ammonium monovanadate NH ₄ VO ₃	11,5	0,115g/100mL 1/100: 0,0015g/100mL	1
Na ₂ EDTA.2H ₂ O a)	5 000	2,5g/500mL	
Sulfate de fer FeSO ₄ .7H ₂ O a)	1 991	0,9955g/500mL	
a) les solutions Na ₂ EDTA et FeSO ₄ sont préparées séparément, puis rassemblées et immédiatement mises à l'étuve à 120 °C pendant 30 min, ce qui donne			
Solution Fe-EDTA			20

Cette solution est à conserver au réfrigérateur +4°C et doit être renouvelée au maximum tous les mois.

Annexe 6 : Protocole de préparation des algues pour les daphnies



Une nouvelle culture de *Chlamydomonas* de 1 litre est mise en route au moins deux fois par semaine en fonction du nombre de daphnies à nourrir. Chaque culture est utilisée la semaine suivante pour nourrir les daphnies. La meilleure valeur nutritionnelle (teneur importante en protéines) est obtenue pour des cellules en croissance exponentielle dans des cultures ayant une concentration élevée (à environ $15 \cdot 10^6$ cellules par ml). Une phase exponentielle est caractérisée par de petites cellules homogènes de 4.0-5.0 μm de diamètre. De plus grosses cellules (supérieures à 6.5-7 μm de diamètre) dénotent de l'induction de la phase de sénescence.

- Le milieu HSM

Le milieu HSM est préparé grâce à 3 solutions stocks :

Solutions stock	Quantités
Phosphates #2	25 mL.L ⁻¹
Beijerink (*10)	5 mL.L ⁻¹
AAP	1 mL.L ⁻¹

Composition et proportion des solutions stock servant à la préparation du milieu de culture HSM

Solutions	Cristaux	Quantités (en g.L ⁻¹)
Phosphates #2	KH ₂ PO ₄	29,6
	K ₂ HPO ₄	57,6
Beijerink	NH ₄ Cl	100
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	4
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	2
AAP (*10)	H ₃ BO ₃	186
	Mn (10 g.L ⁻¹)	115
	FeCl ₃ , 6H ₂ O	160
	Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	300
	ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	3,5
	Co (1 g.L ⁻¹)	0,64
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	3,63
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	8,79

Concentrations des cations et anions (en mol/L) composant le milieu de culture HSM

Ions	Concentration en mol.L ⁻¹
NH ₄	9,35 x 10 ⁻³
Cl	9,49 x 10 ⁻³
K	2,20 x 10 ⁻²
PO ₄	1,37 x 10 ⁻²
SO ₄	8,12 x 10 ⁻⁵
Mg	8,12 x 10 ⁻⁵
Ca	6,80 x 10 ⁻⁵
Na	1,7 x 10 ⁻⁶
BO ₃	3,01 x 10 ⁻⁶
Mn	2,10 x 10 ⁻⁶
EDTA	8,06 x 10 ⁻⁷
Fe	5,92 x 10 ⁻⁷
MoO ₄	3,00 x 10 ⁻⁸
Zn	2,43 x 10 ⁻⁸
Co	1,09 x 10 ⁻⁸
Cu	7,04 x 10 ⁻¹¹

- **Préparation d'erlens stériles contenant du milieu HSM (Autoclave)**

Pour préparer 1L de milieu HSM, il faut mettre dans un erlen de 2 litres, 70 ml d'eau ultra-pure (UHQ) puis 25 ml de la solution stock de Phosphates #2 et 5 ml de la solution stock de Beijerinck. Cette préparation est réalisée sous la hotte pour ne pas contaminer les solutions stock stériles. Les erlens sont ensuite refermés, autoclavés et stockés en chambre froide.

Annexe 7 : Protocole d'extraction de lipides selon la méthode de Bligh et Dyer (1959)

Matériel utilisé

- Acétone, chloroforme, méthanol, eau UHQ
- Tubes en verre pour centrifugation, pipettes pasteur, coupelles en aluminium
- Potter, évaporateur sous flux d'azote avec bain marie (N-EVAP), plaque chauffante, microbalance

Protocole

- Rincer tout le matériel avec de l'acétone (tubes, potter, pointes du N-EVAP...)
- Disposer les échantillons (tubes eppendorf contenant une coupelle avec 1 ou 2 daphnies) sur de la glace
- Déposer la ou les daphnies dans le tube du Potter en faisant couler 1.2 mL d'eau sur la coupelle.
- Ajouter 1.5 mL de chloroforme
- Homogénéiser 30 secondes à 2000 rpm tout en maintenant le tube du Potter dans de la glace
- Verser l'homogénat dans un tube en verre disposé sur de la glace
- Rincer deux fois le Potter avec 1.5 mL de méthanol et ajouter le méthanol de rinçage à l'homogénat
- Rincer une dernière fois le Potter avec 1.5 mL de méthanol et jeter le méthanol dans la poubelle à solvant
- Refermer l'échantillon et le maintenir sur de la glace le temps de préparer les autres échantillons
- Vortexer les échantillons ainsi obtenus puis les disposer dans la centrifugeuse.
- Centrifugation à 4500 RCF pendant 15 minutes (Accélération à 3 et frein à 2) à 4°C
- Verser l'échantillon dans un autre tube avec précaution pour ne pas remettre en suspension les débris qui se sont déposés au fond du tube
- Ajouter 1.5 mL d'eau UHQ et 1.5 mL de chloroforme.
- Agiter fortement pour que les deux phases se mélangent bien
- Centrifuger à nouveau à 4500 RCF pendant 15 minutes à 4°C
- Sortir délicatement les échantillons de la centrifugeuse pour ne pas mélanger à nouveau les 2 phases
- Enlever la phase supérieure à l'aide d'une pipette pasteur et faisant bien attention à ne pas enlever une partie la phase inférieure contenant les lipides et à ne pas laisser de la phase supérieure

- Une fois la partie supérieure correctement enlevée, les échantillons sont disposés sur le N-EVAP. (Température du bain-marie 34°C)

Le flux d'azote sera réglé pour qu'un cône se forme sur la surface des échantillons mais pas « de bulles »

- L'évaporation dure environ 15 à 20 minutes

-Un culot de lipides au fond du tube se forme

- Ajouter quelques gouttes de chloroforme au fond du tube et les récupérer pour les déposer sur une coupelle en aluminium préalablement pesée et placée sur la plaque chauffante à 24°C

- Renouveler l'opération 2 fois puis laisser sécher les coupelles jusqu'à évaporation totale du chloroforme.

- Peser les coupelles

Annexe 8 : Pourcentage moyen de survie et de fécondité en fonction des jours

Suivi réalisé sur 2 bouteilles d'élevage de 2L contenant chacune 40 daphnies

jours	% de survie	fécondité
1	100	0
2	100	0
3	100	0
4	100	0
5	100	0
6	100	0
7	100	0
8	100	0
9	100	0
10	100	5.3
11	100	0
12	100	0
13	100	0
14	99	10.4
15	99	0
16	99	0
17	99	15
18	98	0
19	95	0
20	94	0
21	93	12.6
22	92	0
23	92	0
24	92	23.6
25	90	0
26	90	0
27	90	25
28	90	0
29	88	0
30	88	30.8
31	88	0
32	86	0
33	86	31.3
34	86	0
35	86	0
36	85	0
37	85	29.9
38	85	0
39	85	0
40	84	0
41	84	32.8
42	84	0
43	84	0
44	84	31.7
45	84	0
46	82	0
47	82	30.6
48	82	0
49	82	0
50	82	29.5

jours	% de survie	fécondité
51	82	0
52	82	0
53	80	28.4
54	78	0
55	77	0
56	76	0
57	71	27.3
58	71	0
59	71	0
60	71	26.2
61	71	0
62	67	0
63	67	20.9
64	64	0
65	64	0
66	64	15.5
67	50	0
67	43	0
68	43	12.2
69	40	0
70	39	0
71	33	8.9
72	27	0
73	24	0
74	24	5.6
75	24	0
76	15	0
77	12	2.3
78	10	0
79	10	0
80	10	0
81	10	0
82	10	0
83	9	0
84	8	0
85	7	0
86	7	0
87	5	0
88	5	0
89	5	0
90	2	0
91	2	0
92	2	0
93	0	0

Annexe 9 : Correction des effets de matrice engendrés par le milieu M4-pH7 lors du dosage de l'uranium par ICP-AES

Une gamme d'étalonnage avec des concentrations en uranium croissantes allant de 25 à 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ U a été établie dans le milieu M4-pH7. En exprimant la concentration mesurée dans en fonction de la concentration attendue, un effet matrice a pu être mis en évidence (Figure ci-dessous). Toutes les mesures réalisées dans du M4-pH7 ont donc été corrigées grâce à la relation ident :

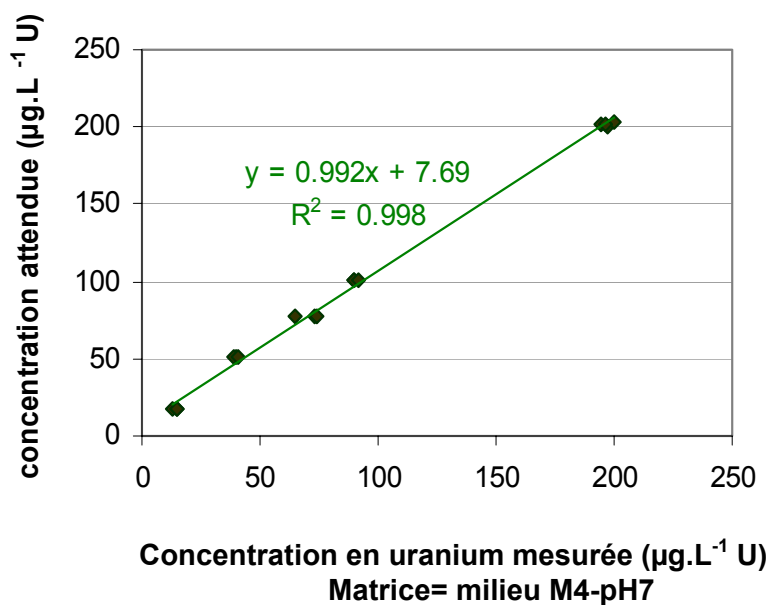


Figure : Concentrations mesurées en U dans du M4-pH7 en fonction de celles attendues.

Annexe 10 : Article : Effet de l'uranium sur la survie, la croissance, la reproduction et sur les processus physiologiques chez le cladocère d'eau douce *Daphnia magna*



Aquatic Toxicology 86 (2008) 370–378

**AQUATIC
TOXICOLOGY**

www.elsevier.com/locate/aquatox

Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*

Florence Anna Zeman^a, Rodolphe Gilbin^{a,*}, Frédéric Alonzo^b,
Catherine Lecomte-Pradines^a, Jacqueline Garnier-Laplace^a, Catherine Aliaume^c

^a Laboratoire de Radioécologie et Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et Sécurité Nucléaire, Cadarache, Bat 186,
BP 3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance Cedex, France

^b Laboratoire de Modélisation Environnementale, Institut de Radioprotection et Sécurité Nucléaire, Cadarache, Bat 159,
BP 3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance Cedex, France

^c UMR CNRS-UMH 5119 Ecosystèmes Lagunaires, Université Montpellier II, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Received 14 May 2007; received in revised form 26 November 2007; accepted 27 November 2007

Abstract

Acute uranium toxicity (48 h immobilisation test) for *Daphnia magna* was determined in two different exposure media, differing in pH and alkalinity. LC₅₀ varied strongly between media, from 390 ± 40 µg L⁻¹ U at pH 7 to 7.8 ± 3.2 mg L⁻¹ U at pH 8. According to the free ion activity model uranium toxicity varies as a function of free uranyl concentration. This assumption was examined by calculating uranium speciation in our water conditions and in those reported in the literature. Predicted changes in free uranyl concentration could not solely explain observed differences in toxicity, which might be due to a competition or a non-competitive inhibition of H⁺ for uranium transport and/or the involvement of other bioavailable chemical species of uranium.

Chronic effects of uranium at pH 7 on mortality, ingestion and respiration, fecundity and dry mass of females, eggs and neonates were investigated during 21-day exposure experiments. A mortality of 10% was observed at 100 µg L⁻¹ U and EC₁₀ for reproduction was 14 ± 7 µg L⁻¹ U. Scope for growth was affected through a reduction in feeding activity and an increase in oxygen consumption at 25 µg L⁻¹ U after 7 days of exposure. This had strong consequences for somatic growth and reproduction, which decreased, respectively, by 50% and 65% at 50 µg L⁻¹ U after 7 days and at 25 µg L⁻¹ U after 21 days. Uranium bioaccumulation was quantified and associated internal alpha dose rates from 2.1 to 13 µGy h⁻¹ were estimated. Compared to the toxicity of other alpha-emitting radionuclides and stable trace metals, our results confirmed the general assumption that uranium chemical toxicity predominates over its radiotoxicity.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Daphnia magna*; Uranium; Chemical speciation; Scope for growth; Energy allocation

1. Introduction

Uranium is a naturally occurring metal from the actinide series and is composed of three alpha-emitting radioactive isotopes, ²³⁸U, ²³⁵U and ²³⁴U, respectively, contributing 99.27%, 0.72% and 0.0055% of mass (Colle et al., 2001). Its behaviour in natural ecosystems has been extensively studied and described in several reviews (Colle et al., 2001; Ragnarsdottir and Charlet, 2000). Uranium is ubiquitous in natural waters at trace concentrations, ranging from 0.02 to 6 µg L⁻¹ U (Bonin and Blanc, 2001). Locally, higher concentrations may reach 2 mg L⁻¹ U,

reflecting mainly the composition of surrounding rocks (Bonin and Blanc, 2001; WHO, 2001). Uranium concentration may also increase in some ecosystems due to anthropogenic activities such as mining, extraction and processing of uranium for nuclear fuel and weapons, as well as spent fuel reprocessing. For two decades, the chemical toxicity of uranium, as a heavy metal, has become of increasing concern (Environment-Canada and Health-Canada, 2000; Sheppard et al., 2005).

In freshwater organisms, ecotoxicological data for acute and chronic exposure concern a wide range of endpoints and show great variability, notably due to differences in the chemical composition of the exposure medium. In a recent review, Sheppard et al. (2005) showed that the sensitivity of organisms to uranium is dependent on several environmental parameters such as alkalinity (due to complexation of uranyl ion UO₂²⁺ with soluble

* Corresponding author. Tel.: +33 4 42 19 95 37; fax: +33 4 42 19 91 51.
E-mail address: rodolphe.gilbin@irsn.fr (R. Gilbin).

carbonates), and hardness (due to its competition with calcium and magnesium). For example, in *Daphnia magna* water hardness and alkalinity reduce the acute toxicity of uranium, with 48 h LC₅₀ increasing from 6.4 to 51.9 mg L⁻¹ U (Poston et al., 1984). Barata et al. (1998) reported a similar value of acute LC₅₀, ranging from 8.3 to 22.4 mg L⁻¹ U dependent on daphnid clone and water hardness. However, as pH, hardness and alkalinity varied concomitantly, the effects of complexation and/or competition on uranium toxicity are difficult to differentiate.

Discrepancies between ecotoxicity data on uranium originate also from the diversity in tested endpoints and time of exposure. In *D. magna*, standard ecotoxicological tests for the identification of chronic effects are based on the outcome of 21-day reproduction. As previously studied by Poston et al. (1984), reproduction inhibition was shown at uranium concentrations from 0.5 to 3.5 mg L⁻¹ U. Reproduction was shown to be more sensitive for another freshwater cladoceran, *Moinodaphnia macleanyi* with a 6-day LOEC of 20–49 µg L⁻¹ U (Semaan et al., 2001). In *Ceriodaphnia dubia*, reported effects on reproduction strongly differed between studies, with a 7-day LOEC of 3.91 mg L⁻¹ U (Kuhne et al., 2002) and a chronic (7-day) EC₂₅ of 3 µg L⁻¹ U (Pickett et al., 1993).

In the literature, effects of uranium are commonly reported to concentrations, as it is done for trace metals, in accordance with the assumption that chemotoxicity of uranium predominates over its radiotoxicity. A small part of toxicity of uranium, as a radioelement, might be imputable to the radiological exposure. Sublethal effects of chronic alpha and gamma irradiation were recently reported in *D. magna* (Alonzo et al., 2006; Gilbin et al., in press). A comparison with these works requires that dose rates are quantified for uranium, based on accumulated concentration in tissues. At dose rates ≥ 0.9 mGy h⁻¹, alpha irradiation induced a reduction in somatic growth with potential strong consequences for energy allocation in organisms. Such studies of individual energy budgets have increasingly been used over the last decade to link effects of pollutants on physiological processes to growth and reproduction (Calow and Sibly, 1990; Calow, 1991; Kooijman, 2000; Knops et al., 2001; Baillieul et al., 2005).

The objectives of this work are: (1) to modulate pH and alkalinity of exposure medium within the tolerance range of daphnid physiology, in order to increase bioavailability and acute toxicity of uranium to *D. magna*; (2) to determine chronic effects of uranium on *D. magna* survival, reproduction, somatic growth and individual endpoints governing energy budget (ingestion, respiration); (3) to quantify uranium uptake and associated dose rate in daphnids and compare toxicity with those of stable trace metals and radiological stressors.

2. Materials and methods

2.1. *D. magna* culture

D. magna cultures (clone obtained from INERIS Verneuil en Halatte, France) were maintained in continuous parthenogenic reproduction in artificial freshwater at pH 8 (Elendt, 1990; M4 medium, hereafter 'M4-pH8') and pH 7 (modified M4 medium,

hereafter 'M4-pH7') renewed twice a week. Composition of M4-pH8 was: 2 mM Ca, 0.5 mM Mg, 0.87 mM Na, 0.081 mM K, 0.51 mM SO₄, 3.2 µM NO₃, 2.1 µM PO₄, 4.9 nM NH₄, 35 µM SiO₃, 46 µM B, 1.8 µM Mn, 7.2 µM Li, 0.59 µM Rb, 0.57 µM Sr, 0.16 µM Br, 0.31 µM Mo, 98 nM Cu, 50 nM Zn, 43 nM Co, 19 nM I, 11 nM Se, 4.9 nM V, 7.2 µM Fe, 13.4 µM EDTA and 4.1 mM Cl. Composition of M4-pH7 differed only in a Cl concentration of 4.8 mM. Media were at equilibrium with air ($p\text{CO}_2 = 3.16 \times 10^{-4}$ atm).

Daphnids were fed daily with green algae *Chlamydomonas reinhardtii* (Dangeard, strain 11/32B from CCAP, United Kingdom). Algae under exponential growth phase were centrifuged (15 min, 1000 × g) and resuspended in M4 to achieve a daily ration of 100 µg carbon per daphnid. Neonates were removed and the medium was renewed twice a week. Cultures were maintained at 20 °C (± 1 °C), a photoperiod of 16 h-light:8 h-dark and a light intensity of 30 µE m⁻² s⁻¹. Reproductive rates >60 neonates per adult over 21 days were confirmed in the two media during 1 year, as a criterion for population health. All experiments were started with juveniles (<24-h old) from the fourth brood.

2.2. Exposure conditions

Uranium was obtained from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) as uranyl nitrate hexahydrate in 0.2% nitric acid solution (1 g L⁻¹ U). Uranium acute toxicity was studied at concentrations ranging from 100 µg L⁻¹ to 100 mg L⁻¹ in M4-pH8 and M4-pH7. Chronic toxicity was examined from 10 to 100 µg L⁻¹ U in M4-pH7. For all test conditions including controls, nitrate concentration was adjusted to 18 µM in M4-pH7 or 1 mM in M4-pH8. This was done to eliminate differences in NO₃⁻ concentration associated with uranium spikes (added as uranyl nitrate hexahydrate). This addition of nitrate did not affect survival of daphnids in the control. Uranium and major ionic concentrations were quantified prior and after 48 h exposure in acute condition or daily in freshly renewed medium and twice weekly after 24 h exposure in chronic conditions (filtration 2 µm), by ICP-AES (Optima 4300DV, PerkinElmer—detection limit = 10 µg L⁻¹ and 0.5 mg L⁻¹, for U and major cations, respectively) and ionic chromatography (Dionex DX-120, Sunnyvale, CA, USA—quantification limit = 100 µg L⁻¹ for major anions). All water samples were stored at 4 °C in darkness before analysis. All concentrations remained within 10% of nominal concentrations. pH was similarly monitored and remained within 0.1 unit of nominal pH.

2.3. Modeling of aqueous speciation

Because of a lack of practicable techniques to directly measure individual uranium chemical species in solution, uranium speciation in water conditions of the exposure medium was predicted using the geochemical speciation code J-Chess (Java Chemical Speciation Equilibrium Speciation with Surfaces, Van der Lee, 1998). A consistent thermodynamic database was compiled of the OECD-NEA (Organization for Economic Cooperation and Development-Nuclear Energy Agency, 1996)

and updated in a recent review (Denison and Garnier-Laplace, 2005). The input parameters for J-Chess were based on measured physicochemical data (temperature, pH and ion concentrations). J-Chess calculations were constrained to equilibrium with the atmosphere ($p\text{CO}_2 = 3.16 \times 10^{-4}$ atm). Calculations estimated the solubility limit and concentrations of complexes and free uranyl ion at the 48 h LC_{50} uranium concentration in M4-pH8 and M4-pH7. Speciation was similarly predicted for water conditions reported by Poston et al. (1984) and Barata et al. (1998).

2.4. Acute tests

Acute toxicity was evaluated in M4-pH7 and M4-pH8 by determining the 48 h LC_{50} of uranium according to the OECD methodology (OECD, 1998). Tested uranium concentrations were: 97 ± 4 , 163 ± 2 , 298 ± 3 , 485 ± 13 , 560 ± 10 , 671 ± 20 , 757 ± 22 , 864 ± 30 and $935 \pm 30 \mu\text{g L}^{-1}$ in M4-pH7; 10.1 ± 0.1 , 16.4 ± 0.2 , 39.7 ± 0.5 , 47.9 ± 0.8 , 56.5 ± 0.4 , 73.6 ± 1.6 , 92.9 ± 2.6 and $109.0 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ in M4-pH8. For each condition, 10 groups of 5 animals were exposed in polycarbonate tubes containing 10 mL medium, without renewal. After a 24 and 48 h exposure, the number of surviving animals in each vial was counted, considering that animals without response to gentle agitation after 15 s were dead.

2.5. Chronic tests

2.5.1. Experimental design

Chronic tests were performed in M4-pH7 at five uranium concentrations and a control, with medium renewed and daphnids fed every day. Tested concentrations were: 10.1 ± 1.2 , 25.3 ± 3.8 , 50.3 ± 5.1 , 74.7 ± 7.5 and $101.7 \pm 10.1 \mu\text{g L}^{-1}$. For reproduction tests, 10 daphnids per condition were individually exposed for 23 days in polycarbonate bottles (50-mL). Survival, moulting and number of neonates produced were checked daily. Three batches of 10 daphnids per condition were exposed in polycarbonate bottles (500-mL) and sampled within 24 h of release of brood 1, 3 or 5 for the quantification of respiration and dry masses. No significant difference in survival or fecundity was observed between 50 and 500 mL bottles.

2.5.2. Ingestion rate

Feeding activity was quantified at release of broods 1, 3 and 5 in five individual 50-mL bottles per condition, based on changes in algal density between $t=0$ (when food was supplied) and 6 h. Algal densities were measured using a Coulter Z2 particle counter (1:10 dilution with ISOTON II isotonic solution, using a 100 μm orifice tube; Beckman Coulter France SA, Villepinte, France). The algal diameter was checked to be constant ($\sim 5 \mu\text{m}$). Particles between 3 and 10 μm diameter were counted in order to get rid most of the cell debris. Exponential models were fitted to observed algal densities according to Frost (1972):

$$C_t = C_0 e^{kt}, \quad C_t = C_0 e^{(k-f)t}$$

where C_0 and C_t are algal densities at time 0 and t , respectively, k (h^{-1}) the growth constant measured in vials without daphnids

and f (h^{-1}) the daphnid grazing coefficient in 50-mL bottles.

Mean algal density C (cell mL^{-1}) and daphnid ingestion I ($\text{cell daphnid}^{-1} \text{ day}^{-1}$) were calculated using the following equations:

$$C = \frac{C_t - C_0}{(k - f)t} \quad \text{and} \quad I = VfCt$$

where V is the experimental volume per individual (50 mL) and assuming a feeding time $t = 10$ h per day. Values were converted into carbon uptake using a total organic carbon content of 25 μg carbon per cell, measured in an aliquot of algal culture (Shimadzu TOC-5000A, Kyoto, Japan).

2.5.3. Respiration rate

At release of broods 1, 3 and 5, respiration was measured using a Unisense microrespiration system (Unisense S/A, Denmark). Six females per condition (from a 500-mL bottle) were placed individually into respiration chambers containing 1 mL of test medium maintained at 20 °C. Decrease in oxygen partial pressure associated with respiration was recorded for 1 h using a miniaturized Clarke-type oxygen sensor connected to a high sensitivity picoammeter. Sensor signal was calibrated using vigorously bubbled M4-pH7 (100% of O_2 -saturation) and a solution of sodium ascorbate (0.1 M) in NaOH (0.1 M) (0% of O_2 -saturation). Percentage of saturation was converted into oxygen concentration using an equilibrium concentration in water of $282.3 \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1}$ (20 °C, 1 atm). Oxygen consumption rates R ($\mu\text{mol O}_2 \text{ daphnid}^{-1} \text{ min}^{-1}$) were calculated as

$$R = \frac{[\text{O}_2]_0(1 - e^{-k\Delta t})V}{\Delta t}$$

where $[\text{O}_2]_0$ is the oxygen concentration ($\mu\text{mol mL}^{-1}$) measured at $t=0$, V the volume (mL) of M4-pH7 in the respiration chamber, $\Delta t = 1$ min and k is the consumption coefficient (min^{-1}) obtained by fitting exponential models to observed oxygen concentrations:

$$[\text{O}_2]_t = [\text{O}_2]_0 e^{-kt}$$

Mass specific respiration rates calculated in order to eliminate the influence of differences in individual dry mass at different ages and between exposure conditions.

2.5.4. Dry mass

At release of broods 1, 3 and 5, body, moult, neonate and egg dry masses were measured using 10 daphnids per condition (6 previously used for respirometry and 4 remaining from 500-mL bottles). All samples were rinsed with UHQ-water. Eggs were carefully dissected out from the brood pouch under a binocular microscope and counted. Daphnids, moults, neonates and eggs were transferred separately into pre-weighed aluminium pans, dried for 24 h at 60 °C and weighed on a microbalance after cooling (precision of 0.1 μg , ultra-microbalance SE2, Sartorius, Goettingen, Germany).

2.5.5. Scope for growth

Scope for growth (SFG) was calculated according to the balance equation: $\text{SFG} = E_A - E_R$, where E_A is the energy

assimilated from food and E_R is the energy metabolised (respiration). Energy lost in excretion is often less than 10% (Baillieul et al., 1996; Smolders et al., 2002) and was neglected here. The conversion of ingestion to assimilated energy was calculated assuming an assimilation efficiency of 80% for herbivorous zooplankton (Mayzaud and Razouls, 2002) and an energy equivalent of 36.8 mJ per μg of assimilated C. Respiration was converted to energy consumption using an oxyjoule equivalent of $21 \text{ kJ L}^{-1} \text{ O}_2$ (Elliot and Davison, 1975). Calculated SFG was reported to somatic dry mass (=mass specific SFG, $\text{J mg}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$) to take changes in mass into account (Baillieul et al., 2005).

2.5.6. Bioaccumulation and calculation of dose rates

Dry samples of daphnids were mineralised in 1 mL of HNO_3 69% and 1 mL of H_2O_2 30% and heated on a sand bath (105°C) until evaporation. Mineralised samples were taken up in 15 mL of HNO_3 2% (v/v). Uranium was analysed by ICP-MS (Varian 1000) with a detection limit of $\sim 10 \text{ ng L}^{-1} {}^{238}\text{U}$ and bioaccumulation was expressed in $\text{ng } {}^{238}\text{U mg}^{-1} \text{ DW}$. Daphnid body length (L , mm) were calculated using the linear allometric relationship $L = 0.005M + 2.44$ ($R^2 = 0.81$) obtained from binocular observation. Biovolume was calculated assuming a constant ellipsoid shape (axial ratio of 1:0.6:0.4). U concentrations in daphnids ($\mu\text{g mL}^{-1} \text{ U}$) was considered to be homogenous in organism and converted into volumic activities (Bq mL^{-1}) using a specific activity of $2.54 \times 10^4 \text{ Bq g}^{-1}$ for natural uranium (Delacroix et al., 2004). Dose rates delivered to daphnids (mGy h^{-1}) were calculated using dose conversion coefficient of $2.2 \times 10^{-3} \text{ mGy h}^{-1} / \text{Bq mL}^{-1}$ calculated by EDEN-v2 software (Beaugelin-Seiller et al., 2006). Alpha particles from accumulated uranium contributed >99.9% to energy deposited in daphnids (beta- and gamma-emissions from accumulated uranium and external radiations from uranium in the water were estimated at <0.1% of total dose rate).

2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were made using the R language and environment for statistical computing (R Development Core Team, 2006). Normality assumption was verified through normal qq-plots of residuals and Shapiro–Wilk tests. Homogeneity was verified graphically by plotting standardized residuals against plots. When homogeneity assumption was rejected, the optimal Box–Cox transformation (Box and Cox, 1964) was applied. When one-way ANOVA was significant ($p < 0.05$), multiple comparisons were made using Tukey’s post hoc test. Results were presented as mean \pm standard error of the mean calculated (S.E.M.). Alpha levels were ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**) and ≤ 0.001 (***)

The add-on package drc (Ritz and Streibig, 2005) was used to fit concentration–effect regressions for the estimation of the EC_{50} and EC_{10} (50% and 10% effect concentrations, respectively). Logistic models were tested:

$$y = c + \frac{d - c}{1 + \exp[b(\log(x) - \log(e))]}$$

where c is the fixed lower limit, d the maximal effect, e the background-corrected EC_{50} according to the extra risk concept (OECD, 2003), b the slope, x uranium concentration and y is the effect. Residual normality and homogeneity assumptions were verified as described previously; when the homogeneity assumption was rejected, the optimal Box–Cox transformation was applied. Results were presented in mean $\pm 2\sigma$.

3. Results

3.1. Acute toxicity and uranium speciation

Acute toxicity test yielded a 48 h EC_{50} mortality value of $390 \pm 40 \mu\text{g L}^{-1} \text{ U}$ and a EC_{10} mortality value of $170 \pm 40 \mu\text{g L}^{-1} \text{ U}$ in M4-pH7. Acute toxicity of uranium in M4-pH8 was much lower than in M4-pH7 with a 48 h EC_{50} mortality value of $7.8 \pm 3.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ U}$. During acute test in M4-pH8 a yellow precipitate was observed at concentrations above $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ U}$. These observations were in agreement with J-Chess calculation: saturation limit for uranium was estimated at 0.8 and 1.8 mg L^{-1} , in M4-pH7 and M4-pH8, respectively. Acute toxicity was compared between the different studies, on the basis of predicted uranium speciation at the 48 h LC_{50} (Table 1). Calculated free uranyl concentrations in the three different water conditions of Poston et al. (1984) were 1.3×10^{-3} , 4.5×10^{-4} , $6.5 \times 10^{-6} \mu\text{g L}^{-1} \text{ UO}_2^{2+}$, respectively, at 70, 133 and $197 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$. Dominant species were $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3(\text{aq})$ and $(\text{UO}_2)_2\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$, with increasing $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3(\text{aq})$ at highest hardness. Calculated free uranyl concentrations in moderate-hard and hard water conditions reported by Barata et al. (1998) were consistent with those we calculated for this study using water conditions reported by the authors (0.007 and $0.0015 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, for moderate-hard and hard water). Free uranyl concentration in M4-pH7 at 48 h LC_{50} level ($\sim 1.7 \times 10^{-1} \mu\text{g L}^{-1} \text{ UO}_2^{2+}$) was at least 25-fold higher than values calculated for Poston et al. (1984) and Barata et al. (1998). Moreover, calculated free uranyl concentration was correlated with pH ($-\log[\text{UO}_2^{2+}] = 2.55 \text{ pH} - 8.84$, $R^2 = 0.89$; Fig. 1) when all values (Poston et al., 1984; Barata et al., 1998; this study) were taken into account.

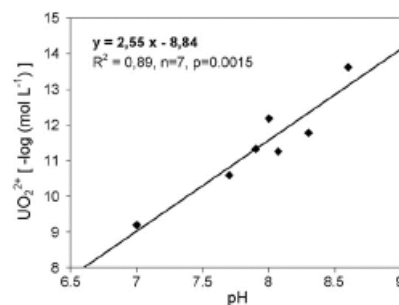


Fig. 1. Calculated free uranyl concentration ($-\log \mu\text{g L}^{-1} \text{ UO}_2^{2+}$) at uranium 48 h LC_{50} in relation to pH in water quality conditions, as reported in this study (M4-pH8 and M4-pH7) and in Barata et al. (1998) and Poston et al. (1984).

Table 1

Uranium concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$ U), water quality and estimation of free uranyl concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$ UO_2^{2+} calculated using geochemical speciation simulations (J-Chess software (Van der Lee, 1998) on the basis of water quality conditions) at uranium 48 h LC_{50} for conditions reported by Barata et al. (1998), Poston et al. (1984) and conditions of this study (M4-pH8 and M4-pH7)

	Synthetic water (this study)		Synthetic water (Barata et al., 1998)		Columbia river water (Poston et al., 1984)		
	M4-pH7	M4-pH8	Moderate-hard	Hard water	Soft	Moderate-hard	Hard
Total U concentration (mg L^{-1} U)	0.39	7.8	8.3	22.4	6.4	37.5	51.9
pH	7.0	8.0	7.7	8.1	7.9	8.3	8.6
Alkalinity (mg L^{-1} CaCO_3)	2.7	34	62	126	57	93	129
Hardness (mg L^{-1} CaCO_3)	250	250	90	179	70	133	197
Free UO_2^{2+} ($\mu\text{g L}^{-1}$ U)	1.7×10^{-1}	1.7×10^{-4}	7.0×10^{-3}	1.5×10^{-3}	1.3×10^{-3}	4.5×10^{-4}	6.5×10^{-6}

3.2. Chronic toxicity

3.2.1. Survival, growth and moulting

In the chronic test, adult mortality occurred only at the highest concentration ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ U) where 10%-mortality was observed after 21 days (2 daphnids died/20 daphnids).

Daphnids exposed to uranium showed a reduced body dry mass (Fig. 2). Somatic dry mass (without brood) was significantly lower after 7-day at uranium concentrations $\geq 50 \mu\text{g L}^{-1}$ than in the control. After 20 days of exposure, a significant decrease in daphnid body mass was observed at concentrations as low as $25 \mu\text{g L}^{-1}$ U.

Changes in dry mass $w(i)$ with age i (in days) were described using an exponential model for the juvenile stage (age $i \leq 7$ days):

$$w(i) = w(1) \exp^{g(i-1)}$$

with $w(1) = 9.4 \mu\text{g daphnid}^{-1}$, $w(7) = 62.5 \mu\text{g daphnid}^{-1}$ and $g = 0.32 \text{ day}^{-1}$ (in control and at concentrations of 10 and $25 \mu\text{g L}^{-1}$ U) and with $w(7) = 51.5 \mu\text{g daphnid}^{-1}$ and $g = 0.28 \text{ day}^{-1}$ (at concentrations of 50, 75 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$ U). As soon as daphnids started producing eggs (age $i \geq 7$ days, adult stage), dry mass $w(i)$ followed a Von Bertalanffy model:

$$w(i) = w(\text{max}) - [w(\text{max}) - w(7)] \times \exp^{k(i-7)}$$

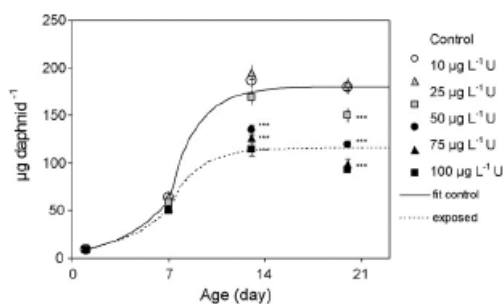


Fig. 2. Individual somatic dry mass (μg), in relation to age (days) and uranium concentration. Continuous line: adult growth in control. Dashed line: adult growth at $100 \mu\text{g L}^{-1}$ U. ANOVA: *** $p < 0.001$. Errors bars = S.E.M.

with $k = -0.5 \text{ day}^{-1}$ independent of exposure condition and $w(\text{max})$ differing between exposure conditions: $w(\text{max}) = 180 \mu\text{g daphnid}^{-1}$ (in control and at concentrations of 10 and $25 \mu\text{g L}^{-1}$ U, $n = 90$); $w(\text{max}) = 116 \mu\text{g daphnid}^{-1}$ (at concentrations of 50, 75 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$ U, $n = 90$). Body mass increased strongly during the juvenile stage in exposure conditions 0, 10 and $25 \mu\text{g L}^{-1}$ U ($38\% \text{ day}^{-1}$) and then stabilized yielding an average growth rate $\sim 0\%$ between 14 and 21 days. Daphnids exposed to 50, 75 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$ U were slightly smaller than individuals from the other conditions with an estimated mass specific growth rate of 33% during juvenile stage and $\sim 0\%$ between 14 and 21 days.

Exposure to uranium did not affect moulting frequency between exposed daphnids and the control. Mass of moults increased with the age of daphnids, following a linear relationship with body dry mass ($y = 0.18x + 8.06$, $n = 12$, $r^2 = 0.70$).

3.2.2. Reproduction

Reproduction was affected by uranium exposure for concentrations as low as $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Total reproduction 21-d (number of neonates produced per female over 21 days) was the most sensitive parameter: EC_{50} (Fig. 3A) and EC_{10} were estimated at 91 ± 15 and at $14 \pm 7 \mu\text{g L}^{-1}$ U ($n = 10$, $\alpha = 0.05$) respectively.

Reproductive effects on broods 1, 3 and 5 were investigated examining two additional reproductive traits, namely the fraction of reproducing daphnids and fecundity (number of offspring per daphnid). The fraction of reproducing daphnids was affected only for the first brood: 60% and 20% for total daphnids, respectively, at $75 \mu\text{g L}^{-1}$ U and $100 \mu\text{g L}^{-1}$ U. At low concentrations of uranium (from 10 to $50 \mu\text{g L}^{-1}$ U) 100% daphnids produced eggs ($n = 10$ per concentration tested) and 90% of the daphnids produced eggs in the control. Compared to the control, fecundity was significantly reduced at the three highest concentrations (from 50 to $100 \mu\text{g L}^{-1}$ U) for broods 1 and 3 and from $25 \mu\text{g L}^{-1}$ U for brood 5 (Fig. 3B).

Egg dry mass increased significantly with female age in the control (Fig. 3C), from $4.3 \pm 0.2 \mu\text{g egg}^{-1}$ on day 7 (brood 1, $n = 10$, $p < 0.05$) to $8.5 \pm 0.4 \mu\text{g egg}^{-1}$ on day 21 (brood 5, $n = 10$, $p < 0.05$). Neonate dry mass also increased significantly with female age in the control, from 5.5 ± 0.6 ($n = 10$, $p < 0.05$) for brood 1 to 9.6 ± 0.8 ($n = 10$, $p < 0.05$) for brood 3, then

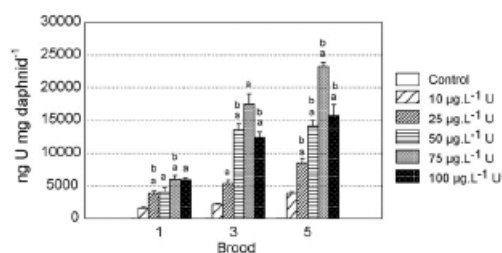


Fig. 5. Uranium bioaccumulation in somatic dry mass of daphnids (ng U mg⁻¹ DW) in relation to brood number and uranium concentration. ANOVA: "a" indicates statistically significant difference compared to control; "b" indicates statistically significant difference compared to preceding concentration, with $p < 0.05$. Errors bars = S.E.M.

4. Discussion

4.1. Influence of chemistry on acute toxicity of uranium

The bioavailability and toxicity of dissolved trace metals, like uranium, was recognized to depend on their chemical speciation in solution. In this work, we modified the composition of exposure medium in order to increase the concentration of bioavailable species of uranium while remaining within the tolerance range of daphnid physiology. According to the free ion activity model (Campbell, 1995), uranium uptake and its consequent toxicity varies as a function of free ion UO_2^{2+} concentration, rather than total uranium concentration. Thus, UO_2^{2+} complexation with inorganic ligands (e.g. carbonates and hydroxyl) leads to a decrease in uranium bioavailability (Fortin et al., 2004). Moreover, other cations (e.g. Ca^{2+} and Mg^{2+}) can also contribute to reduce metal uptake and toxicity through competition for surface binding sites (Di Toro et al., 2005; Riethmuller et al., 2001). Indeed, water hardness and alkalinity were shown to reduce uranium toxicity for aquatic organisms (Barata et al., 1998; Parkhurst et al., 1984; Poston et al., 1984; Sheppard et al., 2005). In this study, reducing pH and alkalinity increased UO_2^{2+} proportion and resulted in a decrease in 48 h LC_{50} expressed as total uranium. At constant competition with cations, 50%-lethality at 48 h should be logically associated with a constant UO_2^{2+} concentration. However, UO_2^{2+} concentration calculated at 48 h LC_{50} varied from 1.7×10^{-1} to $1.7 \times 10^{-4} \mu\text{g L}^{-1}$ between pH 7 and 8, and down to $6.5 \times 10^{-6} \mu\text{g L}^{-1}$ at pH 8.6 in water conditions reported in previous studies (Table 1). Competition with Ca^{2+} and Mg^{2+} could not solely explain this variation, as water hardness varied only from 70 to 250 mg L⁻¹ CaCO_3 . This suggested that influence of chemical speciation and pH on uranium toxicity to *D. magna* was more complex than anticipated. Several hypotheses could be provided, regarding the role of pH (Fig. 1):

- A competition of UO_2^{2+} with H^+ as suggested by the linear relationship between LC_{50} (expressed as $-\log[\text{UO}_2^{2+}]$ concentration) and pH (Fig. 1), according to Di Toro et al. (2005).

- A non-competitive inhibition of metal transport by protons, as recently reported by Fortin et al. (2007) in algae (with a greater uptake of UO_2^{2+} at pH 8 than at pH 7).
- The contribution of other uranium species to toxicity, including UO_2OH^+ or carbonated complexes (Fortin et al., 2007; Markich et al., 2000).

4.2. Effects of uranium on daphnid energy budget

Scope for growth (SFG), defined as the difference between energy assimilated from food and energy metabolised for body maintenance (respiration and excretion), gives a valuable indication of organism health status (Baillieu et al., 2005). In this study, waterborne uranium was shown to induce significant reduction in mass-specific SFG at concentrations as low as $25 \mu\text{g L}^{-1}$ U (Fig. 4C). At the highest uranium concentration, SFG represented only 10% of the value measured in the control. This strong decrease was mainly associated with the reduction in feeding activity, contributing 64% to 100% at brood 5 to the reduction in available energy. Increase in energy demand associated with coping with uranium stress (measured through respiration) accounted for a maximum of 28% at brood 1. Those observations were in agreement in the metabolic cost theory (Calow and Sibly, 1990; Calow, 1991; De Coen and Janssen, 2003) which assumes that under stress conditions, organisms set up defense and repair mechanisms that are energy-consuming. As a consequence, any stress-induced reduction in available energy for organisms comes at the expense of growth and reproduction. Here, growth and reproduction showed the same sensitivity to uranium exposure, both decreasing at the concentration of $50 \mu\text{g L}^{-1}$, as early as brood 1, and of $25 \mu\text{g L}^{-1}$ U at brood 5. Maximum decline in allocation of energy reached 48 and 63–68% for somatic growth and reproduction, respectively. For reproduction, both the number of eggs produced over 21 days and dry mass per egg at broods 3 and 5 were affected by increasing uranium concentration, with potentially major consequences for population dynamics. For example, Ebert (1991) showed that the production of small eggs resulted in retarded somatic growth and delayed reproduction in the offspring generation.

4.3. Effects of uranium compared to radioactive substances and trace metals

Chemical toxicity of uranium is commonly considered of much greater concern in comparison to its radiotoxicity (Miller et al., 2002; Sheppard et al., 2005). In this study, 50%-reduction in reproduction was observed at a sixfold lower concentration ($91 \mu\text{g L}^{-1}$) than previously reported by Poston et al. (1984), as a result of increased bioavailability at pH 7. Parallel quantification of uranium dose rates (from 2.1 to $13 \mu\text{Gy h}^{-1}$) provided a basis for comparing effects with those induced by other radioactive substances and trace metals.

Effects induced by Am-241 alpha irradiation over a higher range of dose rates (Alonzo et al., 2006) were far smaller than those reported for uranium in this study. Thus with Am-241, ingestion and fecundity remained unaffected up to a dose

rate of 7.9 mGy h^{-1} while dry mass per egg and survival of starved neonates decreased above 0.16 mGy h^{-1} , somatic growth reduced after 16 days at 0.9 mGy h^{-1} and respiratory demand increased after 23 days at 7.9 mGy h^{-1} . At $75 \mu\text{g L}^{-1}$ uranium, daphnids were exposed to the maximum dose rate of $13 \mu\text{Gy h}^{-1}$, a value where comparatively with Am-241, expected effects of radiation stress should be very slight. As a conclusion, the observation of a strongly impaired feeding activity and fecundity at $75 \mu\text{g L}^{-1}$ uranium necessarily resulted mainly from chemical toxicity.

Exposure to external gamma radiation, at dose rates ranging from 0.4 to 31 mGy h^{-1} , was shown to affect *D. magna* reproduction (Gilbin et al., in press). The timing of brood release changed in an opposite way when compared to what was observed with uranium, with a 1 to 2-day advance at 31 mGy h^{-1} . At this dose rate, a reduction in brood size after 15 days of exposure caused a 21% decrease in fecundity. In contrast with results obtained with uranium, no change was either detected in egg dry mass, respiration, ingestion rate, or somatic growth.

Effects of uranium are linked to its chemical toxicity as a heavy metal and similarity with other trace metals might be examined. We estimated a 21-day EC_{10} of $59 \mu\text{M}$ ($14 \mu\text{g L}^{-1}$ U) for reproduction. This concentration was comparable to values reported for cadmium ($33 \mu\text{M}$) and copper ($118 \mu\text{M}$), suggesting that uranium might be considered among some of the most toxic metals. This was also interesting to note that toxicity of Cd and Cu closely resembled that reported for uranium, in terms of the nature of effects produced: SFG under cadmium or copper stress was strongly reduced, mainly as a result of decreasing feeding activity; consequences for organisms included a reduced somatic growth and strongly impaired fecundity (Bodar et al., 1988; Baird et al., 1990; Knops et al., 2001; Baillieul et al., 2005). This contrasted with the situation with Am-241 where ingestion was unaffected and daphnids maintained a constant fecundity, despite a reduced SFG associated with increased energy consumption (Alonzo et al., 2006).

Toxicity mechanisms of Cd and Cu are known to involve the production of reactive oxygen species which disrupts normal physiological processes (Stohs and Bagchi, 1995; Livingstone, 2001). Like some transition metals, uranium chemically activates oxygen species via redox reactions (Miller et al., 2002; Yazzie et al., 2003). Further research is needed to test whether uranium, cadmium and copper share the same mechanism of toxicity and to improve our understanding of consequences of uranium exposure for freshwater organisms.

Acknowledgements

We specially thank Nadine Cauvin for her technical assistance with *D. magna* culturing, Virginie Camillieri and Daniel Orjollot for ICP-AES and ionic chromatography measurements. We are also grateful to Claire Della-Vedova for her helpful advice on the statistical analyses. This study is a part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety. We are very grateful to two anonymous referees for the helpful comments on this work.

References

- Alonzo, F., Gilbin, R., Bourrachot, S., Floriani, M., Morello, M., Garnier-Laplace, J., 2006. Effects of chronic internal alpha irradiation on physiology, growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 80, 228–236.
- Baillieul, M., Selens, M., Blust, R., 1996. Scope for growth and fitness of *Daphnia magna* in salinity-stressed conditions. *Funct. Ecol.* 10, 227–233.
- Baillieul, M., Smolders, R., Blust, R., 2005. The effect of environmental stress on absolute and mass-specific scope for growth in *Daphnia magna* Straus. *Comp. Biochem. Physiol. C* 140, 364–373.
- Baird, D.J., Barber, I., Calow, P., 1990. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. I. Chronic life-history effects. *Funct. Ecol.* 4, 399–407.
- Barata, C., Baird, D.J., Markich, S.J., 1998. Influence of genetic and environmental factors on the tolerance of *Daphnia magna* Straus to essential and non-essential metals. *Aquat. Toxicol.* 42, 115–137.
- Beaugelin-Seiller, K., Jasserand, F., Garnier-Laplace, J., Gariel, J.C., 2006. Modeling radiological dose in non-human species: principles, computerization, and application. *Health Phys.* 90, 485–493.
- Bodar, C.W.M., Van der Sluis, I., Voogt, P.A., Zandee, D.I., 1988. Effects of cadmium on consumption, assimilation and biochemical parameters of *Daphnia magna*: possible implication for reproduction. *Comp. Biochem. Physiol. C* 90, 341–346.
- Bonin, B., Blanc, P.L., 2001. L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine. In *L'uranium de l'environnement à l'homme*. EDP Sciences, Les Ulis, France, pp. 8–41.
- Box, G.E.P., Cox, D.R., 1964. An analysis of transformations. *J. R. Stat. Soc. B* 26, 296–311.
- Campbell, P.G.C., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Wiley, New York, pp. 45–102.
- Calow, P., 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100, 3–6.
- Calow, P., Sibly, R.M., 1990. A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Funct. Ecol.* 4, 283–288.
- Colle, C., Garnier-Laplace, J., Roussel-Debet, S., Adam, C., Baudin, J.-P., 2001. Comportement de l'uranium dans l'environnement. In *L'uranium de l'environnement à l'homme*. EDP Sciences, Les Ulis, France, pp. 187–211.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 2003. The missing biomarker link: relationship between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1632–1641.
- Delacroix, D., Guerre, J.-P., Leblanc, P., 2004. *Guide pratique Radionucléides et Radioprotection*. Radioprotection, 4th ed. EDP Science, Les Ulis, France.
- Denison, F.H., Garnier-Laplace, J., 2005. The effects of database parameter uncertainty on uranium(VI) equilibrium calculations. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 2183–2191.
- Di Toro, D.M., McGrath, J.A., Hansen, D.J., Berry, W.J., Paquin, P.R., Mathew, R., Wu, K.B., Santore, R.C., 2005. Predicting sediment metal toxicity using a sediment biotic ligand model: methodology and initial application. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2410–2427.
- Ebert, D., 1991. The effect of size at birth, maturation threshold and genetic differences on the life-history of *Daphnia magna*. *Oecologia* 86, 243–250.
- Elendt, B.P., 1990. Selenium deficiency in Crustacea: an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 25–33.
- Elliot, J.M., Davison, W., 1975. Energy equivalents of oxygen consumption in animal energetics. *Oecologia*, 195–201.
- Environment-Canada and Health-Canada, 2000. Releases of radionuclides from nuclear facilities (impact on non-human biota). Priority substances list—Assessment report. Canadian Environmental Protection Act, Environment Canada Health Canada, 1999.
- Fortin, C., Denison, F.H., Garnier-Laplace, J., 2007. Metal-phytoplankton interactions: modeling the effect of competing ions (H^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+}) on uranium uptake. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 242–248.

- Fortin, C., Dutel, L., Garnier-Laplace, J., 2004. Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: the importance of the free uranyl ion. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 974–981.
- Frost, B.W., 1972. Effects of size and concentration of food particles on the feeding behaviour of a marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. *Limnol. Oceanogr.*, 805–815.
- Gilbin, R., Alonzo, F., Garnier-Laplace, J., in press. Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *J. Environ. Radioact.*
- Knops, M., Altenburger, R., Segner, H., 2001. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquat. Toxicol.* 53, 79–90.
- Kooijman, S.A.L.M., 2000. Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kuhne, W.W., Caldwell, C.A., Gould, W.R., Fresquez, P.R., Finger, S., 2002. Effects of depleted uranium on the health and survival of *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2198–2203.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.
- Markich, S.J., Brown, P.L., Jeffree, R.A., Lim, R.P., 2000. Valve movement responses of *Velesunio angasi* (Bivalvia: *Hyriidae*) to manganese and uranium: an exception to the free ion activity model. *Aquat. Toxicol.* 51, 155–175.
- Mayzaud, P., Razouls, S., 2002. Degradation of gut pigment during feeding by a subantarctic copepod: importance of feeding history and digestive acclimation. *Limnol. Oceanogr.*, 393–404.
- Miller, A.C., Stewart, M., Brooks, K., Shi, L., Page, N., 2002. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. *J. Inorg. Biochem.* 91, 246–252.
- OECD, 1998. *Daphnia magna* reproduction test, guidelines for testing of chemicals, Rep. No. 211. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- OECD, 2003. Draft Guidance Document for on the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- OECD-NEA, 1996. Survey of Thermodynamic and Kinetic Databases. Organisation for Economic Cooperation and Development and Development Nuclear Energy Authority, Paris, France.
- Parkhurst, B.R., Elder, R.G., Meyer, J.S., Sanchez, D.A., Pennak, R.A., Waller, W.T., 1984. An environmental hazard evaluation of uranium in a Rocky Mountain stream. *Environ. Toxicol. Chem.*, 113–124.
- Pickett, J.B., Specht, W.L., Keyes, J.L., 1993. Acute and chronic toxicity of uranium compounds to *Ceriodaphnia dubia*, Rep. No. WSRC-RP-92-995. Prepared for the Department of Energy under contract DE-AC09-89SR 18035.
- Poston, T.M., Hanf Jr., R.W., Simmons, M.A., 1984. Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. *Water Air Soil Poll.* 22, 289–298.
- Ragnarsdottir, K.V., Charlet, L., 2000. Uranium behavior in natural environments. In *Environmental Mineralogy: Microbial Interactions, Anthropogenic Influences, Contaminated Lands and Waste Management*, vol. Series 9. Mineralogical Society of Great Britain and Ireland, London, UK, pp. 333–377.
- R Development Core Team, 2006. R: A language and Environment for Statistical Computing. R Development Core Team, Vienna, Austria.
- Riethmuller, N., Markich, S.J., van Dam, R.A., Pary, D., 2001. Effects of water hardness and alkalinity on the toxicity of uranium to a tropical freshwater hydra (*Hydra viridissima*). *Biomarkers*, 45–51.
- Ritz, C., Streibig, J.C., 2005. Bioassay analysis using R. *J. Stat. Soft.* 12, 1–22.
- Semaan, M., Holdway, D., van Dam, A.R.A., 2001. Comparative sensitivity of three populations of the cladoceran *Moinodaphnia macleayi* to acute and chronic uranium exposure. *Environ. Toxicol.* 16, 365–376.
- Sheppard, S.C., Sheppard, M.L., Gallerand, M.O., Sanipelli, B., 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *J. Environ. Radioact.* 79, 55–83.
- Smolders, R., Bervoets, L., Blust, R., 2002. Transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as active biomonitors in an effluent-dominated river. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1889–1896.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol. Med.* 18, 321–336.
- Van der Lee, J., 1998. Thermodynamic and mathematical concepts of Chess. GIG-Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau, France.
- WHO, 2001. Depleted uranium: sources, exposure, and health effects, Rep. No. WHO/SDE/PHE/01.1. Geneva, Switzerland.
- Yazzie, M., Gamble, S.L., Civitello, E.R., Steams, D.M., 2003. Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chem. Res. Toxicol.* 16, 524–530.

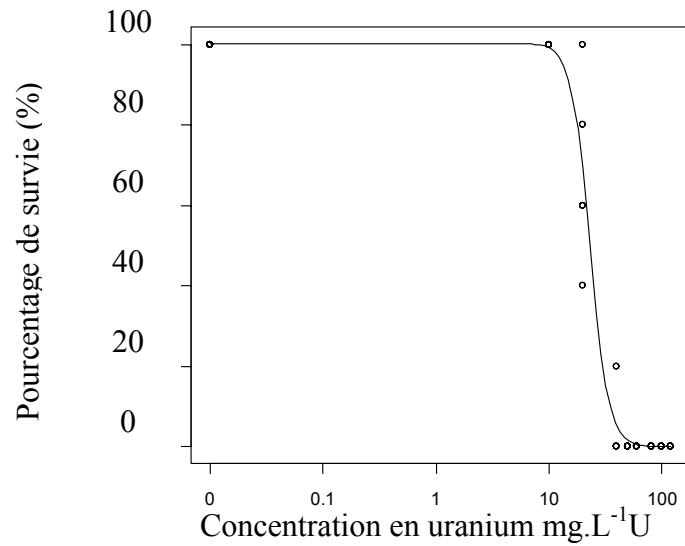
Annexe 11 : Données de toxicité aigüe de l'uranium

- M4-pH8

Mortalité 24h

$$CE_{50}=23,0\pm 0,6 \text{ mg.L}^{-1} \text{ U}$$

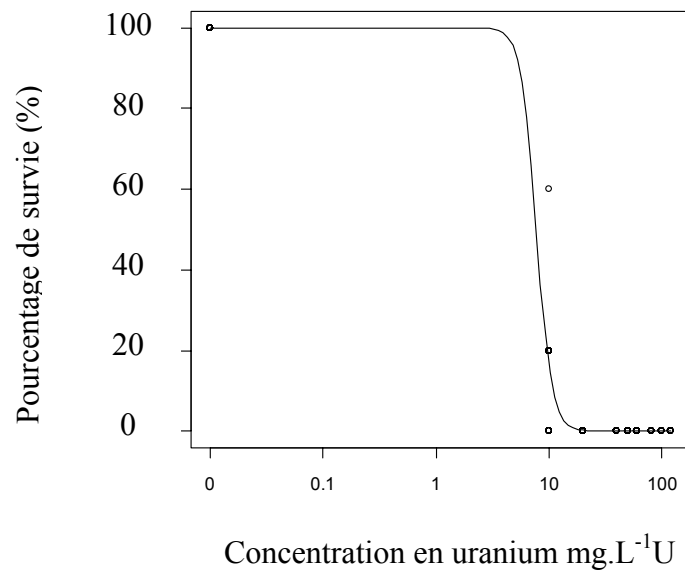
$$CE_{10}=15,3\pm 0,6 \text{ mg.L}^{-1} \text{ U}$$



Mortalité 48h

$$CE_{50}=7,8\pm 3,2 \text{ mg.L}^{-1} \text{ U}$$

$$CE_{10}=5,4\pm 0,6 \text{ mg.L}^{-1} \text{ U}$$

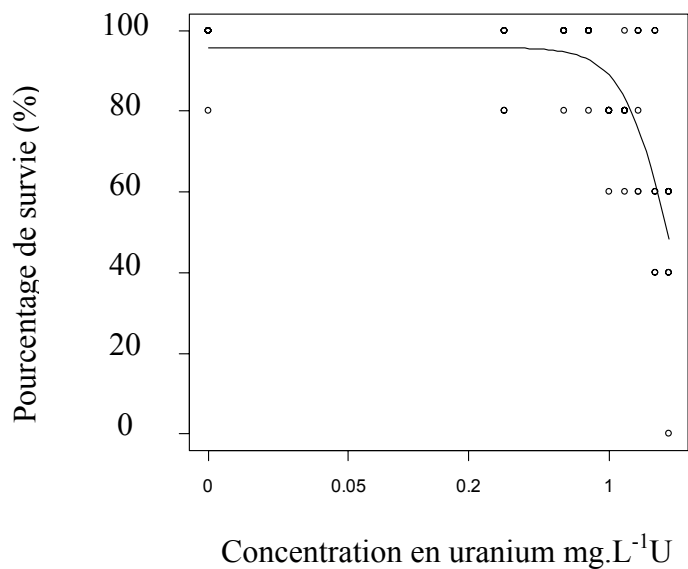


- M4-pH7

Mortalité 24h

$$CE_{50}=2,0\pm 0,5 \text{ mg.L}^{-1} \text{ U}$$

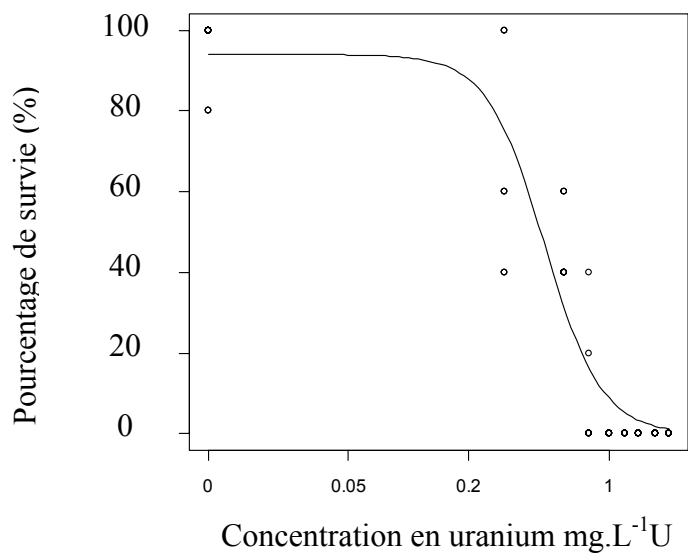
$$CE_{10}=1,1\pm 0,2 \text{ mg.L}^{-1} \text{ U}$$



Mortalité 48h

$$CE_{50}=0,39\pm 0,04 \text{ mg.L}^{-1} \text{ U}$$

$$CE_{10}=0,17\pm 0,04 \text{ mg.L}^{-1} \text{ U}$$

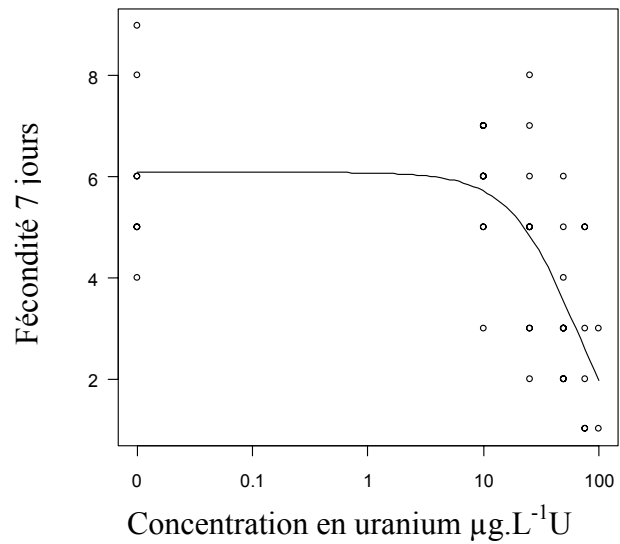


Annexe 12 : Données de toxicité chronique de l'uranium

Fécondité 7 jours

$$CE_{50} = 61 \pm 12 \mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$$

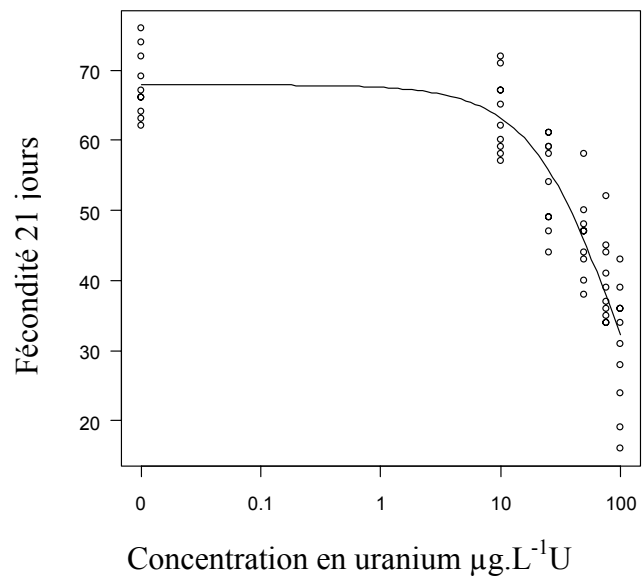
$$CE_{10} = 14 \pm 7 \mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$$



Fécondité 21 jours

$$CE_{50} = 91 \pm 15 \mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$$

$$CE_{10} = 14 \pm 7 \mu\text{g.L}^{-1}\text{U}$$



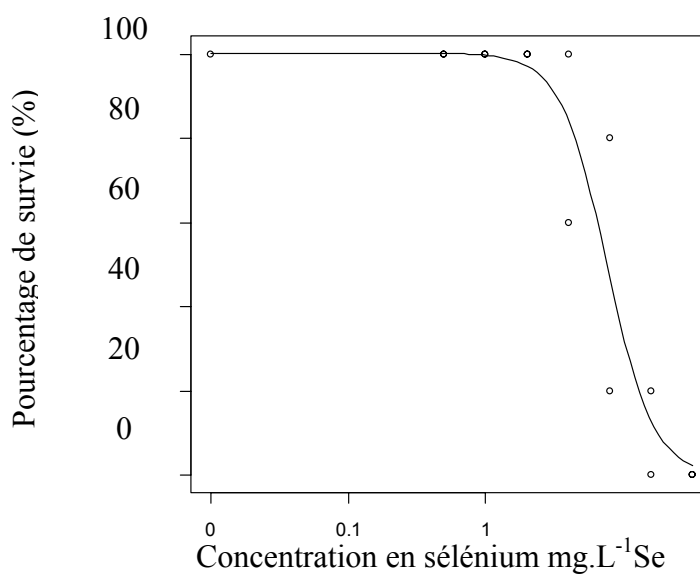
Annexe 13 : Données de toxicité aigüe du sélénium

- sélénite

Mortalité 24h

$$CE_{50}=4,12\pm 0,6 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Se}$$

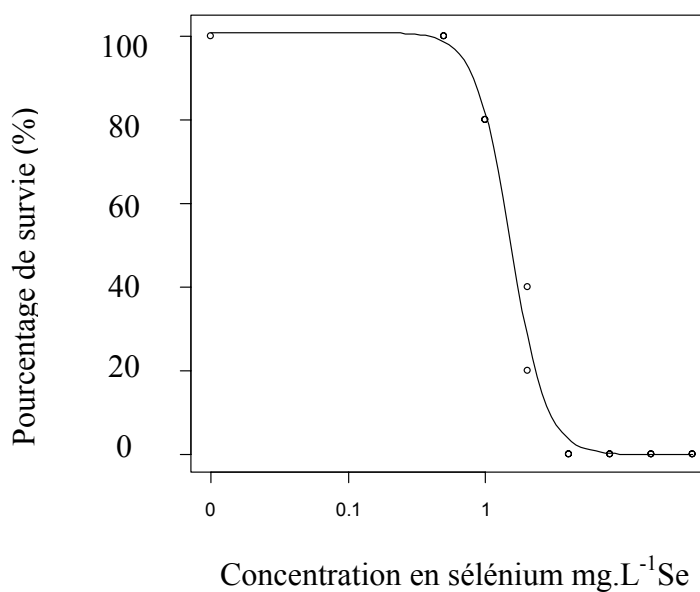
$$CE_{10}=2,23\pm 1,1 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Se}$$



Mortalité 48h

$$CE_{50}=1,86\pm 0,85 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Se}$$

$$CE_{10}=0,79\pm 0,07 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Se}$$

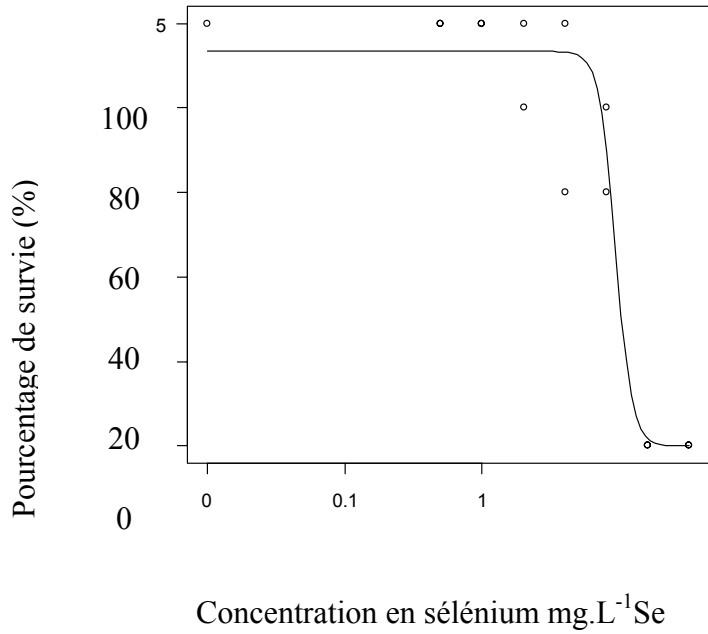


- séléniat

Mortalité 24h

$CE_{50}=4,63\pm 0,26 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Se}$

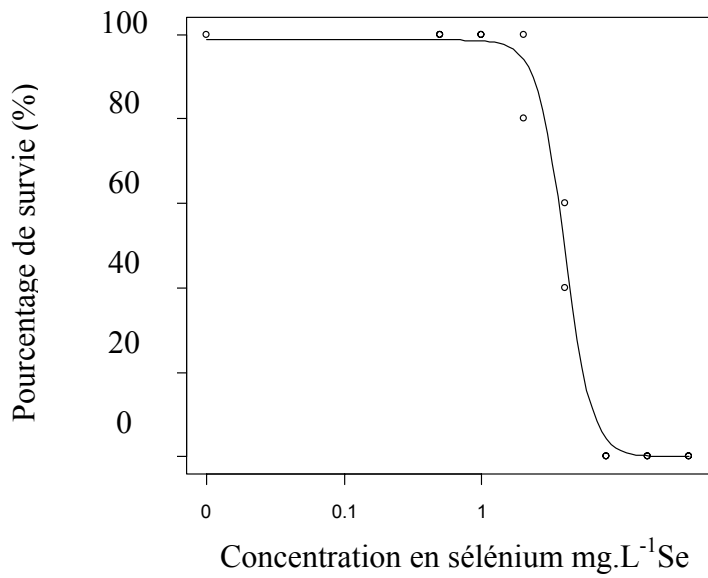
$CE_{10}=3,01\pm 1,61 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Se}$



Mortalité 48h

$CE_{50}=1,99\pm 0,18 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Se}$

$CE_{10}=1,01\pm 0,39 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Se}$

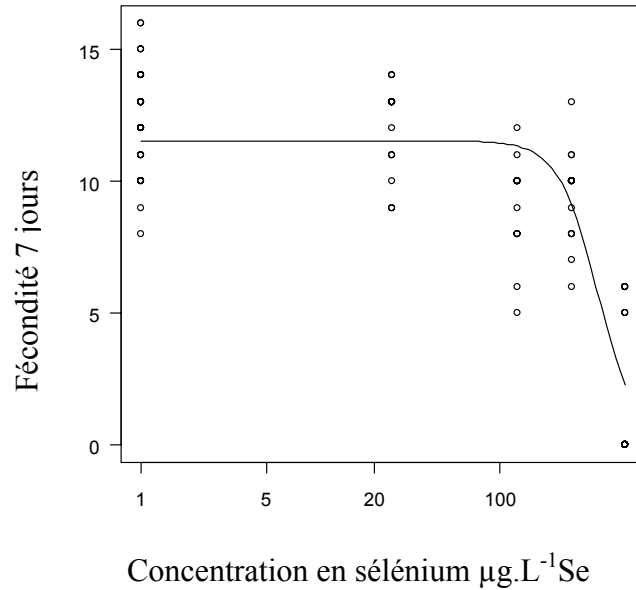


Annexe 14 : Données de toxicité chronique du sélénite

Fécondité 7 jours

$$CE_{50} = 350 \pm 50 \mu\text{g.L}^{-1}\text{Se}$$

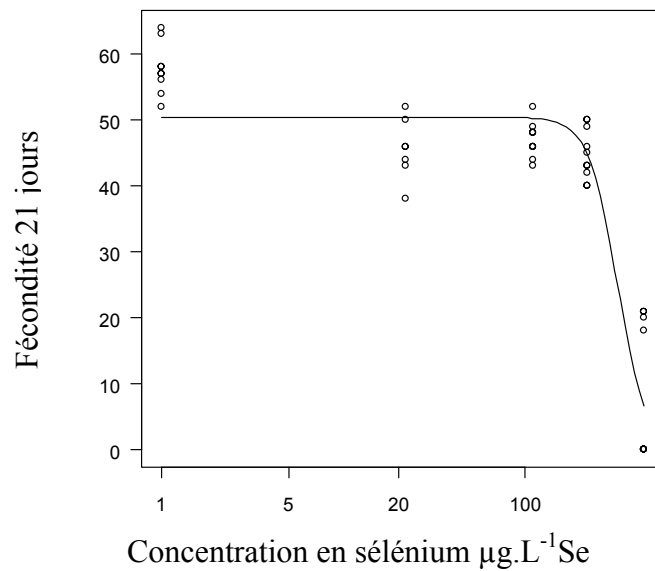
$$CE_{10} = 200 \pm 30 \mu\text{g.L}^{-1}\text{Se}$$



Fécondité 21 jours

$$CE_{50} = 330 \pm 30 \mu\text{g.L}^{-1}\text{Se}$$

$$CE_{10} = 215 \pm 25 \mu\text{g.L}^{-1}\text{Se}$$



Références des annexes

Adams, W.J., Heidolph, B.B., 1985. Short-cut chronic Toxicity Estimates Using *Daphnia magna*, *ASTM Special Technical Publication*, pp. 87.

Barata, C., Baird, D.J., and Markich, S.J., 1998. Influence of genetic and environmental factors on the tolerance of *Daphnia magna* Straus to essential and non-essential metals. *Aquat. Tox.*, 42, 115-137.

Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.

Bringmann, G., Kuhn, R., 1959. The toxic effects of waste water on aquatic bacteria, algae and small crustaceans. *Gesundh.-Ing.*, 80, 115-120.

Bywater, J.F., Banackowski, R., Bailey, M., 1991. Sensitivity of uranium of six species of tropical freshwater fishes and four species of cladocerans from northern Australia. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10, 1449-1458.

Dunbar, A.M., Lazorchak, M., Waller, W.T., 1983. Acute and chronic toxicity of sodium selenate to *Daphnia magna* Strauss. *Env. Toxicol. Chem.*, 2:239-244.

Halter, M.T., Adams, W.J., and Johnson, H.E., 1980. Selenium toxicity to *Daphnia magna*, *Hyallella azteca*, and the fathead minnow in hard water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 24, 102-115.

Ingersoll, C.G., Dwyer, F.J., May, T.W., 1990. Toxicity of inorganic and organic selenium to *Daphnia magna* (cladocera) and *Chironomus riparus* (diptera). *Env. Toxicol. Chem.*, 9,1171-1181.

Jonker, M. J., C. Svendsen, 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Env. Toxicol. Chem.*, 24, 2701-2713.

Johnston, P.A., 1987. Acute toxicity of inorganic selenium to *Daphnia magna* (Straus) and the effect of sub-acute exposure upon growth and reproduction. *Aquat. Tox.* 10, 335-345.

Kast-Hutchenson, K., Rider, C.V., LeBlanc, G.A., 2001. The fungicide Propiconazole interferes with embryonic development of crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 502-509.

Kuhne, W.W., Caldwell, C.A., Gould, W.R., Fresquez, P.R., Finger, S., 2002. Effects of depleted uranium on the health and survival of *Ceriodaphnia dubia* and *Hyallella azteca*. *Env. Toxicol. Chem.*, 21, 2198-2203.

Maier, K.J., Foe, C.G., Knight, A.W., 1993. Comparative toxicity of selenate, selenite, seleno-DL-methionine and seleno-DL-cystine to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 755-765.

Poston, T.M., Hanf Jr, R.W., Simmons, M.A., 1984. Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 22, 289-298.

Semaan, M., Holdway, D., and van Dam, A.R.A., 2001. Comparative sensitivity of three populations of the cladoceran *Moinodaphnia macleayi* to acute and chronic uranium exposure. *Environ. Toxicol.*, 16, 365-376.

Résumé

Parmi la multitude de polluants qui affectent les écosystèmes aquatiques continentaux, l'uranium et le sélénium sont deux éléments qui se retrouvent à l'échelle mondiale, seuls et en mélange dans l'environnement. L'objectif de cette thèse a été d'étudier les effets de l'uranium et du sélénium en mélange chez la daphnie (*Daphnia magna*). L'étude des effets des mélanges implique de connaître au préalable l'effet de chaque stresser isolé. Ainsi dans un premier temps, des études ont été réalisées séparément sur les effets de l'uranium et du sélénium qui ont permis d'obtenir des données de toxicité aiguë comme une CE_{50} 48h de $0,39 \pm 0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ pour l'uranium et une CE_{50} 48h de $1,86 \pm 0,85 \text{ mg.L}^{-1}$ pour le sélénium. Des données de toxicité chronique notamment sur la fécondité avec une CE_{10} reproduction de $14 \pm 7 \mu\text{g. L}^{-1}$ pour l'uranium et de $215 \pm 25 \mu\text{g. L}^{-1}$ pour le sélénium ont pu être obtenues. Ensuite, l'étude des effets du mélange uranium-sélénium a montré un antagonisme entre l'uranium et le sélénium. Cette étude a permis de mettre en évidence différents éléments de réflexion à prendre en compte dans une étude de mélanges binaires, comme l'importance du choix des modèles de référence (addition des concentrations ou indépendance d'action), des méthodes d'analyse statistique, du temps d'exposition et des critères d'effet. Elle a de plus montré l'intérêt d'utiliser des paramètres intégrateurs comme les bilans d'énergie pour mieux appréhender les interactions. S'attacher à la spéciation chimique dans le milieu et à la bioaccumulation dans les organismes permet de faire des hypothèses quant à la nature des interactions présentes au sein d'un mélange (interactions toxico-dynamiques et toxico-cinétiques).

Mots clés : Uranium, sélénium, mélange, antagonisme, *Daphnia magna*.

Abstract

Among the multiple substances that affect freshwaters ecosystems, uranium and selenium are two pollutants found worldwide in the environment, alone and in mixture. The aim of this thesis work was to investigate the effect of uranium and selenium mixture on daphnid (*Daphnia magna*). Studying effects of a mixture requires the assessment of the effect of single substances. Thus, the first experiments were performed on single substance. Acute toxicity data were obtained: EC_{50} 48h = $0,39 \pm 0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ for uranium and EC_{50} 48h = $1,86 \pm 0,85 \text{ mg.L}^{-1}$ for selenium. Chronic effects were also studied. Data on fecundity showed an EC_{10} reproduction of $14 \pm 7 \mu\text{g. L}^{-1}$ for uranium and of $215 \pm 25 \mu\text{g. L}^{-1}$ for selenium. Uranium-selenium mixture toxicity experiments were performed and revealed an antagonistic effect. This study further demonstrates the importance of taking into consideration different elements in binary mixture studies such as the choice of reference models (concentration addition or independent action), statistical method, time exposure and endpoints. Using integrated parameters like energy budget was shown to be an interesting way to better understand interactions. An approach including calculation of chemical speciation in the medium and bioaccumulation measurements in the organism permits assumptions to be made on the nature of possible interactions between mixture components (toxico-dynamic et toxico-kinetic interactions).

Key words: Uranium, selenium, mixture, antagonism, *Daphnia magna*.